

Tesis de Posgrado

Fosforilaciones y proceso endocítico temprano durante el ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*

Ochatt, Claudia Margarita

1994

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

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

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

Cita tipo APA:

Ochatt, Claudia Margarita. (1994). Fosforilaciones y proceso endocítico temprano durante el ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2689_Ochatt.pdf

Cita tipo Chicago:

Ochatt, Claudia Margarita. "Fosforilaciones y proceso endocítico temprano durante el ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2689_Ochatt.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Fosforilaciones y Proceso Endocítico Temprano
Durante el Ciclo de Vida del Parásito
Trypanosoma cruzi

CLAUDIA MARGARITA OCHATT

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires

Director: Dra. María Teresa Téllez-Iñón

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería
Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET),
Fac.Cs.Exactas y Naturales.

1994

Recibido
26/89
Ej. 2



Escribió el poeta Po Chü-yi:

**"El que habla no sabe,
el que sabe no habla."
De este modo, me dicen,
habló Lao-tse.
Mas si hemos de creer
que Lao-tse sí sabía,
¿cómo es que escribió un libro
de cinco mil palabras?**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. María Teresa Téllez-Iñón, mi directora de tesis, el haberme introducido al campo de la parasitología, y su permanente aliento y guía que hicieron posible este trabajo de tesis.

Al Dr. Héctor Torres, quien me permitió trabajar en el instituto, brindándome su experiencia y sugerencias que orientaron mi trabajo. A la Dra. Mirtha Flawia por impulsar los ciclos de seminarios, que contribuyeron en mi formación. Al Dr. Alberto Kornblihtt por su buena disposición para enseñarme siempre que pudo. A la Dra. Elvira Isola, por ofrecerme su hospitalidad y permitirme realizar muchos de los experimentos de este trabajo en su laboratorio. A Silvina Wilkowski, Ana, Gerardo y Estela por compartir su lugar de trabajo conmigo. A Berta, Liliana y Juan por compartir consejos y su lugar de trabajo conmigo.

A los chicos del 201, por hacer que el laboratorio siempre estuviera lleno de gente con ganas de aprender y de pasarla bien. A Gustavito Melen, porque nada mejor que seguir con la buena onda aunque vengan arrasando. A Paulita, por fin otra petisa con quien hablar en el lab. A Andrés Muro, que una noche me despegó al marciano verde de encima (gracias una vez más). A Vivi Bernath y Anabella Srebrow, los quiosquitos antes que yo. Al "Negro" y su música, a Susi Susosi, a Vero "Cribaudo" que sabía hasta de Gershwin, a Santi, Juancito y Marce Cerdán, por su ácida candidez. A Dan, a Cristina (por sus cuentos), al Peruano y a Patricia Levi por reivindicar en muchos aspectos que el "fondo" también existe. A los "papa" Beti, Flor, Gabi, Xime, Ken, Pablo Rabi y al maestro Fernando por muchos mates y más consejos.

A los ex-209 Horacio, Leo y Jorge, los "jefes", por brindarme sus experiencias. A mis compañeros de grupo Sandra, GusMac, Eliana (que

supo bancarse dos meses lap top y de onda), Rita, Malala y a las otras "quinasas" Mercedes, Marisa y Andrea por poner mucha cabeza y horas para que todas estas fosforilaciones tengan algún sentido, y por luchar contra el reduccionismo de estos tiempos. A Tere, de vuelta, por las charlas de historia, porque eso también me importa.

A mis amigos Gus (The Pest) por las cervezas y la buena charla, a Vero Otero, por enseñarme que la vida te da sorpresas y buenos reencuentros (tenés razón: todo llega), a Norbe Mala, por recordarme que la vida es sencilla, a Marisa, por ser un respiro de solidez y nobleza en un ambiente a veces enrarecido, a Beto y Marce, no sólo por las charlas de trabajo hasta cualquier hora y en cualquier lugar, sino también por el apoyo moral que me dieron en todo momento aquí y cuando estaba lejos. A Barbara, porque ella fue la que me dio aire para el último tirón. A Omar y a Edith por los buenos momentos durante los fines de semana tan lejos de casa.

A todos los integrantes del INGEBI que ayudan diariamente a que la maquinaria funcione, sin lo cual no habría tesis ni papers. A la Universidad de Buenos Aires.

A mis padres porque dieron su confianza y apoyo incondicional para que tomara decisiones con libertad y seguridad. A Susi, por ser otra madre-amiga que necesité a veces. A mis hermanos Sergio y Estela porque sus experiencias me sirvieron mucho. A Ricki porque siempre hace falta un hermano menor cerca.

Y a Edu, que me sostiene y me acompaña con amor cada vez que se precisa ir para adelante.

ABREVIATURAS

A: amastigotes
a (nm): Radio de Stokes (medido en nanómetros)
AcM: anticuerpo monoclonal
AcM-DNP: anticuerpo monoclonal anti DNP
AcP: anticuerpo policlonal
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ácido desoxirribonucleico copia
ADNk: ácido desoxirribonucleico quinetoplástico.
ADP: adenosina 5'-difosfato
AG: ácidos grasos cis-insaturados
AMPc: 3'-5'adenosina monofosfato cíclico
APS: persulfato de amonio
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ARNr: ácido ribonucleico ribosomal
ARNt: ácido ribonucleico de transferencia
ATP: adenosina 5'-trifosfato
ATP-SR: ATP y sistema regenerante de ATP
 β -ME: β -mercaptoetanol
 β Glu: β -glucuronidasa
BSA: seroalbumina bovina
CaM: Calmodulina
cPKA: subunidad catalítica de la quinasa de proteínas PKA
CAT: Catalasa
CIT: citosol (sobrenadante de 105000 x g)
CIT.c: Citocromo c
Cloruro de bencetonio: Hyamina
CM-Sephadex: carboximetil Sephadex
CoCl: Cloruro de cobalto
cpm: cuentas por minuto
DAG: diacilglicerol
dbA: dibutiril AMPc
DEAE celulosa: dietilaminoetil celulosa
D-MEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNP- β Glu: β -glucuronidasa derivatizada con dinitrofenol

DNP-BSA: seroalbumina bovina derivatizada con dinitrofenol
 DNP: dinitrofenol
 DTT: ditionitrosol
 E: epimastigotes
 EDTA: ácido etilendiamino tetraacético
 EGTA: ácido etilenglicol bis(β-aminoetileter) N,N,N',N' tetraacético
 FPN: fracción post nuclear
 GMPc: 3'-5' guanosina monofosfato cíclico
 hs: horas
 GTPγS: 5'-3-O-(tio)trifosfato guanosina
 HEPES: ácido N-2-hidroxiethylpiperazine-N'-2-etano sulfónico
 IP3: inositol trifosfato
 kDa: kilo Daltons
 LDH: Lactato Deshidrogenasa
 Man: Manosa
 Man-AcM: anticuerpo monoclonal manosilado
 MDH: Malato Deshidrogenasa
 MES: ácido 2-[N-morfolino] etano sulfónico
 min: minutos
 MIX: 3-isobutil-1-metil-xantina
 MOPS: ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico
 MUGluc: 4-metil-umbeliferil-β-D-glucurónido
 NaCl: Cloruro de Sodio
 NADH: nicotin amida-dinucleótido reducido
 NEM: N-etilmaleimida
 PAGE-SDS: geles de poliacrilamida desnaturalizantes
 PBS: solución de fosfatos
 PC: lisofosfatidil colina
 PIPES: piperazin-N,N-bis [ácido 2-etano sulfónico]
 PKA: quinasa de proteínas dependiente de AMPc
 PKC: quinasa de proteínas de tipo C
 PKI: inhibidor de PKA
 PM: peso molecular
 PMA: forbol miristato acetato (TPA: 12-O-tetradecanoil forbol 13-acetato).
 PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro
 PS: fosfatidilserina

RA: cepa RA de *Trypanosoma cruzi*
rPKA: subunidad regulatoria de la quinasa de proteínas PKA
S: coeficiente de Svedberg
SDS: dodecilsulfato sódico
SFB: suero fetal bovino
SFB-Ø: suero fetal bovino calentado a 56°C durante 30 min.
STI: inhibidor de la tripsina del poroto de soja
TEMED: N,N,N',N' Tetrametietilendiamina
TES: ácido 2-[2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil]aminoetanosulfónico
6-TG: 2-amino-6-mercaptopurina (también llamada 6-tioguanina)
TLCK: N- α -p-Tosyl-L-Lisin cloro-metilcetona
TM: tripomastigotes metacíclicos
TRIS: 2 amino-2 (hidroximetil)-1,3 propanodiol
TS: tripomastigotes sanguíneos
Tul: cepa Tulahuén de *Trypanosoma cruzi*
Tween 20: polioxietilensorbitano monolaurato
°C : grados centígrados de temperatura
VP: vacuola parasitofórica

ABREVIATURAS	1
------------------------	---

INTRODUCCION

1.1. Tripanosomátidos: Generalidades sobre Protozoarios	4
1.2. Ubicación Sistemática de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
2.1. Antecedentes y Relevancia de la Infección con <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
2.2. Ciclo de Vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
2.3. Patogénesis, Diagnóstico y Tratamientos del Mal de Chagas.	10
2.4. Variabilidad de Cepas en <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
2.5. Formas Sanguíneas y de Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
3. Vectores Principales de <i>T.cruzi</i> y Consideraciones Epidemiológicas.	13
4.1. Inmunología de la Enfermedad de Chagas	15
4.2. Macrófagos: Los Huéspedes Primarios de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
4.3. Invasión de Células por <i>Trypanosoma cruzi</i> y Evasión de la Respuesta Celular.	19
5.1. Transducción de Señales en Células Eucariotas Superiores	22
5.2. Importancia Funcional de la Fosforilación de Proteínas	28
5.3. Transducción de Señales en Tripanosomátidos.	28
6. Marcadores de la Metaciclogénesis en <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
7.1. Quinasa de Proteínas Dependiente de AMPc (PKA)	35
7.2. PKA en Eucariotas Inferiores	40
8.1. Quinasa de Proteínas Dependiente de Calcio y Fosfolípidos (PKC).	40
8.2. PKC en Eucariotas Inferiores	46
9. Otras Fosforilaciones en Tripanosomátidos	47
10.1. Tráfico Vesicular del Camino Endocítico y del de Secreción.	49
10.2. Endocitosis: Transporte desde la Membrana Via Endosomas	50
10.3.1. Regulación del Camino Endocítico.	51
10.3.2. Proteínas G en el Transporte Vesicular.	53
10.3.3. Proteínas de Unión a Calcio en la Fusión de Membranas	56
10.3.4. Rol de los Lípidos de Membrana en la Fusión de Vesículas.	58
10.3.5. Regulación de la Fusión de Endosomas por Fosforilación de Proteínas	59
11. Ensayos de Fusión de Endosomas en Sistemas Libres de Células	61
12. Endocitosis en Eucariotas Inferiores.	62
OBJETIVOS.	66

