

Tesis de Posgrado

Inhibidores fisiológicos de la H⁺-ATPasa mitocondrial de tripanosomatideos

Rilo, María Cristina

1993

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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:

Rilo, María Cristina. (1993). Inhibidores fisiológicos de la H⁺-ATPasa mitocondrial de tripanosomatideos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2554_Rilo.pdf

Cita tipo Chicago:

Rilo, María Cristina. "Inhibidores fisiológicos de la H⁺-ATPasa mitocondrial de tripanosomatideos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2554_Rilo.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

INHIBIDORES FISIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS DE LA
H⁺-ATPasa MITOCONDRIAL DE TRIPANOSOMATIDEOS

Autora: Lic. María Cristina Rilo

Director: Dr. Andrés O.M. Stoppani

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones Bioenergéticas.

Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. CONICET.

Tesis presentada para optar al Título de
Doctor en Ciencias Químicas

- 1993 -

Tesis
2054
4, 2
1

A Enrique

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi reconocimiento a todos aquellos cuya colaboración posibilitó la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Andrés O.M. Stoppani, por su apoyo y por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección en el CIBIERG.

A la Dra. M.A. Cataldi de Flombaum, Morro, por haberme permitido trabajar junto a ella, por su gran orientación, por su permanente crítica y por la amistad que me ha brindado.

A mis compañeros del CIBIERG, Silvia, Pili, Esther, Marta, Claudia, Lea, Patricia y Ana María, por su solidaridad, aliento y hermosa amistad.

A Alejandra y Graciela por su invalorable colaboración.

A Sara por su indispensable ayuda, su confianza y amistad.

A mis compañeros Docentes de Bioquímica de la Facultad de Medicina por tantos momentos compartidos.

A la Dra. Schwarcz y sus colaboradoras por su aliento y amistad.

A mis amigos quiero agradecerles todas las horas que me dedicaron, su estímulo, confianza y afecto, sobre todo en los momentos de flaqueza.

A mi madre por su apoyo incondicional.

A mi padre por estar en los duros momentos.

A mis hermanos por que los quiero mucho.

A Yamila y Mariana.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ADP y ATP	adenosina di y trifosfato
H ⁺ -ATPasa	enzima protón ATPasa mitocondrial
F ₁ -ATPasa	enzima ATPasa mitocondrial fracción soluble
IF ₁	inhibidor proteico
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido (reducido)
LD	enzima láctico deshidrogenasa
PK	enzima piruvato quinasa
PEP	fosfoenolpiruvato
CMB	p-cloromercuribenzoato
FMA	fluoresceinmercuriacetato
NEM	N-etilmaleimida
EDTA	ácido etiléndiaminotetraacético
DTT	ditiotreitól
nifurtimox	3-metil-4-(5'-nitro-2-furfurilidene-amino)- tetrahidro-4 <i>H</i> -1,4-tiacina-1,1'-dióxido
CG 8-935	3,4-dihidro-2-metil-2-etil-2 <i>H</i> -nafto [1,2 <i>b</i>]piran-5,6-diona
O ₂ ⁻	radical anión superóxido
HO·	radical hidroxilo

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
1.1. La enfermedad de Chagas.....	1
1.2. Ubicación sistemática de los tripanosomatídeos.....	3
1.3. Estructura y función de la H ⁺ -ATPasa mitocondrial....	5
1.4. Inhibidor proteico natural de la enzima H ⁺ -ATPasa mitocondrial.....	16
1.5. Estructura, metabolismo y función de las poliaminas.....	26
1.6. Inhibidores farmacológicos de la actividad de hidrólisis de ATP de la enzima H ⁺ -ATPasa mitocondrial.....	37
1.7. Objetivos.....	48
2. MATERIALES Y METODOS.....	50
2.1. Crecimiento de los organismos.....	50
2.1.1. Epimastigotes de <i>T.cruzi</i> cepa Tulahuén....	50
2.1.2. Epimastigotes de <i>T.cruzi</i> cepa RA.....	50
2.1.3. <i>C.fasciculata</i> cepa ATCC 11745.....	51
2.1.4. Cultivo de <i>L.seymouri</i>	51
2.2. Fraccionamiento subcelular de <i>T.cruzi</i> y <i>C.fasciculata</i>	52
2.2.1. Obtención de fracción mitocondrial.....	52
2.2.2. Obtención de partículas submitocondriales.....	52
2.2.2.1. Obtención de A-partículas.....	52
2.2.2.2. Obtención de AS-partículas.....	53
2.3. Obtención de F ₁ -ATPasa.....	53
2.4. Obtención del inhibidor proteico de mitocondria de hígado de rata.....	54
2.4.1. Obtención de mitocondrias hepáticas.....	54

2.4.2. Obtención de partículas submitocondriales en pirofosfato.....	54
2.4.3. Obtención de H ⁺ -ATPasa por fraccionamiento con (NH ₄) ₂ SO ₄	55
2.4.4. Obtención de IF ₁ por calentamiento y precipitación alcohólica.....	56
2.5. Determinación de la concentración de células de parásitos en el medio de cultivo.....	56
2.6. Medida de la actividad enzimática.....	57
2.6.1. Método colorimétrico.....	57
2.6.2. Método espectrofotométrico.....	57
2.7. Determinación del consumo de oxígeno.....	58
2.7.1. Consumo de oxígeno en células enteras.....	58
2.7.2. Consumo de oxígeno en fracción mitocondrial y partículas submitocondriales.....	58
2.8. Espectros de absorción.....	59
2.9. Filtración por HPLC.....	59
2.10. Electroforesis en gel.....	60
2.11. Determinación de proteínas.....	61
2.12. Reactivos.....	61

RESULTADOS Y DISCUSION

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL INHIBIDOR PROTEICO DE LA ENZIMA H ⁺ -ATPasa EN TRIPANOSOMATIDEOS.....	63
3.1. Obtención y caracterización de partículas submitocondriales de <i>C.fasciculata</i>	64
3.2. Obtención de AS-partículas de <i>T.cruzi</i> y <i>C.fasciculata</i>	69
3.3. Obtención de IF ₁ de mitocondria de Tripanosomatídeos.....	74

3.3.1. Obtención de IF ₁ de mitocondria de parásito por el método de Lang y Racker modificado.....	74
3.3.2. Obtención de IF ₁ por filtración en Sephadex G-50 de partículas submitocondriales.....	79
3.4. Determinación de la actividad de IF ₁ de <i>T.cruzi</i> y de <i>C.fasciculata</i>	84
3.5. Filtración de IF ₁ de <i>T.cruzi</i> por HPLC.....	91
3.6. Inactivación de IF ₁ de <i>C.fasciculata</i> por acción de la tripsina.....	94
3.7. Interacción entre IF ₁ y la H ⁺ -ATPasa de partículas submitocondriales.....	97
3.7.1. Interacciones homólogas.....	97
3.7.2. Interacción heteróloga.....	99
3.7.2.1. Interacción de IF ₁ hepático con la enzima H ⁺ -ATPasa de <i>T.cruzi</i> y <i>C.fasciculata</i>	99
3.7.2.2. Interacción de IF ₁ de <i>C.fasciculata</i> con la enzima H ⁺ -ATPasa de hígado de rata.....	99
3.7.2.3. Interacción de IF ₁ de <i>T.cruzi</i> con la enzima H ⁺ -ATPasa de <i>C.fasciculata</i>	102
3.7.2.4. Interacción de IF ₁ de de corazón bovino con la enzima de <i>C.fasciculata</i>	103
3.8. Interacción de IF ₁ con F ₁ -ATPasa.....	106
3.8.1. Interacción entre IF ₁ y F ₁ -ATPasa de <i>T.cruzi</i>	107
3.8.2. Interacción de IF ₁ de corazón bovino con F ₁ -ATPasa de <i>T.cruzi</i>	107
3.9. Determinación del peso molecular.....	110
3.10. Discusión.....	113

4. ACCION DE LAS POLIAMINAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE HIDROLISIS DE ATP EN LA ENZIMA H ⁺ -ATPasa MITOCONDRIAL.....	121
4.1. Fraccionamiento subcelular en presencia de poliaminas.....	122
4.2. Acción de las poliaminas sobre la enzima H ⁺ -ATPasa de tripanosomatídeos.....	126
4.2.1. Acción de las poliaminas sobre la enzima de <i>T.cruzi</i>	126
4.2.1.1. H ⁺ -ATPasa de partículas submitocondriales.....	126
4.2.1.2. F ₁ -ATPasa de <i>T.cruzi</i>	128
4.2.2. Acción de las poliaminas sobre la enzima de <i>C.fasciculata</i>	129
4.2.2.1. H ⁺ -ATPasa de partículas submitocondriales.....	129
4.2.2.2. F ₁ -ATPasa de <i>C.fasciculata</i>	132
4.3. Análisis cinético de la inhibición por poliaminas.....	133
4.3.1. Actividad de la H ⁺ -ATPasa de <i>T.cruzi</i>	133
4.3.2. Actividad de la H ⁺ -ATPasa de <i>C.fasciculata</i>	136
4.4. Actividad de hidrólisis de ATP en fracción mitocondrial de células crecidas con deficiencia en poliaminas.....	141
4.4.1. Parásitos crecidos en medio deficiente en poliaminas.....	141
4.4.2. Parásitos crecidos en presencia de inhibidores de la síntesis de poliaminas.....	142
4.5. Discusión.....	144

5. ACCION DE FARMACOS SOBRE LA H ⁺ -ATPasa DE	
<i>C.fasciculata</i> Y <i>L.seymouri</i>	150
5.1. Fármacos generadores de radicales libres	
de oxígeno.....	150
5.1.1. Acción del nifurtimox y CG 8-935 sobre	
<i>C.fasciculata</i> y <i>L.seymouri</i>	150
5.1.1.1. Efecto del nifurtimox y	
CG 8-935 sobre el crecimiento	
de <i>C.fasciculata</i> y <i>L.seymouri</i>	150
5.1.1.2. Actividad de la H ⁺ -ATPasa	
de parásitos incubados con	
drogas.....	153
5.1.1.3. Acción del nifurtimox y de la	
naftoquinona CG 8-935 sobre la	
enzima H ⁺ -ATPasa.....	155
5.1.2. Efecto de los radicales libres de oxígeno	
generados por el sistema xantina-xantina	
oxidasa sobre la H ⁺ -ATPasa.....	157
5.2. Acción de drogas específicas de grupos tioles.....	159
5.3. Discusión.....	165
6. RESUMEN.....	171
7. BIBLIOGRAFIA.....	176

1 . INTRODUCCION

1.1. La enfermedad de Chagas

Evaluaciones recientes indican que la enfermedad de Chagas afecta, con carácter endémico, aproximadamente a veinte millones de personas en América del Sur y a no menos de tres millones solo en nuestro país, por lo tanto su estudio reviste gran importancia desde el punto de vista sanitario.

El agente causal de esta enfermedad es el *Trypanosoma cruzi* quien parasita al hombre afectando selectivamente las células del músculo cardíaco y las del sistema nervioso autónomo. La enfermedad se inicia con una fase aguda, que en algunos casos puede provocar la muerte (especialmente en niños), mientras que en la mayoría de los afectados es asintomática y es seguida años después por una fase crónica caracterizada por manifestaciones de daño cardíaco y del tracto digestivo. La enfermedad de Chagas representa un grave problema sanitario que afecta especialmente las zonas rurales donde las malas condiciones de vida favorecen el desarrollo de la vinchuca (*Triatoma infestans*), el insecto vector. El control de la enfermedad requiere el desarrollo de campañas eficientes que incluyan el mejoramiento y desinfección de viviendas para la eliminación del vector, educación popular, diagnóstico precoz y desarrollo experimental de compuestos activos contra el *Trypanosoma cruzi*.

Si bien existen muchos grupos de investigación abocados al estudio de este parásito y de las consecuencias que su infección provoca en el hombre, aún no se dispone de un tratamiento satisfactorio para esta enfermedad.

Sin embargo en los últimos tiempos se han logrado grandes avances en el estudio de la bioquímica básica, biología molecular e inmunología y es de esperar que los mismos permitan establecer un tratamiento eficaz para la cura de la enfermedad.

El enfoque racional para el diseño y selección de agentes quimioterápicos consiste en la detección de mecanismos biológicos y bioquímicos esenciales para la supervivencia y multiplicación del parásito que puedan ser afectados por drogas inocuas para el huésped. La investigación bioquímica del *Trypanosoma cruzi* está orientada a la búsqueda de diferencias en mecanismos moleculares entre el parásito y el huésped mamífero que puedan ser luego utilizadas con fines quimioterápicos.

En este contexto, el presente trabajo de tesis fue encarado como una contribución al mejor conocimiento de la bioenergética de los tripanosomatídeos y en particular de la enzima H^+ -ATPasa mitocondrial responsable de la generación y mantenimiento de los niveles energéticos intracelulares. Los estudios se llevaron a cabo en el *Trypanosoma cruzi* y organismos modelos, *Crithidia fasciculata* y *Leptomonas seymouri*.

1.2. Ubicación sistemática de los tripanosomatídeos

Los protozoarios son organismos eucariontes unicelulares. En la clasificación clásica los protozoos constituyen un *phylum* dentro del reino animal, pero en la clasificación moderna que divide a los seres vivos en cinco reinos: Monera, Protista, Plantae, Fungi y Animalia, son considerados un subreino del reino Protista (Leedale, 1974).

Los tripanosomatídeos son protozoos cuya taxonomía, según una revisión reciente (The Committee on Systematics and Evolution of the Society of Protozoologists, 1980), es la siguiente:

Phylum Sarcomastigophora: su locomoción se realiza por medio de flagelos y/o pseudopodios. Posee un único tipo de núcleo.

Subphylum Mastigophora: presentan un pequeño número de flagelos, se reproducen por fisión binaria y en algunos grupos por reproducción sexual.

Clase Zoomastigophorea: sin cloroplastos, con uno o varios flagelos; reproducción sexual conocida en pocos grupos, grupo prolífico.

Orden Kinetoplastida: tiene de uno a cuatro flagelos que emergen de una depresión, una única mitocondria que se extiende por toda la célula semejando un tubo o una red de tubos y generalmente posee una organela autorreplicable que es

en realidad una prolongación capsular de la mitocondria, denominada kinetoplasto. El aparato de Golgi está ubicado en la zona de la depresión flagelar. Hay especies parásitas y otras de vida libre.

Suborden Trypanosomatina: posee un solo flagelo, libre o con membrana ondulante, el kinetoplasto es pequeño y compacto. Son parásitos.

Familia Trypanosomatidae: en esta familia encontramos varios géneros monogénicos (con un solo hospedador): *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* y *Herpetomonas*, todos parásitos de invertebrados; y otros digénicos (con más de un hospedador) como *Leishmania* y *Trypanosoma* que alternan un huésped vertebrado y otro invertebrado.

El *Trypanosoma cruzi* es entonces un organismo flagelado, digénico, que presenta durante su ciclo de vida las formas, amastigote, promastigote, epimastigote y tripomastigote. Pertenece al grupo *Estercoraria* que incluye a los tripanosomas que completan su desarrollo en el tubo digestivo del insecto vector y cuya transmisión es a través de las heces del mismo.

Los organismos monogénicos *Crithidia fasciculata* y *Leptomonas seymouri* son parásitos no patógenos para el hombre, generalmente utilizados como modelo para el estudio del metabolismo y mecanismo de acción de drogas en tripanosomatídeos.

1.3. Estructura y función de la H⁺-ATPasa mitocondrial

Desde mediados de la década de 1920 hasta la actualidad, el mecanismo por el cual las células realizan la fosforilación oxidativa ha sido objeto de intensas investigaciones y controversias. Durante este período se realizaron innumerables intentos para identificar un metabolito rico en energía que pudiera participar en la transferencia del grupo fosforilo al ADP en el proceso de síntesis de ATP (Wadkins, 1957), tal intermediario aún no ha sido encontrado. A comienzos de la década de 1960 Peter Mitchell sugirió que tal intermediario no existía (Mitchell, 1977) y postuló la *Teoría Quimiosmótica*, afirmando que el acoplamiento de la oxidación a la fosforilación oxidativa es indirecto y que el papel del supuesto intermediario rico en energía es desempeñado por la fuerza protón motriz.

La transferencia de electrones a través de la membrana mitocondrial interna da como resultado la translocación vectorial de H⁺ desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, originando el gradiente electroquímico, utilizado para la síntesis de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (Fillingame, 1980; Senior, 1981; Hatefi, 1985), como así también para la translocación de iones a través de la membrana.

La síntesis de ATP es catalizada por un complejo multienzimático conocido como ATPsintetasa o H⁺-ATPasa (EC 3.6.1.3). La enzima atraviesa la membrana mitocondrial interna, acopla el pasaje de los H⁺ a favor de un gradiente con la síntesis de ATP y puede también funcionar en forma inversa, hidrolizando ATP y generando gradiente electroquímico (Tuena de Gómez-Puyou, 1983).

La H⁺-ATPasa es una enzima mucho más compleja que otras ATPasas. Está compuesta por un gran número de diferentes subunidades. Existe una gran similitud entre la H⁺-ATPasa mitocondrial, la de cloroplasto y la bacteriana (Amzel, 1983; Hatefi, 1985; Senior, 1983). Todas ellas contienen un componente de membrana llamado F₀ que media el transporte de H⁺ a través de la membrana hacia la subunidad catalítica de la enzima llamada F₁ (Mitchell, 1977; Fillingame, 1980; Senior, 1981; Tuena de Gómez-Puyou, 1983; Hatefi, 1985).

El componente F₀ de la enzima está compuesto por varias subunidades cuya estequiometría aún no está claramente definida. La enzima de *E.coli* contiene en F₀ tres diferentes proteínas llamadas *a*, *b* y *c* (Amzel, 1983; Hatefi, 1985; Senior, 1983) en una relación estequiométrica aproximada de 1:2:12-15 respectivamente (Foster, 1982; von Meyenburg, 1982). La subunidad *c* es un proteolípido fuertemente hidrofóbico que une diciclohexilcarbodimida (DCCD) (Sigrist, 1977).

El componente F₁ es un complejo multiproteico, soluble en

agua, de fácil extracción y purificación (Knowles, 1972; Tuena de Gómez-Puyou, 1977), de peso molecular aproximado a 350 KDa (Pedersen, 1975b; Cataldi de Flombaum, 1980; Pedersen, 1987a). Está constituido por cinco diferentes subunidades α , β , τ , δ y ϵ , cuyos pesos moleculares respectivos oscilan alrededor de 55.000, 50.000, 31.000, 19.000 y 14.000 (Kozlov, 1977; Higa, 1981; Saraste, 1981); con una estequiometría sugerida de $\alpha\beta\tau\delta\epsilon$ (Yoshida, 1978; Babakov, 1979; Huberman, 1979; Yoshida, 1979; Todd, 1980; Stutterheim, 1981). Las subunidades δ y ϵ estarían implicadas en la interacción de F_1 con la fracción de membrana, mientras que α , β y τ estarían relacionadas con el centro catalítico de la enzima. Existen evidencias que demuestran la presencia del mismo en la subunidad β . Harris y col. (1985) midieron la hidrólisis de ATP en la subunidad β purificada y obtuvieron valores de velocidad inferiores a los obtenidos en la enzima entera. Nelson y col. (1973) utilizando anticuerpos contra la subunidad α de la enzima de *Rhodospirillum rubrum* obtuvieron inhibición de la fotofosforilación. Posteriormente Gromet-Elhanan y col. demostraron que el sitio catalítico se encuentra en la subunidad β , reconstituyendo la actividad de fotofosforilación por agregado de la subunidad β purificada de *Rhodospirillum rubrum* a cromatoforos libres de dicha subunidad (Philosoph, 1977; Khananshvili, 1982). Trabajos publicados por Yoshida y col. (1977) demostraron que, si bien el sitio

catalítico de la enzima se encuentra en la subunidad β , ésta en forma aislada no presenta actividad y requiere para su acción la unión con otras subunidades. Experimentos realizados por Deters y Racker (1975) en ATPasa de cloroplasto demostraron que, por tratamiento de F_1 con tripsina se obtiene un complejo α - β con actividad enzimática que se inhibe con NBD-Cl (7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3 diazol) el cual reacciona específicamente con la subunidad β . Los datos publicados sugieren que para la síntesis de ATP sería necesario la interacción entre las subunidades α y β , en tanto que la subunidad τ estaría involucrada en la asociación correcta entre α y β . La presencia de tres subunidades α y tres subunidades β por molécula de F_1 , indica la existencia de tres sitios catalíticos (Tuena de Gómez-Puyou, 1988).

La enzima mitocondrial requiere para una correcta asociación entre F_0 y F_1 la presencia de tres proteínas adicionales: la proteína que le confiere sensibilidad a la oligomicina (OSCP) (McLennan, 1968), la F_8 (Knowles, 1971) y el factor β (Huang, 1987). En *E.coli* la proteína OSCP no existe como una molécula separada, sino que su secuencia de aminoácidos forma parte de la subunidad δ de la fracción F_1 de la enzima (Ovchinnikov, 1985).

Finalmente la H^+ -ATPasa contiene una proteína de bajo peso molecular que inhibe la actividad de hidrólisis de la enzima (Pullman, 1963), denominada **inhibidor proteico natural de la**

ATPasa. Existen evidencias que indican que el inhibidor es un regulador cinético de la síntesis e hidrólisis de ATP (Tuena de Gómez-Puyou, 1983), tal como se explicará posteriormente.

La actividad enzimática de la enzima es muy difícil de medir en mitocondrias intactas, debido a que tanto la síntesis como la hidrólisis de ATP involucran la translocación, mediada por transportadores, de ATP, ADP y fosfato a través de la membrana mitocondrial interna (Heldt, 1972; Lemasters, 1979). El pasaje de nucleótidos de adenina a través de la membrana mitocondrial interna es el paso limitante en el proceso de la fosforilación oxidativa (Moreno-Sánchez, 1985). La mayoría de los trabajos publicados se realizaron con partículas submitocondriales o con la enzima aislada de membrana. Las partículas submitocondriales son preparaciones de membrana en las que, por acción mecánica sobre la mitocondria o por sonicación, se produce la reversión de la membrana mitocondrial interna, quedando expuesta al exterior la monocapa interna y, por lo tanto, el componente F_1 de la H^+ -ATPasa. En estas preparaciones la membrana deja de actuar como barrera y la enzima posee una capacidad catalítica máxima tanto para la hidrólisis como para la síntesis de ATP preservando su sensibilidad a la oligomicina. Los valores publicados de la actividad de hidrólisis de ATP en partículas submitocondriales se encuentran en un rango de 0,4 a 10 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ (Tuena de Gómez-Puyou, 1988), dependiendo fundamentalmente de la composición del medio en el cual se

procesan las mitocondrias, debido a que las diferentes condiciones pueden o no favorecer la disociación del inhibidor proteico de la enzima (Darszon, 1982).

Lardy y Wellman (1953) postularon por primera vez que la actividad de hidrólisis de ATP en mitocondria, es la reversión de la secuencia de reacciones que conducen a la síntesis de ATP. A partir de esta hipótesis distintos autores estudiaron la reacción de hidrólisis de ATP en partículas submitocondriales y en la enzima soluble F_1 , para elaborar un modelo sobre el mecanismo de la reacción de fosforilación oxidativa (Akimenko, 1972; Skulachev, 1974; Mitchell, 1977; Boyer, 1979).

Los grupos de Pedersen y de Penefsky postularon la hipótesis de la existencia de dos vías diferentes para la síntesis e hidrólisis de ATP, debido a la existencia de inhibidores específicos para la reacción de hidrólisis o de síntesis de ATP (Penefsky, 1974a; Pedersen, 1975a).

Se conocen una serie de sustancias que inhiben la actividad de hidrólisis de la enzima sin modificar la reacción de fosforilación oxidativa. Entre otros se encuentran la quercetina (Lang, 1974), análogos del ATP y ADP como por ejemplo el derivado 2,3-dialdehído (Kumar, 1979), determinados anticuerpos contra F_1 (Schoshan, 1979) y azida (Robertson, 1955; Kobayashi, 1977).

La existencia de vías diferentes para la reacción de hidrólisis y síntesis de ATP supone la presencia en la enzima

de dos centros activos distintos (Penefsky, 1974a) o, por lo menos, de dos estados conformacionales diferentes (Tondre, 1973; Lee, 1977). Esta última hipótesis a su vez se reafirmó con trabajos en los cuales se demostró las distintas afinidades de la enzima por el sustrato o por aniones en condiciones de hidrólisis o síntesis de ATP (Löw, 1963; Ferguson, 1976; Pedersen, 1976; Fitin, 1979). Por otro lado la enzima hidroliza no solo al ATP sino también a otros nucleósidos trifosfato, mientras que la reacción de síntesis es mas específica y solo reconoce como sustrato al ADP.

Vinogradov y col. demostraron que la enzima de mitocondria de corazón bovino posee un sitio de unión de alta afinidad para el ADP, que al encontrarse unido al mismo, inhibe la reacción de hidrólisis de ATP y no modifica la síntesis (Fitin, 1979; Minkov, 1979; Minkov, 1980), postularon que dicho sitio sería el centro activo para la síntesis de ATP, y que el factor F_1 de la enzima puede encontrarse en dos estados conformacionales diferentes interconvertibles entre sí, donde el pasaje de la forma de hidrólisis a la forma de síntesis de ATP sería regulado por la disponibilidad de ATP y ADP (Minkov, 1980).

Actualmente se postulan dos mecanismos de acción para la enzima, en los cuales se consideran la existencia de tres sitios catalíticos. Uno de los mecanismos propuestos afirma que los sitios funcionan en forma independiente uno de otro (o por lo menos, dos de ellos independientes del tercero). El

otro mecanismo considera que los tres sitios activos funcionan concertadamente (Martins, 1988); el mismo se basa en los estudios realizados por Boyer y col. (1973 y 1975) (Rossing, 1977; Kayalar, 1977), quienes observaron que la liberación del producto de reacción (ATP en el sentido de síntesis ó ADP y Pi en el sentido de hidrólisis) es facilitada por la unión del sustrato a un sitio catalítico alternativo. Tales hallazgos fueron corroborados por Grubmeyer y Penefsky (1981a,b) quienes utilizando concentraciones de sustrato menores a la concentración de enzima, midieron la actividad en un único sitio catalítico de F_1 , en estas condiciones obtuvieron valores de alta afinidad de la enzima por el sustrato, pero baja velocidad de hidrólisis. Al aumentar las concentraciones de sustrato y entrar en actividad un segundo sitio catalítico, la velocidad de hidrólisis se incrementó 10^6 veces a expensas de un aumento de igual magnitud en la velocidad de liberación del producto debido a la unión de sustrato al siguiente sitio activo (Grubmeyer, 1981a,b). El mecanismo concertado no es totalmente aceptado por otros autores quienes consideran insuficientes los experimentos realizados (Soong, 1984; Wang, 1984).

Posteriormente Grubmeyer, Cross y Penefsky (1982) determinaron la constante de equilibrio de la reacción de hidrólisis de ATP en un sitio catalítico individual, obteniendo valores cercanos a la unidad, lo que indicaría que dentro del mismo sitio catalítico no se requiere energía para

la síntesis de ATP. Estos hallazgos se contradicen con los procesos globales de hidrólisis de ATP que ocurren con un alto cambio de energía (Kalchar, 1941; Hill, 1951).

Más recientemente de Meis, basándose en estudios que indican que la energía liberada durante la hidrólisis de ATP provendría predominantemente de las diferencias de energía de solvatación entre los sustratos y productos (George, 1970; Hayes, 1978), realizó un trabajo en el cual determinó que la energía requerida para la síntesis de la unión pirofosfato β - γ del ATP es críticamente dependiente de las características del medio en el cual se lleva a cabo la reacción (de Meis, 1984). En base a sus experimentos propuso que, la barrera energética para la síntesis de uniones fosfato de alta energía con fosfatos del medio, estaría dada por la difusión del fosfato altamente polar hacia el medio hidrofóbico del sitio catalítico de la enzima, una vez establecido el fosfato en tal medio, la reacción de síntesis del compuesto de alta energía se llevaría a cabo espontáneamente (de Meis, 1984).

Experimentalmente se midió la síntesis de ATP en presencia de un solvente orgánico, el dimetilsulfóxido, como medio de reacción. La enzima, F_1 libre de membrana, tenía unido al sitio catalítico ADP y la reacción se llevó a cabo en presencia de P_i y Mg^{2+} . El ATP formado en estas condiciones permaneció unido a la enzima sin ser liberado al medio. El K_m calculado para el P_i fue aproximadamente 1 mM (Tonomura, 1983 y 1984; Yoshida, 1983; Gomez Puyou, 1986), mientras que en medios

acuosos los K_m observados fueron alrededor de 100 mM (Tonomura, 1983; Gómez-Puyou, 1986).

Resultados similares con Ca^{2+} -ATPasa (de Meis, 1980) y otras ATPasas (Pedersen, 1987b) son una fuerte evidencia a favor de la hipótesis sobre la existencia de una barrera energética como consecuencia de la partición de los sustratos polares entre un medio acuoso y un sitio catalítico hidrofóbico. La energía necesaria para vencer dicha barrera provendría del gradiente electroquímico de H^+ ya que se estableció que el mismo aumenta significativamente la afinidad de la enzima por el Pi y el ADP (Boyer, 1973; McCarty, 1983), lo cual no excluye la posibilidad de que también se requiera energía para la liberación del producto.

Existen evidencias sobre la presencia de la enzima H^+ -ATPasa en mitocondria de tripanosomatídeos. Fueron aisladas y parcialmente caracterizadas las enzimas de mitocondrias de *T.cruzi* (Cataldi de Flombaum, 1980), *C.fasciculata* (Higa, 1981), *L.donovani* (Rassam, 1988) y *T.brucei* (Williams, 1990). En todos los casos la enzima unida a membrana presentó sensibilidad a la oligomicina, y en forma soluble se inactivó por exposición al frío.

En la enzima soluble de *T.brucei* se aislaron y caracterizaron cinco subunidades de peso molecular 55000 (α), 42000 (β), 32000 (τ), 22000 (δ) y 17000 (ϵ) (Williams, 1990), similar a lo encontrado en *C.fasciculata* donde los valores

obtenidos fueron: 54000 (α), 45000 (β), 35000 (τ), 20000 (δ) y 10000 (ϵ) (Higa, 1981). En *T. cruzi* solo se detectaron cuatro subunidades: α , β , τ y δ , de pesos moleculares 62000, 54000, 38000 y 24000 respectivamente, con una alta proporción de subunidad δ en relación a las restantes y un peso molecular estimado para F_1 de 347000 (Cataldi de Flombaum, 1980). Los métodos utilizados para la purificación y caracterización de F_1 en cada tipo de parásito fueron distintos lo que seguramente determinó las variaciones observadas en los resultados obtenidos.

Los valores de actividad específica publicados para la hidrólisis de ATP en la enzima soluble obtenida por tratamiento con cloroformo de la fracción mitocondrial de tripanosomatídeos oscilaron entre 0,6 y 4,5 μmol de ATP hidrolizado por minuto y mg de enzima, mientras que los valores publicados para la enzima pura fueron en $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$: 71,25 para *C. fasciculata* (Higa, 1981), 33,3 para *T. cruzi* (Cataldi de Flombaum, 1980) y 17,84 para *T. brucei* (Williams, 1990). Las diferencias entre las velocidades específicas de hidrólisis probablemente se deban a los distintos tratamientos utilizados tanto para la obtención de la enzima como para la medición de actividad.

1.4. Inhibidor proteico natural de la enzima H^+ -ATPasa mitocondrial

La enzima H^+ -ATPasa posee la capacidad de catalizar tanto la síntesis como la hidrólisis de ATP y, para una misma preparación de enzima, los valores de actividad de hidrólisis no necesariamente se correlacionan con los de síntesis. La enzima posee mecanismos de control que le permiten actuar en uno u otro sentido. Uno de los factores de regulación bien conocido es una proteína de bajo peso molecular denominada péptido inhibidor o inhibidor proteico de H^+ -ATPasa (IF_1) que fue aislada y caracterizada por primera vez a partir de mitocondrias de corazón bovino por Pullman y Monroy en 1963, y fue descrita como un efectivo inhibidor de la reacción de hidrólisis de ATP.

A partir de entonces fueron purificados inhibidores proteicos de mitocondrias de corazón bovino (Pullman, 1963; Hortsman, 1970; Minkov, 1973), hígado de rata (Chan, 1976; Cintrón, 1979b), levaduras (Ebner, 1977), *C. utilis* (Satre, 1975), cloroplastos (Nelson, 1972), bacterias (Kagawa, 1978), *E. coli* (Smith, 1977).

Los pesos moleculares calculados para el inhibidor proteico en gel de poliacrilamida en presencia de SDS varían considerablemente, dependiendo del organismo a partir del cual

se obtuvo. Se determinaron valores de 6000 para el inhibidor obtenido de *C.utilis* (Satre, 1975), 10500 para IF₁ de corazón bovino (Pullman, 1963), 9500 para IF₁ de hígado de rata (Chan, 1976) y 13000 para el obtenido de cloroplastos (Nelson, 1972).

La composición de aminoácidos determinada para los IF₁ de hígado de rata (Cintrón, 1979a), de corazón bovino (Brooks, 1971) y de levaduras (Satre, 1975), fue semejante, con un alto contenido de aminoácidos lisina y glutamato.

Los inhibidores de cloroplastos (Nelson, 1976) y de *E.coli* (Smith, 1975) poseen una estructura similar a la subunidad ϵ de sus correspondientes ATPasas, mientras que el inhibidor proteico de ATPasa mitocondrial es una proteína distinta a la subunidad ϵ de F₁ ya sea por su composición de aminoácidos como por sus propiedades (Brooks, 1971; Senior, 1973).

Si bien en la mayoría de los casos los puntos isoeléctricos determinados pertenecen a un rango de pH alcalino (Chan, 1976; Ebner, 1977; Ernster, 1979), no es correcto afirmar que en todos los casos IF₁ es de naturaleza básica; ya que el inhibidor de levaduras (*C.utilis*) tiene un pI de 5.6 (Satre, 1975).

Independientemente de estas diferencias en los pI, se lograron inhibiciones cruzadas entre IF₁ de levadura *C.utilis* (pI= 5.6) y la ATPasa de corazón bovino, cuyo inhibidor proteico tiene un pI= 7.6 (Satre, 1975).

IF₁ es una molécula resistente al calor, álcalis, ácidos y

al frío. La proteína purificada por Pullman y Monroy no contiene fosfatos ni pentosas (Pullman, 1963).

Trabajos publicados por Racker (1963) demostraron que la actividad de hidrólisis de ATP en partículas submitocondriales aumenta hasta diez veces como resultado de la incubación de la partículas con tripsina. Tales evidencias sugirieron la posibilidad de que la tripsina actuara degradando al IF₁ presente en la enzima. Posteriormente se demostró que incubando al inhibidor con tripsina o quimiotripsina el mismo perdía la capacidad de inhibir a la H⁺-ATPasa (Pullman, 1963; Hortsman, 1970), confirmando la naturaleza proteica del mismo. Cuando se realizaron incubaciones de IF₁ de corazón bovino con tripsina, en condiciones controladas, se obtuvo un péptido de peso molecular 8000 que mantuvo actividad de inhibidor (Dianoux, 1986). Todos los inhibidores proteicos descritos hasta el presente, son sensibles a la inactivación por tripsina.

Una de las características de IF₁ es que protege al factor F₁ de la inactivación por el frío (Pullman, 1963; Gomez Puyou, 1979). Se ha logrado obtener el factor F₁ de corazón bovino aislado de membrana sin pérdida del inhibidor proteico (Feinstein, 1984) y no disociable por disolución. La estequiometría de unión de IF₁ de mitocondrias de corazón bovino con su enzima homóloga es 1:1 (Gómez-Fernández, 1978), mientras que al unirse a F₁ de hígado de rata lo hace en una relación 2:1 (Spitsberg, 1979); esto sugirió la presencia de

más de un sitio de unión para IF₁. La constante de disociación calculada para IF₁ de corazón bovino (K_d) es 10⁻⁸ M (Gómez-Fernández, 1978; Spitsberg, 1979). La formación del complejo enzima-inhibidor sigue una cinética de inhibición de primer orden en relación a la concentración de IF₁ (Gómez-Fernández, 1978).

La localización de IF₁ dentro del complejo enzimático H⁺-ATPasa fue motivo de estudio de varios grupos de trabajo. Pedersen sugirió su localización entre F₁ y F_o teniendo en cuenta las siguientes evidencias: a) al solubilizar la fracción F₁ de partículas Mg-ATP con difosfatidilglicerol, se observó una estimulación en la actividad de hidrólisis de la enzima (Bruni, 1979); b) la presencia de fosfolípidos ácidos previene la inhibición de la enzima soluble o unida a membrana por IF₁ (Dabbeni-Sola, 1974); c) tratando las vesículas de hígado de rata con urea, se aisló F₁ quedando un alto porcentaje de IF₁ unido a membrana.

Hasta el presente aún no se ha podido determinar exactamente cuál es el mecanismo de interacción de IF₁ con la enzima. Con excepción del inhibidor de cloroplastos, todos los IF₁ obtenidos requieren para ejercer su acción de la incubación previa con la enzima durante por lo menos 10 min, a pH= 6.0-7.0 para IF₁ de corazón bovino (Pullman, 1963; Satre, 1975) e hígado de rata (Citron, 1979; Chan, 1976), a pH= 5.5-6.5 para *C.utilis* (Satre, 1975) y pH= 8.0 para *E.coli* (Smith, 1977).

Otra característica peculiar de IF₁ es que para lograr la inhibición de la actividad de hidrólisis de la enzima, requiere la presencia en el medio de incubación de nucleósidos trifosfato ATP, GTP, ITP o UTP y un catión divalente (Gómez-Fernández, 1978). La utilización experimental de análogos de ATP no hidrolizables no promueven la inhibición.

Se obtuvieron valores máximos de inhibición en la enzima de mamífero con 0.1 mM de Mg²⁺ y ATP en una relación 1:1 (Hortsmán, 1970). El Mg²⁺ puede ser reemplazado por otro metal divalente que permita la hidrólisis del nucleótido.

Gómez-Fernández y Harris (1978) demostraron que deben hidrolizarse 200 moles de ATP por mol de F₁ en un medio de baja fuerza iónica para que el inhibidor proteico interaccione con la enzima. Los autores postularon una hipótesis en donde afirman que la hidrólisis de ATP genera un estado conformacional transitorio en la enzima que permite la interacción con el inhibidor, y que el ADP y Pi formados estabilizan a la enzima en dicho estado dando origen a un complejo [F₁(Mg ATP, ADP, Pi)]-IF₁ inactivo.

La velocidad de unión de IF₁ a la enzima depende de la fuerza iónica. A mayor fuerza iónica menor velocidad de asociación y mayor velocidad de disociación de IF₁ del complejo enzima-inhibidor (Gómez-Fernández, 1978; Wong, 1982). A mayor fuerza iónica en el medio de preincubación se necesita mayor hidrólisis de ATP para generar el estado transitorio de la enzima capaz de formar el complejo con IF₁ (Gómez-

Fernández, 1978).

Van de Stadt (1973) y Ernster (1977) demostraron que IF_1 de corazón bovino presenta una cinética de inhibición de tipo no competitivo. La unión de IF_1 a su enzima homóloga no modifica los valores de K_m para el ATP e ITP, ni el valor de K_i para el ADP. Estos datos afirman que IF_1 actúa sobre un sitio distinto al catalítico y al de unión para el ADP.

Estudios realizados por Galante y col. (1980), demostraron que, inhibidores específicos de la reacción de hidrólisis en presencia de IF_1 se unen a la subunidad β , presumiblemente a los residuos de tirosina y arginina del sitio catalítico de la enzima, y mantienen su acción inhibitoria aún cuando, por un aumento de la fuerza iónica del medio, se desplaza al inhibidor proteico de su sitio de acción, comprobando de este modo que IF_1 actúa en un sitio distinto al catalítico.