MATERIALES Y METODOS

1.1. Crecimiento y Purificación de Parásitos	67
--	----

1.2. Diferenciación de Parásitos..	69
2. Fraccionamiento Subcelular	71
3. Detección de Sustratos Protéicos Endógenos Fosforilados.	72
3.1. <i>In vitro</i>	72
3.2. <i>In vivo</i>	73
4. Cultivo de Células	75
5. Generación de Sondas	75
6. Preparación de <i>S.aureus</i> para Colectar Complejos Inmunes	76
7. Preparación de Vesículas Cargadas.	78
8. Ensayo de Fusión entre Endosomas Tempranos	80
9. Ensayos de Interacción MØ-Parásitos.	82
10. Preparaciones de Citosol Filtrado	83
11. Preparación de cPKA de <i>T.cruzi</i>	
11.1. Cromatografía en DEAE-Celulosa.	84
11.2. Cromatografía de Afinidad en AMPC-Agarosa	84
11.3. Purificación por Gradiente de Densidad de Sacarosa	85
11.4.2. Cálculo de los Parámetros Hidrodinámicos	86
11.5. Cromatografía en Columna de Carboximetil-Celulosa	89
11.6. Purificación de Subunidades de PKA de Corazón Bovino.	89
11.7. Reconstitución de la Holoenzima de <i>Trypanosoma cruzi</i>	90
12. Ensayo de Actividad de Quinasa de Proteínas	90
13. Ensayo de Unión de AMPC	91
14. Western Blots	92
15. Ensayos de Inmunoprecipitación.	93
16. Métodos Analíticos.	93
17. Composición de las Soluciones Usadas.	95

I- RESULTADOS Y DISCUSION SOBRE EL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD

ENDOCITICA DE MACROFAGOS INFECTADOS CON *Trypanosoma cruzi*

1. Estudio de la Fusión de Endosomas Tempranos en MØ normales	99
2.1. Inhibición de la Fusión de Endosomas Tempranos en MØ-TS	102
2.2. Inhibición de la Fusión de Endosomas Tempranos en MØ-TM	103
2.3. Efecto Dual Normal del GTP S Sobre la Fusión de endosomas Tempranos en MØ Mock-Infectados	105
2.4. Activación Normal por Calcio de la Fusión entre Endosomas Tempranos en MØ-TM y MØ-TS.	106

3. Estudio de la Fusión de Endosomas Tempranos Mediada por Citosol de <i>T.cruzi</i>	107
3.1. Efecto Estimulador del GTPS Sobre la Fusión de Endosomas Tempranos Mediada por Citosol de TM o TS.	109
3.2. Fusión de Endosomas Tempranos de MØ Normales Competidos con Citosol de Tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	110
3.3. Efecto Estimulador del GTPS Sobre la Fusión de Endosomas Tempranos Mediada por Citosol de Epimastigotes, E, de <i>T.cruzi</i>	112
3.4. Efecto ESTimulador del Calcio Sobre la Fusión de Endosomas Tempranos Mediada por Citosol de TS o TM de <i>T.cruzi</i>	112
3.5. Efecto estimulador del Calcio Sobre la Fusión de Endosomas Tempranos Mediada por Citosol de Epimastigotes, E, de <i>T.cruzi</i>	112

II- RESULTADOS Y DISCUSION SOBRE LA REGULACION ESTADIO ESPECIFICA DE LA FOSFORILACION DE PROTEINAS DURANTE EL CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*:

1. Purificación a Homogeneidad de la Subunidad Catalítica de la PKA de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Caracterización Bioquímica	116
2. Rendimiento de Purificación de cPKA de <i>T.cruzi</i>	123
3. Determinación de PM por PAGE-SDS de cPKA de <i>T.cruzi</i>	123
4. Caracterización Inmunológica	125
5. Resumen de Parámetros Moleculares e Hidrodinámicos de cPKA de <i>T.cruzi</i>	127
6. Estudios de Especificidad y Parámetros Cinéticos de cPKA de <i>T.cruzi</i>	128
7. Resumen de parámetros cinéticos de cPKA de <i>T.cruzi</i>	133
8. Efecto de los Segundos Mensajeros sobre la Transformación de Epimastigotes de <i>T.cruzi</i>	136
8.1. Estimulación de la Metaciclogénesis por Dibutiril AMPc	136
8.2. Estimulación de la Metaciclogénesis por Esteres de Forbol.	137
9. Ensayos de Fosforilación <i>In vivo</i> de los Disitintos Estadios de <i>T.cruzi</i>	137
9.1. Fosforilaciones Específicas del Estadio Epimastigote (p54 y p35)	139
9.2. Fosforilaciones Específicas del Estadio Tripomastigote Metacíclico (p115, p98 y p21 tripomastigote específicas).	142
9.3. Ausencia de Fosforilaciones Específicas y de Actividad PKC en Amastigotes.	148
9.4. Fosforilaciones Específicas del Estadio Tripomastigote Sanguíneo (p98 y p21 tripomastigote-específicas).	149
10. Caracterización inmunológica de las Quinasas PKC y PKA a lo largo del ciclo de vida de <i>T.cruzi</i>	151

I- CONCLUSIONES SOBRE EL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ENDOCITICA EN MØ INFECTADOS Y EN *T.cruzi*

1. Importancia en la Patogenia de la Inhibición de la Fusión entre Endosomas Tempranos en MØ Infectados con <i>T.cruzi</i>	156
--	-----

2. Importancia de la Fusión entre Endosomas Tempranos en el Metabolismo de <i>T.cruzi</i> . .	156
---	-----

II-CONCLUSIONES SOBRE LA REGULACIÓN ESTADIO ESPECIFICA DE LA FOSFORILACION DE PROTEINAS DURANTE EL CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*

1. Caracterización de la Subunidad catalítica de la PKA de <i>Trypanosoma cruzi</i> y estructura molecular de la Holoenzima	159
2. Importancia de la Fosforilación de Proteínas Durante la Diferenciación de <i>T.cruzi</i> .	160

BIBLIOGRAFIA	164
------------------------	-----

APENDICE

Trabajos realizados durante el período de tesis	177
---	-----

B

INTRODUCCION

1.1. TRIPANOSOMATIDOS, GENERALIDADES SOBRE PROTOZOARIOS:

Los protozoarios se encuentran evolutivamente entre los procariotas y los organismos eucariotas superiores, y con ambos comparten algunas características. Son pequeños, tienen tiempos de generación cortos, altas tasas de reproducción, y presentan tendencia a inducir inmunidad a re-infecciones en los huéspedes que los sobreviven. Estas son características de infecciones con microparásitos, como las bacterias. Por otro lado, los protozoarios son indudablemente células eucarióticas con organelas y caminos metabólicos afines a los de sus huéspedes. Los protozoarios han evolucionado también numerosas adaptaciones que les permiten sobrevivir en sus huéspedes, y en particular, para contrarrestar o evadir la respuesta inmune.

1.2. UBICACION SISTEMATICA DE *Trypanosoma cruzi*:

Los flagelados quinetoplástidos se caracterizan por poseer una única organela, llamada quinetoplasto, situada cerca de la base del flagelo, que contiene ADN y es una parte integral del sistema mitocondrial. Los quinetoplástidos flagelados se encuentran parasitando invertebrados y vertebrados. La forma típica es un organismo alargado con un quinetoplasto y un flagelo en el extremo anterior. Se producen variaciones de esta forma por migraciones del complejo quinetoplasto-flagelo dentro del cuerpo del flagelado, asociado con cambios en el sistema mitocondrial. Las formas en el ciclo de vida de un quinetoplástido flagelado se muestran en la Figura 1. El género *Trypanosoma* comprende parásitos digenéticos que tienen en uno de sus estadios de desarrollo la forma tripomastigote.

Este género (Hoare, 1972) se divide en dos secciones: Salivaria y Stercoraria. En la primera están comprendidos *tripanosomátidos*

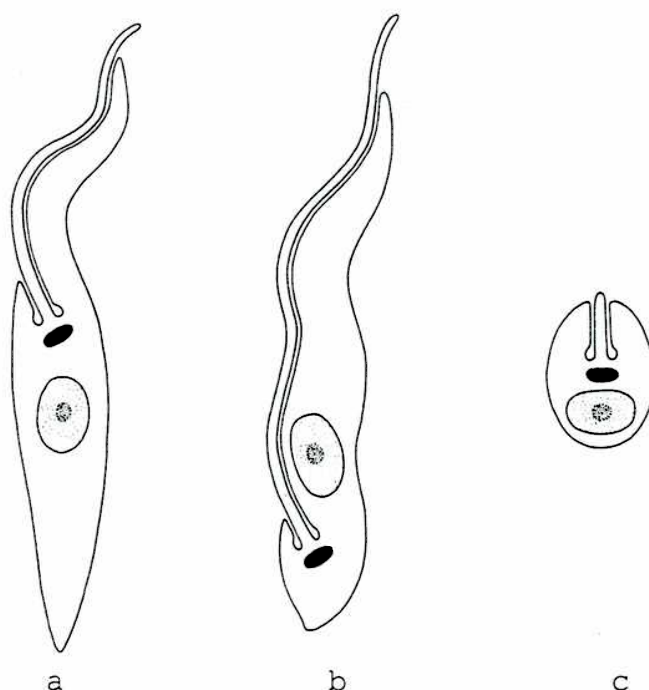


Figura 1: Formas en el ciclo de vida de un flagelado quinetoplástico, a) Epimastigote; b) Tripomastigote y c) Amastigote.

patógenos que se multiplican en el estadio tripomastigote en el mamífero, completan el desarrollo en la parte anterior del vector invertebrado y son transmitidos por inoculación. En la segunda se agrupan especies no patógenas (con excepción de *T.cruzi*). Se multiplican en el mamífero como amastigote y como epimastigote en el vector invertebrado, completan su desarrollo en la parte posterior del vector a tripomastigotes y son transmitidos por contaminación.

La ubicación sistemática de *T.cruzi* es la siguiente (Hoare, 1972; Levine y col., 1980):

Los primeros datos científicos que establecieron la etiología de la enfermedad conocida como tripanosomiasis americana fueron aportados por un médico brasileño, Carlos Chagas, en el año 1909, quien, luego de un relevamiento en áreas rurales de su país, describió las características clínicas más importantes de la enfermedad así como también la morfología del estadio tripomastigote del agente causal de la enfermedad. Las viviendas del lugar se hallaban infectadas por insectos hematófagos de la especie *Tryatoma infestans*, que alojaban en su intestino a un protozoo flagelado, *Schizotrypanum cruzi*, responsable de este mal (Chagas, 1909).

Trypanosoma cruzi infecta alrededor de 20 millones de personas en Sudamérica y América Central, con una población de riesgo de 90 millones. Del 10 al 20 % de las personas infectadas desarrollan algunas de las más importantes manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas, tanto en la fase aguda como en la crónica, y entre 1-10 % de los individuos que padecen Chagas crónico presentan severas manifestaciones de la enfermedad, y eventualmente mueren.

Asimismo, es infectiva para 100-150 especies de mamíferos salvajes y domésticos, pertenecientes a los órdenes Marsupialia, Edentata y Rodentia y también a los Primates, Carnivora, Lagomorpha, Artiodactyla y Chiroptera (como por ejemplo: ratas, perros, murciélagos, comadrejas y varios primates no-humanos), quienes pueden transmitirlos a más de 80 especies de triatómidos.

La infección con *T.cruzi* está esencialmente limitada a Sudamérica y América Central. Se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de nuestro país, considerándose como límite de su extensión el paralelo 43°S, descontando algunas áreas del Caribe que están exentas de la parasitemia. La infección se puede transmitir por transfusiones de sangre, entre personas durante la relación sexual y al feto a través de la placenta. La transmisión puede ocurrir tanto en áreas rurales como en asentamientos urbanos, debido a las migraciones de infectados chagásicos y a la transmisión por vía transfusional o por transplantes de órganos. La elevada prevalencia de la enfermedad de Chagas, especialmente en las poblaciones rurales de las áreas endémicas, y las altas tasas de morbilidad-mortalidad hacen que tenga una importancia médico-sanitaria significativa (PNUD, 1979). Por eso, el desarrollo de nuevas drogas es importante para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Chagas y para ello son de relevancia

los estudios acerca del control de los mecanismos de control de algunas rutas metabólicas importantes, como una manera para abrir nuevas posibilidades para el diseño y ensayo de nuevas aportes terapéuticos.

2.2. CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*:

El ciclo de vida completo de *T.cruzi* fue descrito por Brumpt en 1912 y los cambios patológicos causados por el organismo por Vianna en 1916, como se puede ver en la Figura 2.

La infección es transmitida por un insecto triatómido, vulgarmente conocido como vinchuca en nuestro país, el cual característicamente se alimenta de noche. La vinchuca pica, cerca de boca u ojos del durmiente, ingiere la sangre, y defeca las heces conteniendo al parásito, inmediatamente luego de la alimentación, cerca del sitio de la picadura. Inmediatamente luego de la introducción en el sitio de la picadura, o en las membranas mucosas, los tripomastigotes penetran un amplio rango de células y se transforman dentro de estas células en amastigotes. Luego de varias divisiones, los parásitos se transforman en tripomastigotes. Las células afectadas mueren, liberan los parásitos al torrente sanguíneo, y estos se distribuyen por todo el cuerpo, infectando muchos tejidos diferentes, como células de la glía del sistema nervioso central, músculo cardíaco, plexo mientérico en los intestinos, tracto urogenital y sistema retículoendotelial.

La lesión primaria, usualmente sobre la cara, es conocida como chagoma primario, conteniendo amastigotes intracelulares, además de un edema y decoloración violácea de los párpados, llamado signo de Romana. Los triatómidos se infectan al alimentarse sobre huéspedes infectados.

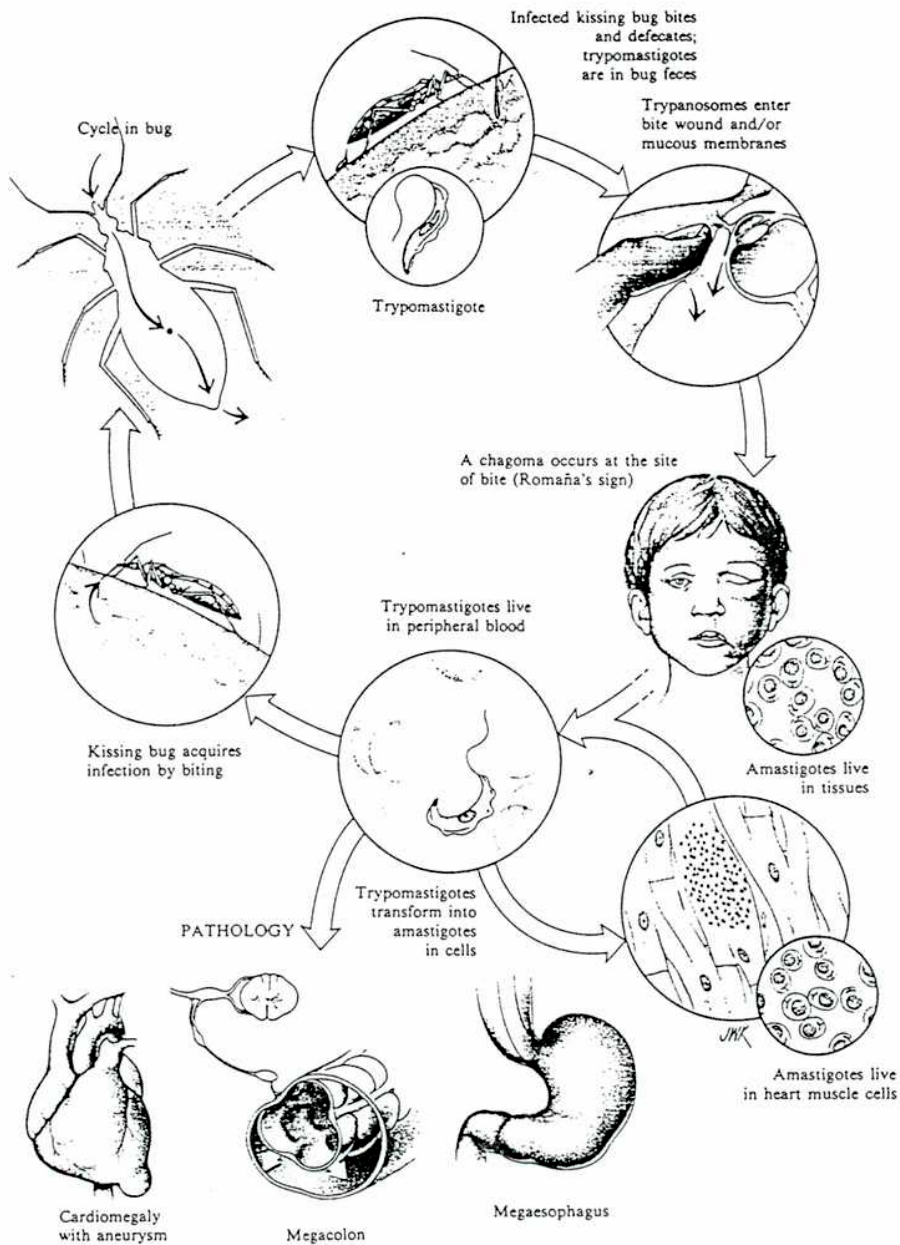


Figura 2: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (Katz y col., 1988).

Los tripomastigotes migran al intestino medio de la vinchuca, en donde se transforman a su estadio epimastigote y luego sufren muchas divisiones. Miles de organismos son producidos en una vinchuca aparentemente sin afectarla. Los epimastigotes en la vinchuca se transforman a tripomastigotes metacíclicos al salir del intestino medio y migran al tracto final del intestino, siendo excretados con las heces.

2.3. PATOGENESIS, DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DEL MAL DE CHAGAS:

La enfermedad de Chagas presenta dos estadios, el agudo y el crónico. El estadio agudo se caracteriza por la diseminación hematológica del parásito, lo cual conduce a la invasión de varios tejidos y sistemas de órganos. La invasión es acompañada por una intensa reacción de inflamación, debido a la infiltración de células mononucleares.

Aquellos que se recuperan de la fase aguda, luego de 2 a 4 meses, entran en la fase crónica de la infección, la cual toma principalmente dos formas, cardíaca o gastrointestinal, siendo la primera la predominante y la causa primaria de muerte en la enfermedad de Chagas. En la forma cardíaca las miofibrillas y las fibras de Purkinje son reemplazadas por tejidos fibrosos, generando defectos en la conducción. En ciertas ocasiones el corazón se alarga y puede desarrollarse un aneurisma ventricular. En el intestino, la destrucción del plexo mientérico es responsable del desarrollo de megaesófago y megacolon. El megaesófago causa disfagias que puede conducir a desnutrición y procesos cancerosos. La deformación del megacolon por su parte, causa constipación y fuertes dolores abdominales (Behnke, 1990).

La diagnosis de la enfermedad de Chagas depende del descubrimiento de tripomastigotes en la sangre del paciente. En pacientes con infección crónica el diagnóstico directo es más difícil, ya que presentan muy pocos tripomastigotes circulantes, siendo necesario confiar en los signos y síntomas compatibles con la enfermedad.

Los tratamientos no son completamente satisfactorios. El nifurtimox y el benznidazole son efectivos en prevenir el esparcimiento de los parásitos de tejido en tejido en la fase aguda. Sin embargo, son frecuentes las recaídas luego del tratamiento, sugiriendo que los

amastigotes de los tejidos no se ven afectados por estas drogas (Behnke, 1990).