Continuando en esta línea y con el objeto de poder precisar mejor el sitio de acción de IF_1 se realizaron trabajos en los cuales se utilizó la aurovertina, un antibiótico inhibidor de la fosforilación oxidativa, que no afecta la reacción de hidrólisis de ATP, ni las reacciones dependiente del mismo. Se determinaron dos sitios de unión de la aurovertina, en presencia de ATP, sobre la subunidad β de F_1 (Chang, 1973; Chang, 1974; Douglas, 1979), uno de los cuales se encuentra enmascarado por la presencia de IF_1 . Partículas submitocondriales acopladas de corazón bovino, preincubadas con aurovertina, en presencia de un sustrato energético para

estimulación de la respiración, presentaron una actividad de hidrólisis de ATP aumentada (Van de Stadt, 1974). Harris y col. (1979), teniendo en cuenta dichas observaciones, sugirió que la aurovertina desplaza de su sitio a IF_1 . Ebel y Lardy (1975) publicaron que, bajo condiciones específicas, la aurovertina induce la estimulación de la actividad de hidrólisis en la fracción F_1 de hígado de rata. Finalmente, se demostró que la aurovertina impide la unión de IF_1 a partículas submitocondriales libres del mismo (Van de Stadt, 1974).

Estudios cinéticos realizados por Cintrón y Pedersen (1979a y 1982) sugirieron la posibilidad de que el inhibidor proteico promueva un cooperativismo negativo entre uno o más sitios alostéricos para el ATP y el sitio de hidrólisis de NTP. En buffer Tris-HCl la hidrólisis de ITP y GTP presentó una cinética de tipo Michaelis-Menten, mientras que la hidrólisis de ATP presentó una cinética bifásica. Estos resultados presuponen la existencia de por lo menos un sitio alostérico específico para el ATP que afecta negativamente al sitio de hidrólisis en presencia de un buffer no reactivo. En presencia de Tris- HCO_3^- , un buffer reactivo, la actividad de hidrólisis de ATP aumentó presentando una cinética micaliana, indicando que en estas condiciones el sitio alostérico para el ATP se encuentra bloqueado. El agregado de IF_1 restaura el patrón de cinética bifásica, cooperativismo negativo. Paralelamente se demostró que altas concentraciones de bicarbonato reducen la

capacidad de inhibición de IF_1 . Los autores concluyen que, el ATP afecta negativamente al sitio de hidrólisis de la enzima, el HCO_3^- actúa como un efector positivo, IF_1 promueve un cooperativismo negativo entre el sitio alostérico para el ATP y el sitio de hidrólisis, posiblemente el HCO_3^- actúe impidiendo la acción de IF_1 , reduciendo dicho cooperativismo negativo. Por consiguiente la velocidad de hidrólisis de NTP en la enzima H^+ -ATPasa dependerá de las concentraciones relativas de ATP, IF_1 y HCO_3^- presentes en el medio de reacción, sin que se afecte la reacción de síntesis de ATP.

Teniendo en cuenta que dentro de la matriz mitocondrial hay una alta concentración de CO_2 proveniente del ciclo de los ácidos tricarbónicos, es muy probable que IF_1 actúe como supresor de la activación por bicarbonato de la actividad de hidrólisis en la enzima H^+ -ATPasa.

Van de Stadt y Van Dam observaron que, cuando se incuban partículas submitocondriales acopladas, de muy baja actividad de hidrólisis de ATP, bajo condiciones de fosforilación, por el agregado de sustrato de oxidación se induce un aumento en la actividad de hidrólisis (Van de Stadt, 1973 y 1974), mientras la velocidad de síntesis de ATP no se modifica. Ante estas evidencias surgió la siguiente pregunta: ¿Cuál es la relación existente entre la síntesis de ATP y la capacidad del sistema de realizar hidrólisis, si las partículas pueden presentar una amplia variación de la velocidad de hidrólisis manteniendo constante la velocidad de síntesis de ATP?. En un

primer momento se pensó que IF_1 actuaba como inhibidor unidireccional de la H^+ -ATPasa (Asami, 1970; Ernster, 1973), sin embargo, desde un punto de vista estrictamente termodinámico, la existencia de un inhibidor unidireccional, es difícil de aceptar (Tuena de Gómez-Puyou, 1988).

La situación comenzó a esclarecerse cuando se determinó que IF_1 también afecta a la reacción de fosforilación oxidativa. Se observó que partículas submitocondriales de corazón bovino, provistas de IF_1 presentaron un retraso de 1-3 segundos en la velocidad de síntesis de ATP antes de alcanzar el estado estacionario en la velocidad de reacción (Gómez-Puyou, 1979; Harris, 1979). Partículas desprovistas de IF_1 no manifestaron ningún tipo de retraso. Similares resultados fueron observados en cloroplastos (Harris, 1978) y partículas submitocondriales hepáticas (Schwerzman, 1981). El retraso en la velocidad de síntesis de ATP se debería a la liberación de IF_1 del sitio de catálisis por acción del gradiente electroquímico de H^+ .

En trabajos posteriores se demostró que la máxima velocidad de hidrólisis de ATP en partículas submitocondriales acopladas, fue alcanzada luego de realizarse fosforilación oxidativa durante varios minutos (Dreyfus, 1981; Klein, 1983; Power, 1983). Estos resultados demuestran que el proceso de activación enzimático por liberación de IF_1 , ocurre en dos fases, una rápida (en segundos) y otra lenta (en minutos).

En base a dichas observaciones Schwerzmann y Pedersen (1986) establecieron un modelo que intenta explicar el

mecanismo de acción de IF₁.

Trabajos posteriores demostraron que, la velocidad de síntesis de ATP en partículas submitocondriales provistas de IF₁, en presencia de un sistema que atrapa al ATP formado, alcanzó valores idénticos a los observados en partículas desprovistas de IF₁ (Beltrán, 1986). En ausencia del sistema mencionado, la cantidad de ATP acumulado por partículas libres de IF₁, fue considerablemente menor al acumulado por partículas que contienen el inhibidor proteico (Beltrán, 1986). Esto indica que en ausencia del control ejercido por IF₁, parte del ATP formado durante la fosforilación oxidativa es hidrolizado.

El inhibidor proteico es un componente esencial para mantener los niveles de ATP intramitocondriales que oscilan entre 1-3 mM (Slater, 1973; Letko, 1980). Evidentemente IF₁ modifica la cinética de la enzima H⁺-ATPasa, disminuyendo la velocidad de hidrólisis de ATP (Tuena de Gómez-Puyou, 1983). Sin embargo, trabajos recientes indican que la función del inhibidor proteico sería aún mas compleja. Guerrieri y col. (1987) publicaron que partículas submitocondriales desprovistas de IF₁, poseían un flujo mayor de H⁺ a través de Fo y que al ser reconstituidas nuevamente, por el agregado de IF₁, disminuían considerablemente la velocidad de flujo de H⁺. Estos datos sugieren la posibilidad de que el inhibidor proteico modifique la permeabilidad del sector de membrana de la enzima.

1.5. Estructura, metabolismo y función de las poliaminas

Las poliaminas son metabolitos policatiónicos ampliamente distribuidos en células procariotas y eucariotas (Herbest, 1984; Cohen, 1971; Tabor, 1972, 1984 y 1985; Pegg, 1986). Originalmente fueron aisladas del líquido seminal, motivo por el cual se las llamó espermina y espermidina. La estructura química de las poliaminas se caracteriza por poseer cadenas cortas alifáticas polisustituídas con grupos amino. Entre ellas se encuentran simples diaminas, tales como 1,3-diaminopropano, 1,4-diaminobutano (putrescina), 1,5-diaminopentano (cadaverina) y, las más comunes, espermina y espermidina (Figura 1.4.1).

Diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
Putrescina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$
Espermina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
Espermidina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$
Cadaverina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$

Figura 1.4.1. Estructura de las poliaminas más comunes.

La distribución de las poliaminas en los seres vivos no es homogénea. En animales y plantas predominan la putrescina, espermina y espermidina, mientras que en bacterias encontramos putrescina y espermidina fundamentalmente. La cadaverina se encuentra en muy bajas concentraciones en tejido animal (Tabor, 1976; Williams-Ashman, 1979).

El contenido intracelular de poliaminas varía ampliamente. Los niveles son mayores en células que se encuentran en activa proliferación. Se ha encontrado aumento de la biosíntesis de poliaminas en animales que presentan regeneración de órganos, previo al incremento de niveles hormonales; como así también, en células en cultivo, ante la presencia de estímulos de crecimiento, tales como la adición de medio o suero fresco al cultivo. Se han observado aumentos incluso en condiciones patológicas como neoplasias y psoriasis (Jänne, 1978; Morris, 1978; Rennert, 1978; Russell, 1978; Seiler, 1979). Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que las poliaminas cumplan una función reguladora en la proliferación celular (Williams-Ashman, 1979; Pegg, 1982; Russell, 1980; Jänne, 1978).

Las rutas fundamentales de biosíntesis de poliaminas en mamíferos y en microorganismos parten de ornitina y metionina. Las reacciones enzimáticas de formación e interconversión de las poliaminas han sido caracterizadas (Figura 1.4.2) (Pegg, 1982; Tabor, 1984). Si bien estas reacciones en células de mamíferos y protozoarios son generalmente similares a las

presentes en plantas y bacterias (Tabor, 1985), existen algunas diferencias importantes. En mamíferos no se encuentra la vía de síntesis de putrescina a partir de agmatina por ausencia de la enzima arginina decarboxilasa (ADC) (Figura 1.4.2). En *T.cruzi* se sugiere la existencia de dicha vía (Schwarcz de Tarlovsky, 1990), mientras que el *T.brucei brucei* no posee la enzima espermina sintetasa (Pegg, 1982; Tabor, 1984).

Trabajos realizados con células deficientes en la enzima ornitina decarboxilasa (ODC) demostraron que en ausencia de síntesis endógena de poliaminas, la célula requiere para su proliferación poliaminas del medio (Tabor, 1984; Pegg, 1988).

Los primeros estudios de inhibición competitiva de la ODC realizados con α -metilornitina sugirieron que la presencia de poliaminas es indispensable en el desarrollo celular, pero tal inhibidor no fue lo suficientemente potente para producir un bloqueo sustancial de la síntesis (Williams-Ashman, 1979; Pegg, 1982). Los efectos de la inhibición fueron contrarrestados con un aumento en la biosíntesis de las enzimas claves de la vía y por un rápido recambio de la ODC. La síntesis de una serie de inhibidores irreversibles (suicidas) de la ODC fue de un gran aporte al estudio de las poliaminas, entre los cuales el α -difluorometilornitina (DFMO) ha sido el más ampliamente usado (Metcalf, 1978; Sjoerdsma, 1984).

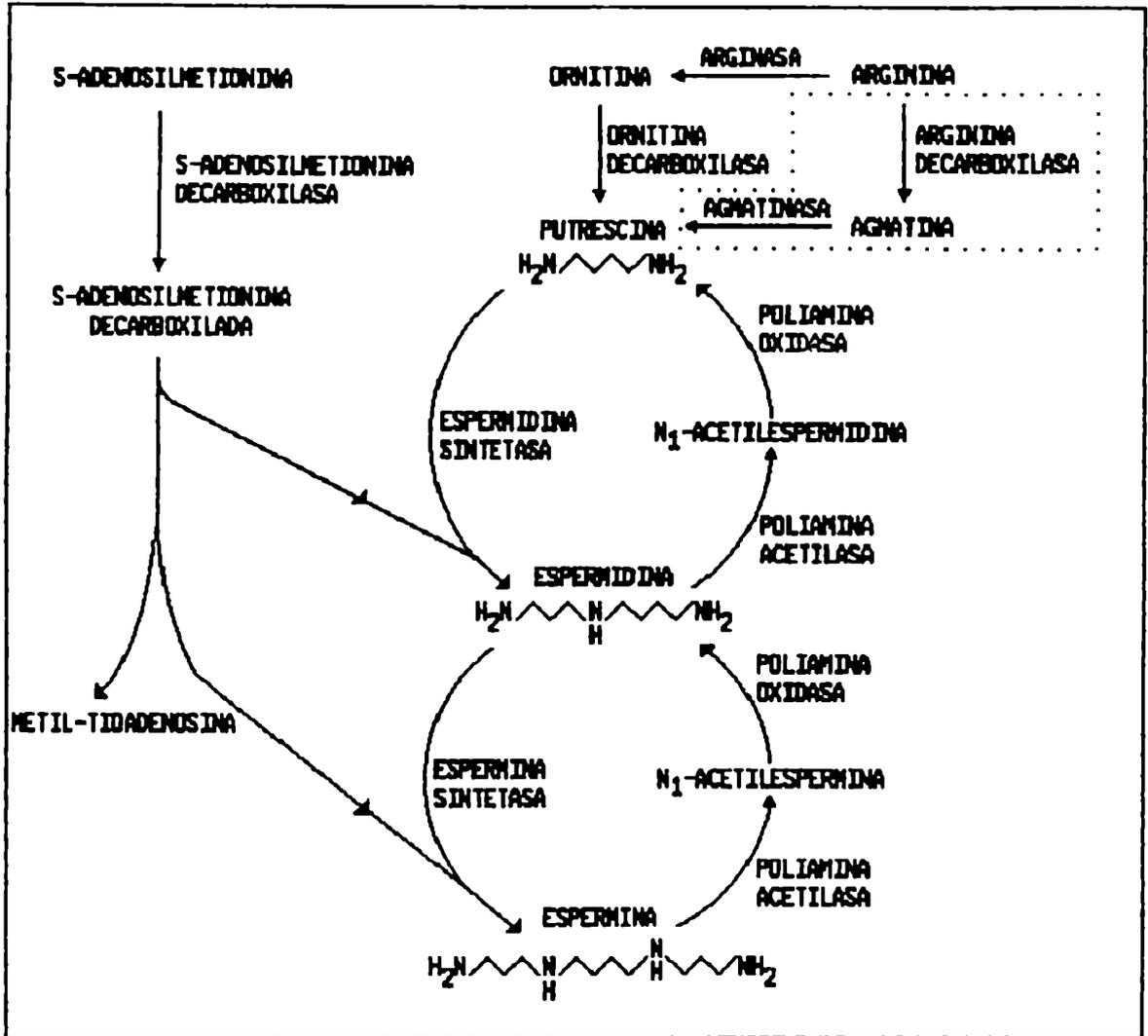


FIGURA 1.4.2. Síntesis e interconversión de poliaminas.

Una amplia variedad de cultivos celulares expuestos a DFMO presentaron una disminución del contenido endógeno de putrescina y espermidina, mientras que los niveles de espermina variaron parcialmente. En la mayoría de los experimentos, el efecto del inhibidor fue de tipo citostático (Pegg, 1982 y 1988; Sjoerdsma, 1984; Tabor, 1984). En todos los casos, el efecto del DFMO fue revertido por el agregado de poliaminas al medio, lo que demostró la gran especificidad del mismo.

A las poliaminas se les atribuyen numerosas funciones, pero los mecanismos de acción a nivel molecular son aún motivo de especulación. A pH fisiológico los grupos amino de las poliaminas se encuentran protonados. Es por ello que interaccionan con macromoléculas cargadas negativamente, tales como los ácidos nucleicos (Marton, 1987); fosfolípidos o residuos de aminoácidos ácidos de proteínas unidas a membrana (Harold, 1964; Igarashi, 1982).

Debido a su naturaleza catiónica las poliaminas presentan muchas características similares a la de los cationes inorgánicos, tales como el Mg^{2+} y/o el Ca^{2+} . La diferencia fundamental radica en que las cargas positivas en las poliaminas se encuentran fijas a lo largo de una cadena hidrocarbonada flexible, lo que le permite interaccionar con cargas a distancia (Liquori, 1967).

Nakai y Glinsmann, utilizando resinas de intercambio iónico, demostraron la formación de complejos nucleótido-

poliamina y calcularon las respectivas constantes de formación de los mismos. A pH: 7,5, una molécula de putrescina interactúa con una molécula de nucleótido de adenina, mientras que dos moléculas de espermina o espermidina pueden unir una molécula de nucleótido de adenina. El Mg^{2+} forma complejos con los nucleótidos de adenina en una relación 1:1. En la Tabla 1.4.1. se muestran los valores de constantes de formación aparentes del complejo nucleótido de adenina con poliaminas o Mg^{2+} (Nakai, 1977), calculadas a pH: 7,5.

TABLA 1.4.1.

VALORES DE CONSTANTES DE FORMACION DE LOS COMPLEJOS
NUCLEOTIDO-POLIAMINAS

NUCLEOTIDO	CONSTANTE	VALORES DE CONSTANTES DE COMPLEJOS NUCLEOTIDO-POLIAMINAS (M^{-1})			
		Put.	Spd.	Spm.	Mg^{2+}
AMP	K-1	82	230	360	160
	K-2	0	22	38	0
ADP	K-1	200	330	1300	1190
	K-2	0	82	120	0
ATP	K-1	290	900	9500	17200
	K-2	0	280	2400	0

Las poliaminas son los metabolitos policatiónicos de mayor concentración intracelular y alcanzan niveles milimolares (Cohen, 1971; Tabor, 1972; Bachrach, 1973; Russell, 1973), lo que hace posible su interacción con los nucleótidos in vivo. Esto sugiere la posibilidad de que las poliaminas compitan con el Mg^{2+} por los nucleótidos in vivo, y consecuentemente, jueguen un papel regulador de aquellas enzimas dependientes de nucleótidos, modificando los niveles intracelulares de los nucleótidos libres y unidos a Mg^{2+} . Un ejemplo de dicha regulación se demostró en cloroplastos, donde la enzima Ca^{2+} -ATPasa es inhibida por altas concentraciones de poliaminas (Hasebe, 1978).

Igarashi y col. comprobaron que la espermina y espermidina regulan la actividad en partículas submitocondriales y F_1 -ATPasa de mitocondrias de hígado de rata, inhibiendo la actividad de hidrólisis de ATP; a la vez que estimulan el intercambio P_i -ATP y la síntesis de ATP en partículas submitocondriales. También observaron que el contenido de ATP en células deficientes en poliaminas fue menor que en células normales (Igarashi, 1989).

Uno de los hallazgos más importantes en el campo de las poliaminas en protozoarios fue realizado por Bacchi y col. (1987) quienes demostraron que el DFMO es capaz de curar la infección aguda producida por *T. brucei brucei* en ratones. Se demostró que la administración de altas dosis de DFMO en mamíferos no produce toxicidad (Seiler, 1978), debido al

rápido recambio y a la corta vida media que presenta la enzima ODC en los mismos (10-20 minutos).

Las poliaminas juegan un papel fundamental en la proliferación y diferenciación de los tripanosomatídeos, sin embargo el contenido de poliaminas en los distintos tipos de parásitos es variado. En las formas sanguíneas de *T. brucei brucei*, Bacchi y col. (1977) encontraron putrescina y espermidina. En *L. donovani* amastigote y promastigote, como así también en *Leishmania spp.* promastigote fueron encontradas putrescina, espermina y espermidina (Bachrach, 1979; Bacchi, 1981). En *Crithidia spp.* y *Leptomonas spp.* encontraron putrescina y espermidina (Bacchi, 1977).

Si bien en un gran número de células se descubrió una vía de síntesis regulada, también se ha demostrado la existencia de sistemas de transporte de poliaminas, que actúan en determinadas condiciones sustituyendo la síntesis de novo (Tabor, 1985; Kasiwagi, 1986; Davies, 1988). El transporte de poliaminas a través de la membrana plasmática es un proceso dependiente de energía, sensible a la temperatura, saturable y capaz de concentrar poliaminas en contra del gradiente; lo que sugiere la presencia de un transportador (Morgan, 1990).

Trabajos realizados por Algranati y col. (1989) en epimastigotes de *T. cruzi* demostraron la existencia de un mecanismo de transporte de poliaminas y aminoácidos básicos. Si bien en extracto de parásitos se determinó la presencia de

espermina, espermidina, putrescina y cadaverina; en experimentos realizados in vivo, con el agregado de arginina-C¹⁴ u ornitina-C¹⁴ no se observó la conversión de los mismos en poliaminas, lo que sugirió la posibilidad de que *T. cruzi* incorpore putrescina del medio en vez de sintetizarla (Bacchi, 1987; Algranati, 1989). Esta hipótesis también se sustenta en el hecho de que no se ha determinado en *T. cruzi* actividad de la enzima ODC y que el agregado de DFMO prácticamente no afecta la proliferación del parásito ni el contenido endógeno de putrescina.

Resultados publicados por Kierszenbaum (1987) sobre estudios de infectividad de *T. cruzi* tratados previamente con los inhibidores DFMO y DFMA (α -D-difluorometilarginina) y en trabajos realizados por Schwarcz y col. (1990), sugieren la existencia de una vía alternativa en la síntesis de putrescina que difiere de la descrita en mamíferos y tripanosomas africanos, en donde se originaría a partir de la arginina mediante una reacción catalizada por la enzima arginina decarboxilasa (ADC) (Figura 1.4.2).

Trabajos publicados por Giffin y col. (1986) mostraron que en células de *T. brucei brucei* con bajo contenido en putrescina disminuía la velocidad de consumo de O₂, mientras que la presencia de putrescina durante el proceso de obtención de la fracción mitocondrial produjo un incremento en la utilización del O₂, tal efecto de la putrescina fue atribuido

a su posible acción estabilizadora de membranas.

En los tripanosomatídeos existe un cofactor, recientemente hallado, que posee espermidina y es indispensable para la actividad de la enzima glutatión reductasa: la tripanotona cuya estructura es N¹,N⁶-bis (L- γ -glutamil-L-hemicistinilglicil) espermidina (Figura 1.4.3) (Henderson, 1987).

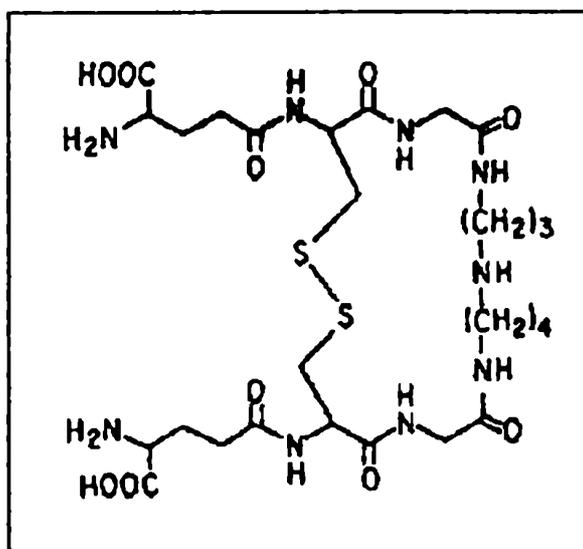


FIGURA 1.4.3. Estructura de la tripanotona.

Recientemente se demostró que la inhibición de síntesis de espermidina en *T. brucei brucei* por acción del DFMO produce un marcado descenso de los niveles de tripanotona, indicando otro de los efectos que produce el DFMO sobre las infecciones por tripanosomas (Fairlamb, 1987). La existencia de la tripanotona en los parásitos marca una diferencia importante en el metabolismo de los mismos con respecto al huésped. La posible alteración de los niveles de poliaminas y por lo tanto de tripanotona presenta un gran interés para el desarrollo de nuevos y más específicos fármacos tripanocidas.

1.6. Inhibidores farmacológicos de la actividad de hidrólisis de ATP de la enzima H^+ -ATPasa mitocondrial

Uno de los métodos utilizados para identificar características esenciales en la actividad catalítica de una enzima, se basa en el estudio de la acción de ciertas drogas sobre la actividad enzimática. Esta resulta ser una poderosa herramienta para la realización de estudios comparativos de una enzima determinada presente en distintos organismos. Para el desarrollo de drogas antiparasitarias es de suma importancia lograr identificar diferencias en la estructura y mecanismos de acción entre las enzimas del parásito y del organismo huésped.

En las células los niveles energéticos intracelulares son mantenidos por la síntesis e hidrólisis de ATP, procesos llevados a cabo fundamentalmente por la enzima H^+ -ATPasa, lo que la hace importante como blanco de acción de drogas siempre y cuando la reactividad de las mismas resulte distinta para la enzima del parásito y la del mamífero.

Los antibióticos efrapeptina, aurovertina y citreoviridina, han resultado ser drogas de interés en el estudio de las propiedades catalíticas y mecanismo de acción de la H^+ -ATPasa de mamíferos y levaduras (Lardy, 1975; Lloyd, 1976; Muller, 1977; Cross, 1978; Kohlbrenner, 1978). La

efrapeptina es un potente inhibidor de la reacción de hidrólisis de ATP en la enzima de *T.cruzi* (Cataldi de Flombaum, 1981) y *C.fasciculata* (Higa, 1981). Se une en forma reversible a un sitio específico de la subunidad catalítica de la H⁺-ATPasa de *T.cruzi* (Cataldi de Flombaum, 1981). En tanto que la aurovertina y la citreoviridina, compiten por dos sitios de unión sobre F₁ de *T.cruzi* (Cataldi de Flombaum, 1981) e inhiben la actividad de hidrólisis de ATP en forma similar a lo observado en la enzima de mamífero (Muller, 1977).

En los últimos años se han descrito mas de cien enzimas en las cuales la arginina está involucrada en el sitio catalítico (Sastre, 1973). Estas enzimas reaccionan con sustratos o cofactores aniónicos los cuales se unen a la arginina cargada positivamente. La modificación de la arginina se realizó por compuestos dicarbonílicos que reaccionan con el grupo guanidino del aminoácido.

Se ha demostrado la presencia de restos arginina esenciales en el sitio activo de distintas ATPasas entre ellas la H⁺-ATPasa mitocondrial de mamífero (Marcus, 1976), la (Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPasa de retículo sarcoplásmico (Murphy, 1976), la (Na⁺+K⁺)-ATPasa de mucosa gástrica (De Pont, 1977), (K⁺+H⁺)-ATPasa (Schrijen, 1980), la de cloroplasto (Andreo, 1977) y la ATPasa de una bacteria termófila (Arana, 1980). Cataldi de Flombaum y Stoppani (1982b) demostraron la

presencia de arginina en la H⁺-ATPasa mitocondrial de *T.cruzi*. La cinética de inhibición obtenida con fenilglioal fue de pseudo-primer orden, ejerciendo el ATP clara acción protectora (Cataldi de Flombaum, 1982a). Estos resultados son compatibles con la presencia de una arginina esencial en el sitio catalítico de la enzima, lo que confirma la similitud de la enzima de *T.cruzi* con la enzima de mamífero (Marcus, 1976).

Contrariamente a lo observado en la H⁺-ATPasa mitocondrial de corazón e hígado (Penefsky, 1974b; Pedersen, 1975b), la acción de reactivos para grupos tioles (-SH) sobre la H⁺-ATPasa de *T.cruzi*, puso de manifiesto la existencia de sulfhidrilos accesibles en la enzima de parásito. Trabajos realizados por Cataldi de Flombaum y col. (1980) demostraron que la actividad de hidrólisis de ATP en la fracción soluble de la enzima, depende de la presencia de grupos -SH libres. El FMA (fluoreceínmercuriacetato) resultó ser el inhibidor de grupos sulfhidrilos mas efectivo sobre la H⁺-ATPasa de *T.cruzi*, seguido por CMB (p-cloromercuribenzoato) y NEM (N-etilmaleimida). La relación entre las características hidrofóbicas de los mercuriales y su influencia sobre la actividad de la H⁺-ATPasa de *E.coli* fue estudiada por Azocar y Muñoz (1978). El FMA presenta mayor capacidad de penetración en las regiones hidrofóbicas de las moléculas de proteínas y se une a grupos -SH con mucha mas afinidad que otros reactivos (Lee, 1969; Mironov, 1974). Mironov y col. (1974) demostraron

que la H⁺-ATPasa de hígado puede ser inhibida por FMA pero con cantidades muy superiores a las utilizadas para inhibir la enzima de parásito.

Los radicales libres de oxígeno producen daño celular, entre otras acciones existe la posibilidad de que inactiven enzimas, como por ejemplo las ATPasas, tal como fue demostrado en estudios realizados sobre ATPasa de sinaptosoma (Sawas, 1984), (Na⁺+K⁺)-ATPasa (Das, 1984) y en ATPasa de miofibrillas cardíacas (Ventura, 1985).

Estudios llevados a cabo con sistemas generadores de radicales libres de oxígeno, sobre la actividad de la H⁺-ATPasa mitocondrial de *T.cruzi* demostraron que, incubando a la enzima en presencia del sistema xantina-xantino oxidasa, reactivo de Fenton (H₂O₂ + Fe²⁺) o sistema ascorbato-Cu, se observa una pérdida gradual de la actividad de hidrólisis en función del tiempo de incubación y de la cantidad de radicales de oxígeno generados (Cataldi de Flombaum, 1986b). El sistema xantina-xantino oxidasa reduce al O₂ generando H₂O₂ y O₂⁻ (Hille, 1981), que interactúan formando OH[•] (Beauchamp, 1970; Kong, 1980). En el reactivo de Fenton reaccionan el Fe²⁺ con H₂O₂ dando Fe³⁺, OH⁻ y OH[•] (Winston, 1983). Con el sistema ascorbato-Cu, por reducción del Cu²⁺ unido a la proteína a su correspondiente catión cuproso, se genera O₂⁻, quien posteriormente genera H₂O₂ que vuelve a reaccionar con el complejo proteína-Cu⁺ dando OH[•] *in situ*. La alta afinidad de las proteínas por el cobre es bien conocida y los residuos de

histidina intervienen en dicha unión. La gran efectividad del sistema ascorbato-Cu para inhibir la actividad de la enzima H⁺-ATPasa puede atribuirse a su acción dentro de la misma proteína, mientras que el radical OH[·] generado por los otros sistemas se distribuyen por todo el medio de reacción.

No solo los residuos de histidina son blanco de la acción del radical OH[·] sino también otros residuos de aminoácidos pueden ser afectados (Yamakura, 1984; Zs.-Nagy, 1984). Los grupos sulfhidrilos presentes en la H⁺-ATPasa pueden unir y reducir al Cu²⁺ formando el complejo Cu-proteína involucrado en la inactivación de la enzima. Con el fin de obtener evidencias mayores sobre la modificación de los grupos SH de la enzima de mitocondria de *T.cruzi* por radicales libres de oxígeno, se realizaron estudios de inhibición utilizando el sistema ascorbato-Cu y CMB como reactivo selectivo de grupos -SH y se observó que la suma de las inhibiciones individuales fue mucho mayor que la inhibición producida por la acción conjunta de ambos inhibidores (Cataldi de Flombaum, 1987). Estos resultados serían una evidencia contundente de que ambos inhibidores interactúan sobre los mismos grupos tioles. La combinación del efecto de inhibición del ascorbato-Cu con el fenilglioxal (agente contra residuos de arginina) determinó que no existe competencia en el mecanismo de acción de cada uno de ellos (Cataldi de Flombaum, 1987). En resumen, la acción competitiva del sistema ascorbato-Cu y CMB, confirman la hipótesis sobre el papel esencial que juega la oxidación de

los residuos -SH por radicales libres de oxígeno en el mecanismo de inactivación de la H⁺-ATPasa de *T.cruzi* (Cataldi de Flombaum, 1986b). La irreversibilidad de este efecto puede ser de gran importancia en la acción de drogas tripanocidas, generadoras de radicales libres.

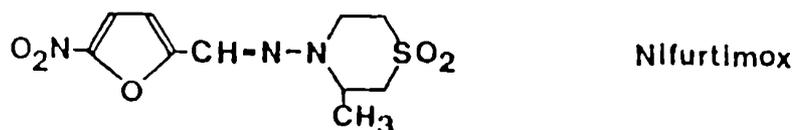
El bromuro de etidio, conocido agente mutagénico mitocondrial, afecta numerosas funciones celulares, entre otras la multiplicación celular, la respiración, la síntesis de los citocromos aas y b (Ucross, 1977; Docampo, 1978; Lima, 1984). En *T.cruzi* el bromuro de etidio disminuye la funcionalidad del complejo H⁺-ATPasa mitocondrial y los citocromos de la cadena respiratoria (Cruz, 1984; Orian, 1984; Chomyn, 1985). Se estudió la acción del bromuro de etidio sobre la H⁺-ATPasa *T.cruzi in vitro* observándose que las concentraciones requeridas para inhibir la enzima son mucho mayores a las utilizadas para inhibir el crecimiento (Cataldi de Flombaum, 1986a) de los parásitos.

Se estudió la acción del suramín, conocida droga tripanocida, sobre la actividad de hidrólisis de ATP en la enzima de *C.fasciculata*, obteniéndose inhibición no competitiva en la enzima unida a membrana e inhibición competitiva en la fracción soluble F₁ (Higa, 1981).

Un gran número de drogas tripanocidas son generadoras de radicales libres de oxígeno (O₂⁻, OH[·]) y peróxido de hidrógeno (Docampo, 1984). Dichos radicales pueden producir grandes

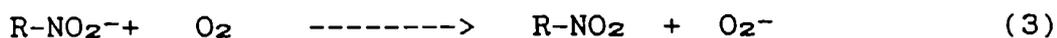
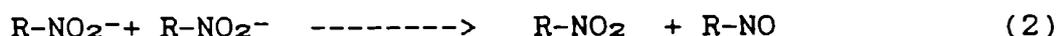
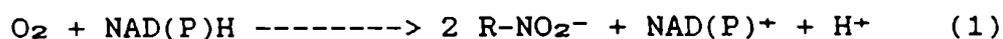
daños celulares (Slater, 1984) y es por ello que se les atribuye el efecto de las drogas sobre los parásitos (Sawas, 1984; Goijman, 1985a,b).

El nifurtimox es un nitrofurano de conocida acción citotóxica, utilizado como quimioterápico en las formas agudas de la enfermedad de Chagas (Van den Bossche, 1978). Presenta la siguiente estructura:



Aún no se sabe a ciencia cierta cual es el mecanismo de acción del nifurtimox, sin embargo la citotoxicidad de los nitrofuranos se conoce desde hace tiempo (Endo, 1971).

Las sustancias orgánicas nitradas son reducidas en su grupo nitro. Los productos resultantes de esa reducción son fácilmente oxidados por el oxígeno, con formación de radicales libres. Docampo y Stoppani (1979) y Docampo y col. (1981) demostraron que en *T. cruzi*, concentraciones farmacológicas de nifurtimox son capaces de generar productos de reducción parcial del oxígeno, a saber, anión superóxido (O_2^-) y agua oxigenada (H_2O_2) de acuerdo a las siguientes reacciones:

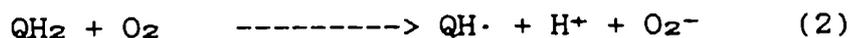
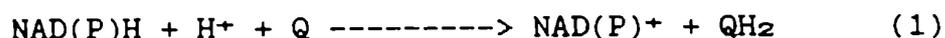


en donde en la reacción (1) participa una reductasa y en la reacción (4) la enzima superóxido dismutasa. Dichas reacciones han sido demostradas en todas las formas del *T.cruzi* (epi-, tripo- y amastigote) y tanto en células enteras, como en homogenados, fracciones mitocondriales y microsomales del parásito (Docampo, 1981). La capacidad de los diferentes organismos para prevenir la acción letal de los derivados de la reducción parcial del oxígeno depende de su contenido en superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa. En contraste con el mamífero, el *T.cruzi* es un organismo pobremente dotado para desintoxicar H_2O_2 pues no posee catalasas y la actividad de la glutatión peroxidasa es relativamente baja (Docampo, 1976; Boveris, 1980). Como consecuencia de estas deficiencias enzimáticas el *T.cruzi* es particularmente vulnerable a la acción tóxica del O_2^- y sus derivados. La acción del nifurtimox involucra inhibición de la síntesis de ADN, ARN y proteínas y estimulación de la degradación de macromoléculas y estimulación de la síntesis no programada de ADN (Goijman, 1985a). Observaciones de Goijman y col. (1985) pusieron de manifiesto una importante propiedad bioquímica del *T.cruzi*: su capacidad para reparar las roturas del ADN causadas por los agentes tripanocidas. Tal capacidad requiere del mantenimiento de altas concentraciones del medicamento en sangre en los enfermos chagásicos para evitar períodos de reparación que permitan la recuperación del parásito.

Las quinonas son derivados dicetona de compuestos aromáticos, que están ampliamente distribuidas en la naturaleza, muchas de ellas se encuentran incorporadas a vías metabólicas tales como la respiración celular y la fotosíntesis. Los compuestos con estructura quinona pueden ser agentes terapéuticos o bien compuestos tóxicos, debido a la producción de un stress oxidativo (Smith, 1985). El stress oxidativo se define como la formación intracelular de oxidantes, los cuales pueden producir cambios en macromoléculas esenciales (Rossi, 1986).

En el *T.cruzi* se han descrito la actividad letal de algunas naftoquinonas, por ejemplo las lapachonas han sido objeto de numerosos estudios (D'Albuquerque, 1972; Lopez, 1978; Docampo, 1978a; Boveris, 1978b; Goijman, 1985a).

Se sabe que en presencia de sistemas respiratorios celulares las sustancias con estructura quinona inducen la formación de peróxido de hidrógeno según las siguientes reacciones:



lo que indica la participación de los radicales libres en la acción de estas drogas.

La β -lapachona, una de las o-quinona que se extrae del

lapacho (*Tabebuia sp.*), produce alteraciones ultraestructurales y metabólicas en las distintas formas del *T.cruzi* (Docampo, 1977). Estudios de Cruz y col. (1978), Docampo y col. (1978a,b) y Boveris y col. (1978a,b), realizados sobre las distintas formas del *T.cruzi*, permitieron establecer la importancia de los productos de reducción parcial del oxígeno en la acción de las quinonas sobre el parásito. Cuanto mayor es la aptitud de la quinona para generar anión superóxido y peróxido de hidrógeno, mayor es su efecto sobre el crecimiento del parásito *in vivo* (Boveris, 1978a,b).

Las o-naftoquinonas derivadas de la β -lapachona, sintetizadas por CIBA-GEIGY (Figura 1.5.1), han sido propuestas como citostáticos que inhiben la ADN polimerasa ARN dependiente y prolongan el tiempo de sobrevida de ratones infectados con el virus de leucemia Rauscher (Schaffner-Sabba, 1984). Estudios realizados por Pahn y col. (1988) indicaron que estas o-quinonas inhiben el crecimiento de *T.mega* y *C.fasciculata*.

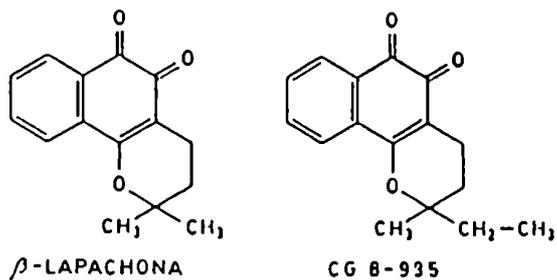


FIGURA 1.5.1. Estructura de o-naftoquinonas. β -lapachona: 3,4-dihidro-2,2 dimetil-2*H*-nafto[1,2*b*] piran-5,6-diona; CG 8-935: 3,4-dihidro-2-metil-2-etil-2*H*-nafto-[1,2*b*] piran-5,6-diona.

1.7. OBJETIVOS

A pesar de su importancia epidemiológica la tripanosomiasis americana, enfermedad de Chagas, no tiene una quimioterapia plenamente satisfactoria. Una de las etapas mas importante que debe cumplirse para el desarrollo de nuevos y mas eficaces fármacos tripanocidas, es el estudio de la bioquímica del parásito a fin de establecer diferencias con el organismo huésped que permitan determinar posibles blancos de acción de drogas.

Teniendo en cuenta que la H^+ -ATPasa mitocondrial es una enzima clave en los procesos de generación y mantención de energía intracelulares, el objetivo del presente trabajo ha sido el estudio de inhibidores fisiológicos y farmacológicos de la H^+ -ATPasa mitocondrial en tripanosomatídeos. Con tal fin se propuso el estudio de la enzima en *T.cruzi* (agente causal de la enfermedad de Chagas) y en organismos modelos como *C.fasciculata* y *L.seymouri*.

Hasta los comienzos del presente trabajo no se había informado sobre la existencia del inhibidor proteico natural de la H^+ -ATPasa mitocondrial en tripanosomatídeos, tal como fuera demostrado en mamíferos por Pullman y Monroy en 1963. Por tal motivo uno de los objetivos fue verificar la presencia del inhibidor proteico en la enzima de *T.cruzi* y *C.fasciculata*

y establecer posibles diferencias y homologías con el inhibidor de mamífero.

Considerando el papel regulador de las poliaminas sobre las enzimas de mamíferos dependientes de nucleótidos y en particular sobre la H⁺-ATPasa mitocondrial, tal como fue descrito por Igarashi y col. (1989) para la enzima de hígado de rata, otro de los objetivos propuestos fue identificar si tal regulación por putrescina, espermidina y espermina se verificaba en la H⁺-ATPasa de tripanosomatídeos, establecer el tipo de regulación que las misma ejercen e identificar posibles diferencias con lo observado en la enzima de mamífero.

La modificación química de una enzima es uno de los métodos utilizados para identificar características esenciales en la actividad catalítica. Con tal fin se realizaron estudios con reactivos de tioles, sistemas generadores de radicales libres y drogas tripanocidas como el nifurtimox y CG 8-935 capaces de generar radicales libres de oxígeno; que permitan establecer homologías y diferencias entre las H⁺-ATPasas de *T.cruzi*, *C.fasciculata* y *L.seymouri* y la enzima de mamífero.

2 . MATERIALES Y METODOS

2.1. Crecimiento de los organismos

2.1.1. Epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuén.

Los epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuén fueron cultivados según la técnica desarrollada en el Instituto Fátala Chabén, por la doctora Carlomagno. El medio líquido contenía por litro: extracto de carne 5 gr, extracto de levaduras 3 gr, triptosa 9 gr, glucosa 4 gr, KCl 4 gr, NaCl 4 gr, Na₂HPO₄ 10 gr, hemina 0.02 gr, pH: 7.4. El cultivo se llevó a cabo durante seis días a 28°C. Las células se recolectaron, lavaron con NaCl 150 mM y congelaron a -20°C.

2.1.2. Epimastigotes de *T. cruzi* cepa RA.

El cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* cepa RA se realizó en medio LIT (Taylor, 1978) que contenía por litro: triptosa 6 gr, infusión de hígado 6 gr, NaCl 4.8 gr, KCl 0.4 gr, Na₂HPO₄.12 H₂O 22 gr, glucosa 2.4 gr, hemina 20 mg, suero fetal bovino inactivado 4% (V/V), pH: 7.4. Para eliminar las poliaminas del medio se procedió a dializarlo exhaustivamente contra una solución salina de la misma composición y carente

de infusión de hígado y triptosa, al medio dializado se lo denominó LIT (-) (Schwarcz de Tarlovsky, 1990). La recolección de epimastigotes se realizó a los seis días (fase estacionaria de crecimiento) y se lavaron con NaCl 150 mM. Las células obtenidas se conservaron a -20°C.

2.1.3. *C.fasciculata* cepa ATCC 11745.

El cultivo de *C.fasciculata* se realizó en medio líquido descrito por Bacchi y col. (1974), que contenía por litro de medio: NaCl 5 g, KCl 2 g, ácido ascórbico 0,2 g, Na₂HPO₄ 0,6 g, MgSO₄ · 7 H₂O 0,5 g, sacarosa 2,5 g, MOPS 0,5 g, infusión de hígado desecado 5 g, peptona 7,5 g, extracto de cerebro corazón 7,5 g, hemina 0,02 g, pH:7,8. Las células se cultivaron a 28°C durante 48 horas, se recolectaron y lavaron con NaCl 150 mM y congelaron a -20°C.

2.1.4. Cultivo de *L.seymouri*.

El cultivo de *L.seymouri* se realizó en el medio descrito por Bacchi y col. (1974), a 26°C durante 72 horas.

Las células se cosecharon y lavaron con NaCl 150 mM y congelaron a -20°C.

2.2. Fraccionamiento subcelular de *T.cruzi* y *C.fasciculata*

2.2.1. Obtención de fracción mitocondrial.

Las células se rompieron con perlas de vidrio en un mortero a 4°C durante 5 min. en una proporción de 2.5 gr de perlas por gramo de células. El homogenado se suspendió en Tris-HCl 10 mM, pH: 7.6, sacarosa 350 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 0.1 mM, KCl 4 mM (buffer de mitocondrias). La mayor parte de las perlas de vidrio se separaron por decantación y la suspensión se sometió a centrifugación diferencial; 5 min. a 800 g para sedimentar núcleos y flagelos; luego 15 min. a 9000 g para obtener la fracción mitocondrial.

2.2.2. Obtención de partículas submitocondriales.

2.2.2.1. Obtención de A-partículas:

La fracción mitocondrial se suspendió en Tris-HCl 10 mM, pH: 7.5, sacarosa 250 mM, hasta una concentración de proteínas de 8-10 mg/ml; la suspensión se sonicó en baño de hielo con dos pulsos de 30 seg. cada uno, con un intervalo de 1 min., a una potencia de 400 watt. Se centrifugó 10 min. a 26000 g, se descartó el sedimento, el sobrenadante se centrifugó 30 min. a 105000 g. El sedimento obtenido contenía las partículas submitocondriales denominadas A-partículas.

2.2.2.2. Obtención de AS-partículas:

Para la obtención de partículas libres de inhibidor proteico (AS-partículas), se procedió por el método de Racker modificado (R14). A-partículas suspendidas en buffer Tris-SO₄ 30 mM, pH: 9,2, KCL 0,25, EDTA 2 mM y sacarosa 75 mM (TESK). Se sembraron 0,5-0,6 ml de A-partículas en una columna de Sephadex G-50 de 24 x 1,6 cm a temperatura ambiente equilibrada con buffer TESK de flujo inverso. Se eluyó a una velocidad de 2 ml/5 min. En las fracciones recogidas se determinó actividad enzimática por el método espectrofotométrico.

2.3. Obtención de F₁-ATPasa

La fracción soluble de la enzima, F₁-ATPasa, se obtuvo por tratamiento con cloroformo de la fracción mitocondrial, utilizando la técnica descrita por Flombaum M.A.C. (Cataldi de Flombaum, 1980). La fracción mitocondrial se suspendió en una relación 1 g/ 13 ml en buffer Tris-HCl 10 mM, pH: 7.6, sacarosa 350 mM, EGTA 0.1 mM, KCl 4 mM. Se agregó a la suspensión 0.5 volúmenes de cloroformo, ATP 2 mM y se agitó 3 min. en tubos de vidrio con tapa esmerilada. Para separar la fase clorofórmica se centrifugó 5 min. a 2000 rpm. Se utilizó la fase acuosa para la determinación de la actividad enzimática.

2.4. Obtención del inhibidor proteico de mitocondria de hígado de rata

La obtención de IF₁ hepático se realizó por la técnica descrita por Racker (Bacchi, 1981) con las siguientes modificaciones:

2.4.1. Obtención de mitocondrias hepáticas.

Se utilizaron ratas ayunadas 24 hs., se extrajo el hígado, se lavó con KCl 150 mM y se homogeneizó con buffer Tris-HCl 5 mM, pH: 7,4; sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, en una proporción de 9 ml/g de hígado. Se centrifugó a 600 g durante 10 min. y se descartó el sedimento que contenía los núcleos, luego se centrifugó a 5000 g durante 10 min. obteniéndose la fracción mitocondrial, la cual fue lavada suavemente dos veces con el mismo buffer en las condiciones detalladas anteriormente. Durante el proceso de extracción se trabajó a 4°C. Las mitocondrias sedimentadas se guardaron a -20°C.

2.4.2. Obtención de partículas submitocondriales en pirofosfato.

Las mitocondrias se suspendieron en pirofosfato 100 mM, pH: 7,4; hasta una concentración proteica final de 20 mg/ml y 10

mM de pirofosfato. La suspensión se sonicó a 40 Watt durante 1 min. 2 veces, con un intervalo de 30 seg. Se centrifugó a 26000 g, durante 15 min. El precipitado se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 105000 g 45 min. El sedimento obtenido de partículas submitocondriales se denominó P-partículas.

2.4.3. Obtención de H⁺-ATPasa por fraccionamiento con (NH₄)₂SO₄.

Se suspendieron las P-partículas en sacarosa 250 mM hasta una concentración de proteínas de 50 mg/ml y se diluyó al 50% con buffer Tris-SO₄ 20 mM, pH: 7,5; EDTA 1 mM, MgSO₄ 2 mM, DTT 1 mM (buffer TEMD). Se agregó solución saturada de (NH₄)₂SO₄ pH: 7,5 con EDTA 1 mM, hasta 20% de saturación. A la solución obtenida se le agregó colato de sodio hasta una concentración de 1,5% (p/v). Se agitó durante 7 minutos y centrifugó a 12600 g, durante 60 min. El precipitado se descartó y al sobrenadante se le agregó (NH₄)₂SO₄ hasta 38% de saturación, se agitó 5 min. y se centrifugó a 32000 g durante 15 min. El sobrenadante se llevó a 45% de saturación con (NH₄)₂SO₄ y centrifugó a 32000 g, durante 15 min. El precipitado contenía la H⁺-ATPasa, el mismo se suspendió en Tris-SO₄ 10 mM pH: 7,5; sacarosa 20 mM, MgSO₄ 1 mM, DTT 0,5 mM (buffer STMD) y se utilizó para lo obtención del inhibidor.

2.4.4. Obtención de IF₁ por calentamiento y precipitación alcohólica.

La suspensión de enzima, se calentó a 75°C durante 4 min. y se centrifugó a 12000 g durante 15 min. El precipitado obtenido se descartó y al sobrenadante se le agregó etanol hasta 75% (v/v) de saturación agitando continuamente durante por lo menos 10 min. y se centrifugó a 12000 g 15 min. El sedimento obtenido (IF₁) se suspendió en Tris-HCl 5 mM, pH: 8,0; sacarosa 250 mM y se conservó a -75°C.

2.5. Determinación de la concentración de células de parásitos en el medio de cultivo

La concentración de células de parásito se determinó midiendo la densidad óptica de la suspensión celular en un fotocolorímetro Klett Summerson (filtro verde). Para su calibración se construyó una curva donde se graficó la densidad óptica en función del número de células, utilizando distintas diluciones de una misma suspensión, cuyo número de células fue determinado previamente por recuento en cámara de Neubauer.

2.6. Medida de la actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó midiendo la concentración de ATP hidrolizado por minuto de reacción. Para llevar a cabo las determinaciones la fracción mitocondrial y las partículas submitocondriales fueron previamente suspendidas en Tris-HCl 10 mM, pH: 7.6, sacarosa 250 mM.

2.6.1. Método colorimétrico.

Por el método colorimétrico se midió la concentración de Pi liberado por la acción de la enzima. La reacción se llevó a cabo en un medio que contenía Tris-HCl 50 mM, pH: 7.6, sacarosa 200 mM y EGTA 0.25 mM, en un volumen final de 1 ml, en presencia de ATP y MgCl₂ cuyas concentraciones se indican en cada caso. La reacción se inició por el agregado de enzima, la cantidad utilizada se detalla en cada experimento. Después de 20 min de incubación a 30 °C, la reacción se detuvo con el agregado de 0.1 ml de tricloroacético al 50% (v/v). El Pi liberado se determinó por el método de Fiske y Subbarow (1925)

2.6.2. Método espectrofotométrico.

En el método espectrofotométrico la actividad de la enzima se determinó midiendo la concentración de ADP en forma acoplada a la oxidación del NADH, mediante el sistema de la

piruvato quinasa-láctico deshidrogenasa. El medio de reacción contenía Tris-HCl 50 mM, pH: 7.6, sacarosa 200 mM, MgCl₂ 2 mM, ATP 1 mM, fosfoenolpiruvato 2 mM, NADH 0.2 mM, lactato deshidrogenasa 10 U, piruvato quinasa 10 U, en un volumen final de 1 ml. Cuando la absorbancia a 340 nm se hubo estabilizado, la reacción se inició por el agregado de enzima y se midió a 30°C. La cantidad de enzima utilizada se indica en cada caso.

2.7. Determinación del consumo de oxígeno

Las determinaciones del consumo de O₂ se realizaron en un oxígrafo de Gilson provisto del electrodo de Clark.

2.7.1. Consumo de oxígeno en células enteras.

Las células se suspendieron en el buffer de medida, KH₂PO₄ 10 mM, pH: 7,4; sacarosa 200 mM, MgCl₂ 2 mM, EDTA 1 mM y las medidas se realizaron a 30°C en un volumen final de 1,8 ml, como sustrato de respiración se utilizó succinato 10 mM.

2.7.2. Consumo de oxígeno en fracción mitocondrial y partículas submitocondriales.

La fracción mitocondrial y partículas submitocondriales obtenidas por los métodos descritos se suspendieron en buffer Tris-HCl 10 mM, pH: 7,4; sacarosa 200 mM. El consumo de oxígeno se determinó utilizando como medio de medida buffer Tris-HCl 10 mM, pH: 7,4; sacarosa 300 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 1 mM, en un volumen final de 1,8 ml a 30°C, con el agregado de 10 mM de succinato como sustrato y ADP 0,3 mM.

2.8. Espectros de absorción

Los espectros de absorción de la fracción mitocondrial y de A-partículas se realizaron a temperatura ambiente en celdas de 5 mm de paso óptico utilizando un espectrofotómetro Aminco-Dwza UV/ vis., en el modo de doble haz. Se utilizó un ancho mecánico de ranura con el que se observó una banda espectral de 0,3 nm. Las muestras se suspendieron en buffer fosfato 100 mM, pH: 7,4 con glicerol al 30% (v/v). Como agente reductor se utilizó ditionito (1 mg/ml) y los espectros se midieron durante 5-10 min.

2.9. Filtración por HPLC

Aproximadamente 100 μ l (50-60 μ g) de la preparación de IF₁ obtenido por precipitación alcohólica suspendida en Tris-HCl 5 mM, pH: 8,0; sacarosa 250 mM, se sembró en una columna de fase reversa C₁₈ μ Bondapak Waters (7,8 x 250 mm) equilibrada a 25 °C con 0,1 % de trifluoroacético (TFA) y 10 % de acetonitrilo. Se eluyó con un gradiente de acetonitrilo del 10% al 60% (v/v) durante 60 min. con una velocidad de 1 ml/min. En las fracciones recogidas se midió absorbancia a 220 nm.

2.10. Electroforesis en gel

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS se realizó por el método de Weber y Osborn (1960). Las muestras de proteínas suspendidas en buffer de corrida fueron disociadas incubando 1 a 10 min. a 100 °C en presencia de SDS al 0,1% (p/v) y 2-mercapto etanol al 0,1% (v/v).

Los geles se tificaron con una solución de Coomassie Brilliant Blue R 0,25% en ácido acético glacial 9% (v/v), metanol 45% (v/v) y 46% de H₂O, durante 12 horas. Se enjuagó con agua destilada y posteriormente con una solución acuosa que contenía: ácido acético glacial 7% y metanol 5%. La determinación de las proteínas se realizó espectrofotométricamente a 660 y 280 nm. El cálculo del peso

molecular se realizó utilizando como testigo proteínas de pesos moleculares conocidos: albúmina, ovoalbúmina, láctico deshidrogenasa, ribonucleasa, citocromo c. El cálculo de la movilidad se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{distancia migración proteína} \times \text{largo gel antes de teñir}}{\text{largo gel después de teñir} \times \text{distancia frente colorante}}$$

2.11. Determinación de proteínas

Las proteínas se determinaron por el método de Bensadoun (1976), usando suero albúmina como testigo.

2.12. Reactivos

Se obtuvieron de los siguientes proveedores:

Extracto de carne, extracto de levaduras, triptosa, infusión de hígado, extracto de cerebro corazón y peptona, fueron obtenidos de Difco Laboratories, Detroit, Michigan.

ATP y ADP (sales de sodio y Tris), NADH (Grado III, sal disódica), sacarosa, EDTA, EGTA, MOPS, DTT, Tris, hemina, colato de sodio, perlas de vidrio (Tipo I, 75-150 μm), tripsina, inhibidor de tripsina, FMA, CMB, NEM, putrescina, espermidina, espermina, fosfoenolpiruvato, piruvato quinasa,

lactato deshidrogenasa, sulfato de amonio, NaCl, KCl, MgCl₂, Na₂HPO₄, glucosa, ácido succínico, antimicina, cianuro, oligomicina, acetonitrilo y trifluoroacético (calidad HPLC), SDS, 2-mercaptoetanol, albúmina sérica bovina, ovoalbúmina, ribonucleasa, citocromo C, Coomassie Brilliant Blue R-250, obtenidos de Sigma Chemical Co.

Sephadex G-50 fue obtenido de Pharmacia Fine Chemicals.

La quinona CG 8-935 fue suministrada por Ciba-Geigy, Basilea, Suiza y el nifurtimox por Bayer A.G., Leverkusen, Alemania.

El inhibidor proteico de la H⁺-ATPasa de corazón bovino fue gentileza del Dr. Gómez-Puyou, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Autónoma de México, México D.F., 0,45 µg inhiben un 50% la actividad de ATPasa de 1,0 µg de F₁ de corazón bovino. La preparación fue homogénea en una electroforesis en gel de poliacrilamida (comunicación personal del Dr. Gómez-Puyou).

RESULTADOS Y DISCUSION

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL INHIBIDOR PROTEICO DE LA ENZIMA H⁺-ATPasa EN TRIPANOSOMATIDEOS

Los organismos pertenecientes al orden *kinetoplástida* poseen una única mitocondria asociada al kinetoplasto formando el complejo kinetoplasto-mitocondria (Steinert, 1964; Simpson, 1972). La mitocondria se halla muy ramificada dentro de la célula (Paulin, 1975 y 1977), de manera que su aislamiento en forma intacta es prácticamente imposible. Esto ha obstaculizado los estudios "in vitro" de los mecanismos conservadores de energía en estos organismos. Por tal motivo los estudios realizados hasta el presente sobre la enzima H⁺-ATPasa de tripanosomatídeos se llevaron a cabo midiendo la reacción de hidrólisis de ATP en lugar de la reacción de síntesis (Cataldi de Flombaum, 1980; Higa, 1981; Williams, 1990).

En el presente trabajo se aisló y estudió la actividad del inhibidor proteico de la H⁺-ATPasa como regulador de la actividad de hidrólisis de ATP en la enzima de partículas submitocondriales, debido a que la misma poseía mayor actividad específica que la enzima presente en la fracción mitocondrial.

3.1. Obtención y caracterización de partículas submitocondriales de *C.fasciculata*

Las partículas submitocondriales de células de mamíferos fueron obtenidas por distintos métodos (Asami, 1970; Brooks, 1971; Nelson, 1973), siendo el método de Lang y Racker (1974), con algunas modificaciones, el adoptado para la obtención de partículas de tripanosomatídeos.

Las partículas submitocondriales (A-partículas) de *C.fasciculata* se obtuvieron a partir de la fracción mitocondrial. Las células se rompieron con perlas de vidrio durante 5 min. a 4°C en una proporción de 2,5 gr de perlas por gramo de célula. El homogenado se suspendió en buffer para mitocondrias que contenía: Tris-HCl 10 mM, pH: 7,6, sacarosa 350 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 0,1 mM, KCl 4 mM. Las perlas de vidrio se separaron por decantación y la suspensión se sometió a centrifugación diferencial, 5 min. a 800 g para sedimentar núcleos y flagelos, luego 15 min. a 9000 g para la obtención de la fracción mitocondrial la cual fue suspendida en buffer Tris-HCl 10 mM, pH: 7,5, sacarosa 250 mM, en una concentración final de 8-10 mg/ml. La suspensión se sonicó con 40 watt de potencia en baño de hielo a dos tiempos distintos, una alícuota se sonicó con dos pulsos de 30 seg y un intervalo de 1 min. y otra alícuota con dos pulsos de 4 min. con un intervalo de 2 min. entre pulso y pulso. Posteriormente las muestras se centrifugaron 10 min. a 26000 g, se descartó el

sedimento y el sobrenadante se centrifugó 30 min. a 105000 g. El sedimento obtenido contenía las A-partículas.

Con el fin de caracterizar a las partículas obtenidas, las mismas fueron suspendidas en buffer Tris HCl 10 mM, pH: 7,4; sacarosa 200 mM y se midió consumo de oxígeno en un oxígrafo Gilson provisto de electrodo de Clark. Las determinaciones se realizaron en buffer Tris-HCl 10 mM, pH: 7,4; sacarosa 300 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 1 mM, en un volumen final de 1,8 ml a 30°C y utilizando como sustrato de respiración succinato 10 mM y ADP 0,3 mM.

En la Tabla 3.1 se muestra que, por el agregado de succinato como sustrato de respiración, se estimuló el consumo de oxígeno en ambas preparaciones de partículas, sin que se evidencie control respiratorio por la incorporación de ADP. Estos resultados demuestran que las partículas obtenidas presentan actividad de la cadena respiratoria desacoplada de la fosforilación oxidativa.

Por incubación de A-partículas de corazón bovino durante 20 min. a 25°C con solución alcohólica de oligomicina en una relación 0,2 µg/mg de proteína y en un volumen tal que la concentración final de alcohol no supere el 4%, Vinogradov y col. obtuvieron partículas acopladas, que presentaron control respiratorio por el agregado de ADP (Minkov, 1980). Como se observa en la Tabla 3.1, las A-partículas de *C.fasciculata* incubadas con oligomicina en las condiciones descritas para mamífero, mantuvieron desacoplada la respiración de la

fosforilación oxidativa, debido a que no presentaron control respiratorio por el agregado de ADP al medio de respiración. El agregado de antimicina al medio de medida inhibió por completo el consumo de oxígeno.

TABLA 3.1.

CONSUMO DE O₂ EN PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES DE *C. fasciculata*

Fracción	Actividad (nmol O ₂ /min.mg)		
	-succinato	+succinato	+succinato +ADP
Mitocondrias	0	0.021	0,028
A-partíc. 30 seg.	0	0,020	0,020
A-partíc. 30 seg. + oligomicina	0	0,016	0,016
A-partíc. 4 min.	0	0,025	0,025
A-partíc. 4 min. + oligomicina	0	0,066	0,066

El consumo de oxígeno se midió por el método polarográfico. la concentración de proteína utilizada fue 2 - 2,5 mg/ml, succinato 10 mM, ADP 0,24 mM y oligomicina 0,2 µg/ml. Otras condiciones experimentales se detallan en el texto.

Se realizó el análisis espectral de las A-partículas obtenidas por dos pulsos de 30 seg. de sonicación, suspendidas en buffer fosfato 100 mM, pH: 7,4. La determinación se llevó a cabo a temperatura ambiente en celdas de 5 mm de paso óptico, en un espectrofotómetro Aminco-Dwza UV/Vis en el modo de doble haz, con un ancho mecánico de ranura de 0,3 nm. en presencia de dititionito como agente reductor. Como se observa en la Figura 3.1. el espectro obtenido mostró dos picos de máxima absorbancia a 430 y 570 nm y un hombro a 540 nm, todos ellos característicos de la presencia del citocromo b en la preparación de membrana (Lemberg, 1973).

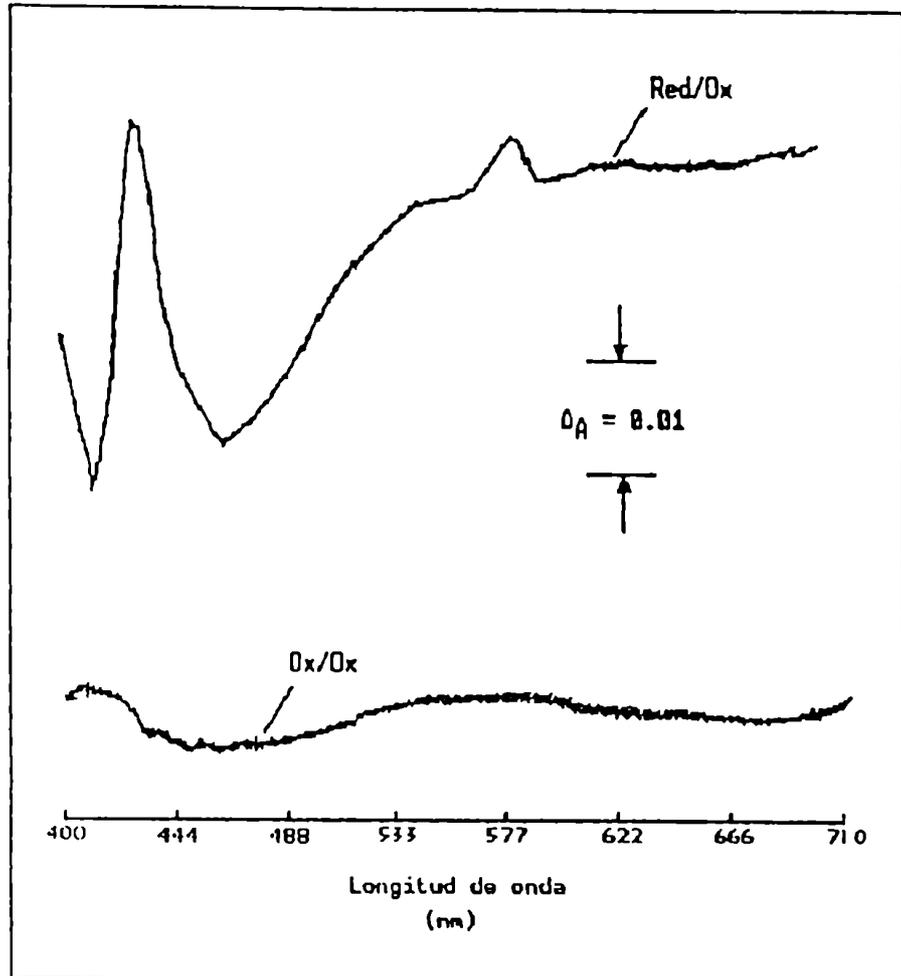


FIGURA 3.1. Espectro diferencial RED/OX de partículas submitocondriales de *C. fasciculata* obtenidas por sonicación durante 4 min. La concentración de proteína utilizada fue 10,9 mg/ml. Otras condiciones se detallan en el texto.

3.2. Obtención de AS-partículas de *T.cruzi* y *C.fasciculata*

La presencia del inhibidor proteico en la enzima H^+ -ATPasa puede demostrarse aumentando la actividad de hidrólisis de ATP por desplazamiento de IF_1 de su sitio de acción. La enzima unida a membrana, al ser filtrada a través de una columna de Sephadex G-50, aumenta su actividad específica, tal como lo demostraron Horstman y Racker (1970) para la enzima de mamífero.

A los efectos de evidenciar la presencia del IF_1 en la H^+ -ATPasa de tripanosomatídeos, se realizó el siguiente experimento.

Las partículas submitocondriales (A-partículas) obtenidas por sonicación de la fracción mitocondrial de *T.cruzi* o de *C.fasciculata* fueron suspendidas en buffer Tris- SO_4 30 mM, pH: 9,2; KCl 0,25 mM, EDTA 2 mM y sacarosa 75 mM (TESK). En una columna de Sephadex G-50 equilibrada con buffer de suspensión de partículas, se sembraron 0,5-0,6 ml de A-partículas, se eluyó con flujo inverso a una velocidad de 2 ml/5 min, durante el transcurso de la filtración la velocidad del flujo fue disminuyendo debido a las características de la muestra sembrada.

La Figura 3.2. representa el perfil de elución de una columna tipo de filtración de A-partículas de *T.cruzi* y *C.fasciculata*. En las fracciones recogidas se determinó

actividad enzimática por el método espectrofotométrico, la cual se distribuyó en un pico relativamente simétrico.

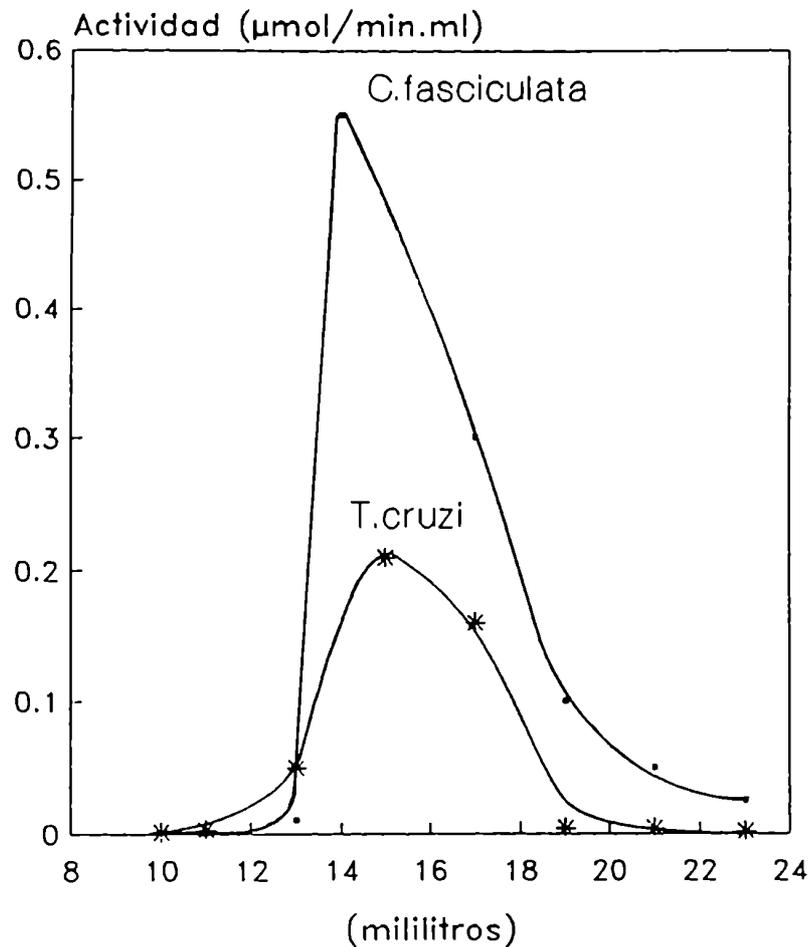


FIGURA 3.2. Filtración en gel de Sephadex G-50 de A-partículas. Se sembraron 0,5-0,6 ml de partículas submitocondriales de: (*) *T. cruzi* (4,0 mg de proteína) o (·) *C. fasciculata* (4,5 mg de proteína), suspendidas en buffer TEKS en una columna de 1,6 x 21 cm previamente equilibrada con el mismo buffer. Se recogieron fracciones de 2 ml a una velocidad inicial de elución aproximada de 2 ml/5 min. y se midió actividad de hidrólisis de ATP.

Como consecuencia de la retención de IF₁ en el gel debido a su estructura peptídica y peso molecular, el cual oscila entre 8000 y 15000, las AS-partículas obtenidas presentaron una activación de 3,5 (*T.cruzi*) o 3,9 (*C.fasciculata*) veces la actividad inicial sembrada (Tabla 3.2).

TABLA 3.2.

ACTIVACION DE LA H⁺-ATPasa DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES
POR FILTRACION EN GEL DE SEPHADEX G-50

Fracción	Actividad ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$)	
	<i>T.cruzi</i>	<i>C.fasciculata</i>
Mitocondrial	0,20	0,12
Partículas	0,22 (1,1)	0,14 (1,1)
Sephadex G-50	0,70 (3,5)	0,55 (3,9)

Las condiciones experimentales se detallan en la Figura 3.2. Los valores entre paréntesis representan la activación

En las Tablas 3.3 y 3.4 se observa que las partículas de *T.cruzi* y *C.fasciculata* al ser incubadas con oligomicina en una relación 25 µg/mg de proteína, durante 20 min. a 25°C presentan un 20-24% de inhibición de la actividad de la enzima H⁺-ATPasa.

TABLA 3.3.

SENSIBILIDAD A LA OLIGOMICINA DE LA H⁺-ATPasa DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES *T.cruzi*

Partículas	Actividad (µmol/min.mg)	Inhibición (%)
A-partículas	0,20	0
A-partículas +oligomicina	0,16	20
AS-partículas	0,63	0
AS-partículas +oligomicina	0,48	24

Las partículas submitocondriales se incubaron con oligomicina en una relación 25 µg/mg de proteína, durante 20 min. a 25°C en buffer de medida de actividad de hidrólisis de ATP, en un volumen final de 0,1 ml.

TABLA 3.4.

SENSIBILIDAD A LA OLIGOMICINA DE LA H⁺-ATPasa DE PARTICULAS
SUBMITOCONDRIALES *C. fasciculata*

Partículas	Actividad ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$)	Inhibición (%)
A-partículas	0,18	0
A-partículas +oligomicina	0,14	23
AS-partículas	0,61	0
AS-partículas +oligomicina	0,49	20

Las partículas submitocondriales se incubaron con oligomicina en una relación 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, durante 20 min. a 25°C en buffer de medida de actividad de hidrólisis de ATP, en un volumen final de 0,1 ml.

3.3. Obtención de IF₁ de mitocondria de Tripanosomatídeos

El inhibidor peptídico de la enzima H⁺-ATPasa (IF₁), fue aislado y caracterizado por primera vez, de mitocondria de corazón bovino, por Pullman y Monroy en 1963. Desde entonces fueron purificados IF₁ de mitocondria de hígado de rata (Chan, 1976; Cintrón, 1979b), levadura (Ebner, 1977), cloroplastos (Spitsberg, 1979) y bacterias (Kagawa, 1978). Hasta el presente no se había demostrado la presencia de IF₁ en la enzima H⁺-ATPasa mitocondrial de tripanosomatídeos. La obtención del mismo se realizó por dos métodos, uno utilizando la técnica empleada por Lang y Racker (1974) para el inhibidor de mamífero con algunas modificaciones y otro por filtración en gel de Sephadex G-50.

3.3.1. Obtención de IF₁ de mitocondria de parásito por el método de Lang y Racker modificado.

La obtención de IF₁ de *T.cruzi* y *C.fasciculata* se realizó como se describió en métodos para la obtención de IF₁ de mitocondrias hepáticas con las siguientes modificaciones:

El primer paso consistió en obtener las partículas submitocondriales en buffer pirofosfato. La fracción mitocondrial de parásito se suspendió en buffer pirofosfato 10 mM, pH: 7,4 en una concentración final de 20 mg/ml; se sonicó a 40 watt cuatro veces, durante un minuto cada vez, con

intervalos de 30 segundos. La fracción obtenida se centrifugó a 26000 g durante 15 minutos, se descartó el sedimento y el sobrenadante se centrifugó a 105000 g durante 45 minutos. El sedimento obtenido (P-partículas) se suspendió en sacarosa 250 mM.

Posteriormente se realizó fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de las P-partículas para la obtención de la H^+ -ATPasa. Las partículas obtenidas anteriormente se diluyeron al 50% con buffer Tris- SO_4 20 mM, pH: 7,5; EDTA 1 mM, MgSO_4 2 mM, DTT 1 mM (buffer TEMED). El extracto obtenido se sometió a un fraccionamiento con solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH: 7,5 con EDTA 1mM, hasta 20% de saturación, se agregó colato de sodio hasta una concentración de 1,5% (p/v), se agitó 7 min. más y centrifugó a 12600 g durante 1 h. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se trató nuevamente con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta 38% de saturación, se agitó 5 min. y centrifugó a 32000 g 15 min. A diferencia de lo que ocurre con A-partículas hepáticas, no se observó precipitación cuando se repitió el tratamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para la precipitación de la fracción proteica correspondiente al 45% de saturación. Por tal motivo, para eliminar el exceso de sal, se dializó la preparación contra Tris- H_2SO_4 10 mM, pH: 7,4, EDTA 1 mM, durante 12 hs a 4°C.

Por último se procedió al aislamiento del inhibidor por calentamiento y precipitación alcohólica. El dializado se calentó a 75°C durante 5 min. y se centrifugó a 12000 g durante 15 min. El precipitado se descartó y al sobrenadante

se le agregó etanol hasta 75% (v/v) de saturación, se agitó durante 10 min. y centrifugó a 12000 g 15 min. El precipitado obtenido, fracción proteica rica en IF₁, se suspendió en Tris-HCl 5 mM, pH: 8,0 y se congeló fraccionado a -70°C.

En una preparación tipo a partir de 10 g de células se obtuvieron aproximadamente 100-120 µg de fracción proteica rica en IF₁.

En la Tabla 3.5 y 3.6 figuran los valores de inhibición obtenidos con IF₁ de *C.fasciculata* y *T.cruzi* respectivamente parcialmente purificados. La determinación de actividad del inhibidor proteico se realizó por el método detallado posteriormente en 3.4.E.

Los extractos de IF₁ parcialmente purificados fueron sometidos a un posterior proceso de purificación que incluyó un paso de filtración por gel, similar al realizado por Cintrón y Pedersen (1979a).

Se utilizó una columna de Sephadex G-75 de 1 x 5,8 cm, equilibrada con buffer fosfato 20 mM, pH: 6,7, EGTA 1 mM, DTT 1 mM. Se sembraron 200 µl de la muestra de IF₁ de *C.fasciculata* (2 mg/ml), se eluyó a una velocidad aproximada de 1 ml/min y se recogieron 40 ml. Posteriormente, para aumentar la fuerza iónica, se cambió el buffer por fosfato 0,5 M, pH: 6,7, EGTA 1 mM, DTT 1 mM y se recogieron las muestras a la misma velocidad de elución. En las fracciones obtenidas se determinó proteínas espectrofotométricamente a 280 nm.

TABLA 3.5.

INHIBICION DE LA H⁺-ATPasa EN AS-PARTICULAS DE *C.fasciculata*
CON IF₁ DE *C.fasciculata*

Adiciones	Inhibición (%)	Purificación (veces)
Ninguna	0	-
IF ₁ * (14,3 µg)	26	1
IF ₁ ** (5,8 µg)	10	1

Se incubaron 1,4 µg de enzima durante 10 min. a 30°C con inhibidor proteico de *C.fasciculata*. Otras condiciones experimentales se detallan en el texto.
IF₁*: inhibidor parcialmente purificado obtenido por calentamiento y precipitación alcohólica.
IF₁** : inhibidor posteriormente filtrado a través de columna de Sephadex G-75.

En la Figura 3.3 se observa el perfil de elución de la columna. Las cuatro fracciones correspondientes a los picos máximos de absorbancia se dializaron contra fosfato 10 mM, pH: 6,7, EGTA 1 mM y se concentró por precipitación alcohólica. Las muestras se resuspendieron en un volumen mínimo de Tris-HCl 5 mM, pH: 8,0 y se midió actividad del inhibidor. El pico de proteínas recogido entre 57 y 63 ml fue el que presentó actividad de inhibidor, la cual se determinó por la técnica descrita posteriormente en 3.4.E. Como se

observa en la Tabla 3.5 en las condiciones estudiadas no se logró incrementar la actividad específica, lo cual no justifica la inclusión de este paso en la secuencia de purificación.