2.4. VARIABILIDAD DE CEPAS EN *Trypanosoma cruzi*:

Para cualquier análisis serio sobre *T.cruzi*, es necesario tener en cuenta la enorme variabilidad entre las cepas, tanto por el curso que pudiera tomar la infección *in vivo* como por la variación en la capacidad de cepas clonadas de diferenciarse *in vitro*, sea porque precisan condiciones especiales (Contreras y col., 1985b) o porque en cultivo varían sus requerimientos nutricionales (Citri y Grossowicz, 1955; Boné y Parent, 1963).

Ya a comienzos de siglo (Chagas, 1909) se describió la existencia de morfologías diferentes en los parásitos circulantes de *T.cruzi*, delgadas al comienzo de una infección aguda, siendo reemplazadas por formas gruesas. Sin embargo, el histotropismo *in vivo* no dependería de la morfología del estadio circulante (Gonzalez Cappa y col., 1981). Se utilizaron diferencias en las actividades enzimáticas de las rutas metabólicas o en perfiles electroforéticos, a los cuales se determinó zimodemas, para determinar la variabilidad genética de distintos stocks de *T.cruzi*. Sin embargo, el perfil isoenzimático puede cambiar luego de subcultivos repetidos, sugiriendo que los caracteres usados para la tipificación en zimodemas no eran muy estables. Por ello, utilizando técnicas de perfil electroforético de fragmentos de ADNk por digestión con endonucleasas, lo que introdujo el termino esquizodema, se lograron diferenciar las cepas Tul 0, Tul 0R, CA1, Sonya e Y de *T.cruzi* (Frasch y col., 1981).

En un intento por elucidar el origen evolutivo y el status taxonómico de las zimodemas de *T.cruzi* se analizaron genéticamente los zimogramas

de 524 stocks de *T.cruzi* tomados de huéspedes variados y representando una amplia zona geográfica, desde los Estados Unidos hasta el sur de Brasil (Tibayrenc y Ayala, 1988). Se pudo determinar una alta variabilidad genética. Así, la estructura de la población de *T.cruzi* parece ser predominantemente multiclonal y compleja. En este trabajo también se determinó que la variabilidad de las isoenzimas y de esquizodemas están fuertemente correlacionados, lo cual favorece la hipótesis de la estructura clonal en *T.cruzi*, sugiriendo que las zimodemas y las esquizodemas son clones naturales del parásito. Ya que los clones naturales se comportan mayormente como entidades genéticas independientes (agamospecies), la variabilidad bioquímica del parásito estaría estadísticamente correlacionada con distintas características médicas. Así, una caracterización bioquímica completa de clones proveería buenas indicaciones acerca de las características clínicas de la infección producida por este parásito (Tibayrenc y Ayala, 1988).

2.5. FORMAS SANGUINEAS Y DE CULTIVO DE *Trypanosoma cruzi*:

Existen múltiples evidencias de medios axénicos de distinto tipo que permiten la diferenciación espontánea *in vitro* a 28°C, usando, por ejemplo, medios no definidos (Castellani y col., 1967; Wood y Pipkin, 1969; O'Daly, 1976), medios parcialmente definidos (Dusanic, 1980; Contreras y col., 1985a; Contreras y col., 1985b), o implantando cámaras subcutáneas en ratones (Sher y col., 1983).

También se han descripto amastigotes extracelulares, derivados espontáneamente a partir de tripomastigotes durante el ciclo de *T.cruzi* en el insecto, llamados amastigotes de insecto (Brack, 1968), y en hemocultivo, por pasaje a medio BHT y 28°C, llamados amastigotes

axénicos (Brenner y Chiari, 1965). El estado de envejecimiento del medio de cultivo, así como otras condiciones hostiles pueden influir en la metaciclologénesis o procesos de transformación a distintos estadios. De hecho, los amastigotes axénicos presentan un metabolismo esencialmente glicolítico, mientras que los epimastigotes, ya fueran derivados de amastigotes axénicos o cultivados como tales por muchas generaciones, pueden catabolizar tanto glucosa como aminoácidos, de acuerdo a la disponibilidad en el medio (Engel y col., 1987).

Estudios posteriores acerca de la diferenciación de E a TM en medios definidos demostró que los estímulos, condiciones y composición del medio diferenciantes para ciertos clones no lo eran para otros. De todas maneras, el homogenato de intestino del insecto vector *Triatoma infestans* siempre resultaba adecuado para inducir la metaciclologénesis (Isola y col., 1989). A partir de macerados de intestinos de vinchuca se logró purificar una mezcla de 5 proteínas, con una mayoritaria de 16 kDa, responsables de la metaciclologénesis inducida por el macerado sin purificar. Asimismo, se purificó una fracción de aproximadamente 43 kDa que inhibía la duplicación de epimastigotes, generando formas aberrantes no completamente divididas (Isola y col., 1986b).

También ha sido documentada la inestabilidad en las zimodemas por subcultivo en medios de composición distinta, correlacionando con la pérdida de infectividad. Luego de pasajes en ratones neonatales parecía recuperarse la capacidad infectiva de los clones subcultivados en los distintos medios (Alves y col., 1993).

3. VECTORES PRINCIPALES DE *T. cruzi* Y CONSIDERACIONES EPIDEMIOLOGICAS:

Los triatómidos pertenecen al phylum Artropoda, subphylum Insecta, familia Reduviida (insectos picadores), subfamilia Triatominae

(vectores de los tripanosomas sudamericanos, *T.cruzi*). Tres géneros mayores actúan como vectores de *T.cruzi*: *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*, y estas especies se han ido adaptando a vivir en contacto cercano con humanos, como se ve en la Tabla 1.

VECTOR	ZONA GEOGRAFICA
<i>Triatoma infestans</i>	Brasil, Argentina, Bolivia
<i>Triatoma dimidiata</i>	América Central
<i>Rhodnius prolixus</i>	Venezuela
<i>Panstrongylus megistus</i>	Brasil

Tabla 1: Vectores invertebrados de *Trypanosoma cruzi* según predominancia geográfica.

Los triatómidos son insectos hemimetábolos chupadores de sangre. Las vinchucas se encuentran generalmente en lugares de descanso cerca de sus fuentes de comida, en agujeros y rajaduras de las paredes o de los pisos, detrás de objetos colgantes de las paredes de las casas, o en techos entretejidos con hojas de palmas, paja u otras vegetaciones y particularmente en áreas de dormir. Las casas de las áreas rurales de Sudamérica pueden albergar varios miles de vinchucas.

El control de los vectores es un método efectivo para reducir la incidencia de la infección, usando, por ejemplo, fumigación de los sitios de alimentación de las áreas rurales. Asimismo, pacientes receptores de sangre pueden ser protegidos de la infección por tratamiento de la sangre donante con violeta de genciana, la cual mata a los tripomastigotes (Docampo y col., 1988). Sin embargo, no existe quimiopprofilaxis ni vacunación, a pesar de los avances recientes en la caracterización de antígenos que inducen a la protección contra *T.cruzi* en ratones (Brener, 1986; Snary, 1985).

La infección parasitaria, la inmunidad celular y la patología son aspectos interconectados de la relación huésped-parásito. En las poblaciones humanas que viven en regiones endémicas, algunos aspectos adicionales, como malnutrición, pobreza e ignorancia, constituyen un círculo vicioso de factores compuestos contra los cuales es difícil ejercer controles efectivos. Ya es reconocido que la malnutrición tiene severas consecuencias inmunodepresoras para el huésped, lo cual a su vez aumenta la susceptibilidad para enfermarse y aumentar la patología (Behnke, 1990). Sería entonces importante considerar el desarrollo de una vacuna para parásitos humanos en los trópicos que contemple el problema adicional de la inmunodepresión en huéspedes malnutridos (Behnke, 1990).

4.1. INMUNOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS:

La prevalencia de largas infecciones crónicas, eventualmente fulminantes, condujo a pensar que no había respuesta inmune efectiva contra la mayoría de los parásitos. Sin embargo, se reconoce actualmente que existe inmunidad a las infecciones parasíticas, de acuerdo a la siguiente evidencia:

- 1) en áreas endémicas la prevalencia de la infección declina con la edad en donde se ve un aumento de la inmunidad (incremento de los niveles de anticuerpos);
- 2) en individuos inmunodeprimidos (por ej., enfermos de SIDA) la enfermedad es usualmente aguda y fatal.
- 3) en modelos experimentales, se puede demostrar, bajo ciertas circunstancias, la existencia de inmunidad adquirida efectiva pero incompleta. Luego de infectar con *T.cruzi* un ratón, los tripomastigotes metacíclicos (TM) entran a los macrófagos, en donde

sobreviven escapando del fagosoma antes que se fusione con el compartimiento lisosomal. *T.cruzi* también penetra en otros tipos celulares, incluyendo músculo y células del sistema nervioso. En todas sus células huésped, luego de escapar de la lisis, el parásito se multiplica en su forma amastigote, produciendo periódicamente formas tripomastigote que vuelven a fluir al torrente sanguíneo (tripomastigotes sanguíneos, TS). Estas formas tripomastigote, que no sufren variación antigénica como sus parientes, los tripanosomátidos africanos, son atacados por el sistema de inmunidad humoral (anticuerpos y el sistema de complemento) y la mayor parte, aunque no todos, son muertos. Algunos sobreviven porque los parásitos son capaces de clivar inmunoglobulinas y también de inhibir la lisis por complemento. *Trypanosoma cruzi* también puede inhibir la producción de IL-2 y controlar negativamente la expresión de receptores de IL-2, lo cual contribuye a una inmunodepresión generalizada, que acompaña a la infección (Piuvezam y col., 1993). Los amastigotes son muertos en macrófagos activados por $\text{Ifn-}\gamma$ por los radicales oxígeno. Pero los amastigotes de células musculares y nerviosas están relativamente a salvo de ataque. Sin embargo, los antígenos parasitarios expuestos en la superficie de la membrana de las células infectadas pueden ser reconocidos por anticuerpos y dichas células pueden ser eliminadas por lisis vía complemento. Por otro lado, existe cierta controversia acerca de si estos antígenos son derivados directamente del parásito o representan epítopes comunes con la célula huésped, comportándose aparentemente como una enfermedad autoinmune, en la cual tanto células infectadas como no infectadas son destruidas (Skeiky y col., 1992).