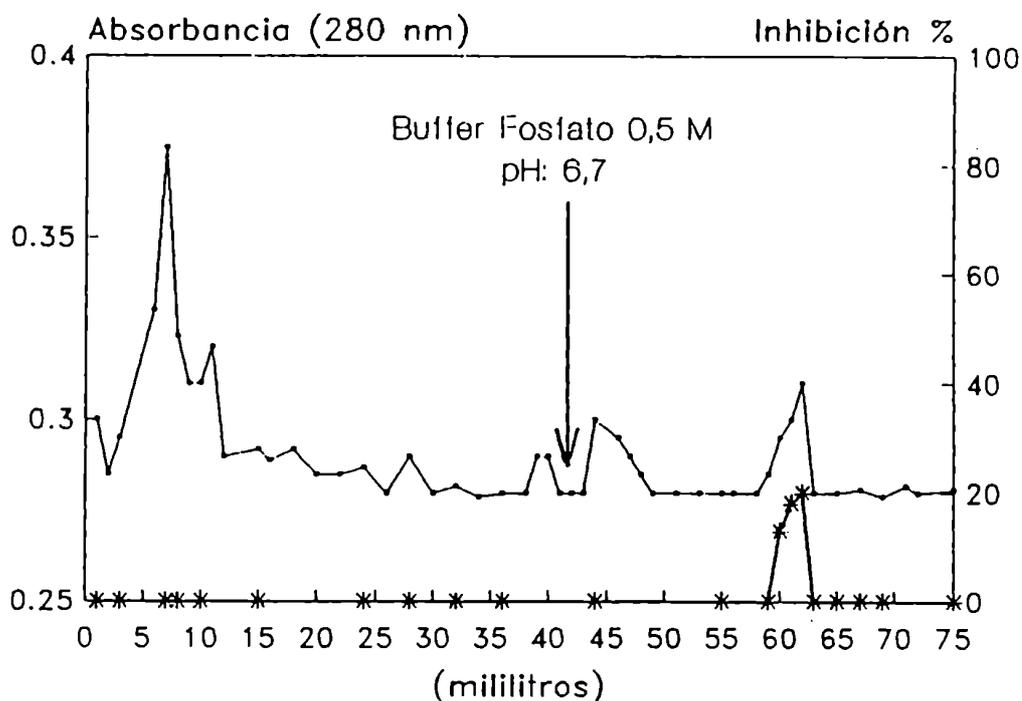


FIGURA 3.3. Purificación de IF₁ de *C. fasciculata* por filtración en Sephadex G-75. Se sembraron 200 μ l de IF₁ de *C. fasciculata* (2 mg/ml) obtenido por el método de Racker modificado en una columna de 1 x 5,8 cm. equilibrada con buffer fosfato 20 mM de pH: 6,7, EGTA 1 mM y DTT 1 mM. Se recolectaron muestras de 1,5 ml a una velocidad de 1 ml/min. Donde se indica (flecha) se cambió el buffer por fosfato 0,5 M pH: 6,7, EGTA 1 mM y DTT 1 mM. El perfil de elución se determinó por el contenido de proteínas a 280 nm (·) y la actividad de IF₁ por el % de inhibición de la H⁺-ATPasa de *C. fasciculata* por el método espectrofotométrico (*).

3.3.2. Obtención de IF₁ por filtración en Sephadex G-50 de partículas submitocondriales.

Resultados preliminares demostraron la posibilidad de eluir de la columna de Sephadex G-50, utilizada para obtener partículas activadas, la fracción proteica retenida en la cual se encuentra el IF₁ desplazado de la enzima. En la Figura 3.4 se observa un típico perfil de elución de AS-partículas de *T.cruzi* y un segundo pico relativamente simétrico de proteína, medido a 280 nm, obtenido luego de cambiar el buffer de elución por uno de mayor fuerza iónica. Se juntaron las fracciones y se sometió a tratamiento por calor y posterior precipitación alcohólica para el aislamiento del inhibidor. En la fracción proteica así obtenida se midió actividad de inhibidor por la técnica detallada en 3.4.E., y no se obtuvo inhibición de la actividad de ATPasa.

Teniendo en cuenta la técnica de purificación del inhibidor publicada por Cintrón y Pedersen (1979a), se decidió agregar al buffer de elución de la fracción proteica retenida en la columna de Sephadex G-50, EGTA para evitar la interferencia de cationes y DTT para prevenir la posible oxidación de grupos sulfhidrilos.

Se sembraron A-partículas de *T.cruzi* en una columna de Sephadex G-50 de 1,6 x 21 cm equilibrada con buffer TEKS, se recogieron 30 ml con una velocidad de elución de 2 ml/3 min. y se midió actividad enzimática.

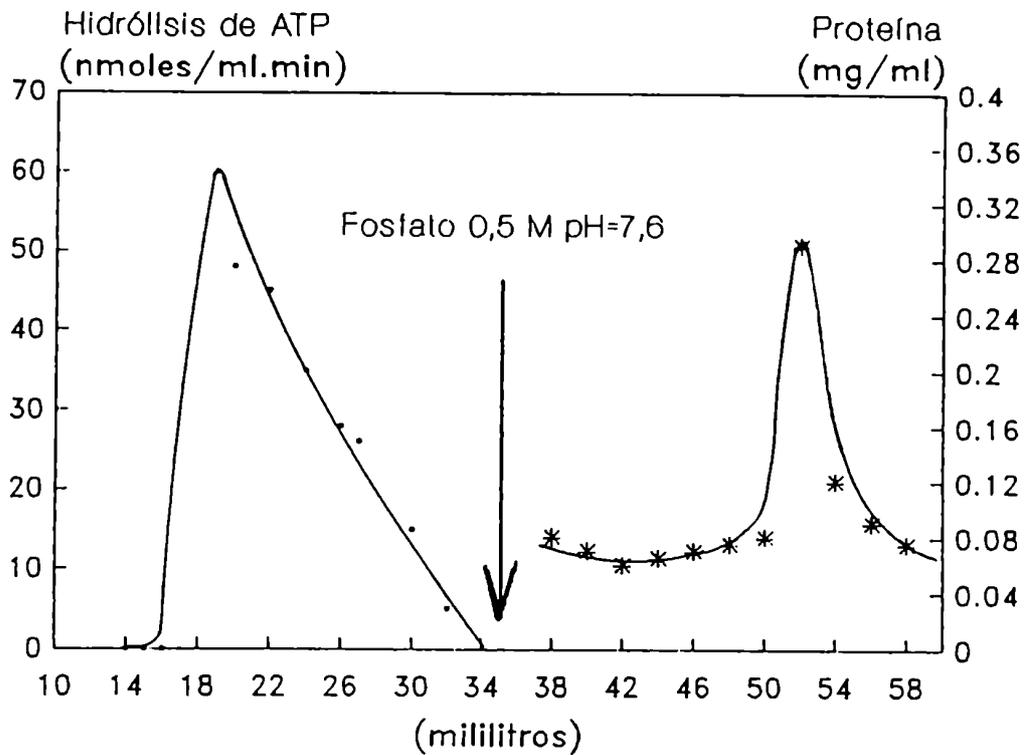


FIGURA 3.4. Filtración en gel de Sephadex G-50 de A-partículas de *T. cruzi*. 0,5 ml de partículas (4 mg) suspendidas en TEKS, se sembraron en una columna de 1,6 x 21 cm. Volumen de recolección 2 ml, velocidad inicial de elución 2 ml/5 min. Se midió actividad de hidrólisis de ATP por el método espectrofotométrico (·). Donde se indica (flecha) la columna se eluyó con buffer fosfato 0,5 M pH: 7,5 y se determinó el contenido de proteínas a 280 nm (*). Otras condiciones experimentales se detallan en el texto.

Las partículas obtenidas presentaron una activación de 3 veces la actividad sembrada. El IF₁ retenido en la columna fue eluído por aumento de la fuerza iónica con el agregado de buffer fosfato 0,5 M, pH: 6,7; EDTA 1 mM, DTT 1 mM. Se recogieron fracciones de 2 ml aproximadamente, en las cuales se midió absorbancia a 280 nm (Figura 3.5).

Se juntaron las fracciones que contenían proteínas, se dializó contra Tris-H₂SO₄ 40 mM, pH: 7,5, EDTA 1 mM, MgSO₄ 4 mM, DTT 2 mM. El dializado se calentó a 75°C durante 5 min. y se centrifugó a 12000 g durante 15 min. El precipitado se descartó y al sobrenadante se le agregó etanol hasta 75% (v/v) de saturación, se agitó durante 10 min. y centrifugó a 12000 g 15 min. El precipitado obtenido, fracción proteica rica en IF₁, se suspendió en Tris-HCl 5 mM, pH: 8,0 y se congeló a -70°C. En la Tabla 3.6 se observa que la actividad específica del inhibidor de *T.cruzi* obtenido de columna fue mayor que la del obtenido por el método descrito anteriormente.

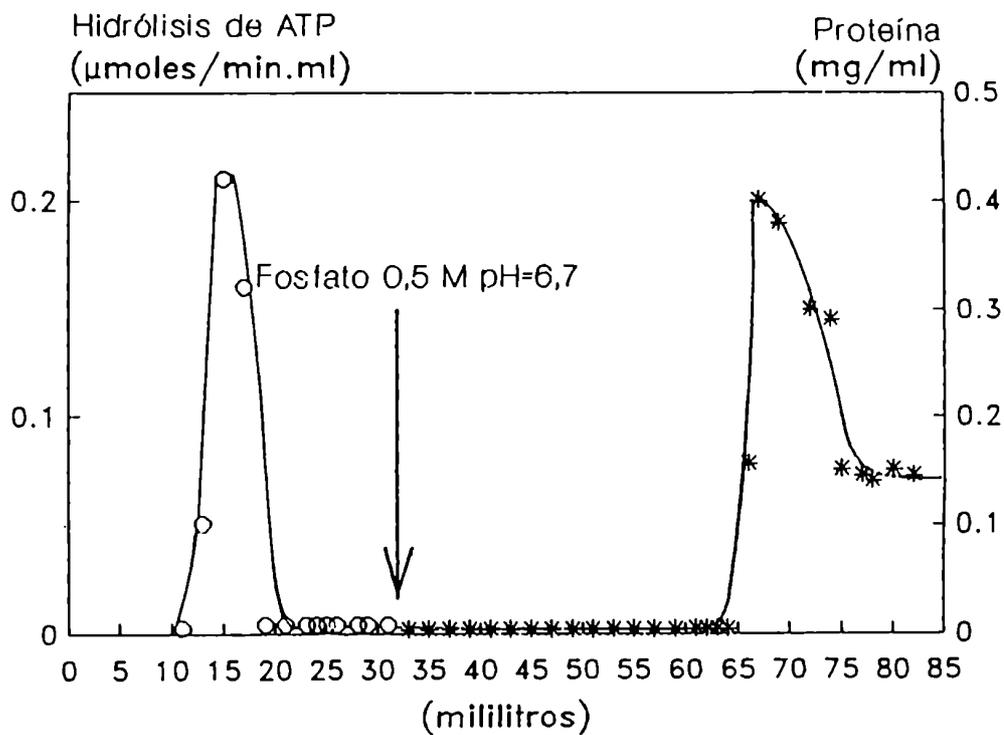


FIGURA 3.5. Obtención de IF₁ de *T. cruzi* por elución de la columna de Sephadex G-50. Las condiciones experimentales se detallan en la Figura 3.4, excepto para el buffer fosfato 0,5 M de pH: 6,7 con EDTA 1 mM y DTT 1 mM. (o) Actividad de hidrólisis de ATP. (*) Proteína.

TABLA 3.6.

INHIBICION DE LA H⁺-ATPasa EN AS-PARTICULAS DE *C. fasciculata*
CON IF₁ DE *T. cruzi*

Adiciones	Inhibición (%)	Purificación (veces)
Ninguna	0	-
IF ₁ * (10,4 µg)	24	1
IF ₁ ** (4,8 µg)	20	2

Se incubaron 0,8 µg de enzima durante 10 min. a 30°C con inhibidor proteico obtenido por distintos métodos. Otras condiciones experimentales se detallan en el texto.

IF₁*: inhibidor obtenido por el método de Racker modificado.

IF₁** : inhibidor obtenido de la columna de Sephadex G-50.

3.4. Determinación de la actividad de IF_1 de *T.cruzi* y de *C.fasciculata*

Se estudió la inhibición de IF_1 sobre la actividad de hidrólisis de ATP de la H^+ -ATPasa mitocondrial de tripanosomatídeos, en distintas condiciones experimentales a los efectos de poder establecer las condiciones óptimas y lograr estandarizar el método de medida.

La medida de actividad de la H^+ -ATPasa se realizó por el método espectrofotométrico midiendo a 340 nm la concentración de ADP formado, acoplado a la oxidación del NADH mediante el sistema piruvato quinasa-lactato deshidrogenasa, tal como se describió en métodos, en un volumen final de 0,5 ml. En todos los casos se preincubó la enzima con inhibidor durante 10 min. a 30°C, antes de iniciarse la medida de la actividad por el agregado del sustrato.

A continuación se detallan las distintas condiciones experimentadas:

A.- La primera condición ensayada se basó en preincubar la enzima con IF_1 directamente en el medio de reacción (volumen final 0,5 ml). Transcurrido los 10 min. de incubación se agregó ATP para dar comienzo a la reacción. En estas condiciones no se observó inhibición, presumiblemente debido al gran volumen de preincubación para la baja cantidad de proteína utilizada, lo que disminuyó la probabilidad de interacción de la enzima con IF_1 (Tabla 3.7.A).

B.- Para favorecer la interacción del inhibidor con la enzima se redujo el volumen de preincubación a 0,1 ml utilizando un medio de reacción que contenía Tris-HCl 50 mM, pH: 7,4; sacarosa 200 mM; y se incorporó ATP-Mg 20 μ M para estimular la actividad de hidrólisis (Gómez-Fernández, 1978), fosfoenolpiruvato 2 mM y piruvato quinasa 10 UI, para regenerar el ADP formado. Luego de transcurrida la preincubación, se dio comienzo a la reacción con el agregado de 0,4 ml de medio de reacción y de ATP. En estas condiciones tampoco se observó inhibición (Tabla 3.7.B).

C.- En condiciones similares a las descritas en B, pero aumentando la concentración de ATP-Mg a 1 mM durante la preincubación, tampoco se observó inhibición (Tabla 3.7.C). Los resultados obtenidos indicaban la posibilidad de que, al aumentar el volumen para medir actividad enzimática, se disocie el complejo enzima-inhibidor, no permitiendo registrar la inhibición.

D.- Con el fin de establecer la cantidad de ADP acumulado durante la preincubación, se repitieron las condiciones de C, pero en ausencia del sistema regenerante de ATP (fosfoenolpiruvato y piruvato quinasa). En estas condiciones se observó que, en presencia de IF_1 , la cantidad de ADP acumulado era menor, lo que se puso en evidencia por la escasa oxidación del NADH producida al agregar los 0,4 ml de medio de reacción. Estos resultados nos permitieron establecer la existencia de inhibición durante la preincubación (Tabla 3.7.D).

E.- En condiciones similares a D, pero reemplazando el buffer Tris por MOPS 10 mM, pH: 6,6 y disminuyendo el volumen de preincubación a 0,07 ml, se observó mayor inhibición (Tabla 3.7.E).

Por lo tanto las condiciones establecidas de incubación de la enzima con el inhibidor fueron las siguientes: 1,0-2,0 μ g de AS-partículas se incubaron con IF₁ a 30°C durante 10 min., en un medio que contenía MOPS 10 mM, pH: 6,6, sacarosa 100 mM, ATP-Mg 1 mM, en un volumen final de 0,070 ml (Figura 3.6.A).

Los controles se realizaron reemplazando IF₁ por Tris-HCl 5 mM, pH: 8,0, medio en el cual se encontraba suspendido el inhibidor. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió actividad de hidrólisis de ATP.

TABLA 3.7.

CONDICIONES DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE IF₁ EN
H⁺-ATPasa DE *C.fasciculata*.

	Condiciones de incubación	Actividad (%)	Inhibición (%)
A-	ATP-Mg 1 mM Medio de reacción*	100	0
B-	ATP-Mg 20 μM Tris-HCl pH:7,4 + SR	100	0
C-	ATP-Mg 1 mM Tris-HCl pH:7,4 + SR	100	0
D-	ATP-Mg 1 mM Tris-HCl pH:7,4 - SR	50**	50
E-	ATP-Mg 1 mM MOPS pH:6,6 - SR	0**	100

SR: sistema regenerante de ATP.

* : volumen de incubación 0,5 ml

** : actividad enzimática durante la incubación

Se utilizaron 1,5 μg de AS-partículas y 30 μg de IF₁ de *C.fasciculata*, obtenido por el método de Racker modificado. Otras condiciones experimentales se detallan en el texto.

En un volumen de 0,425 ml de medio de reacción de actividad de H⁺-ATPasa que contenía: Tris-HCl 0,05 M, pH: 7,4, sacarosa 200 mM, MgCl₂ 2 mM, fosfoenolpiruvato 2 mM, piruvato quinasa 10 UI, lactato deshidrogenasa 10 UI, NADH 0,2 mM de absorbancia conocida (Figura 3.6.B y 3.7- Abs.i), se agregó 0,070 ml de mezcla de incubación (AS-partículas ± IF₁), lo que produjo una disminución de la absorbancia del NADH (Figura 3.6.C y 3.7-Abs.f), debido a la acumulación de ADP durante la incubación, dependiendo su concentración de la actividad de la H⁺-ATPasa.

La actividad de la H⁺-ATPasa en el medio de reacción (actividad remanente) se midió iniciando la reacción por el agregado de ATP 1 mM (Figura 3.6.D y 3.7). Cabe hacer notar que la inhibición producida durante la incubación se revierte por dilución en el medio de reacción. El cálculo de la actividad incluye la variación de absorbancia registrada como resultado del cambio de volumen producido al ser incorporada la mezcla de incubación al medio de medida (Figura 3.7.C).

El cálculo de la actividad de la enzima durante la incubación se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad } (\mu\text{mol}/10 \text{ min} \times \text{ml}) = \frac{(\text{Abs } i - \text{Abs dil}) - \text{Abs } f}{E} \times D$$

Donde: Abs i: absorbancia inicial; Abs dil: absorbancia producida por dilución del NADH; Abs f: absorbancia final (Figura 3.7). E: coeficiente de extinción molar del NADH, 6,22 cm⁻¹ M⁻¹; D: dilución de AS-partículas.

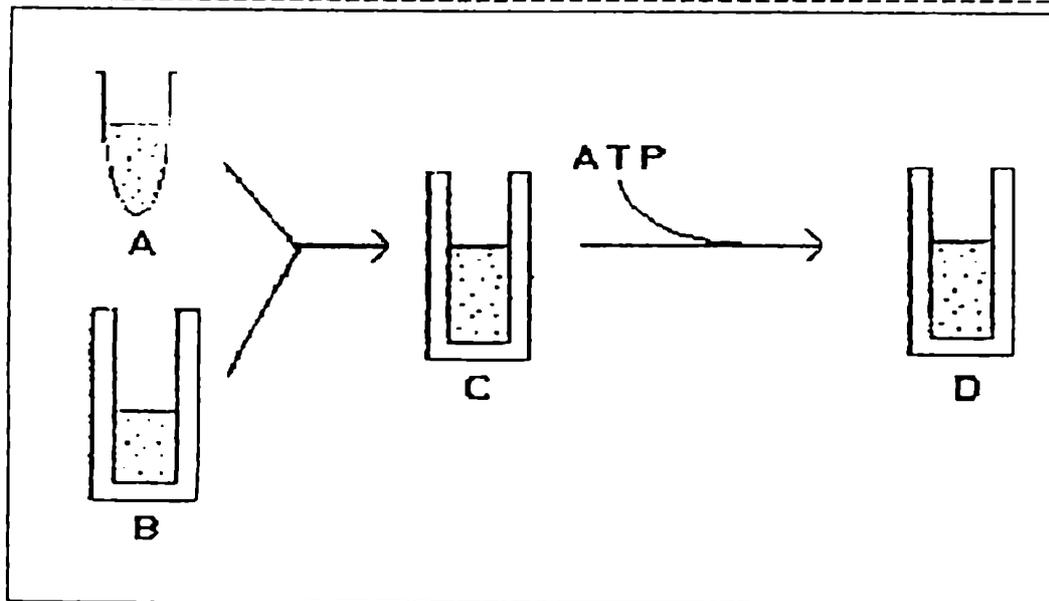


FIGURA 3.6. Esquema de trabajo para la determinación de la inhibición de la H⁺-ATPasa con IF₁ por el método espectrofotométrico a 340 nm.

A- Mezcla de incubación: AS-partículas ± IF₁, en buffer MOPS 10 mM pH: 6,6, ATP-Mg 1 mM, a 30°C durante 10 min, en un volumen final 0,070 ml.

B- Medio de reacción: Tris-HCl 50 mM pH: 7,4, sacarosa 0,2 M, MgCl₂ 2 mM, PEP 2 mM, PK 10 U, LDH 10 U, NADH 2 mM, volumen final 0,425 ml. Absorbancia conocida a 340 nm: Abs i.

C- Medio de reacción mas la mezcla de incubación, volumen final 0,495 ml. Nueva absorbancia a 340 nm: Abs f.

D- Agregado de ATP al medio C, volumen final 0,5 ml, se mide la actividad remanente de la enzima.

Otras condiciones experimentales se detallan en el texto.

En la Figura 3.7 se observa un típico experimento de inhibición donde las AS-partículas incubadas sin inhibidor, al ser agregadas al medio de medida, disminuyeron la absorbancia en 0,75 unidades, mientras que las partículas incubadas con inhibidor causaron una disminución de 0,10 unidades. En ambos casos se restó la variación de absorbancia por dilución del medio de medida. El porcentaje de inhibición calculado es 85%.

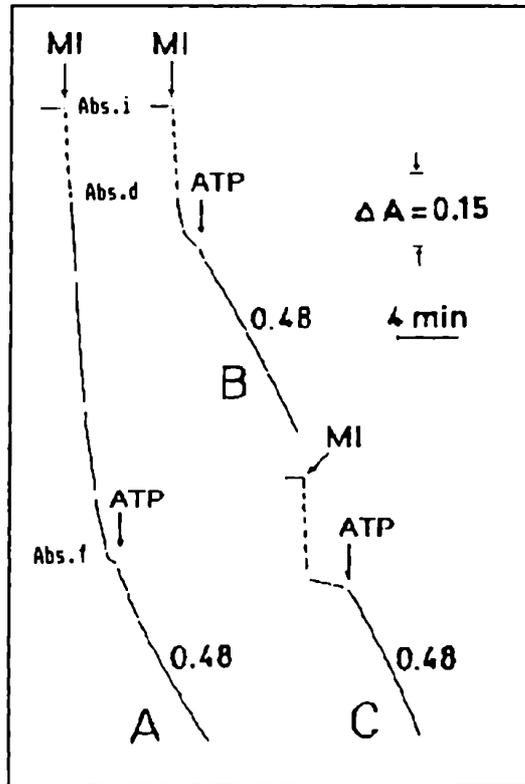


FIGURA 3.7. Inhibición de la H^+ -ATPasa de *C.fasciculata* por IF_1 homólogo. Las distintas mezclas de incubación (MI), contenían lo siguiente:
 Muestra A: 1,5 μg de AS-partículas, buffer MOPS 10 mM pH: 6,6 y ATP-Mg 0,7 mM, en un volumen de 70 μl . Muestra B: igual a A mas 24 μg de IF_1 de *C.fasciculata*. Muestra C: idéntica a B sin ATP-Mg. Donde se indica con flechas se agregó ATP 1 mM. Las líneas de puntos representan la disminución de absorbancia debido a la dilución del medio de reacción. Abs i: absorbancia inicial; Abs d: absorbancia por dilución; Abs f: absorbancia final por ADP acumulado durante la incubación. Los valores de actividad remanente se expresan en $\mu mol/min.ml$.

3.5. Filtración de IF₁ de *T.cruzi* por HPLC

Los extractos de IF₁ de *T.cruzi* parcialmente purificados fueron sometidos a un proceso de filtración por HPLC. El extracto proveniente de la precipitación alcohólica se sembró en una columna de HPLC-C₁₈ de fase reversa. Se eluyó a una velocidad de 1 ml/min con un gradiente de acetonitrilo (10-60%) en presencia de 0,1% de trifluoroacetato durante 60 min. aproximadamente. En las fracciones recogidas se determinó la absorbancia a 220 nm. Las condiciones experimentadas fueron las mismas que las utilizadas por Dianoux (1986) para el inhibidor de *Cándida utilis*.

En la Figura 3.8 se observa el perfil de elución de IF₁ de *T.cruzi*. En las dos fracciones correspondientes a los picos máximos de absorbancia, previamente liofilizadas y suspendidas en buffer Tris-HCl 5 mM, pH:8,0; se midió la actividad del inhibidor. La muestra correspondiente a la fracción que eluyó a 35% (v/v) de acetonitrilo presentó actividad de inhibidor. 10 µg de IF₁ obtenidos por HPLC inhiben un 44% la actividad de 0,8 µg de H⁺-ATPasa de *C.fasciculata*.

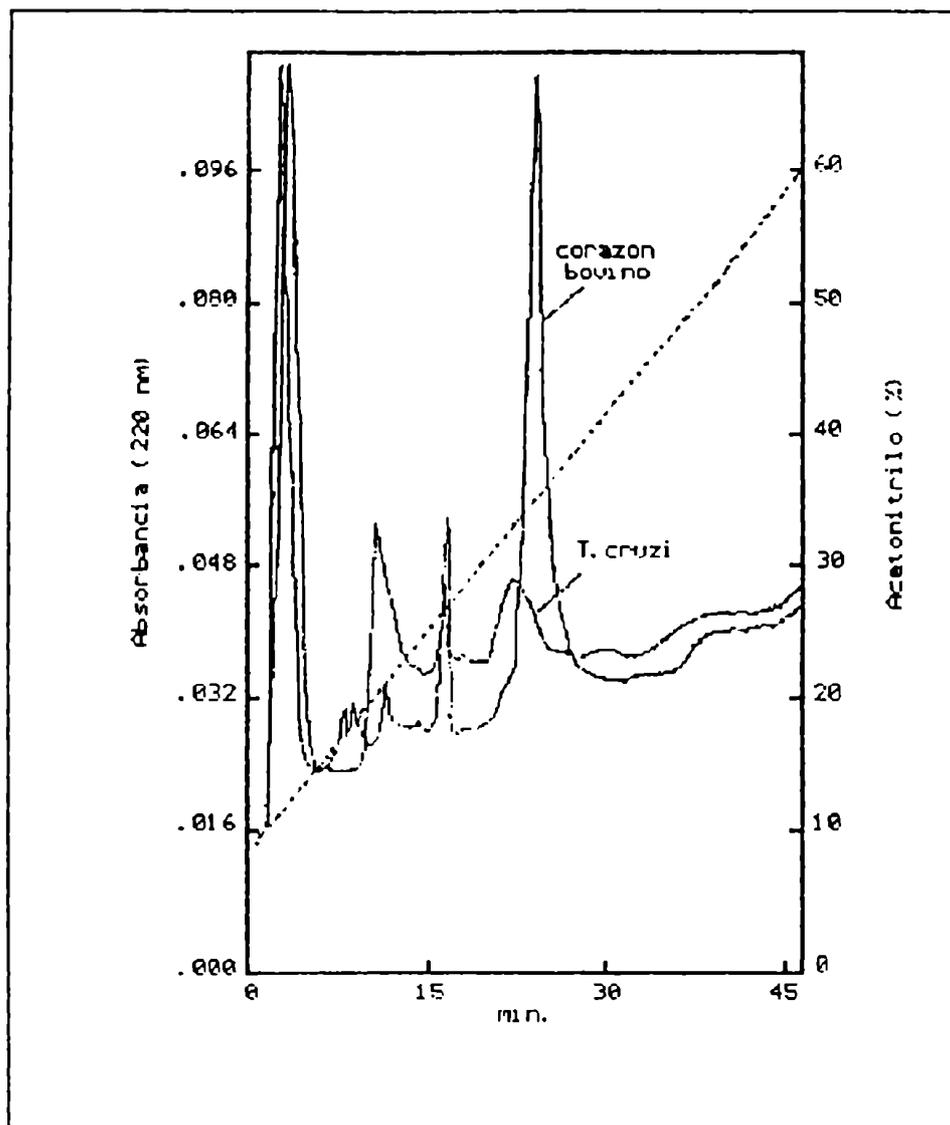


FIGURA 3.8. Filtración de IF₁ de *T.cruzi* y corazón bovino, a través de columna de HPLC. En una columna de HPLC-C₁₈ de fase reversa se sembraron 120 µl de IF₁ de *T.cruzi* (0,5 mg/ml), se eluyó con gradiente de acetonitrilo (10 - 60 %) en presencia de TFA (0,1 %), se recogieron fracciones de 1 ml a una velocidad de 1 ml/min y se midió absorbancia a 220 nm. Como control se sembraron 100 µl de IF₁ de corazón bovino (0,6 mg/ml). Otras condiciones experimentales se detallan en métodos.

Paralelamente se realizó la filtración por HPLC al IF₁ obtenido de corazón bovino. La Figura 3.8 muestra que el IF₁ de mamífero (60 µg) eluyó aproximadamente a 38% (v/v) de acetonitrilo.

Los valores de elución obtenidos son similares a los descritos en la literatura para inhibidores de otros orígenes (Tabla 3.8).

TABLA 3.8.

VALORES DE GRADIENTE DE ACETONITRILLO ALCANZADOS EN LA ELUCIÓN DE IF₁

IF ₁ origen	Acetonitrilo (%)
<i>T. cruzi</i>	35
Corazón bovino	38
Levadura	38,5*
Corazón bovino	35*

* Dianoux A.C. (1986)

Las condiciones experimentales se detallan en la Figura 3.15

3.6. Inactivación de IF₁ de *C.fasciculata* por acción de la tripsina

Una de las propiedades del inhibidor proteico es su alta sensibilidad a la acción de la tripsina, la cual debido a su actividad proteolítica, inactiva al inhibidor impidiendo que el mismo actúe sobre la enzima H⁺-ATPasa (Pullman, 1963).

Con el objeto de establecer si el inhibidor de la enzima H⁺-ATPasa de tripanosomatídeos es sensible a la inactivación por tripsina, se incubó IF₁ de *C.fasciculata* con tripsina en una relación 1:3, en un medio que contenía Tris-HCl 50 mM, pH: 8,8; durante 3 min. a 30°C, el inhibidor así tratado se incubó con su enzima homóloga y se midió actividad.

En la Tabla 3.9 se observa que la inhibición producida por IF₁ (B), se pierde totalmente en presencia de tripsina (C). La preincubación de la tripsina con inhibidor de tripsina, impide la digestión triptica de IF₁ observándose inhibición de la actividad en la H⁺-ATPasa (D). Es importante destacar que la tripsina por si misma produce la estimulación de la actividad de la H⁺-ATPasa (E), posiblemente debido a la remoción del IF₁ residual en las AS-partículas (Racker, 1967; Horstman, 1970).

Paralelamente en forma comparativa se realizó el mismo experimento con el inhibidor de hígado de rata (HIF₁) (Tabla 3.10). La acción de la tripsina sobre HIF₁ fue similar a lo observado para el inhibidor de *C.fasciculata*.

TABLA 3.9.

ACCION DE LA TRIPSINA SOBRE IF₁ DE *C. fasciculata*

Adiciones	Hidrólisis de ATP en la incubación (nmol/10 min)	Inhibición (%)
A- Ninguna	24,8	-
B- IF ₁	16,0	36
C- IF ₁ + Tripsina	25,1	-3
D- IF ₁ + Tripsina + inhibidor de tripsina	17,7	29
E- Tripsina	29,8	-19

El medio de incubación de las muestras A-E contenía AS-partículas de *C. fasciculata* (0,8 µg), MOPS 10 mM, pH: 6,6, sacarosa 100 mM, MgATP 0,7 mM con las siguientes adiciones: A- ninguna; B- Inhibidor proteico (IF₁) de *C. fasciculata* (30 µg); C- IF₁ previamente tratado con tripsina (120 µg) en 50 µl de buffer Tris-HCl 50 mM, pH: 8,8 durante 3 min a 30°C; D- idéntico a C excepto para tripsina que fue previamente incubada con su inhibidor (650 µg) en 8,0 µl de Tris-HCl pH: 8,8, durante 3 min a 30°C; E- idéntico a C, pero sin IF₁. Otras condiciones se describen en el texto.

TABLA 3.10.

ACCION DE LA TRIPSINA SOBRE IF₁ DE ORIGEN HEPATICO

Adiciones	Hidrólisis de ATP en la incubación (nmol/10 min)	Inhibición (%)
A- Ninguna	45,0	-
B- IF ₁	3,3	92
C- IF ₁ + Tripsina	28,2	40
D- IF ₁ + Tripsina + inhibidor de tripsina	15,0	77
E- Tripsina	46,5	-3

El medio de incubación de las muestras A-E contenía AS-partículas de *C.fasciculata* (1,5 µg). El inhibidor proteico utilizado (IF₁) era de origen hepático (24 µg). Se utilizó 60 µg de tripsina y 300 µg de inhibidor de tripsina. Las condiciones experimentales se describen en la Tabla 3.9.

3.7. Interacción entre IF₁ y la H⁺-ATPasa de partículas submitocondriales

Como se demostró en una gran variedad de organismos IF₁ modifica la cinética de la enzima H⁺-ATPasa, disminuyendo la velocidad de hidrólisis de ATP (Tuena de Gómez-Puyou, 1983). Con el objeto de estudiar de que manera el inhibidor de parásito interacciona con la H⁺-ATPasa y a fin de establecer analogías y diferencias con el inhibidor de mamífero, se realizaron experimentos de inhibición. Se llevaron a cabo incubaciones con el IF₁ y la H⁺-ATPasa de un mismo origen (interacciones homólogas) o utilizando IF₁ y enzima de orígenes distintos (interacciones heterólogas). Los experimentos se realizaron con AS-partículas, debido a que las mismas presentan mayor actividad de hidrólisis de ATP por carecer de IF₁.

3.7.1. Interacciones homólogas.

Se realizaron curvas de inhibición de la H⁺-ATPasa de *C.fasciculata* con su IF₁ homólogo, obteniéndose 85% de inhibición de la actividad enzimática con una relación de 80 µg de inhibidor/1,5 µg de proteína. Como se observa en la Figura 3.9, la cantidad necesaria de inhibidor para producir un 50% de inhibición enzimática (I₅₀) fue 50 µg.

La inhibición total de la actividad de la H⁺-ATPasa en

AS-partículas de *T.cruzi* se produjo por el agregado de 7,2 μg de IF_1 por 1,5 μg de enzima.

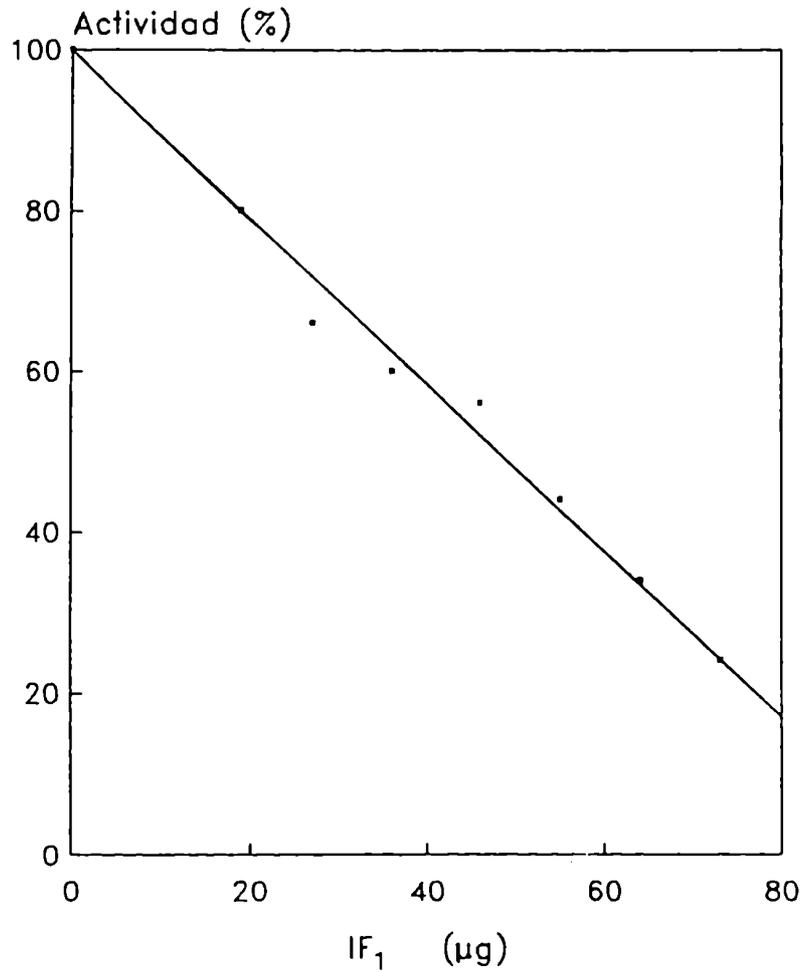


FIGURA 3.9. Curva de inhibición de la H^+ -ATPasa de AS-partículas de *C.fasciculata* con IF_1 homólogo. Se incubaron 1,5 μg de partículas con cantidades crecientes de IF_1 a 30°C durante 10 min, como se indica en la Figura 3.6.

3.7.2. Interacción heteróloga.

3.7.2.1. Interacción de IF₁ hepático con la enzima H⁺-ATPasa de *T.cruzi* y *C.fasciculata*:

El inhibidor proteico de la H⁺-ATPasa mitocondrial de hígado de rata (HIF₁), aislado por la técnica descrita métodos, se incubó en cantidades crecientes con AS-partículas de *T.cruzi* y *C.fasciculata*. Como se observa en la Figura 3.10, se obtuvo total inhibición de la enzima de *T.cruzi* con 16 µg de HIF₁ y 82% de inhibición de la enzima de *C.fasciculata* con 24 µg de HIF₁. Los I₅₀ calculados para HIF₁ fueron 2,5 y 7 µg con la enzima de *T.cruzi* y *C.fasciculata* respectivamente.

3.7.2.2. Interacción de IF₁ de *C.fasciculata* con la enzima H⁺-ATPasa de hígado de rata:

Como en los experimentos anteriores el grado de inhibición alcanzado en la actividad de la H⁺-ATPasa de hepatocito, fue dependiente de la cantidad de proteína de IF₁ de *C.fasciculata* (CIF₁) con que se incubó la enzima. En la Figura 3.11 se observa un máximo del 75% de inhibición de la H⁺-ATPasa hepática con 4,4 µg de CIF₁. El I₅₀ calculado para CIF₁ fue 1,6 µg.

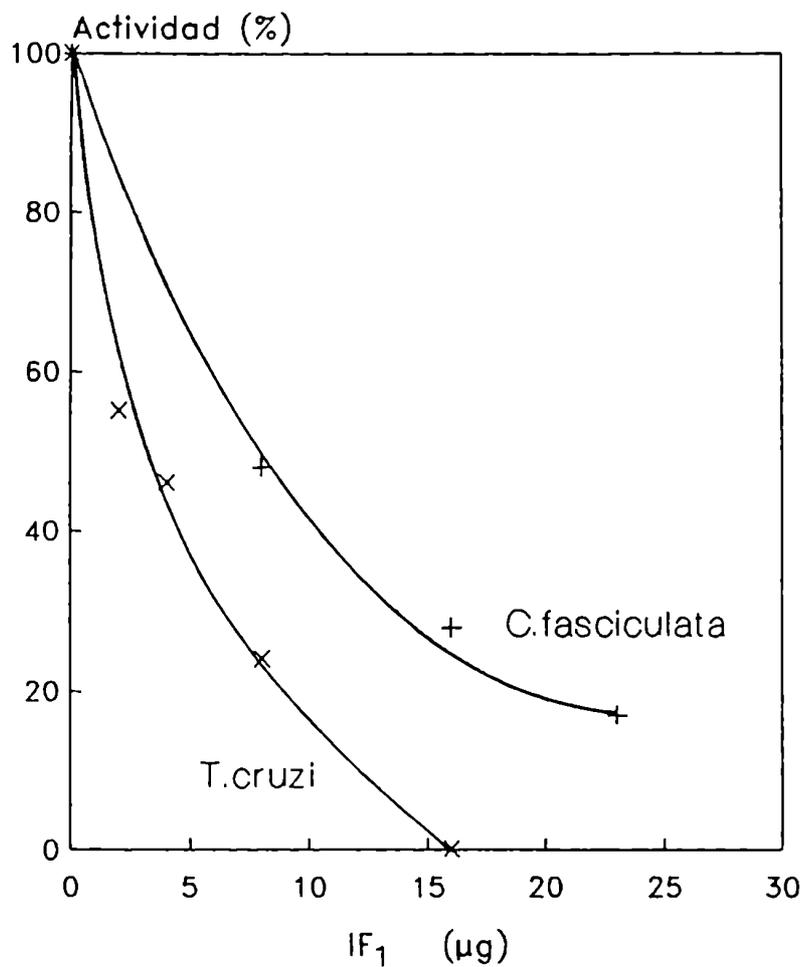


FIGURA 3.10. Curvas de inhibición de la H^+ -ATPasa de AS-partículas de *T. cruzi* y *C. fasciculata* con IF_1 hepático. Se incubaron 7,2 μg de partículas de *T. cruzi* y 1,5 μg de partículas de *C. fasciculata* con cantidades crecientes de IF_1 hepático, a 30°C durante 10 min, como se indica en la Figura 3.6.

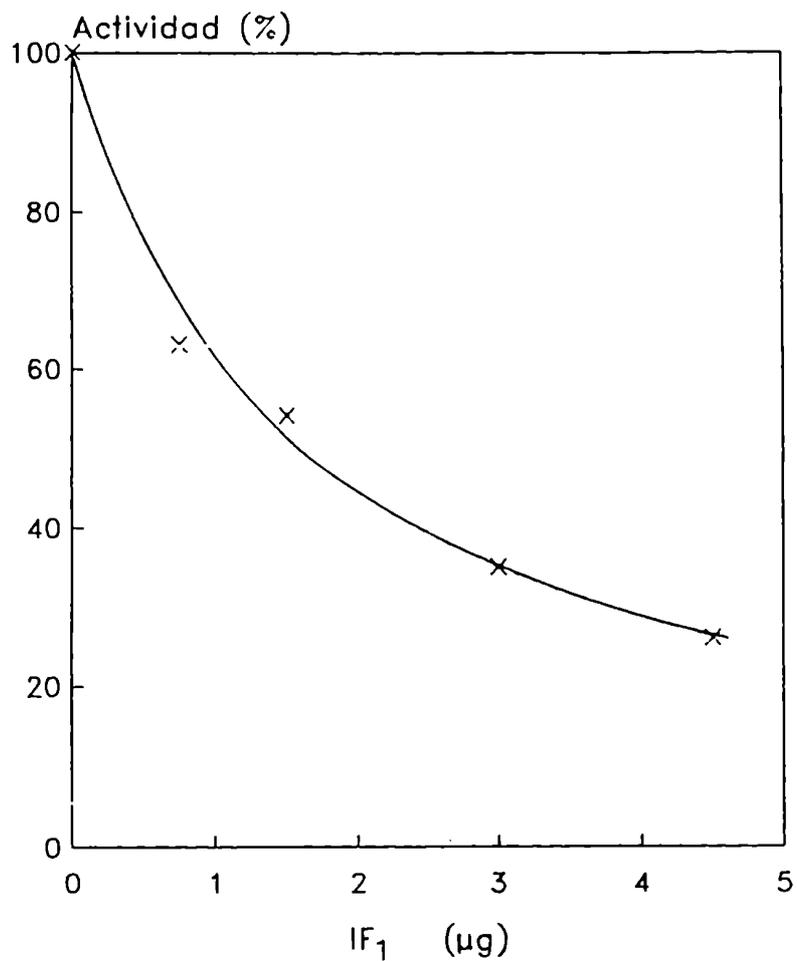


FIGURA 3.11. Curva de inhibición de la H⁺-ATPasa de AS-partículas hepáticas con IF₁ de *C. fasciculata*. Se incubaron 0,8 µg de partículas hepáticas con cantidades crecientes de IF₁ de *C. fasciculata*, a 30°C durante 10 min, como se indica en la Figura 3.6.

3.7.2.3. Interacción entre IF₁ de *T.cruzi* con la enzima H⁺-ATPasa de *C.fasciculata*:

Las AS-partículas de *C.fasciculata* se incubaron con cantidades crecientes de inhibidor proteico de *T.cruzi* (TIF₁). En la Figura 3.12 se observa que el 82 % de inhibición de la enzima de *C.fasciculata* se obtienen con 35 µg de TIF₁. El I₅₀ calculado fue 20 µg de TIF₁.

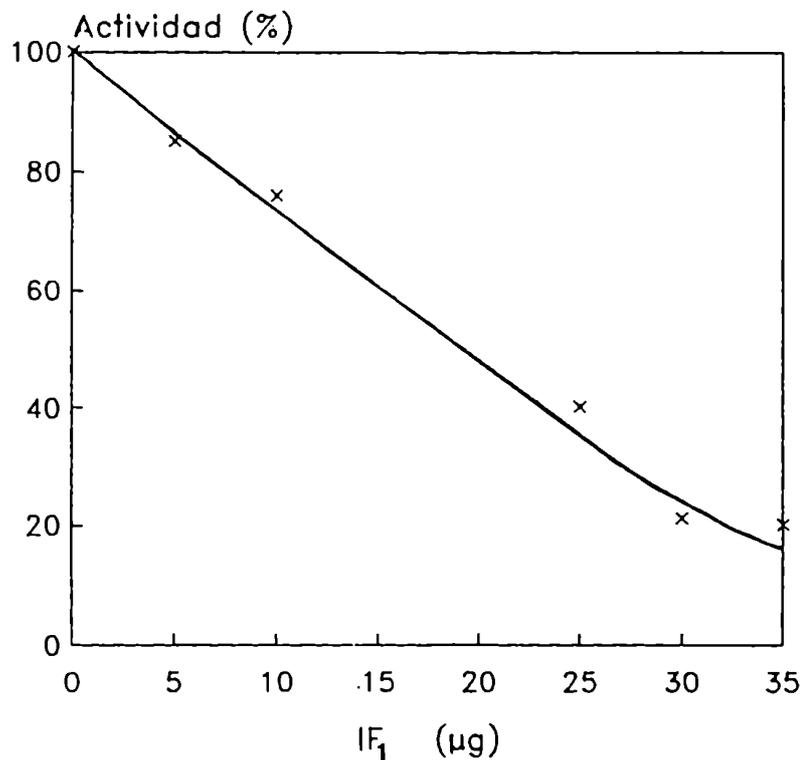


FIGURA 3.12. Curva de inhibición de la H⁺-ATPasa de AS-partículas de *C.fasciculata* con IF₁ de *T.cruzi*. Se incubaron 0,8 µg de partículas de *C.fasciculata* con cantidades crecientes de IF₁ *T.cruzi*, a 30°C durante 10 min, como se indica en la Figura 3.6.

3.7.2.4. Interacción de IF₁ de corazón bovino con la enzima de *C.fasciculata*:

Se incubaron las partículas activadas de *C.fasciculata* con cantidades crecientes de una preparación purificada de inhibidor de corazón bovino (MIF₁). Como se observa en la Figura 3.13. se obtuvo 100% de inhibición de la actividad de la H⁺-ATPasa de *C.fasciculata* durante la incubación con MIF₁. El I₅₀ calculado para MIF₁ fue 3,5 µg.

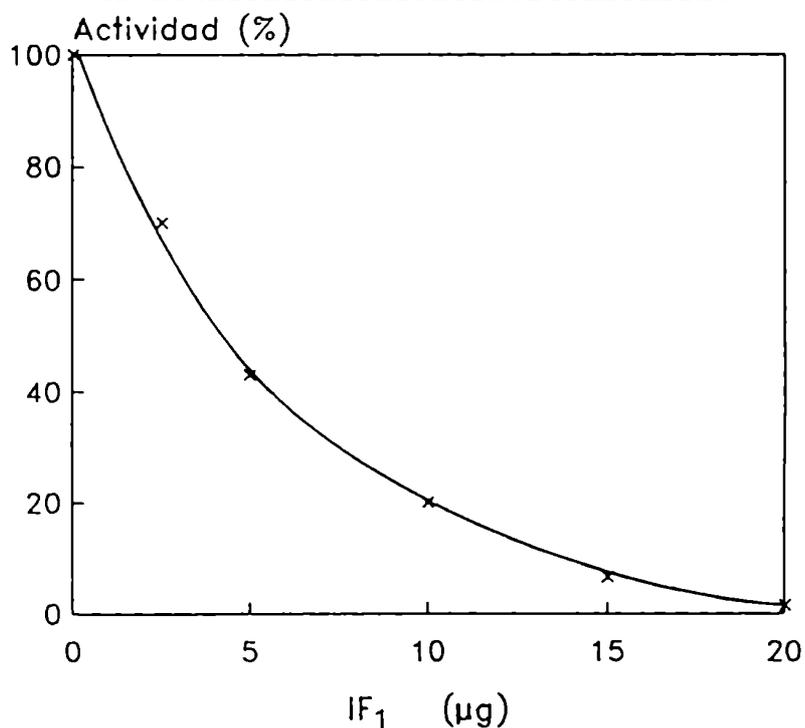


FIGURA 3.13. Curva de inhibición de la H⁺-ATPasa de AS-partículas de *C.fasciculata* con IF₁ de corazón bovino. Se incubaron 0,8 µg de partículas de *C.fasciculata* con cantidades crecientes de IF₁ corazón bovino, a 30°C durante 10 min, como se indica en la Figura 3.6.

En la Figura 3.14 se muestra un registro típico del experimento, donde se observa que la enzima de *C.fasciculata* en presencia de MIF_1 presenta un 34% de inhibición de su actividad remanente. Este comportamiento puede ser explicado por la gran actividad específica que presente el inhibidor bovino debido a su alto grado de pureza, estableciéndose una mayor interacción enzima-inhibidor que no se revierte por aumento de la dilución durante los tiempos ensayados.

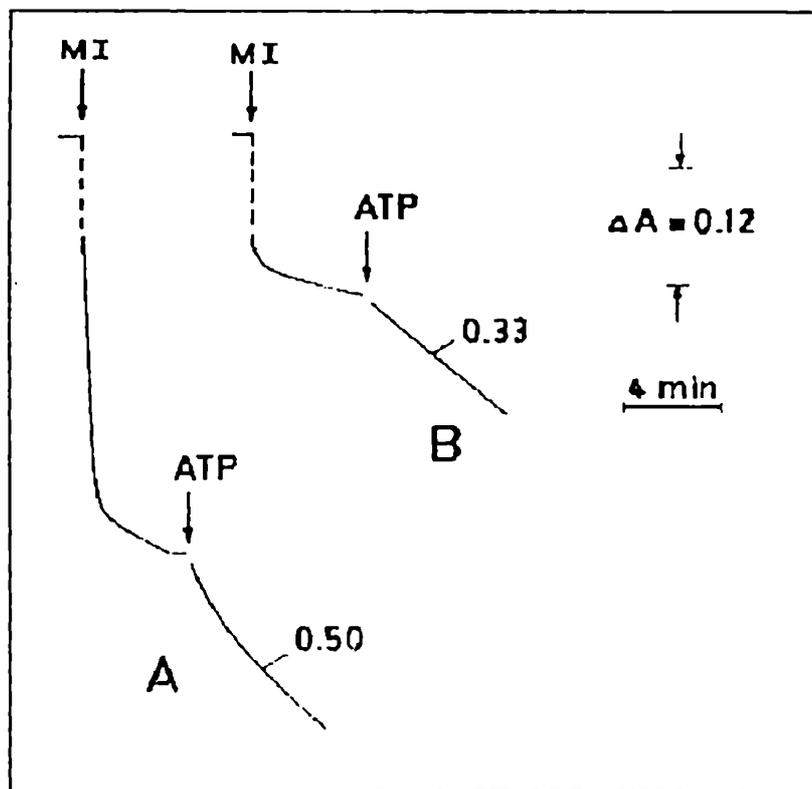


FIGURA 3.14. Inhibición de la H^+ -ATPasa de *C.fasciculata* con IF_1 de corazón bovino. Las condiciones experimentales se detallan en la Figura 3.7, excepto para la cantidad de partículas ($0,8 \mu\text{g}$) e inhibidor proteico de corazón bovino ($16 \mu\text{g}$). El medio de incubación C no se muestra.

En la Tabla 3.11 se muestran los valores de I₅₀ correspondientes a los distintos IF₁ utilizados para la inhibición de la actividad de hidrólisis de ATP en la enzima H⁺-ATPasa de *C.fasciculata*. Los mismos varían considerablemente, dependiendo del grado de pureza de cada preparación.

TABLA 3.11.

INHIBICION DE LA H⁺-ATPasa DE *C.fasciculata* POR INCUBACION CON IF₁ DE DIFERENTES ORIGENES

Origen del Inhibidor	I ₅₀ (µg)
Corazón bovino	3,5
Hígado de rata	7
<i>T.cruzi</i>	20
<i>C.fasciculata</i>	50

Los I₅₀ se calcularon como la cantidad de IF₁ utilizado para inhibir en un 50% la actividad de hidrólisis de ATP en la H⁺-ATPasa de *C.fasciculata*. La cantidad de AS-partículas utilizada fue 1,5 µg. Otras condiciones se describen en el texto.

3.8. Interacción de IF₁ con F₁-ATPasa

Con el objeto de establecer si el inhibidor proteico requiere para su acción que la enzima H⁺-ATPasa se encuentre unida o no a la membrana mitocondrial interna, y para determinar si su sitio de inhibición se encuentra en la subunidad soluble de la enzima (F₁) o en la porción de membrana (F₀), se realizaron estudios de inhibición de la enzima soluble (F₁-ATPasa).

La F₁-ATPasa se aisló de la fracción mitocondrial de parásito por tratamiento con cloroformo. La enzima extraída quedó retenida en la fase acuosa y con bajo contenido en inhibidor proteico (Bruni, 1979), la actividad específica de la misma era de 2 a 3 veces mayor que la actividad de la enzima unida a membrana.

Las condiciones de incubación de la enzima con el inhibidor fueron similares a las ensayadas con partículas, 1,0-2,0 µg de F₁-ATPasa se incubaron con IF₁ a 30°C durante 10 min., en un medio que contenía MOPS 10 mM, pH: 6,6, sacarosa 100 mM, ATP-Mg 1 mM, en un volumen final de 0,070 ml. Los controles se realizaron reemplazando IF₁ por Tris-HCl 5 mM, pH: 8,0, medio en el cual se encontraba suspendido el inhibidor. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió actividad de hidrólisis de ATP por la incorporación de la mezcla de incubación al medio de medida y el agregado de ATP 1 mM.

3.8.1. Interacción entre IF₁ y F₁-ATPasa de *T. cruzi*.

La enzima soluble de *T. cruzi* se incubó con cantidades crecientes de IF₁ homólogo (TIF₁). Como se observa en la Figura 3.15 se obtuvo inhibición de la actividad de hidrólisis durante la incubación. Las preparaciones de TIF₁ utilizadas, contenían baja concentración proteica y el método de medida no permitió el agregado de volúmenes mayores de IF₁, lo que impidió alcanzar porcentajes mayores de inhibición. Los intentos de concentrar la solución de proteína colocando la muestra en un tubo de diálisis en un medio hipertónico fueron insatisfactorios, debido a la pérdida de actividad inhibitoria de la misma. Probablemente la proteína haya difundido a través del tubo de diálisis debido a su bajo peso molecular.

3.8.2. Interacción de IF₁ de corazón bovino con F₁-ATPasa de *T. cruzi*.

Se incubaron F₁-ATPasa de *T. cruzi* de actividad específica 0,32 μ moles/min.mg con 9,79 μ g de inhibidor de miocardio bovino (MIF₁), durante 10 min. a 32°C en presencia de sistema regenerante de ATP. Se obtuvo total inhibición de hidrólisis de ATP durante la incubación y un 22% de inhibición en la actividad remanente de la enzima (Tabla 3.12); mientras que con 6,4 μ g de TIF₁, si bien se logró un 60% de inhibición

durante la incubación, no se observó inhibición en la actividad remanente (Tabla 3.12).

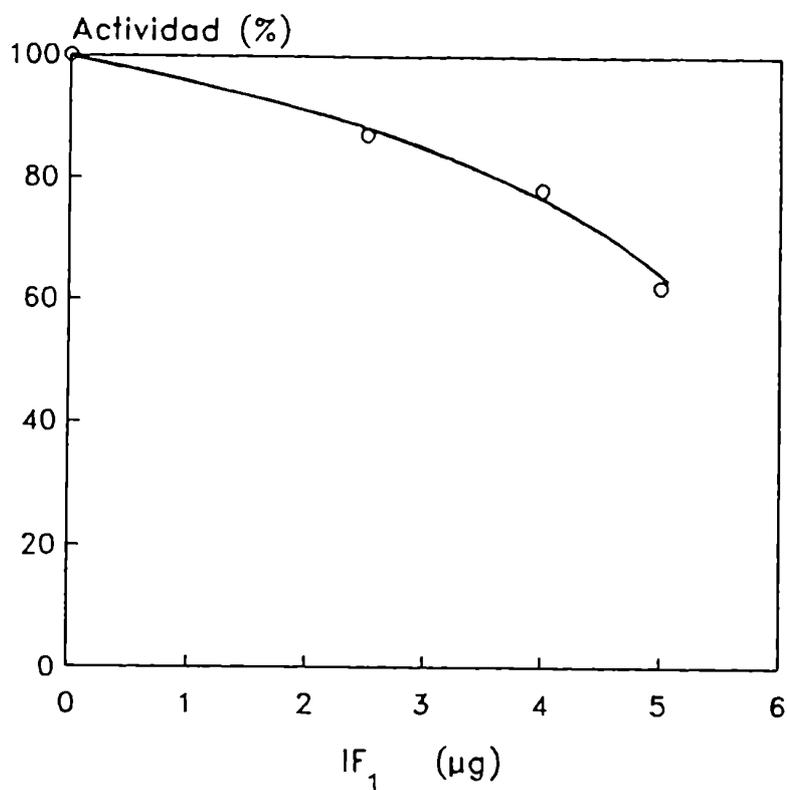


FIGURA 3.15. Inhibición de F₁-ATPasa de *T. cruzi* con inhibidor proteico homólogo. Se incubaron 2,2 µg de la fracción soluble de la enzima de *T. cruzi* con cantidades crecientes de IF₁ del mismo origen, a 30°C durante 10 min. Otras condiciones experimentales se indican en el texto.

TABLA 3.12.

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE HIDROLISIS DE ATP EN LA
FRACCION SOLUBLE DE LA ENZIMA DE *T. cruzi* F₁-ATPasa

Adiciones	Inhibición (%)	
	durante la incubación	de la actividad remanente
Ninguna	0	0
MIF ₁ (9,79 µg)	100	22
TIF ₁ (6,4 µg)	60	0

Se incubaron 1,6 µg de F₁-ATPasa de *T. cruzi* de actividad específica 0,32 µmol/min.mg, con IF₁ de corazón bovino (MIF₁) y de *T. cruzi* (TIF₁), durante 10 min a 32°C. Otras condiciones experimentales se detallan en el texto.

3.9. Determinación del peso molecular

Para determinar el peso molecular de IF₁ se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y al 15%, en presencia de 0,1% (p/v) de SDS, por el método de Weber y Osborn (1960). Las muestras a sembrar se disociaron calentando durante 1 min. a 100°C. La electroforesis se realizó a 4-5 mA por tubo. El tiempo de corrida osciló entre 8 y 10 hs. La coloración se realizó con Coomassie Brilliant Blue R-250 y las bandas obtenidas en el gel se registraron espectrofotométricamente a 280 y 660 nm. En la Figura 3.16 se muestra un típico registro de absorbancia de geles de poliacrilamida al 10% con SDS.

El peso molecular se determinó calculando la movilidad electroforética de la banda de proteínas obtenida y extrapolando en el gráfico construido con los marcadores de peso molecular conocido, descritos en Métodos. En la Tabla 3.13 se observan los valores de peso molecular calculados para IF₁ de *C.fasciculata*.

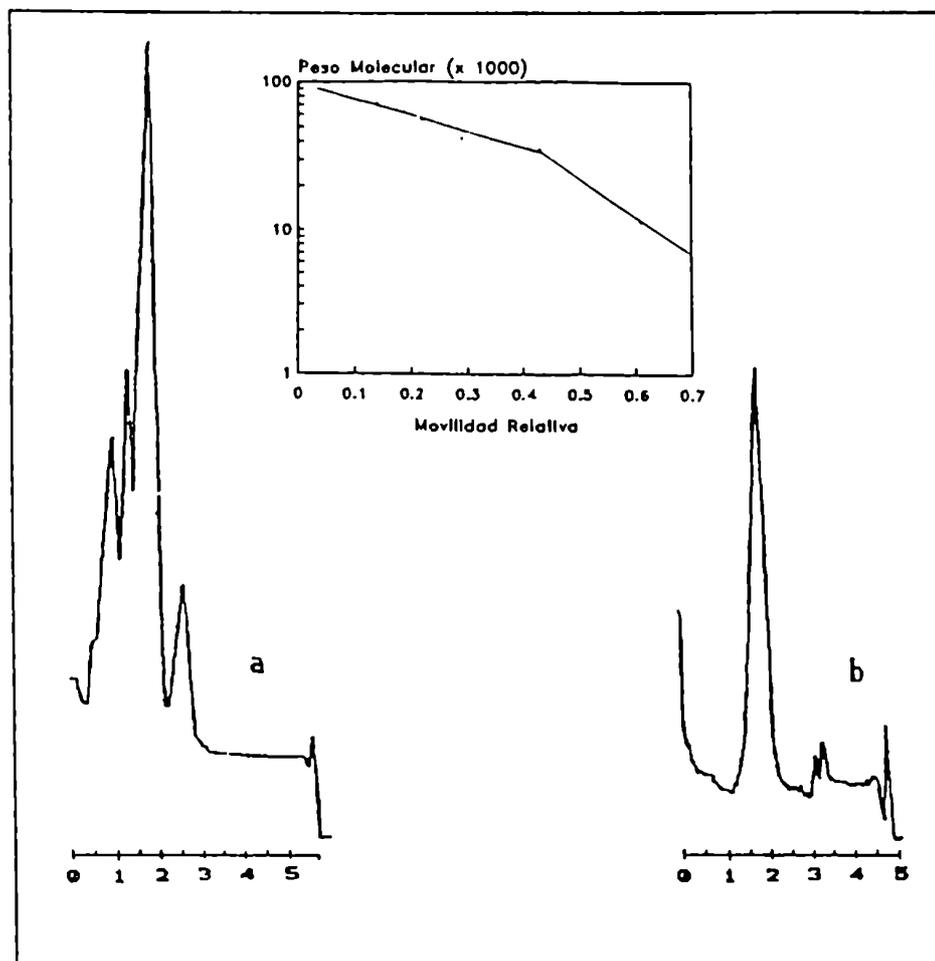


FIGURA 3.16. Electroforesis en gel de poliacrilamida de IF₁ de *C.fasciculata*.

a- registro de los marcadores de peso molecular,
 b- registro de la muestra de IF₁ de *C.fasciculata*. En el centro gráfico de los pesos moleculares de los marcadores en función de su movilidad relativa. Marcadores utilizados: albúmina, ovoalbúmina, láctico deshidrogenasa, piruvato quinasa y citocromo C. Otras condiciones experimentales se detallan en el texto.

TABLA 3.13.

PESO MOLECULAR CALCULADO PARA IF₁ DE *C. fasciculata*

Acrilamida (%)	Peso Molecular aproximado
10	8000 ± 1500 (4)
15	8500 ± 1500 (3)

(n): número de veces realizada la determinación.
Las determinaciones se realizaron por el método de Weber y Osborn de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de 0,1% (v/v) de SDS. Otras condiciones experimentales se detallan en el texto.

3.10. Discusión

El inhibidor proteico de la H^+ -ATPasa fue descrito como una proteína reguladora de la actividad de la H^+ -ATPasa mitocondrial en un gran número de organismos (Pullman, 1963; Nelson, 1972; Chan, 1976; Ebner, 1977; Kagawa, 1978). Considerando la importancia que presenta dicha enzima en los procesos de generación y conservación de energía intracelulares, es fundamental el estudio de la regulación de su actividad.

Por esa razón, el aislamiento y caracterización del inhibidor proteico de la H^+ -ATPasa mitocondrial en tripanosomatídeos presentó gran interés, a fin de dilucidar las analogías y diferencias con la enzima de mamífero.

Se obtuvieron partículas submitocondriales de *T.cruzi* y *C.fasciculata* por sonicación de la fracción mitocondrial (A-partículas), que conservaron la capacidad de consumir oxígeno (Tabla 3.1) y presentaron, por análisis espectral, un espectro característico de membrana mitocondrial de tripanosomatídeos, con dos picos de máxima absorbancia a 430 y 570 nm y un hombro a 540 nm (Figura 3.1) (Lemberg, 1973; Docampo, 1978). Al ser filtradas a través de una columna de Sephadex G-50, las partículas eluyeron en un simple pico (Figura 3.2), de actividad específica de H^+ -ATPasa aumentada 3,5 y 3,9 veces

para *T.cruzi* y *C.fasciculata* respectivamente, con respecto a la actividad sembrada (Tabla 3.2) y mantuvieron sensibilidad a la incubación con oligomicina (Tablas 3.3 y 3.4). Las partículas activadas fueron denominadas AS-partículas.

Los resultados obtenidos concuerdan con los publicados por Racker (1967) y Horetman (1970) sobre partículas de mamífero, quienes atribuyen tal activación a la separación de IF₁ de la enzima. Estos resultados son una evidencia de la presencia del inhibidor proteico (IF₁) en la enzima H⁺-ATPasa de tripanosomatídeos.

Considerando que luego de la obtención de AS-partículas de *T.cruzi* a través de la columna de Sephadex G-50, el inhibidor quedó retenido en la misma, se intentó recuperarlo aumentando la fuerza iónica del buffer (Figura 3.4). Se obtuvo un pico de proteínas que luego de ser sometido a tratamiento por calor y precipitación alcohólica para el aislamiento del inhibidor, no presentó actividad inhibitoria sobre la enzima H⁺-ATPasa. La pérdida de actividad del inhibidor posiblemente se debió a la oxidación de restos sulfhidrilos presentes en la proteína y a la interferencia de cationes. Por tal motivo y considerando el método de purificación empleado por Cintrón y Pedersen (1979a) para IF₁ de mamífero, se repitió el experimento incluyendo en el buffer de elución DTT y EDTA (Figura 3.5), con lo cual luego del calentamiento y la precipitación alcohólica se obtuvo una fracción proteica con actividad inhibitoria (Tabla 3.6).

Para la obtención de mayores cantidades de IF₁ se procedió en base a la técnica descrita por Racker omitiendo la precipitación a 45% de saturación con (NH₄)₂SO₄, debido a lo cual la preparación debió ser dializada para eliminar el exceso de sal. En una típica preparación, por cada 10 g de células de *C.fasciculata* procesadas por este método, se obtuvieron aproximadamente 100-120 µg de IF₁ con una actividad relativa de inhibición menor que la registrada con el inhibidor extraído de columna (Tabla 3.6).

Se estudió un método alternativo para aumentar la actividad específica de IF₁ basado en uno de los pasos de purificación del inhibidor de mamífero de la técnica de Cintrón y Pedersen (1979a), que consistía en una filtración a través de columna de Sephadex G-75 (Figura 3.3). El método no aumentó la actividad específica del inhibidor, lo que no justificó la inclusión de este paso en la obtención del mismo.

Para lograr establecer las condiciones óptimas de medida de la actividad del inhibidor se realizaron ensayos en diferentes condiciones (Tabla 3.7). La actividad del inhibidor se puso de manifiesto cuando se incubaron AS-partículas (partículas activadas exentas de inhibidor) con IF₁ en volúmenes pequeños, favoreciendo de esta manera la asociación del complejo enzima inhibidor y evitando su disociación. En el medio de incubación fue necesaria la presencia de ATP-Mg, sugiriendo la necesidad de mantener activa a la enzima para que se produzca la inhibición (Figura 3.6). Estos resultados coinciden con los

publicados por Gómez-Fernández y Harris (1978), quienes afirman que la hidrólisis de ATP y la baja fuerza iónica del medio generan un estado conformacional transitorio en la enzima que permite la formación del complejo con el inhibidor. La utilización de MOPS como buffer de incubación a un pH: 6,6, en lugar de Tris-HCl pH: 7,4, aumentó en un 50% la efectividad de la inhibición (Tabla 3.7.E). Similares resultados fueron obtenidos con inhibidor bovino por Pedersen y col. (1981).

La actividad remanente de la enzima no sufrió inhibición, posiblemente debido al desprendimiento del inhibidor de la enzima como consecuencia del aumento de la dilución, 12 veces aproximadamente, producido al agregar la mezcla de incubación al medio de medida (Figura 3.7).

Los experimentos de inhibición de la actividad de la H⁺-ATPasa en AS-partículas de *T.cruzi* y *C.fasciculata* con su inhibidor homólogo, dieron como resultado la inhibición total de la enzima de *T.cruzi* y un 80% de inhibición de la enzima de *C.fasciculata* (Figura 3.9).

Con el fin de establecer analogías y diferencias entre las distintas preparaciones de IF₁ se realizaron experimentos de interacción heteróloga. El inhibidor hepático tuvo efecto sobre la H⁺-ATPasa de AS-partículas de parásito produciendo total inhibición de la enzima de *T.cruzi* y un 80% de inhibición en *C.fasciculata* (Figura 3.10). En forma inversa el IF₁ de *C.fasciculata* inhibió en un 75% a la enzima de

hepatocito (Figura 3.11).

La H^+ -ATPasa de *C.fasciculata* fue inhibida con todos los tipos de IF_1 ensayados (Figuras 3.10, 3.12 y 3.13). Se calcularon los I_{50} como la cantidad de IF_1 necesaria para inhibir a la enzima en un 50% (Tabla 3.11) y se observó que IF_1 de corazón bovino es el que presenta la mayor actividad específica relativa de inhibidor. Las diferencias entre los distintos I_{50} probablemente se deban al diferente grado de pureza alcanzado en cada preparación.

Es importante destacar que la obtención de IF_1 de tripanosomatídeos presentó dificultades particulares, debido a la presencia de una única mitocondria por célula de parásito y la imposibilidad de aislar a la misma en forma intacta para la obtención de la H^+ -ATPasa y, posteriormente, del inhibidor. De esta manera, al partir de una fracción mitocondrial, la posibilidad de contaminación de nuestra preparación de IF_1 con otros péptidos de pesos moleculares similares es mayor, lo que explica los altos valores de I_{50} alcanzados con los inhibidores de *T.cruzi* y *C.fasciculata*.

Por otra parte la actividad remanente en AS-partículas de *C.fasciculata* permaneció inhibida en un 34% luego de la incubación con IF_1 bovino, lo que demostró su gran actividad específica debido al alto grado de pureza con el que fue obtenido (Figura 3.14).

En todos los casos estudiados la actividad de la enzima

disminuyó en función de la cantidad de inhibidor agregado al medio de incubación.

Se aisló la fracción soluble de la enzima de *T.cruzi*, con una actividad específica 2 a 3 veces mayor que la observada en la fracción mitocondrial. Por incubación de F₁-ATPasa con IF₁ homólogo se obtuvo inhibición (Figura 3.15). Incubando la fracción soluble de la enzima de *T.cruzi* con el inhibidor de corazón bovino, se obtuvo 100% de inhibición durante la incubación y 22% de inhibición en la actividad remanente de la enzima (Tabla 3.12). Los datos obtenidos indican que no es necesaria la presencia de la porción de membrana para que IF₁ interaccione con la subunidad catalítica F₁. Estos datos concuerdan con lo publicado por Dabbeni-Sala (1974) y Bruni (1979) sobre la estimulación de la actividad de hidrólisis de ATP obtenida al solubilizar la fracción F₁ de partículas submitocondriales, sugiriendo la posible localización de IF₁ dentro del complejo enzimático H⁺-ATPasa entre F₁-ATPasa y el canal F_o.

El hecho de que se establezcan interacciones enzima-inhibidor heterólogas, es una evidencia de la existencia de importantes analogías entre los inhibidores de distintos orígenes, como así también entre las enzimas de distintos tipos de células y sus mecanismos de interacción con el inhibidor.

Una de las propiedades características de IF₁ es su alta sensibilidad a la inactivación por tripsina (Pullman, 1963).

La previa incubación de IF₁ de mitocondria de corazón bovino con tripsina, destruye completamente su actividad inhibitoria. Racker (1967) demostró que partículas submitocondriales de mitocondria de mamífero incubadas con tripsina aumentan su actividad unas 10 veces.

En el presente trabajo se realizaron experimentos de inactivación del inhibidor con tripsina. Los datos obtenidos coinciden con lo publicado por Pullman y Monroy (1963) y Racker (1967), donde la incubación del inhibidor proteico de *C.fasciculata* con tripsina en una relación 1:3, anuló parcialmente la actividad inhibitoria del mismo sobre la H⁺-ATPasa homóloga (Tabla 3.9). La preincubación de la tripsina con inhibidor de tripsina, impidió la digestión trípica de IF₁, permitiendo que conserve su actividad inhibitoria. Idénticos resultados se obtuvieron en experimentos paralelos realizados con IF₁ hepático (Tabla 3.10).

Cuando las AS-partículas se incubaron con tripsina, en algunos experimentos se observó estimulación de la actividad de hidrólisis de ATP, posiblemente debido a la remoción del IF₁ residual contenido en las mismas (Tabla 3.9). Tal sensibilidad de IF₁ a la inactivación por incubación con tripsina, confirma su naturaleza proteica.

Los experimentos de filtración por HPLC de IF₁ de *T.cruzi* mostraron la heterogeneidad de nuestra preparación, observándose un perfil de elución con dos picos máximos, de

los cuales el correspondiente al gradiente de 35% de acetonitrilo presentó actividad de inhibidor (Figura 3.8). En forma comparativa y en las mismas condiciones se filtró el inhibidor de corazón bovino, obteniéndose un pico a 38% de acetonitrilo (Figura 3.8). Los distintos valores de gradiente observados en el presente trabajo indicarían que el inhibidor proteico de tripanosomatídeo posee una estructura algo más hidrofílica que el de mamífero, pero si comparamos los valores obtenidos con los publicados por Dianoux (1986) (Tabla 3.8), podríamos afirmar que en realidad dichas diferencias serían despreciables.

La determinación del peso molecular aproximado se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y 15% en presencia de SDS. El peso molecular del inhibidor de *C.fasciculata* calculado fue 8000-8500 \pm 1500 (Tabla 3.13). Este valor se corresponde con los publicados para IF₁ de: *C.utilis* (6000) (Satre, 1975), corazón bovino (10500) (Pullman, 1963), hígado de rata (9500) (Chan, 1976) y cloroplastos (13000) (Nelson, 1972).

Considerando los resultados obtenidos en el presente trabajo, podríamos afirmar que las características observadas en el inhibidor proteico de la H⁺-ATPasa mitocondrial de *T.cruzi* y *C.fasciculata*, son básicamente similares a las descritas para otros inhibidores.

4. ACCION DE LAS POLIAMINAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE HIDROLISIS DE ATP EN LA ENZIMA H⁺-ATPasa MITOCONDRIAL

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina son metabolitos policatiónicos ampliamente distribuidos en células procariontes y eucariontes (Herbest, 1948; Cohen, 1971; Tabor, 1972, 1984 y 1985). Juegan un importante papel en la regulación del crecimiento y diferenciación celular (Jänne, 1978; Williams-Cahellakis, 1979; Roussell, 1980; Pegg, 1982), interaccionan con las membranas mitocondriales y sus funciones (Harold, 1964; Igarashi, 1982). En tripanosomatídeos la membrana mitocondrial puede ser estabilizada por poliaminas, tal como lo indican los efectos de la putrescina sobre la respiración celular de *T. brucei brucei* (Giffin, 1986).

Estudios realizados por Igarashi y col. (1989) demostraron que la actividad de hidrólisis de ATP de partículas submitocondriales y F₁-ATPasa de mitocondrias de hígado de rata, fue inhibida por acción de espermina y espermidina, al competir con el Mg²⁺ por la unión con el ATP.

Teniendo en cuenta dicho comportamiento de las poliaminas sobre la membrana mitocondrial y la enzima H⁺-ATPasa de mamíferos y con el fin de establecer si tal regulación de las poliaminas sobre la actividad de hidrólisis de ATP podría

extenderse a los tripanosomatídeos, se realizaron estudios con la H⁺-ATPasa de *T.cruzi* y *C.fasciculata*.

4.1. Fraccionamiento subcelular en presencia de poliaminas

Con el objeto de verificar la acción estabilizadora de membranas de las poliaminas, se aisló la fracción mitocondrial de *C.fasciculata* y *T.cruzi* por ruptura mecánica de las células, en presencia de 5 mM de poliamina (putrescina, espermidina o espermina) en el buffer de suspensión de mitocondrias y posterior centrifugación diferencial. La fracción sedimentada a 9000 g se resuspendió en un volumen mínimo del mismo buffer, aproximadamente 20 mg de proteína por ml de buffer. En la fracción mitocondrial así obtenida se midió actividad de hidrólisis de ATP por el método espectrofotométrico y consumo de O₂.

En la Tabla 4.1, se muestran los valores de actividad de la enzima H⁺-ATPasa de *C.fasciculata*, donde se observa inhibición de la reacción de hidrólisis de ATP en las fracciones tratadas con poliaminas. El aumento de la concentración de poliaminas durante el fraccionamiento, o en el medio de medida, no modificó los valores de inhibición alcanzados.

Este efecto no fue observado en la preparación de membranas de *T.cruzi*.

En la fracción mitocondrial de *C.fasciculata* obtenidas en

presencia de 5 mM de poliaminas se midió respiración observándose aumento del consumo de oxígeno (Tabla 4.1), similar a los resultados publicados por Giffin y col. (1986), donde se demuestra que la presencia de putrescina durante el aislamiento de la fracción mitocondrial de *T.brucei brucei* estimuló el consumo de oxígeno.

 TABLA 4.1.

ACTIVIDAD DE H⁺-ATPasa Y CONSUMO DE O₂ EN MITOCONDRIAS AISLADAS EN PRESENCIA DE POLIAMINAS

Adiciones	Hidrólisis de ATP ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$)	Consumo de O ₂ (nmol O ₂ /min.mg)
Ninguna	0,47 \pm 0,03	6,71 \pm 0,01
Espermina	0,22 \pm 0,06 (53)	6,99 \pm 0,02
Espermidina	0,34 \pm 0,06 (28)	10,1 \pm 1,36
Putrescina	0,24 \pm 0,03 (40)	8,62 \pm 0,04

Las medidas se realizaron en la fracción mitocondrial de *C.fasciculata* obtenida en presencia de 5 mM de poliamina cuando se indica. Otras condiciones experimentales se detallan en el texto. Los valores son el promedio \pm S.D. de 4 determinaciones. Entre paréntesis se expresa el porcentaje de inhibición de la H⁺-ATPasa.

En los experimentos realizados con la fracción mitocondrial de *T.cruzi* no se observó actividad respiratoria. Por lo tanto con el objeto de verificar la integridad de la cadena respiratoria en la preparación de membrana, se realizaron espectros diferenciales de absorción de la muestra, en presencia de ditionito como agente reductor, en un espectrofotómetro de doble haz. En la Figura 4.1 se observa que la fracción mitocondrial de *T.cruzi* no mostró el pico de absorción a 570 nm, ni el hombro a 540 nm característicos del citocromo b reducido (Lemberg, 1973), probablemente debido a la escasez de oxígeno durante el cultivo de los parásitos por falta de agitación.