4.2. MACROFAGOS: LOS HUÉSPEDES PRIMARIOS DE *Trypanosoma cruzi*:

Todas las células reclutadas en un foco inflamatorio son originalmente derivadas de la médula ósea. La función de este órgano es vital para el desarrollo de la inflamación inducida por parásitos. Poblaciones individuales derivadas de células de la médula ósea, tales como los macrófagos, pueden jugar un rol crucial en la respuesta protectora contra muchos parásitos.

Se han identificado ocho subpoblaciones mayores de células hematopoiéticas: neutrófilos, granulocitos, eosinófilos y basófilos, monocitos, mastocitos, megacariocitos, células eritroides y linfocitos. Un elemento importante en el desarrollo de la respuesta inflamatoria es la capacidad de las células madre de la médula ósea de auto replicarse y de generar distintos tipos de células progenitoras. Las células hematopoiéticas de la médula ósea adulta o del bazo se pueden dividir en tres grupos principales (Behnke, 1990), como se esquematiza en la Figura 3.

Los macrófagos, células derivadas de los monocitos circulantes, se encuentran ampliamente distribuidos en el cuerpo y son parte de una familia de fagocitos mononucleares que incluyen las células de Kupffer del hígado, las células dendríticas, las células de Langerhans de la piel y las células vellosas de los órganos linfoides periféricos. Contienen una variedad de enzimas hidrolíticas lisosomales (por ej.: glicosidasas y proteinasas) y secretan enzimas no-lisosomales incluyendo el activador del plasminógeno, colagenasas y elastasas (Behnke, 1990). Cuando son estimulados producen leucotrienos, prostaglandinas, metabolitos del oxígeno (radicales libres, H_2O_2), y factores activadores de plaquetas (PAF). De esa manera, cuando están activados son potentes células inflamatorias.

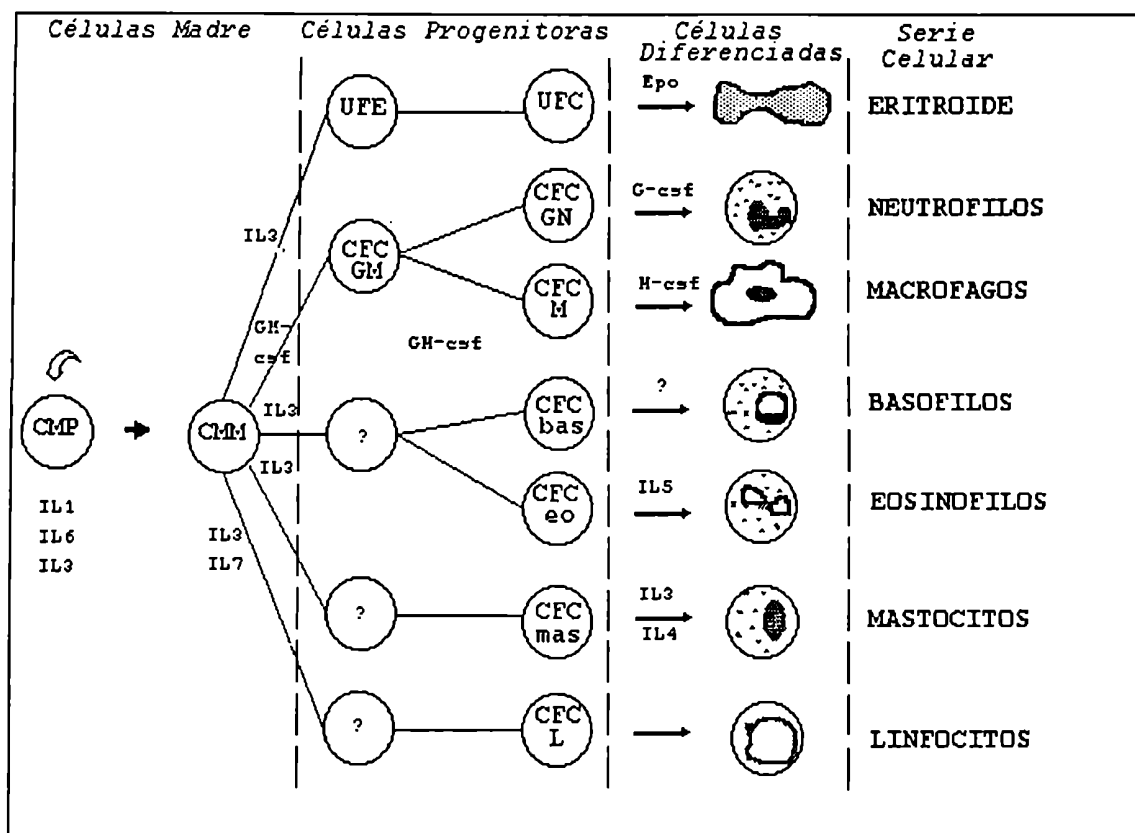


Figura 3: Compartimientos celulares de la línea hematopoiética.

En donde: CMP, son células madre pluripotenciales; CMM, son: células madre multipotenciales; UFE, es unidad formadora eritroide; CFC-GM, son células formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos; CFC-G, son células formadoras de colonias de granulocitos (neutrófilos); CFC-M, son células formadoras de colonia de monocitos; bas, son basófilos; eo, son eosinófilos; l, son linfocitos; Epo, es eritropoietina; M-csf, es factor formador de colonias de monocitos ; G-csf, es csf de granulocitos; IL, son interleuquinas.

Las citoquinas son moléculas regulatorias secretadas que incluyen a las interleuquinas (IL), interferones (Ifn), y los factores formadores de colonias (CSF). Las interleuquinas están definidas hoy en día como glicoproteínas secretorias de leucocitos que están involucradas en la respuesta inflamatoria (Paul, 1988).

Las principales citoquinas que activan a los macrófagos una vez que dejaron la médula ósea son el Ifn- γ y el GM-CSF. *T.cruzi*, que normalmente se replica en muchas células nucleadas incluyendo los

fagocitos, es rápidamente muerto por macrófagos activados por Ifn- γ (Behnke, 1990).

4.3. INVASION DE CELULAS POR *Trypanosoma cruzi* Y EVASION DE LA RESPUESTA CELULAR:

T.cruzi es un protozoo intracelular obligado de grandes dimensiones (10-20 μ m de largo), que parasita tejidos mesodermales de mamífero, siendo de particular importancia los macrófagos (Araujo-Jorge y col., 1989) y las fibras de tipo I de músculo estriatal (Teixeira y Dvorak, 1985; Postan y col., 1986; Meirelles y col., 1986). En cultivo celular, los tripomastigotes son capaces de invadir fibroblastos por un mecanismo de interacción entre la superficie del huésped y la del parásito. El parásito produce una proteína similar a la lectina responsable de la citoadherencia ayudada por un sistema activante proteolítico; la penetración es efectuada por una glicoproteína sensible a tunicamicina. La célula huésped contribuye a estos eventos produciendo glicoproteínas que son activas en la adherencia y en la penetración de *T.cruzi* en los fibroblastos. En contraste, la entrada de *T.cruzi* a los macrófagos es por fagocitosis (Nogueira y Cohen, 1976). Los tripomastigotes sobreviven dentro del macrófago, escapando de la vacuola parasitofórica y replicándose dentro del citoplasma. Durante y luego de la invasión de los tripomastigotes de *T.cruzi* al macrófago se detecta redistribución en los marcadores de superficie (Meirelles y col., 1986, 1987). Han sido caracterizadas al menos 3 proteínas de tripomastigotes involucradas en la inhibición de la vía del complemento, las glicoproteínas GP 160 de la membrana de tripomastigotes, la proteína 87-93 liberada al medio extracelular espontáneamente y la GP 68 de la membrana de tripomastigotes. Esto

proveería al estadio infectivo del parásito múltiples medios alternativos para protegerse de los efectos líticos del complemento (Joiner y col., 1988; Fischer y col., 1988; Norris y col., 1991).

Aunque tanto los epi como los tripomastigotes de *T.cruzi* entran a la célula fagocítica por medio de la formación de vacuolas parasitofóricas, VP (María y col., 1982; Ulisses de Carvalho y de Souza, 1989), sólo el estadio infectivo sobrevive y perpetúa la infección. Pudo determinarse que epimastigotes opsonizados eran incorporados junto con receptores de complemento C3R en las VP pero no así los TM. Por otro lado, todas las membranas de las VP contenían marcadores lisosomales. Esto indicaría que aunque los tripomastigotes puedan evadir la incorporación celular por fagocitosis convencional vía C3R o FcR, aún así no escapan a la fusión con lisosomas donde pueden verse expuestos a mecanismos microbiocidas (Hall y col., 1991). *T.cruzi* expone en superficie una proteína de 60 kDa, llamada penetrina, que promovería la adhesión selectiva de los tripomastigotes a tres componentes de la matriz extracelular: heparina, heparán-sulfato y colágeno. Dicha proteína podría jugar un rol crítico en la unión del parásito a la matriz extracelular o en la invasión a la célula huésped, facilitando la reacción con receptores de la superficie celular del huésped y la migración de los tripomastigotes en el líquido intersticial al reconocer a los proteoglicanos y al colágeno (Ortega-Barria y Pereira, 1991). Algunas evidencias también indican que el proceso fagocítico involucra una interacción inicial ligando-receptor (Araujo-Jorge y de Souza, 1986). Una proteína de 160 kDa de la superficie de los tripomastigotes estaría involucrada en la adhesión a la célula huésped (Schenkman y col. 1991). La interacción

T. cruzi-macrófago también se ve afectada por los niveles de AMPc (Wirth y Kierszenbaum, 1982).

T. cruzi es un protozoo que invade la mayor parte de las células por los márgenes pobres en lisosomas, formando una VP independientemente de actina (Schenkman y col., 1988; Schenkman y col., 1991). Al parecer, inmediatamente luego de la internalización se produciría un reclutamiento, agregación y fusión de lisosomas con la VP (Milder y Kloetzel, 1979; Tardieux y col., 1992), con la consecuente incorporación de marcadores lisosomales y acidificación (Ley y col., 1990). Luego, los tripomastigotes secretan al lumen fagosomal una hemolisina, TC-TOX, similar a la proteína C9 del complemento, que se activaría al pH ácido del fagosoma e induciría la formación de canales iónicos en la bicapa fosfolipídica lo cual contribuiría a la disrupción del fagosoma, permitiendo así el escape al citosol donde se replicará como amastigote (Andrews y col., 1990).