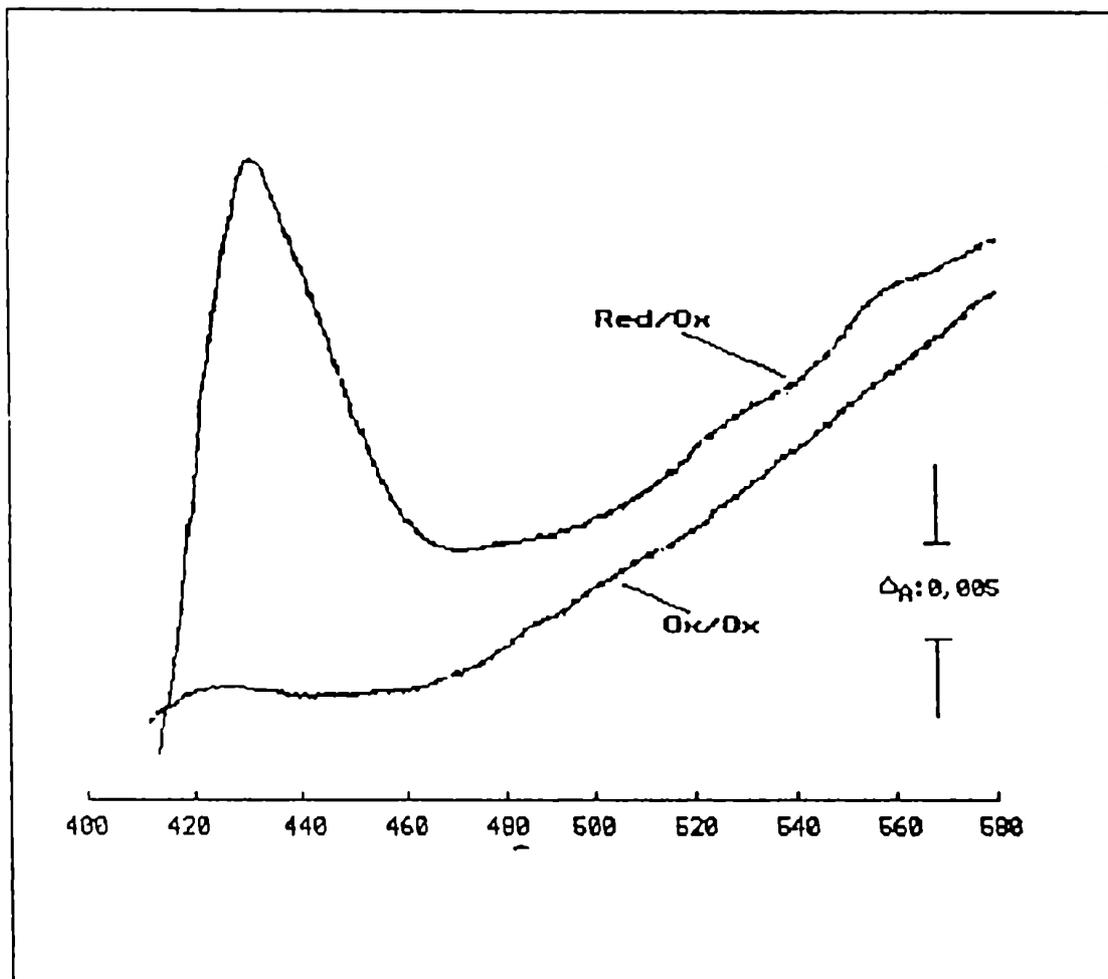


FIGURA 4.1. Espectro diferencial redox de la fracción mitocondrial de *T. cruzi*. Concentración de proteína utilizada 2,0 mg/ml.

4.2. Acción de las poliaminas sobre la enzima H⁺-ATPasa de tripanosomatídeos

Se realizaron estudios sobre la actividad de hidrólisis de ATP en la enzima H⁺-ATPasa de tripanosomatídeos, con la adición directa de las poliaminas al medio de medida de reacción. En estos experimentos el fraccionamiento subcelular se realizó en ausencia de poliamina.

4.2.1. Acción de las poliaminas sobre la enzima de *T.cruzi*.

4.2.1.1. H⁺-ATPasa de partículas submitocondriales.

Las partículas submitocondriales (A-partículas) de parásito se suspendieron en buffer Tris-HCl 10 mM, pH: 7.6, sacarosa 250 mM, se incubaron en el medio de medida Tris-HCl 50 mM, pH: 7,6, sacarosa 200 mM, EGTA 0,25 mM, en presencia de MgCl₂ 2 mM y cantidades crecientes de poliaminas, en un volumen final de 1 ml, durante 20 min a 30°C. La reacción comenzó con el agregado de ATP 3 mM. La concentración de ortofosfato formado se midió por el método colorimétrico. En la Tabla 4.2. se muestran los valores de inhibición obtenidos con espermina sobre la actividad de hidrólisis de ATP en partículas submitocondriales de *T.cruzi*. Con 10 mM de espermina se alcanzó hasta 51% de inhibición, mientras que la espermidina y la putrescina no modificaron la actividad de la H⁺-ATPasa en A-partículas.

Incubando las partículas submitocondriales con 4 mM de espermina se observó inhibición de la actividad de hidrólisis de ATP que se revirtió con el aumento de la concentración de MgCl₂ agregados (Figura 4.2).

TABLA 4.2.

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE HIDROLISIS DE ATP EN
A-PARTICULAS DE *T. cruzi* POR ACCION DE LA ESPERMINA

Espermina (mM)	Actividad (nmol Pi/min.mg)	Inhibición (%)
0	88,3	0
1	84,4	5
2	75,3	15
3	68,3	23
4	64,9	27
5	58,3	34
10	43,3	51

Se incubaron 80 µl de A-partículas (8,0 mg/ml) en buffer Tris-HCl 50 mM, pH: 7,6, sacarosa 200 mM, EGTA 0,25 mM, en presencia de 2 mM de MgCl₂ y cantidades crecientes de poliaminas, en un volumen final de 1 ml, durante 20 min a 30°C. La reacción comenzó con el agregado de ATP 3 mM. La concentración de ortofosfato formado se midió por el método colorimétrico.

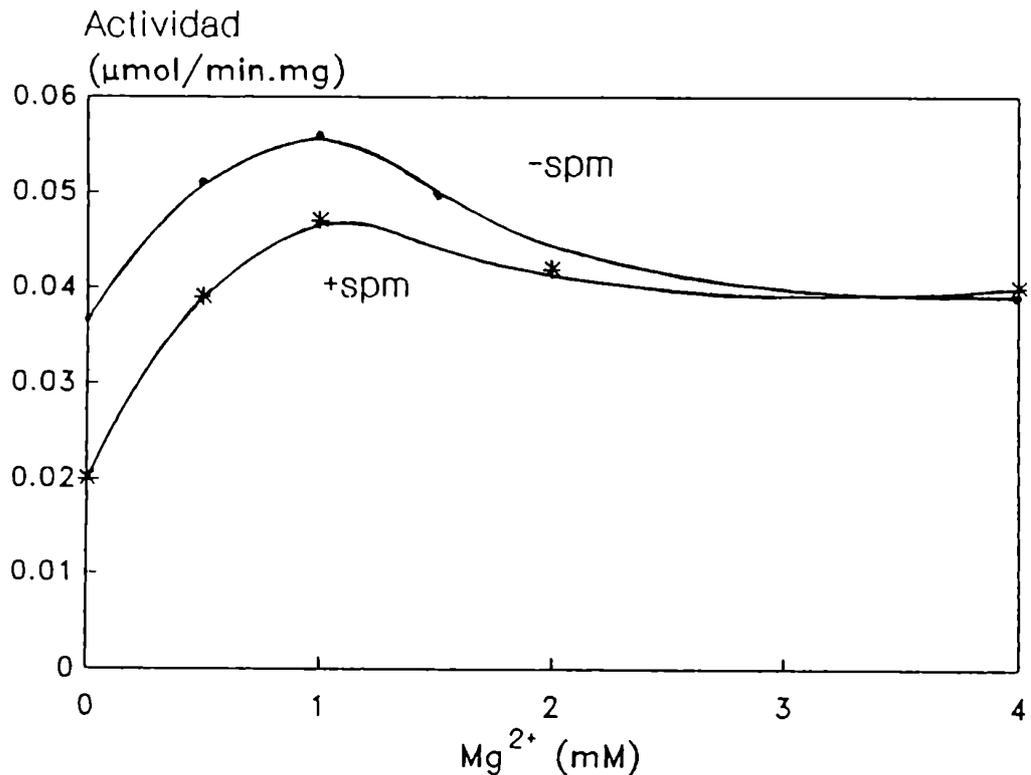


FIGURA 4.2. Acción de la espermina en partículas submitocondriales de *T.cruzi*. Se incubaron 70 µl de A-partículas (6,4 mg/ml) con 4 mM de espermina en buffer Tris-HCl 50 mM, pH: 7,6, sacarosa 200 mM, EGTA 0,25 mM, y cantidades crecientes de MgCl₂, en un volumen final de 1 ml, durante 20 min a 30°C. La reacción comenzó con el agregado de ATP 3 mM. La concentración de ortofosfato formado se midió por el método colorimétrico como se indica en métodos.

4.2.1.2. F₁-ATPasa de *T.cruzi*

La fracción soluble de la enzima, se obtuvo por extracción de la fracción mitocondrial con cloroformo de F₁-ATPasa. Las determinaciones se llevaron a cabo utilizando la fase acuosa de la extracción.

Se realizaron incubaciones en presencia de $MgCl_2$ 2 mM y cantidades crecientes de espermina, se dio comienzo a la reacción con el agregado de ATP 3 mM. En la enzima de *T.cruzi* no se observó inhibición, sugiriendo la imprescindibilidad del entorno lipídico para que la espermina tenga efecto sobre la enzima. En los experimentos realizados con putrescina y espermidina tampoco se obtuvo inhibición.

4.2.2. Acción de las poliaminas sobre la enzima de *C.fasciculata*.

4.2.2.1. H^+ -ATPasa de partículas submitocondriales.

Las partículas submitocondriales de *C.fasciculata* fueron obtenidas e incubadas como se indicó anteriormente para *T.cruzi*. Como se observa en la Tabla 4.3, con 10 mM de espermina se alcanzó un 31% de inhibición, mientras que la espermidina y la putrescina no modificaron la actividad de la H^+ -ATPasa en A-partículas.

En presencia de 4 mM de espermina se observó inhibición de la actividad de hidrólisis y la misma se revirtió por aumento de las concentraciones de $MgCl_2$ agregados (Figura 4.3).

TABLA 4.3.

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LA H⁺-ATPasa EN

A-PARTICULAS DE *T. cruzi* POR ACCION DE LA ESPERMINA

Poliamina	Concentración (mM)	Actividad (nmol Pi/min.mg)
Espermina	2	11
	4	20
	10	31
Espermidina	10	0
Putrescina	10	0

Se incubaron 50 μ l de A-partículas de *C. fasciculata* (4 mg/ml) con las cantidades de poliamina indicadas en la tabla. Otras condiciones se detallan en la Tabla 4.2.

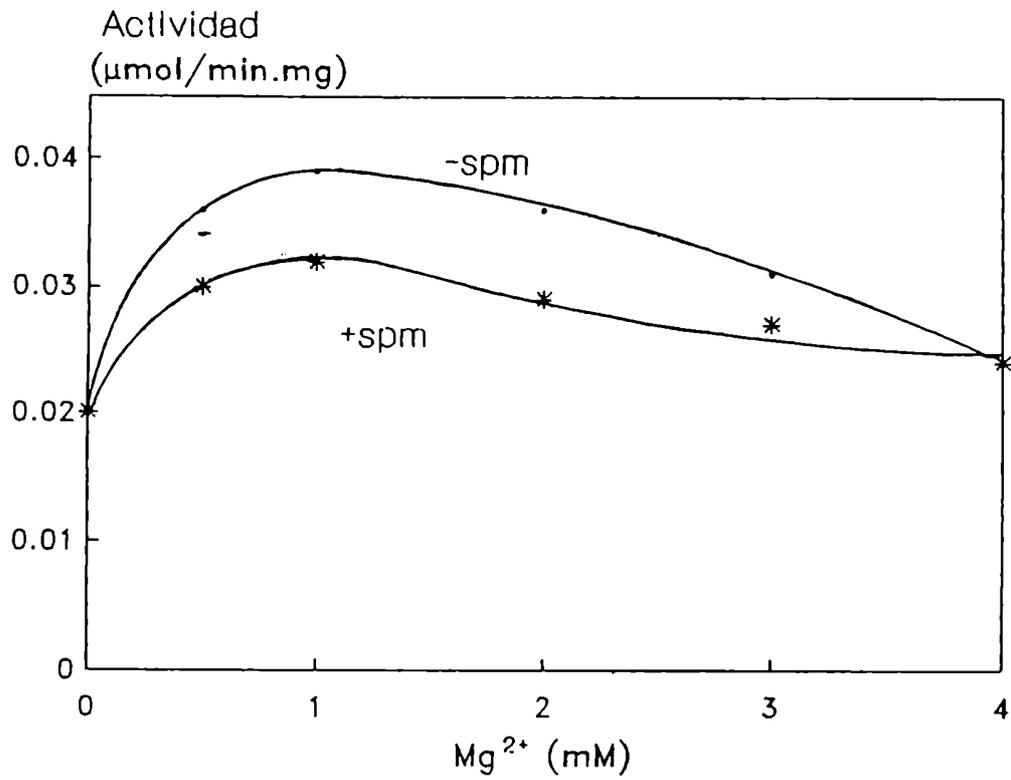


FIGURA 4.3. Acción de la espermina en partículas submitocondriales de *C.fasciculata*. Se incubaron 50 μl de A-partículas (8,9 mg/ml) con 4 mM de espermina en las condiciones descritas en la Figura 4.2. La reacción se inició con el agregado de ATP 3 mM.

4.2.2.2. F₁-ATPasa de *C.fasciculata*.

Se realizaron incubaciones en presencia de espermina 4 mM dando comienzo a la reacción con el agregado de ATP 3 mM. Se observó hasta un 35% de inhibición de la actividad de hidrólisis de ATP (Figura 4.4).

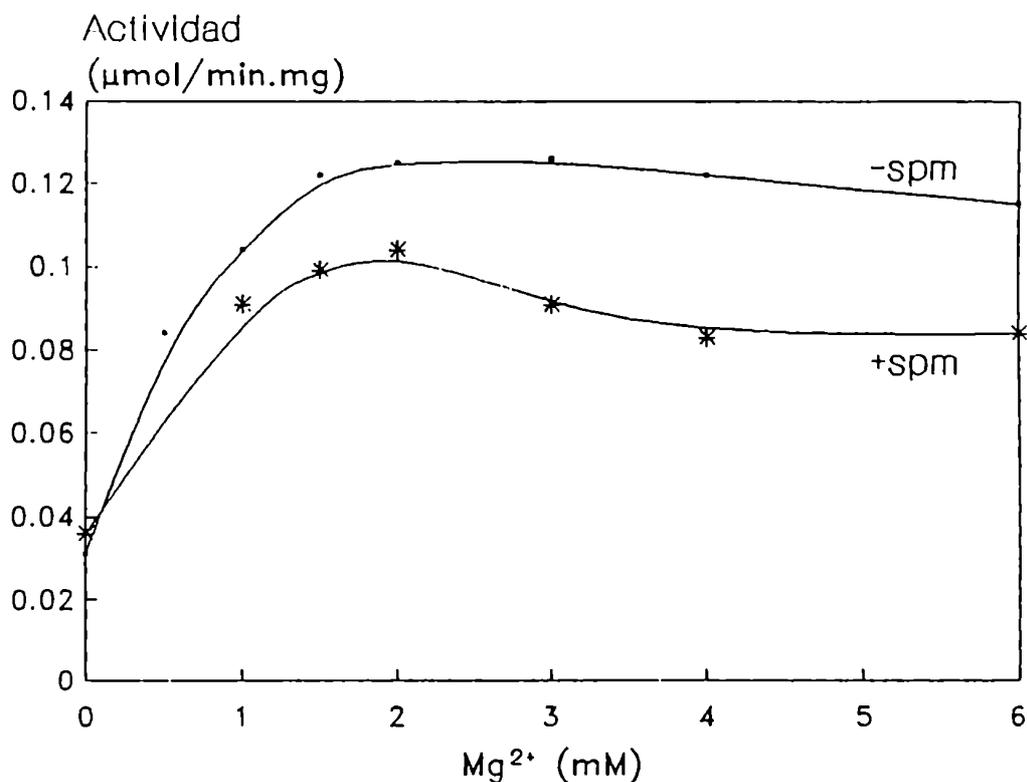


FIGURA 4.4. Acción de la espermina sobre F₁-ATPasa de *C.fasciculata*. Se incubaron 200 μl de enzima (1,49 mg/ml) con 4 mM de espermina y cantidades crecientes de MgCl₂ en las condiciones descritas en la Figura 4.2. La reacción se inició con el agregado de ATP 3 mM.

4.3. Análisis cinético de la inhibición por poliaminas

Con el fin de determinar el mecanismo de inhibición de las poliaminas sobre la enzima H^+ -ATPasa de *T.cruzi* y *C.fasciculata*, se realizaron cinéticas de inhibición de la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de 4 mM de espermina, que en ambos parásitos producía entre 20 y 30 % de inhibición. Los experimentos se realizaron variando las concentraciones del complejo ATP-Mg en una relación 2:1, o manteniendo constante la concentración de $MgCl_2$ (2 mM) y variando las concentraciones de ATP, en buffer Tris-HCl 50 mM, pH: 7,6, sacarosa 200 mM, EGTA 0,25 mM, en un volumen final de 1 ml. En todos los casos la reacción se inició con el agregado de enzima y se llevó a cabo durante 20 min a 30°C empleando el método colorimétrico.

4.3.1. Actividad de la H^+ -ATPasa de *T.cruzi*.

En los experimentos realizados con A-partículas de *T.cruzi* en presencia de 4 mM de espermina, variando las concentraciones del complejo ATP-Mg (2:1) se observó, inhibición de tipo no competitivo (Figura 4.5).

Cuando se variaron las concentraciones de ATP manteniendo constante la concentración de $MgCl_2$ (2 mM) y comenzando la reacción con el agregado de enzima no se observaron cambios en

la actividad de hidrólisis de partículas submitocondriales de *T.cruzi* (Figura 4.5).

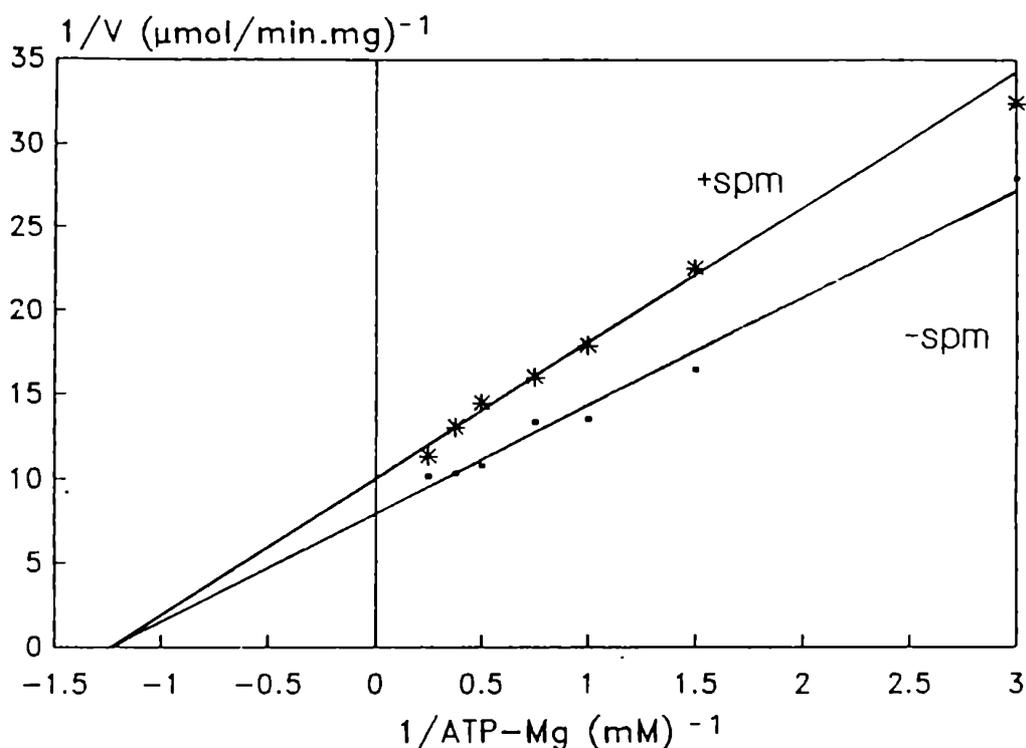


FIGURA 4.5. Efecto de la variación del complejo ATP-Mg sobre la reacción de hidrólisis de ATP en partículas submitocondriales de *T.cruzi* en presencia de espermina. Se incubaron 50 μl de A-partículas (8,4 mg/ml) con cantidades crecientes de ATP-Mg (2:1) en presencia de 4 mM de espermina en las condiciones descritas en el texto.

En los estudios realizados con espermina sobre la fracción soluble de la enzima de *T.cruzi* (F_1 -ATPasa) no se observó

inhibición de la actividad enzimática. Tales evidencias explicarían el tipo de inhibición no competitiva observado en A-partículas de *T.cruzi*. Con el agregado de putrescina o de espermidina tampoco se obtuvo inhibición.

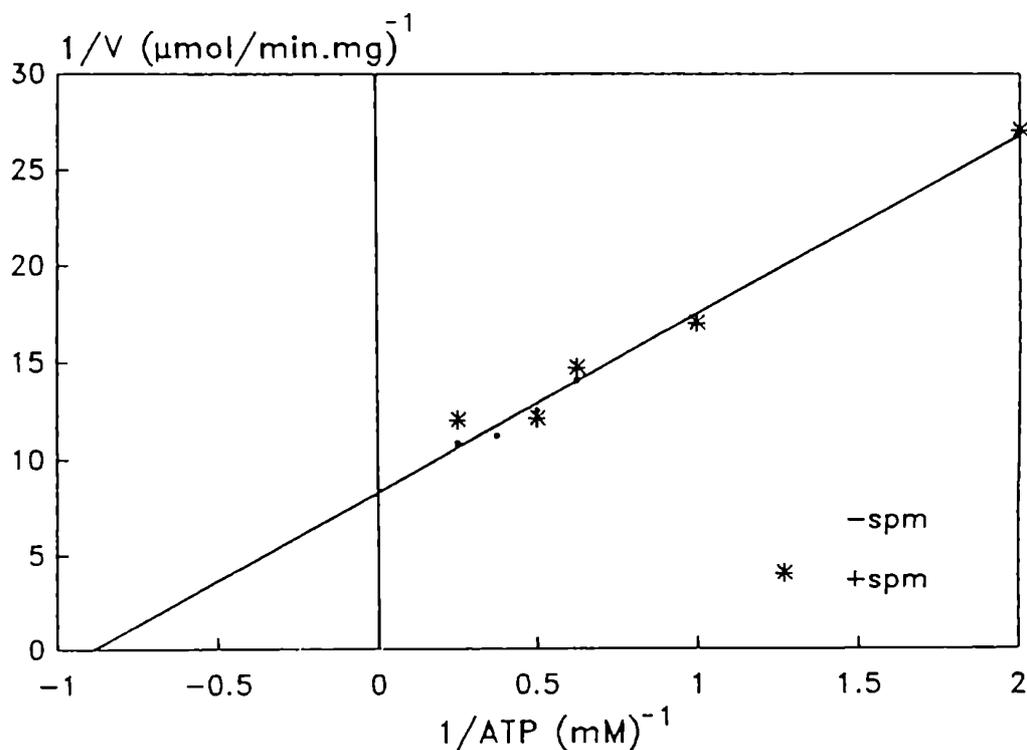


FIGURA 4.6. Efecto de la variación de ATP sobre la reacción de hidrólisis en partículas submitocondriales de *T.cruzi* en presencia de espermina. Se incubaron 50 μl de A-partículas (8,4 mg/ml) con cantidades crecientes de ATP, en presencia de 2 mM de MgCl_2 y 4 mM de espermina en las condiciones descriptas en el texto.

4.3.2. Actividad de la H⁺-ATPasa de *C.fasciculata*.

Se realizaron cinéticas de inhibición sobre partículas submitocondriales de *C.fasciculata* (A-partículas), en presencia de 4 mM de espermina, variando la concentración de ATP, ya sea como complejo ATP-Mg en una relación 2:1 (Figura 4.7) o manteniendo constante la concentración de MgCl₂ (2 mM) (Figura 4.8).

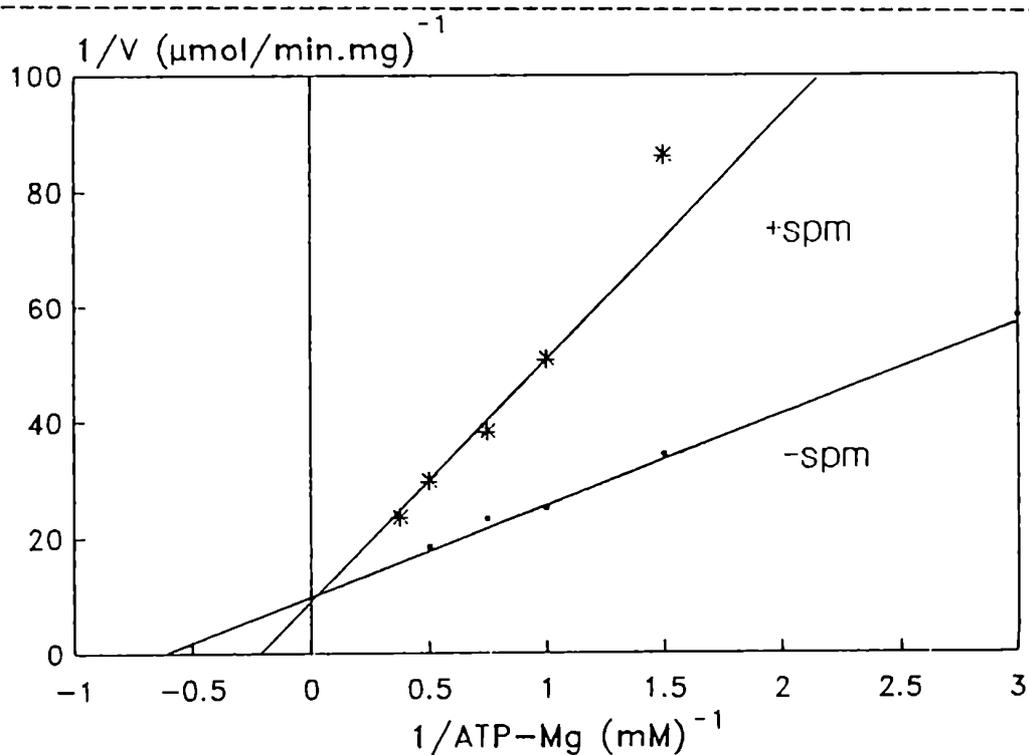


FIGURA 4.7. Efecto de la variación del complejo ATP-Mg sobre la reacción de hidrólisis de ATP en partículas submitocondriales de *C.fasciculata* en presencia de espermina. Se incubaron 50 μl de A-partículas (13,02 mg/ml) con cantidades crecientes de ATP-Mg (2:1) en presencia de 4 mM de espermina en las condiciones descritas en el texto.

Como se observa en la Figuras 4.7 y 4.8, la presencia de poliamina en el medio de reacción produjo un aumento del K_m de la enzima y variación en el valor de V_{max} .

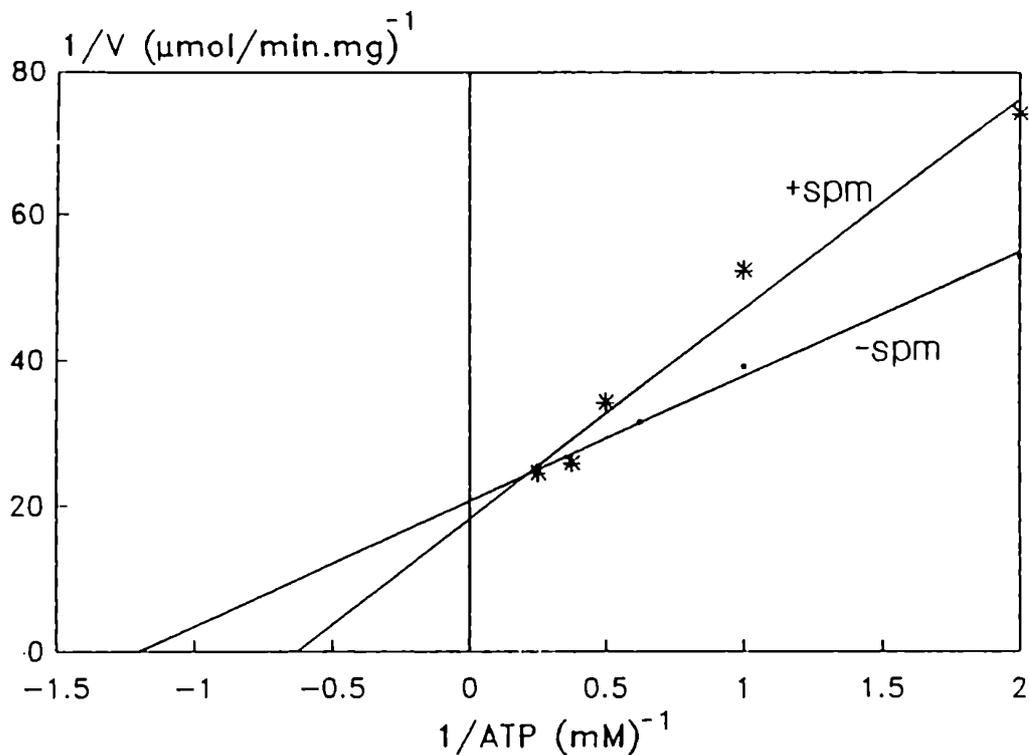


FIGURA 4.8. Efecto de la variación de ATP sobre la reacción de hidrólisis en partículas submitocondriales de *C. fasciculata* en presencia de espermina. Se incubaron 50 μl de A-partículas (13,02 mg/ml) con cantidades crecientes de ATP, en presencia de MgCl_2 2 mM y espermina 4 mM en las condiciones descritas en el texto.

El estudio cinético de la reacción realizada en la fracción F_1 -ATPasa de *C.fasciculata*, en presencia de 4 mM de espermina y variando las concentraciones del complejo ATP-Mg (2:1) mostró una inhibición de tipo competitivo (Figura 4.9), donde en presencia de espermina se observa un valor de K_m mayor, repitiéndose el comportamiento observado en partículas submitocondriales.

Idénticos experimentos se realizaron con espermidina y putrescina y no se observó ningún tipo de efecto sobre la actividad de hidrólisis de ATP.

Se calcularon los K_m y V_{max} de estos y otros experimentos similares realizados sobre la enzima de *C.fasciculata*. En la Tabla 4.4 se muestran los valores promedios \pm SD obtenidos. Como se observa en dicha tabla la espermina aumenta el K_m alrededor de dos veces (experimentos A y C) y tres veces (experimento B, en todos los casos $P < 0,005$); mientras que la V_{max} aumenta un 33% (experimento B, $P < 0,001$) o 20% (experimento C, $P < 0,005$) y no varía en F_1 -ATPasa (experimento A).

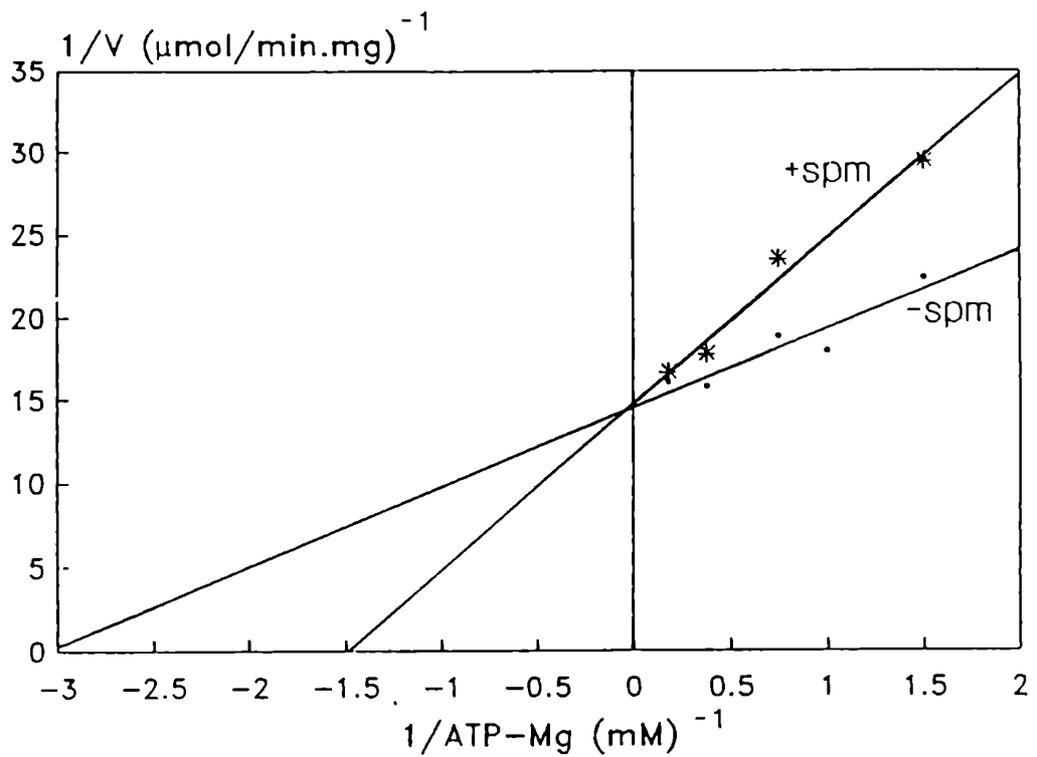


FIGURA 4.9. Efecto de la variación del complejo ATP-Mg sobre la reacción de hidrólisis de ATP en F₁-ATPasa de *C. fasciculata* en presencia de espermina. Se incubaron 250 μl de enzima (1,88 mg/ml) con cantidades crecientes de ATP-Mg (2:1) en presencia de 4 mM de espermina, otras condiciones se describen en el texto.

TABLA 4.4.

PARAMETROS CINETICOS DE INHIBICION CON ESPERMINA DE LA ENZIMA
H⁺-ATPasa DE *C. fasciculata*

Experimento	Parámetros Cinéticos			
	Control		+ Espermina	
	Km (mM)	Vmax	Km (mM)	Vmax
A	0.30 ± 0,04	67 ± 1,7	0,70 ± 0,01	68 ± 1,0
B	1,48 ± 0,05	95 ± 2,4	5,31 ± 0,32	126 ± 5,7
C	0,84 ± 0,10	49 ± 0,7	1,83 ± 0,23	59 ± 4,0

Los datos representan los promedios ± S.D. de los valores obtenidos por los métodos Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf y Eadie-Hofstee. Experimento A: las condiciones fueron descritas en la Figura 4.9. B: descrito en la Figura 4.8. C: idéntico a la Figura 4.7.

4.4. Actividad de hidrólisis de ATP en fracción mitocondrial de células crecidas con deficiencia en poliaminas

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Schwarcz y col. (1990), quienes demostraron que el contenido de poliaminas en células de *T.cruzi* crecidas en medio LIT dializado (LIT (-)) libre de poliaminas y en presencia de DFMO (5-D-difluorometil-ornitina) y DFMA (5-D-difluorometil-arginina) inhibidores de la síntesis de poliaminas (Kierszenbaum, 1987), era inferior al del control, se decidió medir la actividad de hidrólisis de ATP en fracción mitocondrial de epimastigotes de *T.cruzi* cepa RA con bajo contenido endógeno de poliaminas.

4.4.1. Parásitos crecidos en medio deficiente en poliaminas.

Los epimastigotes fueron crecidos en medio LIT dializado (LIT (-)), libre de poliaminas. Al sexto día de crecimiento se cosecharon los parásitos y se obtuvo la fracción mitocondrial. Las medidas de hidrólisis de ATP realizadas en fracción mitocondrial, utilizando el método espectrofotométrico, mostraron un incremento del 28% de actividad con respecto al control realizado con parásitos crecidos en medio LIT completo (Tabla 4.5).

TABLA 4.5.

ACTIVIDAD DE LA H⁺-ATPasa EN FRACCION MITOCONDRIAL DE
EPIMASTIGOTES DE *T. cruzi* CRECIDOS EN MEDIO DE CULTIVO
DEFICIENTE EN POLIAMINA

Condiciones	Actividad	
	($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$)	(%)
LIT	0,552	100
LIT (-)	0,710	128

Los valores de actividad son el promedio de cuatro determinaciones independientes. Las mediciones se realizaron por el método espectrofotométrico. Las condiciones experimentales se describen en el texto.

4.4.2. Parásitos crecidos en presencia de inhibidores de la síntesis de poliaminas.

Se realizaron cultivos de parásitos en medio deficiente en poliaminas (LIT (-)) y se incorporó al medio DFMO 0,6 mM o DFMA 5 mM durante los seis días de cultivo cada 24 horas. Se

midió la actividad de hidrólisis de ATP en la fracción mitocondrial, observándose un incremento de actividad del 18% en parásitos tratados con DFMO y 84% en parásitos tratados con DFMA, con respecto al control realizado con células crecidas sin inhibidores de la síntesis de poliaminas (Tabla 4.6).

TABLA 4.6.

ACTIVIDAD DE LA H⁺-ATPasa EN FRACCION MITOCONDRIAL DE EPIMASTIGOTES DE *T. cruzi* CRECIDOS EN MEDIO DE CULTIVO DEFICIENTE EN POLIAMINA. CON DFMO Y DFMA.

Adiciones	Actividad	
	(μ mol/min.mg)	(%)
Ninguna	0,418	100
DFMO (0,6 mM)	0,497	118
DFMA (5,0 mM)	0,770	184

Los valores de actividad son el promedio de tres determinaciones independientes. Las determinaciones de actividad se realizaron por el método espectrofotométrico. Otras condiciones experimentales se describen en el texto.

4.5. Discusión

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina, son metabolitos ampliamente distribuidos en células procariotas y eucariotas, que participan en la regulación del crecimiento y diferenciación celular, poseen una intrincada vía de síntesis exquisitamente regulada, lo cual atrajo la atención de numerosos grupos de investigadores.

Los mecanismos mediante los cuales las poliaminas ejercen su efecto, no han sido esclarecidos hasta el momento, pero se sabe que en ausencia de las mismas, las células no crecen ni sobreviven. La existencia de tal comportamiento sugirió la hipótesis que vincula a las poliaminas con la regulación de los niveles energéticos intracelulares.

Los trabajos publicados por Byczkowski y col. (1982) indican que, en concentraciones milimolares, las poliaminas alteran el estado-4 de la respiración en mitocondrias aisladas de hígado de rata. Phillips y Chaffe (1982) demostraron que específicamente la espermina reestablece el control respiratorio y la fosforilación oxidativa en mitocondrias desacopladas de corazón bovino. Por otro lado Giffin (1986) encontró que la fracción mitocondrial de *T.brucei brucei* obtenida con 5 mM de putrescina presentó un incremento en el

consumo de oxígeno.

En concordancia con lo publicado, los resultados del presente trabajo muestran que la fracción mitocondrial de *C.fasciculata* aislada con 5 mM de putrescina, espermidina o espermina, presentó una velocidad de consumo de oxígeno mayor a la del control obtenido sin poliamina (Tabla 4.1). El agregado de poliamina directamente al medio de medida de respiración no produjo estimulación.

La actividad de la enzima H⁺-ATPasa de hidrólisis de ATP medida en la fracción mitocondrial de *C.fasciculata* aislada en presencia de poliaminas resultó disminuida (Tabla 4.1). En tanto que el agregado directo de espermidina y putrescina al medio de reacción no inhibió la actividad enzimática.

Rutter y col. (1992) también informaron sobre la irreversibilidad del efecto de la espermina y espermidina sobre la membrana del tejido adiposo. En tal sentido es importante destacar que los productos de oxidación de las poliaminas, los amino aldehídos, son tóxicos para varios tipos de células incluyendo tripanosomas, *Plasmodio*, *Babesia* y *Leishmania infantum* (Brunton, 1991; Cona, 1991; Vliagoftis, 1992). Por lo tanto la oxidación de poliaminas durante el fraccionamiento subcelular podría facilitar la producción de amino aldehídos tóxicos responsables de la inactivación de la H⁺-ATPasa.

La diferencia de comportamiento de las células de *T.cruzi* respecto al consumo de oxígeno, se debió a que dichas células no poseían actividad respiratoria. Tal como se demostró en el espectro diferencial redox de los citocromos de membrana mitocondrial, las células carecían del citocromo b (Figura 4.1), posiblemente se deba a que los parásitos fueron cultivados sin agitación y crecieron en forma anaeróbica desarrollando una cadena respiratoria incompleta.

Los presentes datos experimentales muestran que el agregado directo de espermina al medio de reacción, inhibe la degradación del ATP en partículas submitocondriales de *T.cruzi* y *C.fasciculata* (Tablas 4.2 y 4.3), coincidentemente con lo publicado por Igarashi y col. (1989), quienes realizaron con espermidina y espermina experimentos de inhibición de la reacción de hidrólisis de ATP y de estimulación de la fosforilación oxidativa, en partículas submitocondriales de hígado de rata, atribuyendo el efecto inhibitorio a la formación del complejo ATP-poliamina.

Nakai y Glisman (1977) demostraron que las poliaminas forman complejos con los nucleósidos trifosfato de adenina, siendo las correspondientes constantes de formación a pH 7,5: putrescina 290 M^{-1} , espermidina 900 M^{-1} y espermina 9500 M^{-1} .

En los experimentos de inhibición por agregado directo de la poliamina al medio de medida, a diferencia de lo que

ocurrió con la espermina, la espermidina y putrescina no ejercieron ningún efecto sobre la H⁺-ATPasa. El comportamiento diferente de la espermina podría deberse a que forma el complejo con el ATP con mayor afinidad que las otras poliaminas y por lo tanto es la única que en nuestras condiciones de trabajo *in vitro*, produjo inhibición de la enzima (Tablas 4.2 y 4.3).

El efecto inhibitorio de la espermina se revirtió con el aumento de MgCl₂ al medio, lo que indicaría que existe competencia entre la poliamina y el Mg²⁺ para la formación de complejo con el ATP (Figuras 4.2 y 4.3). En los estudios cinéticos se observó una marcada diferencia en los mecanismos de inhibición en cada parásito. Variando las concentraciones del complejo ATP-Mg (2:1), en partículas de *T.cruzi* se obtuvo inhibición de tipo no competitivo (Figura 4.5), mientras que en partículas de *C.fasciculata* la inhibición fue de tipo competitivo (Figura 4.7) o mixto (Tabla 4.4). Cuando se varió la concentración de ATP manteniendo constante la de Mg²⁺, la enzima de partículas submitocondriales de *C.fasciculata* presentó inhibición de tipo mixto (Figura 4.8 y Tabla 4.4). Estos mecanismos se corroboran al realizar los ensayos con la fracción de la enzima libre de membrana F₁, donde no se observó inhibición para la enzima de *T.cruzi* y se mantuvo la inhibición competitiva en la enzima de *C.fasciculata* (Figura

4.9 y Tabla 4.4)

Los resultados obtenidos indicarían que en *T.cruzi* la espermina requiere, para su acción sobre la enzima, de la presencia de un entorno hidrofóbico; mientras que en *C.fasciculata* la inhibición se produjo sobre F_1 independientemente de la presencia o no de los componentes de membrana. Lo observado en *C.fasciculata* coincide con los datos publicados por Igarashi sobre la H^+ -ATPasa de mitocondria de hígado de rata (Igarashi, 1989).

Los experimentos realizados con fracción mitocondrial de *T.cruzi* cultivados en medio LIT (-), deficiente en poliaminas y en presencia de DFMO o DFMA, posibles inhibidores de la biosíntesis endógena de las mismas (Metcalf, 1978; Kierszbaum, 1987), muestran un marcado aumento en la actividad de la enzima H^+ -ATPasa con respecto al control (Tablas 4.5 y 4.6), indicando que la disminución en el contenido de poliaminas intracelular estimula la degradación del ATP. Estos datos coinciden con el comportamiento *in vitro* de la enzima H^+ -ATPasa en presencia de poliaminas.

Los datos experimentales obtenidos en el presente trabajo indican que la actividad de hidrólisis de la enzima H^+ -ATPasa mitocondrial de tripanosomatídeos es inhibida por poliaminas; ya sea compitiendo con el Mg^{2+} por la formación del complejo con el ATP, como así también estabilizando la membrana

mitocondrial interna en forma directa o a través de sus productos de oxidación, impidiendo de esta manera que se hidrolice el ATP. Paralelamente la estabilización de la membrana mitocondrial provoca un aumento del consumo de oxígeno lo que supondría, en células enteras, la estimulación de la fosforilación oxidativa.

Dichas evidencias corroboran la hipótesis que le otorga a las poliaminas el papel regulador de los procesos enzimáticos dependientes de ATP, a través de la regulación de los niveles intracelulares de nucleótido de adenina.

Aparentemente la espermina, la más activa de las poliaminas sobre la actividad de la H^+ -ATPasa mitocondrial, no es un metabolito fisiológico en los tripanosomatídeos (Shim, 1988; Algranati, 1990), lo que indicaría la improbabilidad de que ejerza un papel regulatorio significativo en el metabolismo del parásito. No obstante es importante destacar que los parásitos, podrían captar la espermina del entorno (Algranati, 1990).

5. ACCION DE FARMACOS SOBRE LA H⁺-ATPasa DE

C.fasciculata Y *L.seymouri*

5.1. Fármacos generadores de radicales libres de oxígeno

5.1.1. Acción del nifurtimox y CG 8-935 sobre *C.fasciculata* y *L.seymouri*.

Se ensayó la acción de drogas generadoras de radicales libres de oxígeno, nifurtimox (nitrofurano) y CG 8-935 (naftoquinona) derivado de la β -lapachona, sobre la actividad de la H⁺-ATPasa mitocondrial de *C.fasciculata* y *L.seymouri*, dos organismos propuestos como modelos para el ensayo de drogas tripanocidas activas sobre *T.cruzi*.

5.1.1.1. Efecto del nifurtimox y CG 8-935 sobre el crecimiento de *C.fasciculata* y *L.seymouri*.

Se estudiaron los efectos producidos por el nifurtimox y CG 8-935 sobre el crecimiento de *C.fasciculata* y *L.seymouri*. Las drogas fueron añadidas al medio de cultivo líquido y estéril, previo a la siembra de los microorganismos, en forma aséptica como solución etanólica o etanol-dimetilformamida. Dichos disolventes en las cantidades utilizadas no afectaron

el crecimiento de los parásitos. Los cultivos se realizaron tal como se describe en métodos. La concentración de células se determinó midiendo la densidad óptica de la suspensión celular, en la fase estacionaria de crecimiento, por la técnica fotocolorimétrica. En las Figuras 5.1 y 5.2 se observan los porcentajes de inhibición del crecimiento en función de la concentración de droga agregada al medio de cultivo.

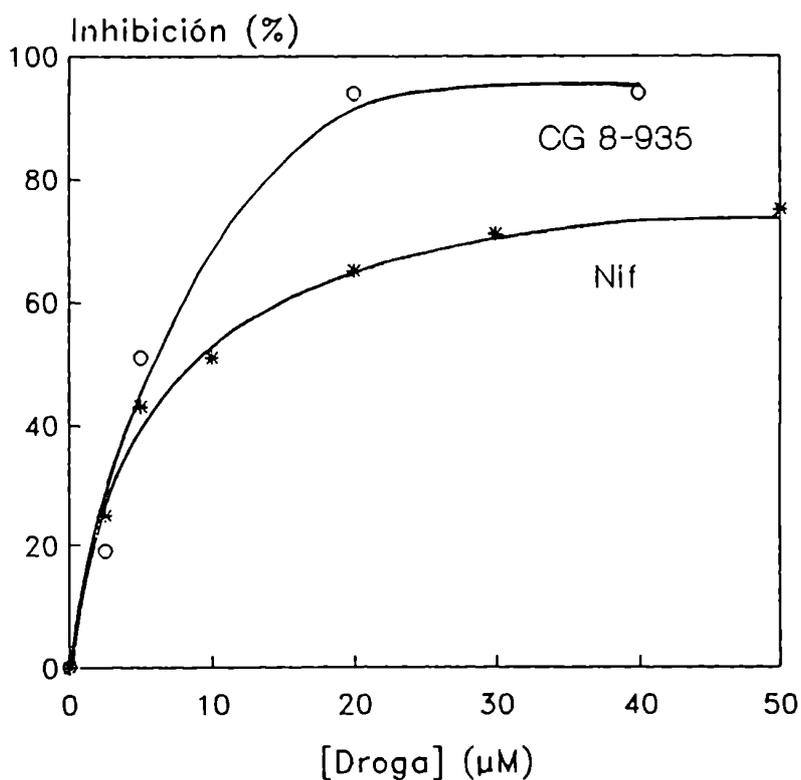


FIGURA 5.1. Inhibición del crecimiento de *C. fasciculata* en función de la concentración de droga (μM) agregada al medio de cultivo.
Nif: nifurtimox.

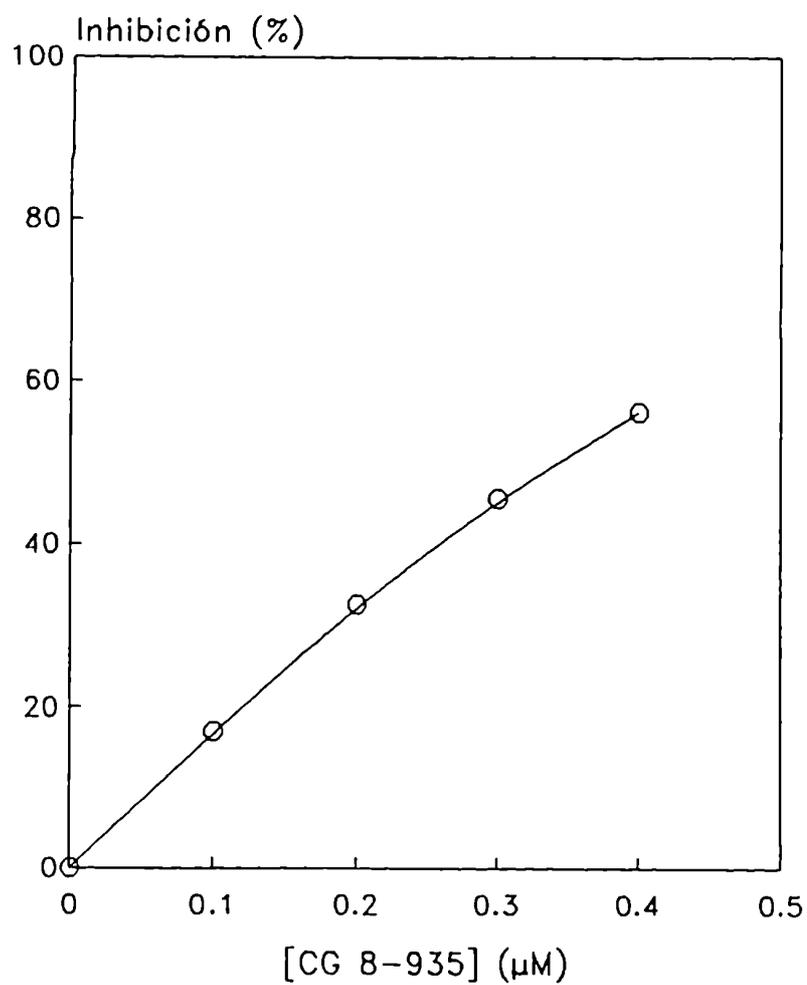


FIGURA 5.2. Inhibición del crecimiento de *L.seymouri* en función de la concentración de naftoquinona CG 8-935 (μM) agregada al medio de cultivo.

Las concentraciones de droga que producen un 50% de inhibición del crecimiento en *C.fasciculata* fueron: 5,1 μM de CG 8-935 y 7,5 μM de nifurtimox y en *L.seymouri*: 0,35 μM de CG 8-935. Si bien ambas drogas inhiben el crecimiento de los parásitos, la naftoquinona CG 8-935 lo hace a menor concentración.

5.1.1.2. Actividad de la H^+ -ATPasa de parásitos incubados con drogas.

A los parásitos cultivados por la técnica descrita en métodos, cuando alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento, se les adicionó 100 μM de nifurtimox o 50 μM de CG 8-935 y se incubó a 28 °C las células de *C.fasciculata* y a 26°C las de *L.seymouri* durante 3 horas con agitación para permitir el ingreso de las drogas al interior de las células y su metabolización. Posteriormente las células fueron cosechadas por centrifugación durante 5 min a 800 g y se sometieron a fraccionamiento subcelular. En la fracción que sedimentó a 9000 g se midió actividad de hidrólisis de ATP por el método colorimétrico. La actividad de las fracciones mitocondriales de parásitos incubados con droga presentó un aumento con respecto al control (Tabla 5.1).

TABLA 5.1.

ACTIVIDAD DE HIDROLISIS DE ATP EN FRACCION MITOCONDRIAL DE
C.fasciculata Y *L.seymouri* INCUBADAS CON NIFURTIMOX Y CG 8-935

Adiciones	Actividad (nmol Pi /min.mg)	
	<i>C.fasciculata</i>	<i>L.seymouri</i>
Ninguna	40	22
Nifurtimox 100 μ M	42	28

Ninguna	6,5	15
CG 8-935 50 μ M	6,6	17

Las células de *C.fasciculata* y *L.seymouri* se cultivaron hasta su fase estacionaria de crecimiento y luego se agregó nifurtimox o CG 8-935. Las condiciones experimentales se detallan en el texto.

5.1.1.3. Acción del nifurtimox y de la naftoquinona CG 8-935 sobre la enzima H⁺-ATPasa.

Se midió el efecto de las drogas sobre la actividad de hidrólisis de ATP en la fracción mitocondrial y partículas submitocondriales, obtenidas por fraccionamiento subcelular de *C.fasciculata* y *L.seymouri*. Las fracciones se suspendieron en buffer Tris-HCl 50 mM, sacarosa 200 mM, pH: 7.6, y se preincubaron con 100 µM de nifurtimox o 50 µM de CG 8-935 en presencia de 30 mM de NADH como agente reductor para la metabolización de las drogas. A los 30 min de incubación se midió actividad por el método colorimétrico. Los resultados obtenidos en partículas submitocondriales incubadas con naftoquinona muestran inhibición del 21 % para *C.fasciculata* y del 37 % para *L.seymouri*, mientras que con nifurtimox la inhibición fue del 10 % y del 18 % para *C.fasciculata* y *L.seymouri* respectivamente (Tabla 5.2). Las actividades medidas en fracción mitocondrial no mostraron inhibición significativa con respecto al control (Tabla 5.2).

Con el objeto de comparar resultados, paralelamente se realizaron ensayos con partículas y fracción mitocondrial de *T.cruzi*. Contrariamente a lo observado para *C.fasciculata* y *L.seymouri*, se obtuvo inhibición de la actividad de hidrólisis de ATP en la fracción mitocondrial, 37% con 100 µM de nifurtimox y 46% con 50 µM de CG 8-935, mientras que los porcentajes de inhibición en partículas submitocondriales

fueron del 17% para ambas drogas (Tabla 5.2).

TABLA 5.2.

ACTIVIDAD DE HIDROLISIS DE ATP EN FRACCION MITOCONDRIAL Y PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES EN PRESENCIA DE NIFURTIMOX Y NAFTOQUINONA CG 8-935

Adiciones	Actividad (nmol Pi /min. mg)					
	CF		LS		TC	
	Mit	A-part	Mit	A-part	Mit	A-part
Ninguna	6,4	49	27	33	37	66
nifurtimox	6,4	44	28	27	23	55
CG 8-935	6,0	39	27	21	20	55

Se incubaron 150 μ g de fracción mitocondrial (Mit) o 40 μ g de partículas submitocondriales (A-part) de *C.fasciculata* (CF), *L.seymouri* (LS) y *T.cruzi* (TC), en presencia de 100 μ M de nifurtimox o 50 μ M de CG 8-935 en el medio de reacción. Otras condiciones experimentales se describen en el texto.

5.1.2. Efecto de los radicales libres de oxígeno generados por el sistema xantina-xantina oxidasa sobre la H⁺-ATPasa.

Uno de los métodos utilizados en el estudio del mecanismo de acción de una enzima y de los residuos de aminoácidos involucrados en la actividad de la misma, se basa en el empleo de sistemas generadores de radicales libres de oxígeno altamente reactivos. El sistema xantina-xantina oxidasa reduce al O₂ generando H₂O₂ y O₂⁻ (Hille, 1981) quienes reaccionan entre si formando OH· (Beuchamp, 1970; Kong, 1980).

En el presente trabajo se midió la actividad de hidrólisis de ATP en fracción mitocondrial de *C.fasciculata* y *L.seymouri* en presencia del sistema xantina-xantina oxidasa. Se preincubaron 0,6 mg de enzima en 1 ml de un medio que contenía Tris-HCl 100 mM, pH: 7.6, xantina 10 mM, xantina oxidasa 0.46 UI/ml. A distintos tiempos se tomaron alícuotas de 200 µl para determinar actividad enzimática por el método colorimétrico. En la Figura 5.3 se observa que tanto la enzima de *C.fasciculata* como la enzima de *L.seymouri* no fueron afectadas por el sistema generador de radicales libres de oxígeno a diferencia de lo observado en la enzima de *T.cruzi* utilizada como control, quien presentó un T_{0.5}= 60 min, similar al publicado por Cataldi de Flombaum y Stoppani (1986b).

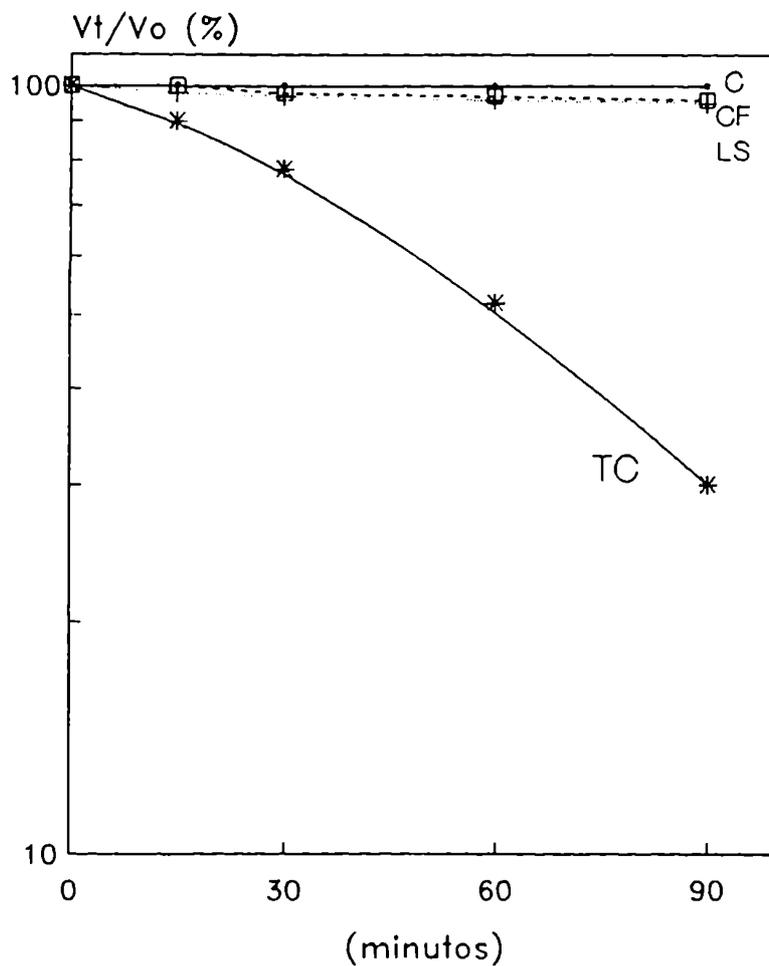


FIGURA 5.3. Acción del sistema xantina-xantina oxidasa sobre la actividad de hidrólisis de ATP en la enzima H^+ -ATPasa de la fracción mitocondrial. Los tiempos de incubación se especifican en el eje de las abscisas. Otras condiciones experimentales se detallan en el texto. • = Control, o = *C. fasciculata*, + = *L. seymouri*, * = *T. cruzi*.

5.2. Acción de drogas específicas de grupos tioles

Estudios realizados por Sastre y Stoppani (1973) y por Cataldi de Flombaum y Stoppani (1980) demostraron que la H^+ -ATPasa de *T.cruzi* fue inhibida por incubación con reactivos para grupos -SH, y que los mismos resultaron ser susceptibles a la oxidación por radicales libres de oxígeno (Cataldi de Flombaum, 1987).

Teniendo en cuenta que la actividad de hidrólisis de ATP en las fracciones mitocondriales de *C.fasciculata* y de *L.seymouri* no fue inhibida por la acción de radicales libres de oxígeno, generados por el sistema xantina-xantina oxidasa, se decidió estudiar la sensibilidad de la enzima de estos parásitos a la acción de grupos sulfhidrilos involucrados en la actividad catalítica.

La fracción mitocondrial obtenida por fraccionamiento subcelular, se incubó a 0 °C durante 10 min. con cantidades crecientes de reactivos específicos para grupos sulfhidrilos en 1 ml de medio de reacción que contenía: Tris-HCl 50 mM, sacarosa 200 mM, pH: 7,6, MgCl₂ 4 mM, EGTA 0,25 mM, luego se agregó ATP 3 mM para iniciar la reacción de hidrólisis a 30 °C. A los 20 min. se frenó la reacción por el agregado de 0,1 ml de TCA al 50% v/v. Las concentraciones de ortofosfato se midieron por el método colorimétrico.

Las Figuras 5.4 y 5.5 muestran que las enzimas de

C.fasciculata y *L.seymouri* fueron inhibidas por: N-etilmaleimida (NEM), p-cloromercuribenzoato (CMB) y fluoresceinmercuriacetato (FMA), obteniéndose los siguientes I_{50} expresados en mM, para *C.fasciculata*: 2,5 (NEM); 0,09 (CMB); 0,018 (FMA) y para *L.seymouri*: 0,19 (NEM); 0,04 (CMB) y 0,010 (FMA) (Tabla 5.3).

Se realizaron estudios comparativos con partículas submitocondriales de *T.cruzi* obtenidas por sonicación de la fracción mitocondrial. Los I_{50} calculados en concentración mM (Tabla 5.3) a partir de las curvas de inhibición realizadas fueron: 0,70 (NEM), 0,060 (CMB) y 0,002 (FMA) (Figura 5.6), los mismos coinciden en el orden de magnitud, con los valores publicados por Cataldi de Flombaum y col. (1980), para la fracción soluble (F_1) de la H^+ -ATPasa de *T.cruzi*, y por Sastre y Stoppani (1973), para la enzima unida a membrana.

Si bien las enzimas de *C.fasciculata* y *L.seymouri* tienen grupos -SH de los cuales depende su actividad catalítica, tal como ocurre con la enzima de *T.cruzi*; los mismos no son afectados por el sistema xantina-xantina oxidasa generador de radicales libres de oxígeno.

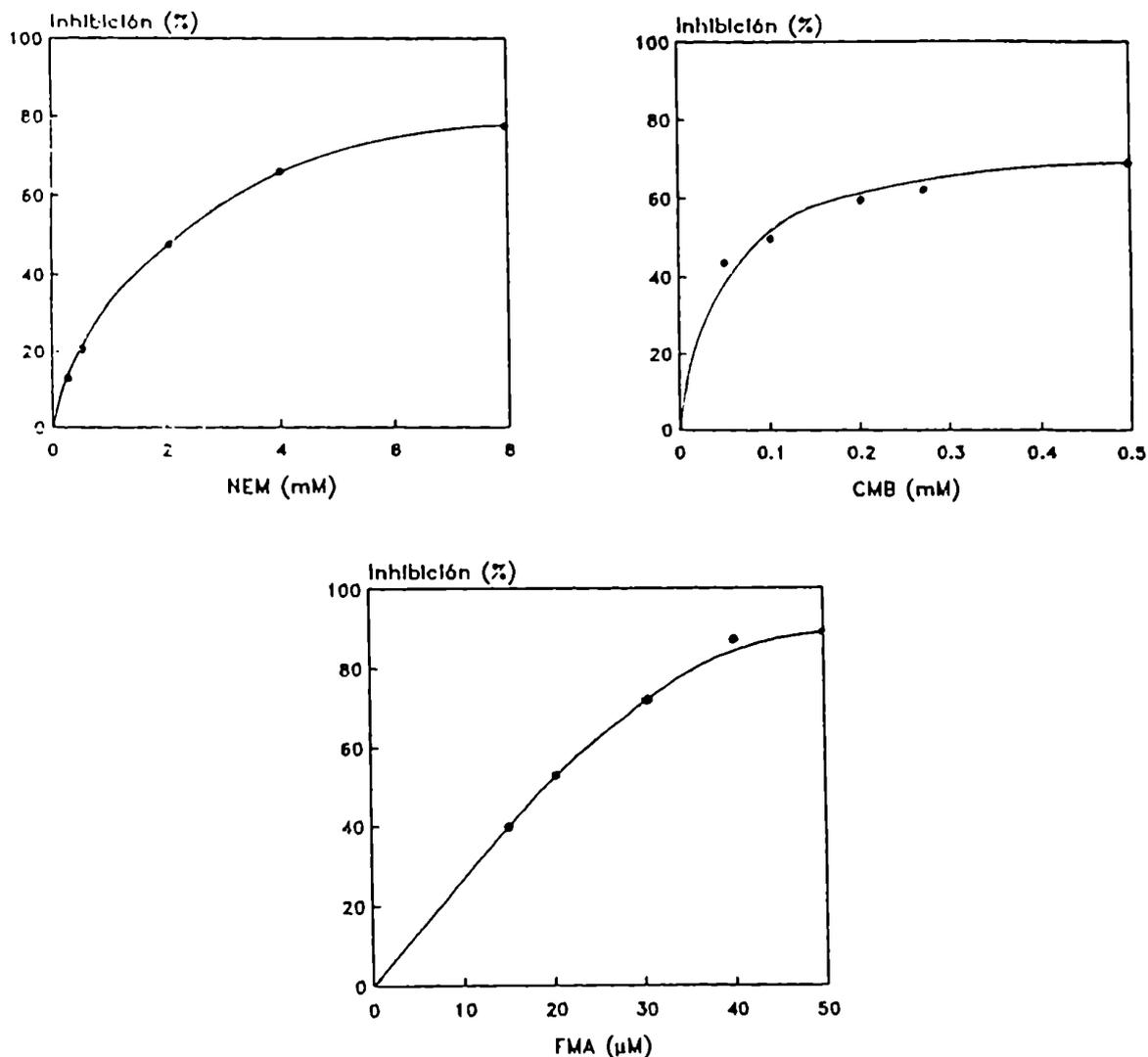


FIGURA 5.4. Inactivación de la enzima H⁺-ATPasa en partículas submitocondriales de *C. fasciculata* por NEM, CMB y FMA. Las concentraciones de inhibidor utilizadas se indican en el eje de las abscisas. Se midió actividad por el método colorimétrico de detección de Pi. Las partículas se incubaron a 0°C con reactivo para SH y luego se adicionó ATP para medir la reacción de hidrólisis. Otras condiciones experimentales se describen en el texto.

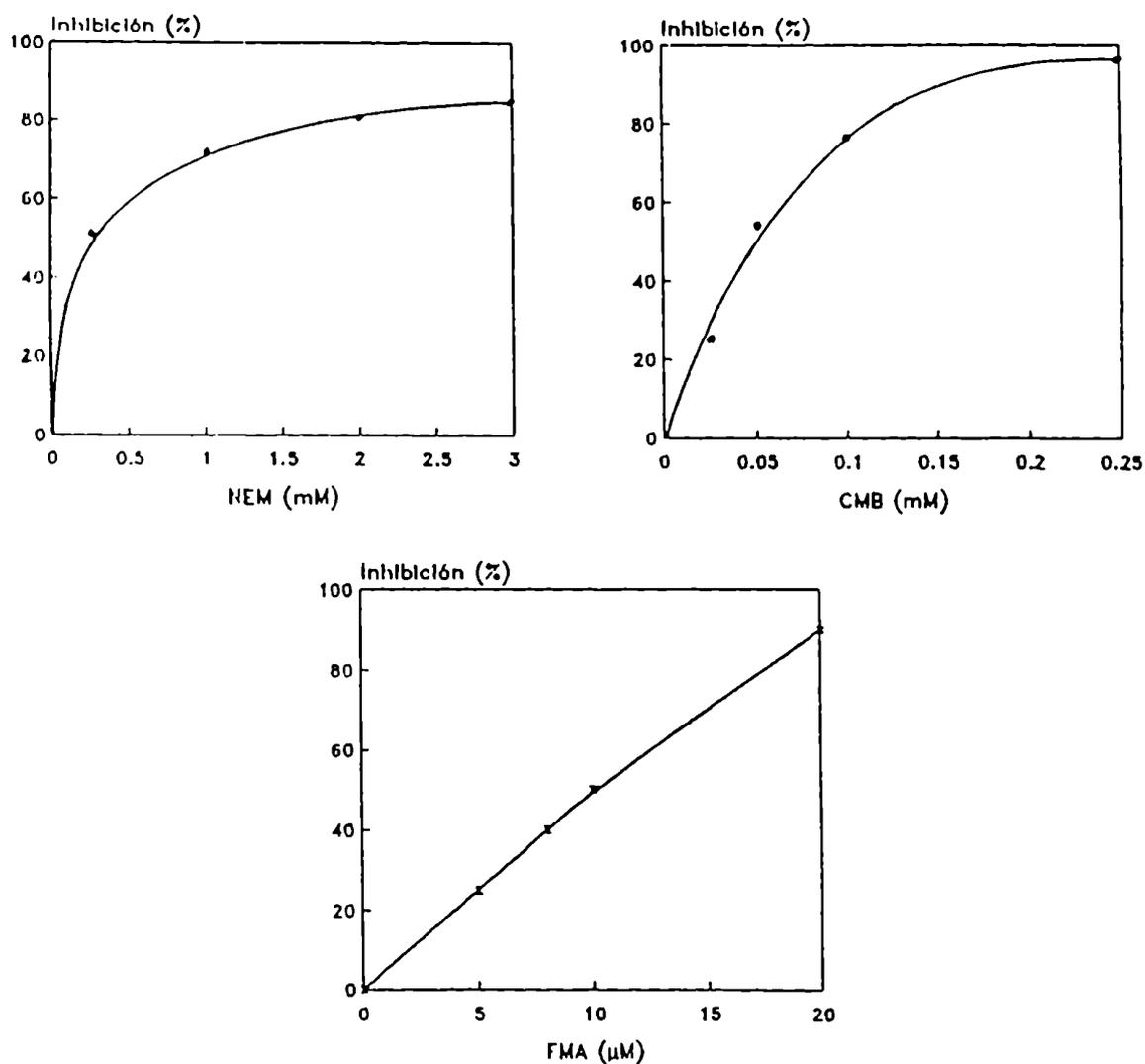


FIGURA 5.5. Inactivación de la enzima H⁺-ATPasa en partículas submitocondriales de *L.seymouri* por NEM, CMB y FMA. Las concentraciones de inhibidor utilizadas se indican en el eje de las abscisas. Se midió actividad por el método colorimétrico de detección de Pi. Las partículas se incubaron a 0 °C con reactivo para SH y luego se adicionó ATP para medir la reacción de hidrólisis. Otras condiciones experimentales se describen en el texto.

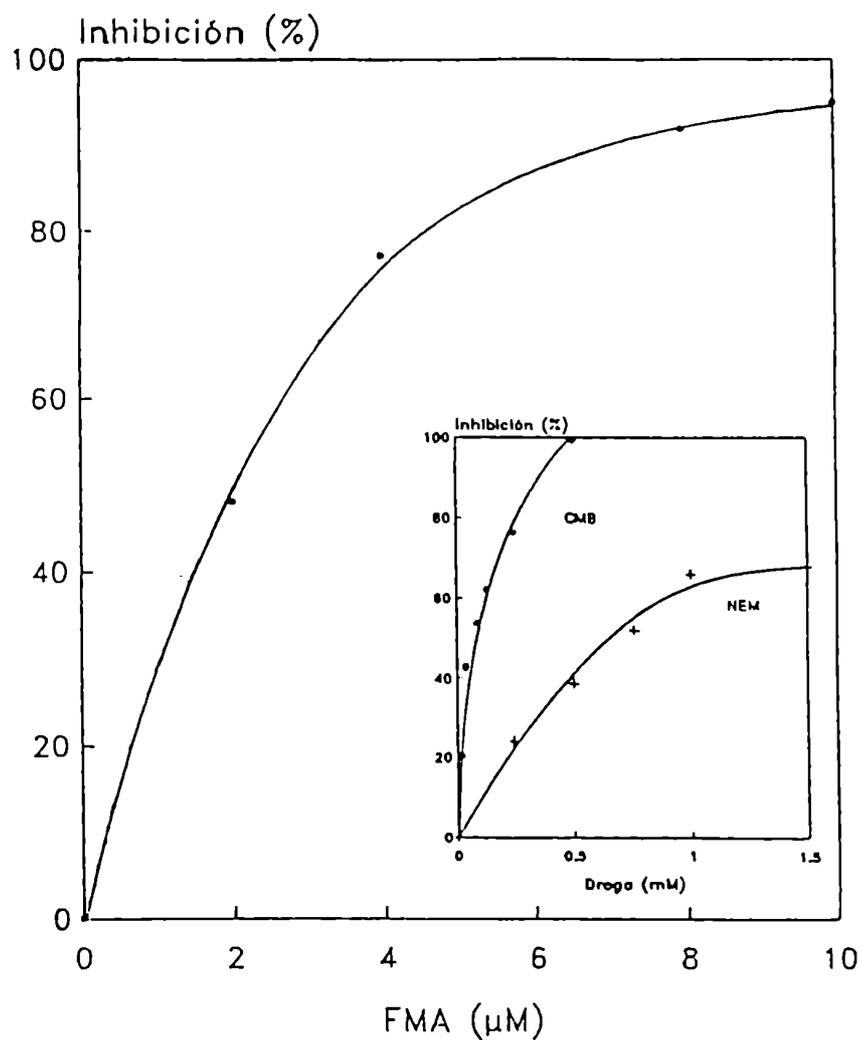


FIGURA 5.6. Inactivación de partículas submitocondriales de *T. cruzi* por NEM, CMB y FMA. Las concentraciones de inhibidor utilizadas se indican en el eje de las abscisas. Se midió actividad por el método colorimétrico de detección de Pi. Las partículas se incubaron a 0 °C con reactivo para SH y luego se adicionó ATP para medir la reacción de hidrólisis. Otras condiciones experimentales se describen en el texto.

TABLA 5.3.

CONCENTRACION DE DROGA NECESARIA PARA INHIBIR UN 50% LA
ACTIVIDAD DE LA H⁺-ATPasa DE *C.fasciculata* Y *L.seymouri*

Drogas	Iso (mM)		
	CF	LS	TC
NEM	2,50	0,19	0,70
CMB	0,09	0,04	0,06
FMA	0,018	0,010	0,002

La fracción mitocondrial de *C.fasciculata* (CF), *L.seymouri* (LS) y *T.cruzi* (TC) se incubaron con N-etilmaleimida (NEM), p-cloromercuribenzoato (CMB) y fluoresceinmercuriacetato (FMA), a 0°C durante 10 min. La reacción de hidrólisis de ATP se midió por el método colorimétrico. Otras condiciones experimentales se detallan en el texto.

5.3. Discusión

En el presente trabajo se ensayaron dos drogas con acción tripanocida: el nifurtimox, un nitrofurano utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Chagas en su fase aguda (Van den Bossche, 1978), y la droga de CIBA-GEIGY CG 8-935 utilizada como modelo de naftoquinona (Schaffner-Sabba, 1984). Ambas drogas son generadoras de radicales libres de oxígeno (O_2^- y H_2O_2) (Docampo y Stoppani, 1979 y 1980; Chance y col., 1979).

Los experimentos se realizaron en *C.fasciculata* y *L.seymouri*, tripanosomatídeos utilizados como modelos de estudio de la H^+ -ATPasa mitocondrial.

El crecimiento de ambos parásitos fue inhibido por el agregado de droga al medio de cultivo (Figuras 5.1 y 5.2). Las concentraciones necesarias para inhibir el crecimiento en un 50% fueron para *C.fasciculata* 5,1 μM de CG 8-935 y 7,5 μM de nifurtimox y para *L.seymouri* 0,35 μM de CG 8-935. El ciclo redox de las quinonas y los nitrofuranos en *T.cruzi* genera oxi-radicales altamente reactivos, lo que no excluye la acción directa de las drogas con los diferentes componentes celulares, entre ellos los grupos tioles de las proteínas. La respuesta de *C.fasciculata* a las drogas en general fue menor que la de *L.seymouri*. Esta menor sensibilidad puede atribuirse

al alto contenido de actividad de catalasa en *C.fasciculata* que protege al parásito de los oxi-radicales. Si bien ambas drogas presentan acción tripanocida, la naftoquinona CG 8-935 actuó a menores concentraciones. Los datos obtenidos coinciden con lo publicado por Pahn y col. (1988).

El agregado de altas concentraciones de drogas al medio de cultivo en la fase estacionaria de crecimiento, no modificó la actividad de hidrólisis de ATP en la fracción mitocondrial con respecto al control realizado con parásitos cultivados sin droga (Tabla 5.1).

Considerando que tanto el nifurtimox como la naftoquinona CG 8-935 son drogas generadoras de radicales libres de oxígeno (Docampo, 1979 y 1981), y que en la enzima H^+ -ATPasa mitocondrial de *T.cruzi* se demostró la presencia de grupos sulfhidrilos (-SH) capaces de reaccionar con dichos radicales (Yamakura, 1984; Zs-Nagy, 1984; Cataldi de Flombaum, 1986b; Cataldi de Flombaum, 1987), se realizaron incubaciones de partículas submitocondriales obtenidas de *C.fasciculata* y *L.seymouri* con exceso de droga, respecto de las cantidades necesarias para inhibir el crecimiento de los parásitos en cultivo o para la producción de O_2^- y H_2O_2 por la membrana mitocondrial (Boveris, 1978a). Los relativamente bajos porcentajes de inhibición obtenidos (Tabla 5.2), considerando las altas concentraciones de droga ensayadas, indican que la actividad de la enzima H^+ -ATPasa mitocondrial de

C.fasciculata y *L.seymouri* es relativamente poco sensible a la acción del nifurtimox y de la naftoquinona CG 8-935. Idénticos experimentos se realizaron con las fracciones mitocondriales de ambos parásitos, donde tampoco se observaron valores significativos de inhibición de actividad de hidrólisis de ATP.

Cuando los ensayos en forma comparativa se realizaron con la enzima de *T.cruzi* se observó un comportamiento distinto. La actividad de hidrólisis de ATP en la fracción mitocondrial fue más fuertemente inhibida que en partículas submitocondriales (Tabla 5.2).

En todos los casos estudiados la naftoquinona demostró ser más potente inhibidor de la H⁺-ATPasa que el nifurtimox.

Cuando las fracciones mitocondriales de *C.fasciculata* y *L.seymouri* fueron incubadas con el sistema xantina-xantina oxidasa, generador de O₂⁻ y H₂O₂, no se observó alteración de la actividad de la H⁺-ATPasa durante el período de incubación ensayado (Figura 5.3). Comparativamente se repitió el experimento con la fracción mitocondrial de *T.cruzi*, donde se observó un tiempo de incubación para inhibir a la mitad su actividad enzimática (t_{0,5}) de 60 min., similar a los valores publicados por Cataldi de Flombaum y Stoppani (1986b). Tales diferencias en el comportamiento de la H⁺-ATPasa ante el sistema xantina-xantina oxidasa también podrían deberse a la presencia de catalasa en las preparaciones de *C.fasciculata* y

L.seymouri, que protege de la acción de los radicales libres de oxígeno, mientras que las preparaciones de *T.cruzi* no estarían protegidas por no poseer estos parásitos a dicha enzima.