Durante la infección de *T. cruzi* a fibroblastos (Low y col., 1992) y a células endoteliales (Morris y col., 1988) se ve un aumento inicial en los niveles de Ca^{2+} intracelulares del huésped sin localización específica, pero una gran disminución (7 nM células infectadas vs. 23 nM células no infectadas) luego de 3 a 5 días de infección, acompañado por la disrupción de componentes del citoesqueleto, los filamentos de vimentina y actina (Low y col., 1992; Osuna y col., 1990). La elevación aparente del Ca^{2+} podría deberse a la unión de las células a los cubreobjetos durante la determinación (Low y col., 1992). A pesar de que la elevación intracelular de Ca^{2+} en células infectadas por *T. cruzi* no ha sido todavía completamente probada como una reacción específica, se han reportado múltiples evidencias que sugieren que la elevación del Ca^{2+} incrementaría significativamente la capacidad

infectiva del parásito, por la activación de sistemas de transducción de señales mediados por CaM (Yakubu y col., 1994). Análogamente en *Paramecium* sp. la CaM estaría involucrada en la regulación de fenómenos exocíticos, probablemente interactuando con proteínas de unión a Ca^{2+} (CaBP) o por la interacción con canales de K^+ Ca^{2+} -dependientes (Kerboeuf y col., 1993). Asimismo, se ha descrito en *Chlamydomonas* spp. que un aumento en la concentración intraflagelar de Ca^{2+} regularía la fosforilación de proteínas flagelares en contacto con la matriz extracelular, las cuales podrían estar involucradas en la redistribución de glicoproteínas de la membrana flagelar (Bloodgood, 1992).

5.1. TRANSDUCCION DE SEÑALES EN CELULAS EUCARIOTAS SUPERIORES:

La mayoría de los agonistas extracelulares ejercen sus efectos sobre las células por activación o inhibición de sistemas de señales transmembrana que controlan la producción de segundos mensajeros. Estos últimos son los mediadores que actúan modulando las actividades de quinasas y fosfatasas de proteínas. La fosforilación (o defosforilación) de residuos serina, treonina y tirosina provoca cambios conformacionales en proteínas reguladas, las cuales cambian sus propiedades bioquímicas, conduciendo a respuestas fisiológicas, normalmente evocadas por el agonista particular.

Las vías principales de los segundos mensajeros que operan en células eucariotas y las quinasas de proteínas que ellos activan están sumariadas en la Figura 4 (Cohen, 1992).

Estos caminos tienen muchas características en común. Una molécula receptora ubicada en la superficie celular transmite información a través de la membrana plasmática hacia el interior de la célula por

This diagram illustrates the complex signaling pathways initiated by ligand binding to various receptors on the cell membrane. The pathways are divided into the cytoplasm and the nucleus.

- Membrane Receptors and Initial Signaling:**
 - Grb2/Src Pathway:** Ligand binding to a receptor (R) activates Grb2, which recruits Src. Src then activates Ras, which in turn activates Raf-1, leading to the MAPK cascade (MAPKK → MAPK).
 - PI3K Pathway:** Ligand binding to another receptor (R) activates PI3K, which produces PI-4,5-P in the membrane. This leads to the production of DAG and InsP₃.
 - G-protein Pathway:** Ligand binding to a G-protein coupled receptor (Rs) activates G_α, which then activates AC (Adenylate Cyclase), converting ATP to AMPc.
- Cytoplasmic Signaling:**
 - PKC Activation:** DAG and PKA (holo.) activate PKC. PKC then phosphorylates various substrates, including Ser/Thr-PP and Raf-1.
 - Calcium Signaling:** InsP₃ releases Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum (ER), which activates CalM-PK.
 - MAPK Cascade:** The activated MAPK enters the nucleus to regulate transcription factors.
- Nuclear Signaling:**
 - Transcription Factors:** In the nucleus, MAPK, CK2, and other factors regulate transcription factors such as TCF/SRF, Jun, Fos, CREB, and CREM.
 - PKA and AMPc:** PKA (holo.) and AMPc (from AC) also regulate nuclear transcription factors.

- 23 -

específicos, encargados de llevar a cabo o modificar una determinada ruta metabólica.

La fosforilación específica de los sustratos por ambas quinasas es revertida por un grupo diverso de fosfatasas específicas y no específicas, muchas de las cuales también se regulan por fosforilaciones dependientes de AMPc.

El AMP cíclico (AMPc) producido por la vía de la AC media un amplio espectro de respuestas a estímulos hormonales, especialmente β adrenérgicos. Dichas respuestas incluyen: movilización de la energía acumulada (ruptura de carbohidratos en hígado o triglicéridos en células grasas por estímulos β adrenérgicos), homeostasis de Ca^{2+} , regulación de varios procesos endócrinos y renales, y otros. El AMPc ejerce prácticamente todos sus efectos mediante la activación de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc (PKA), que actúa como receptor intracelular del nucleótido y es ubicua.

Actualmente se sabe que el AMPc interviene en el control del metabolismo de células animales, hongos, algas, bacterias y protistas a nivel de diferenciación celular (de Gunzburg y col., 1986), neurotransmisión (Hemmings y col., 1989; Nairn y col., 1985), síntesis de macromoléculas (de Gunzburg y col., 1986), reproducción (de Gunzburg y col., 1986; Horowitz y col., 1988; Tash y col., 1980), variaciones en la permeabilidad de membrana de muchos organismos eucariotas (Hemmings y col., 1989; Mason y Nelson, 1989), crecimiento, síntesis de ADN y división (Dumont y col., 1989; McIntosh y Koonce, 1989) y motilidad (Horowitz y col., 1988; Mason y Nelson, 1989). Respecto de la regulación a corto plazo del AMPc en eucariotas, la

única base molecular probada se localiza a nivel de la activación de la PKA.

Tanto en genes procariotas como eucariotas se ha descrito inducción de la transcripción en respuesta a la variación de los niveles de AMPc. En los promotores de algunos genes eucariotas regulados por AMPc se aislaron secuencias reguladas por AMPc, llamadas CRE (Roesler y col., 1988). CREB es una proteína de 43 kDa, asociada a la cromatina, que se une a secuencias CRE, y que al unir AMPc puede regular positivamente la expresión de operones sujetos a represión catabólica en *E.coli* (Montminy y Bilezikjian, 1987).

Otras proteínas como ATF-1 (Reh fuss y col., 1991) y JunD (Kobierski y col., 1991) también estimulan la transcripción en respuesta a variaciones en los niveles de AMPc. Por ensayos de delección de promotor se observó que el Ca^{2+} puede estimular la expresión de c-fos a través de elementos CRE (Sheng y col., 1990). Al parecer, las señales del Ca^{2+} y el AMPc podrían convergir en un único elemento de respuesta al Calcio/AMPc, CaRE/CRE (Armstrong y Montminy, 1993).

En eventos nucleares (de Gunzburg y col., 1986; Nigg y col., 1985) se han propuesto dos hipótesis alternativas para la vía de acción del AMPc: 1) cambios en la actividad nuclear, debido a la fosforilación de determinadas proteínas nucleares por la subunidad catalítica de la PKA, cPKA, translocada desde el citoplasma al núcleo; o bien 2) por analogía a lo que ocurre en procariotas, sería el AMPc unido a la subunidad regulatoria de tipo II de la PKA, $R_{II}PKA$, quien controlaría la transcripción de proteínas intranucleares. Esta hipótesis se basó en la homología de secuencia que $R_{II}PKA$ presenta respecto de CREB. Ciertas observaciones, aunque aisladas, conducen a pensar en un rol relevante de PKA durante la división celular. Por ejemplo: se observo

asociación de cPKA al núcleo en paralelo a cambios con la transcripción, particularmente con la fracción asociada a la lamina de la matriz residual nuclear (Sikorska y col. 1988); se verificó un aumento en la cantidad de cPKA en la fracción nuclear durante el desarrollo de *Dictyostelium discoideum* (Woffendin y col., 1986); y más tarde se vio que la inyección de anticuerpos dirigidos contra cPKA retardan la anafase (McIntosh y Koonce, 1989). Sin embargo, en los casos donde se ha demostrado la localización de rPKA, tanto de tipo I como de tipo II, no ha sido fácil demostrar la actividad de topoisomerasa propuesta para R_{II}PKA (Sikorska y col., 1988). Por lo tanto, parece hasta ahora más probable que cPKA translocada al núcleo sería responsable de regular eventos nucleares en respuesta a variaciones en los niveles de AMPc.

El otro camino, ligado a la activación primaria de la fosfolipasa C (PLC), incluye dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el inositol trisfosfato (IP₃). Estos se producen por la acción de hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, que actúan sobre receptores, estimulando, vía una proteína G (no confirmada en todos los casos), la actividad de PLC β , quien hidroliza específicamente el fosfolípido de membrana fosfatidil inositol 4-5 bisfosfato, liberando DAG e IP₃. El IP₃, estimulando su propio receptor, libera Ca²⁺ de los reservorios del retículo endoplásmico (RE). El Ca²⁺ intracelular aumenta de 0,1 μ M a 0,5-1 μ M. Este ion puede unirse a Calmodulina (CaM), el receptor intracelular más abundante para Ca²⁺, provocando cambios conformacionales a este péptido termoestable. El complejo Ca²⁺-CaM activa enzimas específicas como por ejemplo: fosfodiesterasas (PDE), la quinasa de proteínas multifuncional

dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, llamada CaM-K II , y otras quinasas de proteínas que fosforilan un solo sustrato (llamadas especializadas), como la quinasa de la cadena liviana de la miosina, la fosforilasa quinasa y la quinasa del factor 2 de elongación de la traducción, las cuales regulan la contracción muscular, la glucogenolisis y la síntesis proteica, respectivamente.

Por otra parte, el DAG confinado a la membrana plasmática activa, junto con el ion Ca^{2+} , a la quinasa de proteínas C (PKC), quien fosforila sustratos intracelulares específicos. Esta quinasa de proteínas PKC desempeña múltiples funciones dentro de la célula, regulando, por ejemplo, la exocitosis y la diferenciación celular.