A pesar de la ausencia de inactivación de la H^+ -ATPasa en *C.fasciculata* y *L.seymouri* por radicales libres de oxígeno, la incubación de las fracciones mitocondriales con reactivos específicos para grupos tioles, NEM, CMB y FMA (Lee, 1969, Azocar, 1978; Cataldi de Flombaum, 1980), produjo la inactivación total de la enzima H^+ -ATPasa (Figuras 5.4 y 5.5). Los valores de I_{50} obtenidos para la enzima de *C.fasciculata* fueron mayores que para *L.seymouri* y *T.cruzi*, lo que indicaría que los grupos -SH de la H^+ -ATPasa de *C.fasciculata* se encuentran menos expuestos a la acción de drogas (Tabla 5.3). Los valores obtenidos en el presente trabajo son coincidentes con los publicados por Cataldi de Flombaum y col. (1980) para F_1 de *T.cruzi* (NEM: 0,48 mM; CMB: 25 μ M y FMA: 0,7 μ M) y con los publicados por Sastre y Stoppani (1973) para la enzima unida a la fracción mitocondrial de *T.cruzi* (NEM: 1 mM y CMB: 27 μ M).

Los datos obtenidos demuestran que la H^+ -ATPasa de *C.fasciculata*, *L.seymouri* y *T.cruzi* posee grupos sulfhidrilos relacionados con la actividad catalítica de la enzima. Coincidentemente con lo publicado por Sastre y Stoppani (1973) y Cataldi de Flombaum y col. (1980), sobre la enzima de

T. cruzi, el FMA fue el inhibidor mas efectivo, seguido por CMB y NEM; lo que demuestra su mayor capacidad de penetrar en la molécula y su mayor afinidad por los grupos sulfhidrilos de la H⁺-ATPasa (Lee, 1969).

Las enzimas H⁺-ATPasa de *L. seymouri* y *C. fasciculata* poseen grupos sulfhidrilos vinculados con la actividad de hidrólisis de ATP. Los mismos no son afectados por la presencia de radicales libres de oxígeno en el medio de reacción generados por el sistema xantina-xantina oxidasa, tal como ocurre en *T. cruzi*. Dicha diferencia entre la enzima de *T. cruzi* y la de los parásitos en estudio, podría deberse a la ubicación de los restos -SH en la estructura de la proteína, pudiendo encontrarse localizados en sitios poco accesibles a la acción de los radicales libres del oxígeno generados por el sistema xantina-xantina oxidasa, o bien a la presencia de la enzima catalasa en las fracciones ensayadas que impiden la acción de los radicales libres de oxígeno.

Para producir una moderada inhibición de la enzima H⁺-ATPasa de *L. seymouri* y de *C. fasciculata* fueron necesarias altas concentraciones de nifurtimox y de CG 8-935. Dichas drogas podrían afectar a la enzima mediante la interacción directa con la misma. Sin embargo la posibilidad de que exista un mecanismo de acción mediado por la producción de radicales libres de oxígeno no puede ser descartada y, debido a la baja reactividad de la H⁺-ATPasa de los parásitos en estudio a

dichos radicales, se hacen necesarias altas concentraciones de drogas en el medio de reacción.

Las concentraciones de droga necesarias para inhibir el crecimiento de *L.seymouri* fueron inferiores que las utilizadas para *C.fasciculata*. La H⁺-ATPasa de *L.seymouri* es un poco más sensible a la incubación con naftoquinona y nitrofurano, 0,76 y 0,80 veces respectivamente, que la enzima de *C.fasciculata*. Coincidentemente también se observó que, ante la incubación con reactivos específicos de grupos sulfhidrilos, la H⁺-ATPasa de *L.seymouri* es más sensible que la enzima de *C.fasciculata*, sin embargo ambas permanecieron inalteradas cuando se incubaron con el sistema xantina-xantina oxidasa, generador de radicales libres de oxígeno. Las observaciones mencionadas sugieren sutiles diferencias entre las enzimas de ambos parásitos, mientras que dichas diferencias se acentúan aún más al compararse con la enzima de *T.cruzi*.

Por todo lo expuesto podríamos afirmar que, si bien los parásitos experimentados pertenecen a la familia trypanosomatidae, existen diferencias entre la H⁺-ATPasa mitocondrial de *T.cruzi* y la enzima de *C.fasciculata* y *L.seymouri* ante la modificación química de la misma por las drogas ensayadas. Tales diferencias indicarían que las enzimas H⁺-ATPasa de *C.fasciculata* y *L.seymouri* no son un modelo ideal para el estudio de la enzima de *T.cruzi*.

6 . RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se realizó el estudio de inhibidores fisiológicos y farmacológicos de la H⁺-ATPasa mitocondrial de tripanosomatídeos, con el fin de esclarecer el mecanismo de acción de la enzima de parásito, aportando mayores evidencias que permitan establecer posibles diferencias y similitudes con la enzima de mamífero.

1.- Se aisló y estudió el inhibidor peptídico (IF₁) de la H⁺-ATPasa de *T.cruzi* y *C.fasciculata*. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

a) Las partículas submitocondriales de *T.cruzi* y *C.fasciculata* filtradas a través de una columna de Sephadex G-50, aumentaron su actividad 3-4 veces, debido a la separación del IF₁ de la enzima. El inhibidor de *T.cruzi* retenido en la columna de Sephadex G-50, se recuperó por aumento de la fuerza iónica del buffer en presencia de DTT y EDTA.

b) Para la obtención de IF₁ de la H⁺-ATPasa de fracción mitocondrial de *T.cruzi* y *C.fasciculata* se procedió según el siguiente esquema de trabajo:

I.- ruptura mecánica de las células con perlas de vidrio.

II.- centrifugación diferencial para la obtención de fracción mitocondrial.

III.- sonicación en buffer pirofosfato para la obtención de partículas submitocondriales.

IV.- tratamiento con colato y precipitación fraccionada con

(NH₄)₂SO₄ para la obtención de la H⁺-ATPasa.

V.- calentamiento y precipitación alcohólica con el fin de aislar al inhibidor proteico.

c) La actividad del inhibidor se puso de manifiesto cuando se incubaron partículas activadas en presencia de IF₁, en un volumen reducido para evitar la disociación y con el agregado de ATP-Mg para generar un estado conformacional transitorio de la enzima que permita la formación del complejo enzima-inhibidor.

d) Los estudios de inhibición realizados determinaron la posibilidad de establecer interacciones entre la H⁺-ATPasa y el inhibidor de un mismo origen (interacciones homólogas), como así también entre la enzima e inhibidor de distintos orígenes (interacciones heterólogas). Esto evidencia la existencia de importantes analogías entre las H⁺-ATPasas y los inhibidores proteicos de distintas especies.

e) Se observó inhibición de la fracción soluble de la enzima (F₁-ATPasa) de *T.cruzi* indicando que no sería necesaria la presencia de los componentes de membrana para que IF₁ interactúe con la subunidad catalítica.

f) El inhibidor de *C.fasciculata* resultó ser sensible a la inactivación por tripsina, similar a lo observado para el inhibidor de hígado de rata y de corazón bovino.

g) Por filtración del inhibidor proteico a través de una columna de HPLC-C₁₈ con gradiente de acetonitrilo, se obtuvo un pico máximo a 35% de acetonitrilo que presentó actividad de

inhibidor. Dicho valor de gradiente se asemeja al de elución de IF₁ de corazón bovino y de *C.utilis*.

h) El peso molecular calculado para IF₁ de *C.fasciculata* por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 y 15% en presencia de SDS fue 8000-8500 ± 1500. Dicho valor se corresponde a los publicados para IF₁ de otros organismos.

Los datos obtenidos demuestran que las características del inhibidor proteico de *T.cruzi* y *C.fasciculata* son similares a las descritas para otros inhibidores.

2) Se demostró la regulación de la cadena respiratoria y la H⁺-ATPasa mitocondrial de *T.cruzi* y *C.fasciculata* por poliaminas. Los resultados se describen a continuación:

a) Las fracciones mitocondriales de *C.fasciculata* aisladas en presencia de putrescina, espermidina y espermina presentaron mayor velocidad de consumo de oxígeno y disminución de la actividad de hidrólisis de ATP.

b) En partículas submitocondriales de *T.cruzi* y *C.fasciculata* se observó inhibición de la H⁺-ATPasa por incubación con espermina, efecto posiblemente atribuido a la formación del complejo ATP-espermina, debido a que la inhibición por espermina se revierte con el aumento de la concentración de Mg²⁺ en el medio de reacción.

c) La cinética de inhibición de la H⁺-ATPasa de partículas submitocondriales de *T.cruzi* incubadas con espermina fue de

tipo no competitivo. La fracción soluble F_1 -ATPasa de *T.cruzi* no presentó inhibición. La inactivación por espermina de la H^+ -ATPasa de partículas submitocondriales de *C.fasciculata* fue de tipo competitivo y mixto, observándose aumento del K_m y disminución de la V_{max} . En la fracción F_1 -ATPasa de la enzima de *C.fasciculata* se observó inhibición de tipo competitivo.

d) Las células de *T.cruzi* cultivadas en ausencia de poliaminas, presentaron una marcada activación de la enzima H^+ -ATPasa.

Los presentes datos indican que las poliaminas intervienen en los procesos de regulación de los niveles de energía intracelulares de los tripanosomatídeos similar a lo observado para células de mamíferos.

3) Se estudió la actividad de la H^+ -ATPasa de *C.fasciculata* y *L.seymouri* en presencia de drogas. Los resultados obtenidos muestran que:

a) El crecimiento de *C.fasciculata* y *L.seymouri* fue inhibido por el agregado al medio de cultivo del nitrofurano nifurtimox y de la naftoquinona CG 8-935.

b) La actividad de la H^+ -ATPasa de fracción mitocondrial obtenida de *C.fasciculata* y de *L.seymouri* cultivadas con el agregado de droga al medio no presentó modificación.

c) La incubación de partículas submitocondriales con el nitrofurano nifurtimox y con la naftoquinona CG 8-935

directamente en el medio de medida, produjo la inhibición de la actividad de la H^+ -ATPasa de *C.fasciculata*, de *L.seymouri* y de *T.cruzi*.

d) La incubación de la fracción mitocondrial de *C.fasciculata* y de *L.seymouri* con el sistema generador de oxi-radicales xantina-xantina oxidasa no produjo inhibición de la H^+ -ATPasa a diferencia de lo observado con *T.cruzi*.

e) La presencia de grupos -SH en la enzima H^+ -ATPasa de *C.fasciculata* y *L.seymouri* se puso de manifiesto incubando la fracción mitocondrial con reactivos específicos para grupos sulfhidrilos (NEM, CMB y FMA). Los resultados demostraron que los grupos -SH de la enzima de *C.fasciculata* se encuentran menos expuestos a dichos reactivos que en la enzima de *L.seymouri*. En ambos casos el FMA fue el inhibidor más efectivo, seguido por CMB y NEM. Estos datos concuerdan con lo observado para la enzima de *T.cruzi*.

Los datos obtenidos sugieren sutiles diferencias entre las enzimas de *C.fasciculata* y *L.seymouri*, mientras que dichas diferencias se acentúan aún más al compararse con la enzima de *T.cruzi*.


PROF. DR. ANDRÉS O. M. STOPPANI
DIRECTOR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOENERGÉTICAS
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS


M. María Cristina Kilo

7 . BIBLIOGRAFIA

- Akimenko, V.K., Minkov, I.V. and Vinogradov, A.D. (1972) *Biokhimiya* 37, 348.
- Algranati, I.D., Sánchez, C.P. and González, N.S. (1989) International Symposium on the Biology and Chemistry of Polyamines, abril 9-12, 1989. Buenos Aires, Argentina.
- Algranati, I.D., Sánchez, C.P. and González, N.S. (1990) The Biology and Chemistry of Polyamines, (Goldenberg, S.H. and Algranati, I.D.,) pp. 137-146, ICSU-IRL Press, Oxford.
- Amzel, L.M. and Pedersen, P.L. (1983) *Annu. Rev. Biochem.* 52, 801.
- Andreo, C.S. and Vallejos, R.H. (1977) *FEBS Lett.* 78, 207.
- Arana, J.L., Yoshida, M., Kagawa Y. and Vallejos, R.H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 593, 11.
- Arcos, J.C. and Argus, M.F. (1974) Chemical Induction of Cancer, Academic Press, New York, 2B, 37.
- Asami, K., Yuntti, R. and Ernster, L. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 205, 307.
- Azocar, O. and Muñoz, E. (1978) *J. Gen. Microbiol.* 108, 239.
- Babakov, A.V., Terekhov, O.P. and Yanenko, A.S. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 547, 438.
- Bacchi, C.J., Lambros, C., Goldberg, B., Hunter, S.H. and de Carvahlo, G.D.F. (1974) *Antimicrob. Ag. Chemoter.* 6, 785.
- Bacchi, C.J., Lipschik, G.Y. and Nathan, H.C. (1977) *J. Bacteriol.* 131, 657.
- Bacchi, C.J. (1981) *J. Protozool.* 28, 20.
- Bacchi, C.J. and McCann, P.P. (1987) Parasitic protozoa and polyamines. Orlando. Florida. Academic Press, pp.317-344.
- Bachrach, V. (1973) Function of Naturally Occurring Polyamines, New York, N.Y., Academic Press.
- Bachrach, V., Brem, S., Wertman, S.B., Schnur, L.F. and Greenblatt, C.L. (1979) *Exp. Parasitol.* 48, 457.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 4641.

- Beltrán, C., Tuena de Gómez-Puyou, M., Darzon, A. and Gómez-Puyou, A. (1986) *Eur. J. Biochem.* **160**, 163.
- Bensadoun, A. and Weinstein, D. (1976) *Analyt. Biochem.* **70**, 241.
- Boveris, A., Docampo, R., Turrens, J. and Stoppani, A.O.M. (1978a) *Biochem. J.* **175**, 431.
- Boveris, A., Stoppani, A.O.M., Docampo, R. and Cruz, F.S. (1978b) *Comp. Biochem. Physiol.* **61C**, 327.
- Boveris, A., Sies, H., Martino, E., Docampo, R., Turrens, J.P. and Stoppani, A.O.M. (1980) *Biochem. J.* **188**, 643.
- Boyer, P.D., Cross, R.L. and Momsen, W. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 2837.
- Boyer, P.D. (1975) *FEBS Lett.* **58**, 1.
- Boyer, Y.C. (1979) Addison-Wesley Publ. Co., p.461.
- Brooks, J.C. and Senior, A.E. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 467.
- Bruni, A., Piotti, A., Palatini, P., Dabbeni-Sala, F., and Bigon, E. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **545**, 404.
- Brunton, V.G., Grant, M.H. and Wallace, H.M. (1991) *Biochem. J.* **280**, 193.
- Byczkowski, J.Z., Zychlinski, L. and Porter, C. (1982) *Biochem. Pharmacol.* **31**, 4045.
- Cataldi de Flombaum, M.A., Frasc, A.C.C. and Stoppani, A.O.M. (1980) *Comp. Biochem. Physiol.* **65B**, 103.
- Cataldi de Flombaum, M.A. and Stoppani, A.O.M. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* **3**, 143.
- Cataldi de Flombaum, M.A. and Stoppani, A.O.M. (1982a) *Anales Asoc. Quim. Argentina* **70**, 437.
- Cataldi de Flombaum, M.A. and Stoppani, A.O.M. (1982b) *Mol. Biochem. Parasitol.* **5**, 371.
- Cataldi de Flombaum, M.A. and Stoppani, A.O.M. (1986a) *Biochem. Int.* **12**, 513.
- Cataldi de Flombaum, M.A. and Stoppani, A.O.M. (1986b) *Biochem. Int.* **12**, 785.

- Cataldi de Flombaum, M.A. and Stoppani, A.O.M. (1987) *Biochem. Int.* **14**, 1035.
- Chan, S.H.P. and Barbour, R.L. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**, 499.
- Chang, T.M. and Penefsky, H.S. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 2746.
- Chang, T.M. and Penefsky, H.S. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 1090.
- Chomyn, A., Mariottini, P., Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I., Matsuna-Yagi, A., Hatefi, Y., Doolittle, R.F. and Attardi, G. (1985) *Nature* **314**, 592.
- Cintrón, N.M. and Pedersen, P.L. (1979a) *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **38**, 456.
- Cintrón, N.M. and Pedersen, P.L. (1979b) *J. Biol. Chem.* **254**, 3439.
- Cintrón, N.M., Hullitren, Y., Schwerzman, K. and Pedersen, P.L. (1982) *Biochemistry* **21**, 1878.
- Cohen, S.S. (1971) *Introduction to the Polyamines*, Englerwood Cliffs, N.Y., Prentice-Hall.
- Cona, A., Federico, R., Gramiccia, M., Orsini, S. and Gradoni, L. (1991) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **14**, 54.
- Cross, R.L. and Kohlbrenner, W.E. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 4865.
- Cruz, F.S., Docampo, R. and De Souza, W. (1976) *Acta Tropica* **35**, 35.
- Cruz, V.F. de la, Neckelmann, N. and Simpson, L. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 15136.
- D'Albuquerque, I.L., Maciel, M.C.N., Schuler, A.R.P., De Araujo, M.D.C.M., Medeiros Maciel, G., Cavalcanti, M.D., Gimino Martins, D. and Lacerda, A.L. (1972) *Rev. Inst. Antibiot.* **12**, 31.
- Dabbeni-Sala, F., Furlan, R., Piotti, A. and Bruni, A. (1974) *Biochem. Biophys. Acta* **347**, 77.
- Darszon, A. and Gómez-Puyou, A. (1982) *Eur. J. Biochem.* **121**, 427.

- Das, D. and Neogi, A. (1984) *Clin. Physiol. Biochem.* 2, 32.
- Davies, R.H. and Ristow, J.L. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 479.
- Davies, R.H. and Ristow, J.L. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 271, 315.
- de Meis, L., Martins, O.B. and Alves, E.W. (1980) *Biochemistry* 19, 4252.
- de Meis, L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 6090.
- De Pont, J.J.H.A.M., Schoot, B.M., van Prooyenvan Eaden, A. and Lanting, S.L. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 482, 213.
- Deters, D.W. and Racker, E. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 1041.
- Dianoux, A.C. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134, 332.
- Docampo, R., Boiso, J.F., Boveris, A. and Stoppani, A.O.M. (1976) *Experientia* 32, 972.
- Docampo, R., López, J.N., Cruz, F.S. and De Souza, W. (1977) *Exp. Parasitol.* 42, 142.
- Docampo, R., Boiso, J.F. de, and Stoppani, A.O.M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 502, 466.
- Docampo, R., De Souza, W., Cruz, F.S., Roitman, I., Cover, B. and Gutteridge, W. (1978a) *Z. Parasitenkr.* 57, 189.
- Docampo, R., Cruz, F.S., Boveris, A., Muñiz, R.P.A. and Esquivel, D.M.S. (1978b) *Arch. Biochem. Biophys.* 186, 292.
- Docampo, R. and Stoppani, A.O.M. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 317.
- Docampo, R., Moreno, S.N.J., Stoppani, A.O.M., León, W., Cruz, F.S., Villalta, F. and Muñiz, R.F.A. (1981) *Biochem. Pharmacol.* 30, 1947.
- Docampo, R. and Moreno, S.N.J. (1984) *Rev. Infect. Dis.* 6, 223.
- Douglas, M.G., Koh, Y., Ebner, E., Agsteribbe, E. and Schatz, G. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1335.
- Dreyfus, G., Gómez-Puyou, A. and Tuena de Gómez-Puyou, M. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 400.

- Ebel, R.E. and Lardy, H.A. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 4992.
- Ebner, E. and Maier, K.L. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 671.
- Endo, H., Ono, T. and Sugimura, T. (1971) *Recent Results Cancer Res.* **34**, 1.
- Ernster, L., Yuntti, R. and Asami, K. (1973) *J. Bioenerg.* **4**, 149.
- Ernster, L., Asami, K., Juntti, K., Coleman, J. and Noerdenbrand, K. (1977) *Struct. Biol. Membr.* **135**.
- Ernster, L., Carlsson, C., Hundal, T. and Nordenbrand, K. (1979) *Methods Enzymol.* **55**, 399.
- Fairlamb, A.H., Blackburn, P., Uhlrich, P., Chait, B.T. and Cerami, A. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* **24**, 185
- Feinstein, D.L. and Moudrianakis, E.N. (1984) *J. Bio. Chem.* **259**, 4230.
- Ferguson, S.J., Lloyd, W.J. and Radda, G.K. (1974) *FEBS Lett.* **38**, 234.
- Ferguson, S.J., Lloyd, W.J. and Radda, G.K. (1976) *Biochem. Biophys. Acta* **223**, 174.
- Ferguson, S.J., Harris, D.A. and Radda, G.K. (1977) *Biochem. J.* **162**, 351.
- Fillingame, R.H. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 1079.
- Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.* **66**, 375.
- Fitin, A.F., Vasilyeva, E.A. and Vinogradov, A.D. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86**, 434.
- Foster, D.L. and Fillingame, R.H. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 2009.
- Frigeri, L., Galante, Y.M., Hanstein, W.G. and Hatefi, Y. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 3147.
- Galante, Y., Wong, S.Y. and Hatefi, Y. (1980) *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **39**, 1844.
- George, P., Witonsky, R.J., Trachtman, M., Wu, C., Dormost, W., Richman, L., Richman, W., Shurayh F. and Lentz, B. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* **223**, 1.

- Giffin, B.F., Mc Cann, P.P. and Bacchi, C.J. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 165.
- Goijman, S.G., Frasc, A.C.C. and Stoppani, A.O.M. (1985) *Biochem. Pharmacol.* 34, 1457.
- Goijman, S.G. and Stoppani, A.O.M. (1985a) *Arch. Biochem. Biophys.* 240, 273.
- Goijman, S.G. and Stoppani, A.O.M. (1985b) *Biochem. Pharmacol.* 34, 1331.
- Gómez-Fernandez, J.C. and Harris, D.A. (1978) *Biochem. J.* 176, 967.
- Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. and Ernster, L. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 547, 252.
- Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. and de Meis, L. (1986) *Eur. J. Biochem.* 159, 133.
- Grubmeyer, C. and Penefsky, H.S. (1981a) *J. Biol. Chem.* 256, 3718.
- Grubmeyer, C. and Penefsky, H.S. (1981b) *J. Biol. Chem.* 256, 3728.
- Grubmeyer, C., Cross, R.L. and Penefsky, H.S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 12092.
- Guerrieri, F., Scarfo, R., Zanotti, F., Che, Y.W. and Papa S. (1987) *FEBS Lett.* 213, 67.
- Harold, F.M. (1964) *J. Bacteriol.* 68, 1416.
- Harris, D.A. and Crofts, A.R. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 502, 87.
- Harris, D.A., von Tscherner, V. and Radda, G.K. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 548, 72.
- Harris, D.A., Boork, J. and Baltscheffsky, M. (1985) *Biochemistry* 24, 1876.
- Hasebe, H., Yamazaki, S., Tamaura, Y., Hagiwara, H. and Inada, Y. (1978) *FEBS Lett.* 95, 295.
- Hatefi, Y. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* 54, 1015.
- Hayes, D.M., Kenyon, G.L. and Kollman, P.A. (1978) *J. Am. Chem. Soc.* 100, 4331.

- Heldt, H.W., Klingenberg, M. and Milovancev, M. (1972) *Eur. J. Biochem.* **30**, 434.
- Henderson, G.B. and Fairlamb, A.H. (1987) *Parasitology Today*, **3**, 312.
- Herbest, E.J. and Snell, E.E. (1948) *J. Biol. Chem.* **176**, 989.
- Higa, A.I. and Cazzulo J.J. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* **3**, 357.
- Hill, T.L. and Morales, M.F. (1951) *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 1606.
- Hille, R. and Massey V. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 9090.
- Hortsman, L.L. and Racker, E. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 1336.
- Huang, C.H. and Mitchel R.A. (1972) *Biochemistry* **11**, 2278.
- Huang, Y., Kantham, I. and Sanadi, D.R. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 3007.
- Huberman, M. and Salton, M.R.J. (1979) *Biochem. Biophys. Acta* **547**, 230.
- Igarashi, K., Sakamoto, I., Goto, N., Kashiwagi, K., Honna, R. and Hirose, S. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* **219**, 498.
- Igarashi, K., Kashiwagi, K., Kobayashi, H., Ohnishi, R., Kakegawa, T., Nagasu, A. and Hirose, S. (1989) *J. Biochem.* **106**, 294.
- Jänne, J., Poso, H. and Raina, A. (1978) *Biochem. Biophys. Acta (Rev.Cancer)* **473**, 241.
- Kagawa, Y. (1978) *Biochem. Biophys. Acta* **505**, 45.
- Kalckar, H.M. (1941) *Chem. Rev.* **28**, 71.
- Kasiwagi, K., Kobayashi, H. and Igarashi, K. (1986) *J.Bacteriol.* **165**, 972.
- Kayalar, C., Rossing, J. and Boyer, P.D. (1977) *J. Biol. Chem.* **258**, 2486.
- Khananshvili, D. and Gromet-Elhanan, Z. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11377.
- Kierszenbaum, F., Wirth, J.J., Mc Cann, P.P. and Sjoerdsman, A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4278.

- Klein, G. and Vignais, P.V. (1983) *J. Bioenerg. Biomembr.* 15, 347.
- Knowles, A.F., Guillory, R. and Racker, E. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 2672.
- Knowles, A.F. and Penefsky, H.S. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6617.
- Kobayashi, H., Maeda, M. and Anraku, J. (1977) *J. Biochem.* 81, 1071.
- Kohlbrenner, W.E. and Cross, R.L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7609.
- Kong, S. and Davison, A.J. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 204, 18.
- Kozlov, I.A. and Skulachev, V.P. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 463, 29.
- Kumar, G., Kalra, V.K. and Brodie, A.F. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1964.
- Lang, D.R. and Racker, E. (1974) *Biochem. Biophys. Acta* 333, 180.
- Lardy, H.A. and Wellman, H. (1953) *J. Biol. Chem.* 201, 357.
- Lardy, H.A., Reed, P. and Lin, C.H.C. (1975) *Fed. Proc.* 34, 1707.
- Lee, M.J., Harris, R.A. and Green, D.E. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 937.
- Lee, S.H., Kalra, V.K., Ritz, C.J. and Brodie, A.F. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 1084.
- Leedale, G.F. (1974) *Taxon* 23, 261.
- Lemasters, J.J. and Sowers, A.E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1248.
- Lemberg, R. and Barret, J. (1973) *Cytochromes.* Academic Press. London.
- Letko, G., Kuster, U., Duslinski, J. and Kunz, W. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 593, 196.
- Lima, M.F. and Kierszenbaum, F. (1984) *J. Parasit.* 70, 911.

- Liquori, A.M., Constantino, L., Crescenzi, V., Elia, B., Putili, R., De Santi-Sabino, M. and Vitagliano, V. (1967) *J. Mol. Biol.* **34**, 113.
- Lloyd, D. and Edwards, S.W. (1976) *Biochem. J.* **160**, 335.
- Löw, H. and Vallin, J. (1963) *Biochem. Biophys. Acta* **69**, 361.
- López, J.N., Cruz, F.S., Docampo, R., Vasconcellos, M.E.L., Zampallo, M.C.R., Pinto, A.V. and Gilbert, B. (1978) *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72**, 521.
- Marcus, F., Shuster, S.M. and Lardy, H.A. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 1775.
- Martins, O.B., Gómez-Puyou, A. and Tuena de Gómez-Puyou, M. (1988) *Biophys. Chem.* **29**, 111.
- Marton, L.J. and Morris, D.R. (1987) *Inhibition of Polyamine Metabolism*. Orlando, Florida. Academic Press, pp.79-105.
- McCarty, J.E.G. and Ferguson, S.J. (1983) *Eur. J. Biochem.* **132**, 425.
- McLennan, D.H. and Tzagaloff, A. (1968) *Biochemistry* **76**, 1603.
- Metcalf, B.W., Bey, P., Danzin, C., Jung, M.J., Casara, P. and Vever, J.P. (1978) *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 2551.
- Minkov, I.V. and Vinogradov, A.D. (1973) *Biokhimiya* **39**, 542.
- Minkov, I.V., Fitin, A.F., Vasilyeva, E.A. and Vinogradov, A.D. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 1300.
- Minkov, I.V., Fitin, A.F., Vasilyeva, E.A. and Vinogradov, A.D. (1980) *Biochem. Int.* **1**, 478.
- Mironov, G.P., Evtodienko, Y.V. and Kondrashova, M.N. (1974) *Biokhimiya* **39**, 668.
- Mitchell, P. (1977) *FEBS letters* **78**, 1.
- Mondrianacis, E.N. and Adolfsen, R. (1975) *Elec. trans. chain and oxid. fosfor.* Amsterdam, North Holland, pp 373.
- Morello, A. (1988) *Comp. Biochem. Physiol.* **90**, 1.
- Moreno-Sánchez, A. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 12554.
- Morgan, D.M.L. (1990) *Biochem.Soc.Trans.* **18**, 1080.

- Morris, D.R. (1978) *Advances in Polyamine Research*, Raven Press, N.Y., 1, 105.
- Muller, J.L.M., Rosing, J. and Slater, E.C. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 462, 422.
- Murphy, A.J. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70, 1048.
- Nakai, C. and Glinemann, W. (1977) *Biochemistry* 16, 5636.
- Nelson, N., Nelson, H. and Racker, E. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 7657.
- Nelson, N., Deters, D.W., Nelson, H. and Racker, E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 2049.
- Nelson, N. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 456, 314.
- Orian, J.M., Hadikusumo, R.G., Marzuki, S. and Linnana, A.W. (1984) *J. Bioenerg. Biomembr.* 16, 561.
- Ovchinnikov, Yu.A., Modyanov, N.N., Grinkevich, V.A., Belugrudov, G.I., Hundal, T., Norling, B., Sandri, G., Wojtezak, L. and Ernster, L. (1985) *Bioenergetics* eds. Elsevier, Amsterdam, 1, 223.
- Pahn, E.M., Molina Portela, M.P. y Stoppani, A.O.M. (1988) *Rev. Arg. Microbiol.* 20, 107.
- Paulin, J.J. (1975) *J. Cell. Biol.* 66, 404.
- Paulin, J.J. (1977) *Exp. Parasitol.* 41, 283.
- Pedersen, P.L. (1975a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 610.
- Pedersen, P.L. (1975b) *J. Bioenerg.* 6, 243.
- Pedersen, P.L. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 936.
- Pedersen, P.L. and Carafoli, E. (1987a) *Trends Biochem. Sci.* 12, 146.
- Pedersen, P.L. and Carafoli, E. (1987b) *Trends Biochem. Sci.* 12, 186.
- Pegg, A.E. and McCann, P.P. (1982) *Am. J. Physiol.* 234, C212.
- Pegg, A.E. (1986) *Biochem. J.* 234, 249.
- Pegg, A.E. (1988) *Cancer Res.* 48, 751.

- Penefsky, H.S. (1974a) *J. Biol. Chem.* **249**, 3579.
- Penefsky, H.S. (1974b) *The enzymes*, Academic Press, N.Y., 375.
- Phillips, J.E. and Chaffe, R.R.J. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **108**, 174.
- Philosoph, A., Binder, A. and Gromet-Elhanan, Z. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 8747.
- Power, R., Cross, R.L. and Harris, D.A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **724**, 128.
- Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A. and Racker, E. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 3322.
- Pullman, M.E. and Monroy, G.C. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 3762.
- Racker, E. and Horstman, L.L. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 2547.
- Rassam, M.B. and Robert, Z.J. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* **29**, 153.
- Rennert, O.M. and Shukla, J.B. (1978) *Advances in Polyamine Research*, Raven Press, N.Y., **2**, 195.
- Riordan, J.F. (1979) *Mol. Cell. Biochem.* **26**, 71.
- Robertson, H.E. and Boyer, P.D. (1955) *J. Biol. Chem.* **214**, 295.
- Rossi, L., More, G.A., Orrenius S. and O'Brien, P.J. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **251**, 25.
- Rossing, J., Kayalar, C. and Boyer, P.D. (1977) *J. Biol. Chem.* **258**, 2478.
- Russell, D.H. (1973) *Polyamines in Normal and Neoplastic Growth*, New York, N.Y., Raven Press.
- Russell, D.H. and Durie, B.G.M. (1978) *Prog. Cancer Res. Therap.* Raven Press, N.Y. vol.8.
- Russell, D.H. (1980) *Pharmacology*, **20**, 117.
- Rutter, G.A., Diggle, T.A. and Denton, R.M. (1992) *Biochem. J.* **285**, 435.
- Saraste, M., Gay, N.J., Eberle, A., Runswick, M.J. and Walker, J.E. (1981) *Nucleic Acids Res.* **9**, 5287.

- Sastre, M.B.R. de and Stoppani, A.O.M. (1973) FEBS Letters 31, 137.
- Satre, M., de Jerphanion, M.B., Huet, J., and Vignais, P.V. (1975) Biochim. Biophys. Acta 387, 241.
- Sawas, A.H. and Gilbert, J.C. (1984) Arch. Int. Pharmacodyn. 269, 4.
- Schaffner-Sabba, K., Schmidt-Ruppin, K.H., Wehrli, W., Schuerch, A.R. and Wasley, J.W.F. (1984) J. Med. Chem. 27, 990.
- Schoshan, V. and Shavit, N. (1979) Eur. J. Biochem. 94, 87.
- Schrijen, J.J., Luyben, W.A.H.M., De Pont, J.J.H.H.M. and Bonting, S.L. (1980) Biochim. Biophys. Acta 297, 331.
- Schwarcz de Tarlowsky, M., Hernández, S., Bedoya, A., Lammel, E. e Isola, E. (1990) III Congreso Argentino de Protozoología y Reunión sobre Enfermedad de Chagas, noviembre 17-20. Buenos Aires, Argentina.
- Schwerzman, K. and Pedersen, P.L. (1981) Biochemistry 20, 6305.
- Schwerzman, K. and Pedersen, P.L. (1986) Arch. Biochem. Biophys. 250, 1.
- Sebald, W., Graf, T. and Lukins, H.B. (1979) Eur. J. Biochem. 93, 587.
- Seiler, N., Danzin, C., Pracash, N.J. and Koch-Weser, J. (1978) Enzyme-Activated Irreversible Inhibitors. Elsevier/North Holland. Amsterdam, pp.55.
- Seiler, N., Knodgen, B. (1979) Biochem. Med. 21, 168.
- Seiler, N., Dezeure, F. (1990) Int. J. Biochem. 22, 211.
- Senior, A.E. (1973) Biochim. Biophys. Acta 301, 249.
- Senior, A.E. and Wise, J.G. (1981) Annu. Rev. Biochem. 50, 681.
- Senior, A.E. and Wise, J.G. (1983) J. Membr. Biol. 73, 105.
- Shim, H. and Fairlamb, A.H. (1988) J. Gen. Microbiol. 134, 807.

- Sigrist, H., Sigrist-Nelson, K. and Gitler, C. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**, 178.
- Simpson, L. (1972) *Int. Rev. Cytol.* **32**, 139.
- Sjoerdsman, A. and Schechter, P.J. (1984) *Clin. Pharmacol. Ther.* **35**, 287.
- Skulachev, V.P. and Kozlov, I.A. (1974) *Proton adenosine triphosphatase*. Nauka.
- Slater, E.C., Rosing, J. and Hol, A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **292**, 534.
- Slater, T.F. (1984) *Biochem. J.* **222**, 1.
- Smith, J.B., Sternweis, P.C. and Heppel, L.A. (1975) *J. Supramol. Struct.* **3**, 248.
- Smith, J.B. and Sternweis, P.C. (1977) *Biochemistry* **16**, 306.
- Smith, M.T., Evans, C.G., Thor, H. and Orrenius, S. (1985) *Oxidative Stress*, Sies, H., ed., Academic Press, London, pp.91.
- Soong, K.S. and Wang, J.H. (1984) *Biochemistry* **23**, 136.
- Spitsberg, V.L., Morris, H.P. and Chan, S.H.P. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* **195**, 136.
- Steinert, M. (1964) *J. Cell. Biol.* **20**, 192.
- Stutterheim, E., Henneke, M.A.C. and Berden, J.A. (1981) *Biochem. Biophys. Acta* **634**, 271.
- Tabor, C.W. and Tabor, H. (1972) *Adv. Enzymol.* **36**, 203.
- Tabor, C.W. and Tabor, H. (1976) *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 285.
- Tabor, C.W. and Tabor, H. (1984) *Polyamines. Annu. Rev. Biochem.* **53**, 749.
- Tabor, C.W. and Tabor, H. (1985) *Microbiol. Rev.* **49**, 81.
- Taylor, A.E.R. and Baker, J.R. (1978) Academic Press, N.Y./London.
- The Committee on Systematics and Evolution of the Society of Protozoologists (1980) *J. Protozool.* **27**, 37.

- Todd, R.D., Griesenbeck, T.A. and Douglas, M.G. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 5461.
- Tondre, C. and Hammes, G.G. (1973) *Biochem. Biophys. Acta* **314**, 245.
- Tonomura, J. and Tonomura, Y. (1983) *J. Biochem. (Tokyo)* **93**, 1601.
- Tonomura, J. (1984) *J. Biochem. (Tokyo)* **96**, 475.
- Tuena de Gómez-Puyou, M. and Gómez-Puyou, A. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* **182**, 82.
- Tuena de Gómez-Puyou, M., Muller, U., Dreyfus, G., Ayala, G. and Gómez-Puyou, A. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 13680.
- Tuena de Gómez-Puyou, M., Martins, O.B. and Gómez-Puyou, A. (1988) *Biochem. Cell. Biol.* **66**, 677.
- Ucros, H., León, W., and Krassner, S.M. (1977) *Exp. Parasitol.* **41**, 410.
- Van de Stadt, R.J., De Boer, B. L. and van Dam, K. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **292**, 338.
- Van de Stadt, R.J. and van Dam, K. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **347**, 240.
- Van den Bossche H. (1978) *Nature* **273**, 626.
- Ventura, C., Guarnieri, C. and Calderara, C.M. (1985) *The Ital. J. Biochem.* **34**, 267.
- Vliagoftis, H., Boucher, W.S., Mak, L.L. and Theoharides, T.C. (1992) *Biochem. Pharmacol.* **43**, 2237.
- Von Meyenburg, K., Jorgensen, B.B., Nielsen, J., Hansen, F. and Michelsen, O. (1982) *Tokai J. Exp. Clin. Med. (Special Symposium Issue)* **7**, 23.
- Wadkins, C.L. and Lehninger, A.L. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1010.
- Wang, J.H. (1984) *Biochemistry* **23**, 6350.
- Weber, K. and Osborn, M. (1960) *J. Biol. Chem.* **244**, 4406.
- Williams, N. and Frank, P.H. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* **43**, 125.

- Williams-Ashman, H.G. and Cahellakis, Z.N. (1979) *Perspect. Biol. Med.* 22, 421.
- Winston, G.W., Harvey, W., Berl, L. and Cederbaum, A.I. (1983) *Biochem. J.* 216, 415.
- Wong, S.Y., Galante, Y.M. and Hatefi, Y. (1982) *Biochemistry* 21, 5781.
- Yamakura, F. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 635.
- Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H. and Kagawa, Y. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 3480.
- Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H. and Kagawa, Y. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84, 117.
- Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H. and Kagawa, Y. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 9525.
- Yoshida, M. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114, 907.
- Zs.-Nagy, I and Floyd, R.A. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 790, 238.