Una clase de agonistas extracelulares peptídicos, tales como insulina y factores de crecimiento, se unen a receptores con actividad de quinasas de proteínas de tirosina. La autofosforilación de estos receptores permite su interacción con proteínas conteniendo dominios SH2/SH3, que son las que juegan un rol importante en la transmisión de la señal. La activación de receptores de quinasas de tirosina es seguida en minutos por la activación de muchas quinasas de proteínas de Ser/Thr y, por ende, de una variación (ya sea disminución o incremento) en la fosforilación de las Ser y Thr de muchas proteínas intracelulares.

Estos sistemas de señales, descritos independientemente sólo como una simplificación, en realidad interactúan simultáneamente produciendo diferentes señales, efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos, según el tipo celular y la respuesta biológica que se estudie.

5.2. IMPORTANCIA FUNCIONAL DE LA FOSFORILACION DE PROTEINAS:

La fosforilación y defosforilación de proteínas es el proceso post-transduccional más importante involucrado en la regulación de varias funciones celulares.

Los resultados obtenidos hasta el presente sugieren que el sistema de transducción de señales en eucariotes inferiores es semejante al demostrado en células de mamíferos. Los segundos mensajeros como AMPc, Ca^{2+} -calmodulina y Ca^{2+} -fosfolípidos regulan sistemas enzimáticos en células tan variadas como levaduras, protozoarios y plantas. En *T.cruzi* se ha demostrado la presencia de algunas enzimas moduladas por segundos mensajeros. Dichos mecanismos representan eventos fundamentales en la programación de funciones celulares cuya clarificación es un paso crucial para el desarrollo de otros aportes terapéuticos.

5.3. TRANSDUCCION DE SEÑALES EN TRIPANOSOMATIDOS:

Tal vez ciertas alteraciones en los niveles de AMPc del parásito durante la fase en el vertebrado se encuentren asociadas a eventos del desarrollo relacionados con la infección al huésped mamífero. La naturaleza del estímulo inductivo y del rol regulatorio del AMPc en el proceso de la diferenciación de tripanosomátidos está aún siendo estudiado.

La enzima AC fue detectada en *T.brucei* (Voorheis y Martin, 1982), y en *T.cruzi* se caracterizó la enzima y se purificó a homogeneidad (Zingales y col., 1979; Torruella y col., 1986; Eisenschlos y col., 1986a, b). El gen de AC fue clonado en *T.brucei* y su expresión apareció estar coordinada con la expresión del gen VSG, sugiriendo una

relación funcional entre ellos (Pays y col., 1989; Alexandre y col., 1988; Jefferies y col., 1991).

Se ha postulado la existencia de un receptor de superficie en epimastigotes de *T.cruzi* para un péptido de 10 kDa derivado de la hemoglobina, que al activar la AC de la membrana provocarían la diferenciación al estadio infectivo (Fraidenraich y col., 1993b). La estimulación del parásito con globina- α^D de pollo conduce a la estimulación de la AC y promueve la metaciclogénesis *in vitro*. El receptor estaría acoplado a la AC a través de una proteína G α_s y posiblemente a la PLC mediante una proteína G α_q (Fraidenraich y col., 1993b).

A partir de extractos de membrana de *T.cruzi* se purificaron y caracterizaron bioquímicamente las subunidades α_s , α_i y β de proteínas G (Eisenschlos y col., 1986b; Coso y col., 1992). Los datos indican que el parásito poseería un conjunto de proteínas G bien desarrollado que estaría asociado con mecanismos de transducción a través de la membrana celular.

No está aún determinado cómo es que el AMPc influye en la diferenciación de *T.cruzi*, pero se ha descrito actividad de PKA en formas epimastigote (Ulloa y col., 1988). Alternativamente el AMPc tendría que ver en la expresión de algunos genes de *T.cruzi* (Heath y col., 1990) al igual que en otros eucariotas (Nagamine y Reich, 1985). Tampoco se puede descartar que la existencia de un receptor de AMPc descrito en *T.cruzi*, denominado CARPT de 62 kDa y $S_{20,w}$ 8.25, claramente distinto de la subunidad RII-PKA de eucariotas superiores de 56 kDa y $S_{20,w}$ 4.1 (Rangel-Aldao y col., 1983; Rangel-Aldao y col., 1985), se comporte de manera similar al de *D.discoideum*. Más aún, el AMPc podría ser la señal para la adhesión celular, como en

D.discoideum. De hecho se observó que los epimastigotes se adhieren a un sustrato previamente a la transformación en tripomastigotes metacíclicos, tanto en el insecto triatómido (Zeledon y col., 1984) como *in vitro* (Bonaldo y col., 1988). Algo similar ocurre en las formas no proliferativas de *T.lewisi* (Strickler y Patton, 1975).

La CaM ha sido detectada y purificada en *T.brucei* (Ruben y col., 1983; Ruben y Patton, 1985), en *T.cruzi* (Téllez-Iñón y col., 1985) y en *Leishmania* (Benaïm y col., 1987). Asimismo se la ha podido clonar en *T.brucei* (Tschudi y col., 1985; Tschudi y Ullu, 1988) y en *T.cruzi* (Chung y Swindle, 1990), en este último caso asociada a los genes de ubiquitina del parásito (Ajioka y Swindle, 1993). La PDE de nucleótidos cíclicos se describió como la primera enzima regulada por el complejo Ca^{2+} y calmodulina que se bloquea por drogas neurolépticas, las cuales también inhiben la motilidad del parásito (Téllez-Iñón y col., 1985). La enzima PDE de AMPc también fue descrita en *T.gambiense* (Walter, 1974), *T.brucei* (Walter y Oppenheimer, 1982) y *L.donovani* (Walter, 1980). Asimismo, una ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}), presente en vesículas de membranas plasmáticas y regulada por el complejo Ca^{2+} -CaM, ha sido descrita en *T.cruzi* (Benaïm y col., 1991). También fue descrita una CaM-K II asociada al citoesqueleto y flagelo de epimastigotes de *T.cruzi*, con alta homología a su contraparte mamífera y con capacidad de unirse y ser activada por CaM homóloga (Ogueta y col., 1994). Las proteínas de unión a CaM se expresan diferencialmente durante los distintos estadios del parásito (Orr y col., 1992). Esto sugiere que la CaM-K II de epimastigotes de *T.cruzi* podría jugar un rol importante en eventos Ca^{2+} -dependientes, tales como la diferenciación morfogénica del parásito o en eventos que controlen el movimiento flagelar (Ogueta y col., 1994).

La concentración de Ca^{2+} intracelular en los eucariotas superiores es mantenida a niveles muy bajos (10^{-7} M) comparada con los niveles extracelulares (10^{-3} M), mediante bombas de Ca^{2+} presentes en la membrana plasmática, la mitocondria y el retículo endoplásmico. La disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular está relacionada a pérdida de la viabilidad celular y toxicidad celular, lo cual contribuye a la muerte celular. Por eso también ha sido estudiada la importancia del Ca^{2+} en el metabolismo y crecimiento de tripanosomátidos. Epimastigotes de *T.cruzi* presentan alta capacidad de retención de Ca^{2+} dentro de la mitocondria, lo cual podría ser de importancia para minimizar la acción de enzimas degradatorias Ca^{2+} -sensibles que pudieran iniciar un daño celular irreversible en condiciones de hipoxia durante el ciclo de vida del parásito, lo cual se sabe genera un flujo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Docampo y Vercesi, 1989). Ejemplos de fenómenos regulados por Ca^{2+} son: el ensamblado de microtúbulos en *T.brucei* (Dolan y col., 1986), el movimiento del flagelo en *Crithidia oncopelleti* (Holwill y McGregor, 1976), la liberación de una glicoproteína variable de superficie en *T.brucei* (Voorheis y Martin, 1982), y la diferenciación celular en *Leishmania* (Morrow y col., 1981).

La alta tasa de recambio de fosfoinosítoles en *T.cruzi* (Antunes y Oliveira, 1981) y *C.fasciculata* (Palmer, 1973), sugeriría un rol metabólico importante para el fosfatidil inositol. Se pudo determinar una actividad de PLC en *T.cruzi* (Schenckman y col., 1988). Asimismo, se verificó que el recambio de fosfoinosítoles es activado por Ca^{2+} en *T.cruzi* (Docampo y Pignataro, 1991). En *T.brucei* pudo purificarse (Fox y col., 1986) y clonarse (Hereld y col., 1988) una PLC específica

de fosfatidil inositol glicanos Ca^{2+} -independiente, PI-PLC, que sería la encargada de clivar las VSG de la membrana del parásito.

Las fosfatasas de proteínas se han descripto en tripanosomátidos africanos (Walter y Oppenheimer, 1982). En *L.donovani* se describieron actividad de fosfatasas hacia varios sustratos fosforilados e inositol fosfatos (Das y col., 1986b). En *T.b.rhodesiense* se clonó la subunidad catalítica de la fosfatasa de proteínas 1 y 2A, presentando 66 y 40% de homología con las fosfatasas de células de mamíferos (Erondy y Donelson, 1991).

6. MARCADORES DE LA METACICLOGÉNESIS EN *Trypanosoma cruzi*:

Durante su ciclo de vida *T.cruzi* se adapta a cambios en el medio ambiente, siendo capaz de evadir la respuesta inmune del huésped a través de mecanismos no completamente elucidados aún. Estos cambios están acompañados tanto por alteraciones bioquímicas como morfológicas del parásito. Ciertas evidencias sugieren que el camino regulado por segundos mensajeros estaría involucrado en la metaciclogénesis de *T.cruzi*. Asimismo, las enzimas responsables de la transducción de señales ya han sido descriptas en tripanosomátidos, como ha sido detallado anteriormente.

Hay evidencias que sugieren la importancia del AMPc en la inducción de la metaciclogénesis en *T.cruzi* (Gonzales-Perdomo y col., 1988). Si bien no se conoce el rol preciso que cumple el nucleótido en el parásito, los extractos purificados del intestino de vinchuca activan la AC del parásito estimulando asimismo la metaciclogénesis (Fraidenraich y col., 1993a, Fraidenraich y col., 1993b), como se mencionó en transducción de señales de tripanosomátidos. En

epimastigotes de *T.cruzi* un aumento en los niveles de AMPc inhiben la síntesis de ADN, por tanto el crecimiento (Oliveira y col., 1984) y este efecto podía ser mimetizado mediante la estimulación de la AC con isoproterenol (De Castro y Oliveira., 1987; Oliveira y col., 1984). De estos datos se infiere que la diferenciación de *T.cruzi* sería un fenómeno hormona-dependiente. Sin embargo, mayor evidencia es necesaria para demostrar la existencia de un receptor β -adrenérgico. Al mismo tiempo, los niveles endógenos del AMPc difieren en ambas formas celulares. Los tripomastigotes contienen niveles intracelulares más altos de AMPc que los epimastigotes, 0.54 μ M y 0.13 μ M respectivamente (Rangel-Aldao y col., 1987). Por tanto, el AMPc jugaría un rol importante en el ciclo y diferenciación del parásito (Rangel-Aldao y col., 1987; Gonzalez-Perdomo y col., 1988; Fraidenraich y col. 1993a). Es posible que el mecanismo interno del disparo de la diferenciación se ejerza vía fosforilación, por lo descrito en el ítem 5.3. de la introducción y los datos presentados aquí, dado que el receptor intracelular del AMPc es la quinasa PKA, ya descrita en el parásito (Ulloa y col., 1988). Por otro lado, durante la diferenciación de epimastigotes de *T.cruzi* a tripomastigotes metacíclicos se expresa un gen inducible por AMPc (Heath y col., 1990). En mamíferos, los genes controlados por AMPc son activados por el factor transcripcional CREB, que es un sustrato fosforilable por cPKA (Yamamoto y col., 1988). En eucariotas superiores, la sola presencia de cPKA sería suficiente para inducir la expresión de, al menos, dos genes controlados por AMPc, y sin un aumento concomitante de los niveles de AMPc (Riabowol y col., 1988). Es posible que la transcripción de dicho gen en *T.cruzi* involucre un mecanismo que requiera también de la presencia de cPKA.

La transformación del parásito de epi a tripomastigote ocurre naturalmente en el intestino del insecto vector y se encuentra afectado por numerosos factores ambientales. Resultados previos muestran que factores como el pH (Ucros y col., 1983), niveles de aminoácidos (Contreras y col., 1985b; Homsy y col., 1989), acumulación de metabolitos (Fernandez y Castellani, 1966), sacáridos y cloruro de sodio (Adroher y col., 1988), pueden jugar un papel en estimular la transformación de epi a tripomastigotes.

El perfil proteico de los tripomastigotes es más complicado que el de los epimastigotes y durante la metaciclogénesis presentan, por lo menos, tres perfiles proteicos distintos (Walter y Opeerdoes, 1982).

En cuanto al camino modulado por Ca^{2+} , se ha reportado que el bloqueo de Ca^{2+} externo afecta la capacidad de diferenciación de *T.cruzi* (Isola y col., 1989).

Se sabe que el éster de forbol PMA, un conocido inductor de la actividad de PKC, substituye al CO_2 como agonista en la metaciclogénesis de *T.cruzi* en medios pobres (Carvalho y de Souza, 1986). Trabajos posteriores demostraron que, en epimastigotes de los clones CL y de aislamientos peruanos, la inducción de la metaciclogénesis por CO_2 o PMA no se veía acompañada por cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+} y que los inhibidores clásicos de PKC, staurosporina y H7, no bloqueaban el proceso metaciclogénico (Krassner y col., 1993). Sin embargo, se han descrito resultados contrarios para epimastigotes del clon RA, en donde el efecto metaciclogénico del PMA es específicamente revertido por H7 y staurosporina (Isola y Lammel., 1993). Sin embargo en ninguno de estos ensayos se midió la

actividad de PKC ni la modificación de sustratos fosforilables específicos de esa enzima.

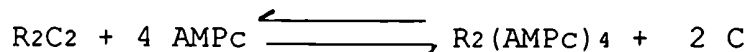
7.1. QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMPc (PKA):

Las quinasas de proteínas dependientes de AMPc son proteínas que transfieren un grupo fosfato de un fosfato donador a un aminoácido aceptor en una proteína sustrato. Los requerimientos básicos para el reconocimiento de péptidos para esta enzima son las Arg de los sustratos fisiológicos, que preceden al sitio de fosforilación, el cual normalmente es una Ser y menos frecuentemente una Thr (Toner-Webb y Taylor, 1987).

El primer indicio de la existencia de dos tipos de PKA fue por elución diferencial en una DEAE-celulosa de dos actividades quinásicas con capacidad de ligar AMPc. Se denominaron PKA-I y PKA-II, de acuerdo al orden de elución en un gradiente salino: 0.08-0.1 M NaCl y 0.2 M NaCl respectivamente. Ambas quinasas son solubles, presentan la misma estructura tetramérica y el mismo mecanismo de acción frente al AMPc. La subunidad catalítica cPKA se conserva mientras que los distintos tipos de subunidades regulatorias rPKA, del tipo I y II correspondientes al gradiente salino respectivo, difieren. La cantidad de PKA-I y PKA-II sintetizadas en distintos tejidos son diferentes, sugiriendo así que se trata de dos isoenzimas con diferentes funciones biológicas. Esta hipótesis se sostiene por el hecho que la relación tipo I a tipo II cambia en distintas líneas celulares durante su diferenciación (Lee y col., 1983).

La función catalítica de PKA muestra un ordenado mecanismo de unión. Primero se une al Mg^{2+} -ATP, lo cual le genera un cambio conformacional. Luego, se une al sustrato. Se produce la reacción catalítica y se

libera secuencialmente el sustrato fosforilado y el Mg^{2+} -ADP, respondiendo directamente al AMPc, según la siguiente reacción:



Siendo,

R_2C_2 : la holoenzima inactiva

$R_2(\text{AMPc})_4$: la subunidad regulatoria libre unida al AMPc

C: subunidad catalítica libre con actividad de quinasa de proteínas.

Las quinasas de proteínas difieren significativamente en: tamaño, localización celular, mecanismo de regulación y sustratos que reconocen. Por las secuencias directas o deducidas del ADN se ve que todas las quinasas evolucionaron de un ancestro común. La homología se ve reducida a la subunidad catalítica, incluyendo el dominio de unión a ATP y las regiones directamente involucradas en la actividad catalítica. Esto sugiere que el mecanismo catalítico de las quinasas de proteínas se conservó a lo largo de la evolución (Taylor y col., 1988). Sin embargo, la localización del dominio catalítico no es fija. En las quinasas monoméricas está ubicado cerca del carboxilo terminal, dejando el amino terminal para las zonas regulatorias, como se describe más adelante para el caso de PKC. En las quinasas multiméricas las actividades regulatorias y catalíticas se encuentran en subunidades separadas, como se describe a continuación para PKA. Los dominios de cPKA consisten en regiones alternadas de alta y baja conservación (Hanks y col., 1988), presentando por lo menos tres sitios funcionales:

- Un sitio conservado de unión a Mg^{2+} -ATP de una tríada de glicinas que formaría un codo alrededor del nucleótido (Taylor y col., 1988; Hanks y col., 1988).

- Un sitio de reconocimiento a sustrato, con un consenso para especificidad Ser/Thr, precedido por la C199, involucrada en la unión, más hacia en amino terminal en la secuencia de cPKA respecto del sitio de reconocimiento (Hanks y col., 1988):
- Un sitio catalítico, donde ocurriría la transferencia de un grupo fosfato y que, muchas veces, inmediatamente hacia el amino terminal presenta una secuencia Ala-Pro-Glu de especificidad para sustratos Ser/Thr no muy conservada (Hanks y col., 1988).
- El dominio cPKA posee una característica inusual, dos sitios de autofosforilación, muy resistentes a las fosfatasas (Shoji y col., 1983). En algunos casos se observó que la autofosforilación aumenta la actividad catalítica (Kmieciak y Shalloway, 1987), ya que resultaría en un cambio conformacional, permitiendo un mejor acceso de los sustratos exógenos al sitio catalítico (Hanks y col., 1988).
- Otra modificación importante en la cPKA es un grupo N-tetradecanoil (miristilo) en su amino terminal (Beeke y Corbin, 1986; Shoji y col., 1983), indicando una posible unión a membrana cuya función contralora de la actividad enzimática es aún desconocida. Sin embargo, ya que no todas las proteínas miristoiladas se localizan en la membrana plasmática, habría otros factores adicionales involucrados en la unión a membrana (Spiegel y col., 1991). Existen evidencias de que el miristato de la proteína viral gag del retrovirus HIV sería requerida para la interacción proteína-proteína más que para la inserción en la bicapa lipídica (Gordon, 1990).

La subunidad regulatoria también presenta dominios con características conservadas importantes. La región de la bisagra, en el caso de r_I PKA incluye un sitio de pseudosustrato, y, en el caso de r_{II} PKA, un sitio de autofosforilación, que ocuparía el sitio de unión a sustrato en la

holoenzima y así podría competir con él. Esta hipótesis se basa en la homología de secuencias entre r_{II} PKA y ciertos sustratos. El modelo también propone que este sitio estaría ocupado por la C199 cuando cPKA se encuentra disociada de r_{II} PKA (First y col., 1988). Cerca del sitio de autofosforilación de r_{II} PKA se encuentra una C97, la cual forma un puente disulfuro con la C199 de cPKA (First y col., 1988). Aparentemente la forma fosforilada favorecería la disociación de la holoenzima (Rangel-Aldao y Rosen, 1974). A favor de dicha teoría, se demostró que en músculo liso las formas fosforiladas y defosforiladas varían con las concentraciones intracelulares de AMPc (Scott y Mumby, 1985).

Alhanaty y col. (1981) describieron una proteasa específica de cPKA. Cuando cPKA se disocia de rPKA se hace susceptible de ser atacada por dicha proteasa, produciendo una subunidad catalítica inactiva de 34 kDa. El rol fisiológico de este mecanismo proteolítico sería el de actuar como control de sensibilidad, que operaría durante la fase de desensibilización de la respuesta celular a la estimulación hormonal. Los niveles de la subunidad cPKA libre activa se reducirían, y así no llegarían a ser inhibitorios para el crecimiento normal de la célula (Hemmings, 1986).

En eucariotas superiores se han descripto varias isoformas para cPKA: c_{α} PKA y c_{β} PKA, dependiendo del tipo de tejido estudiado (Uhler y col., 1986b).

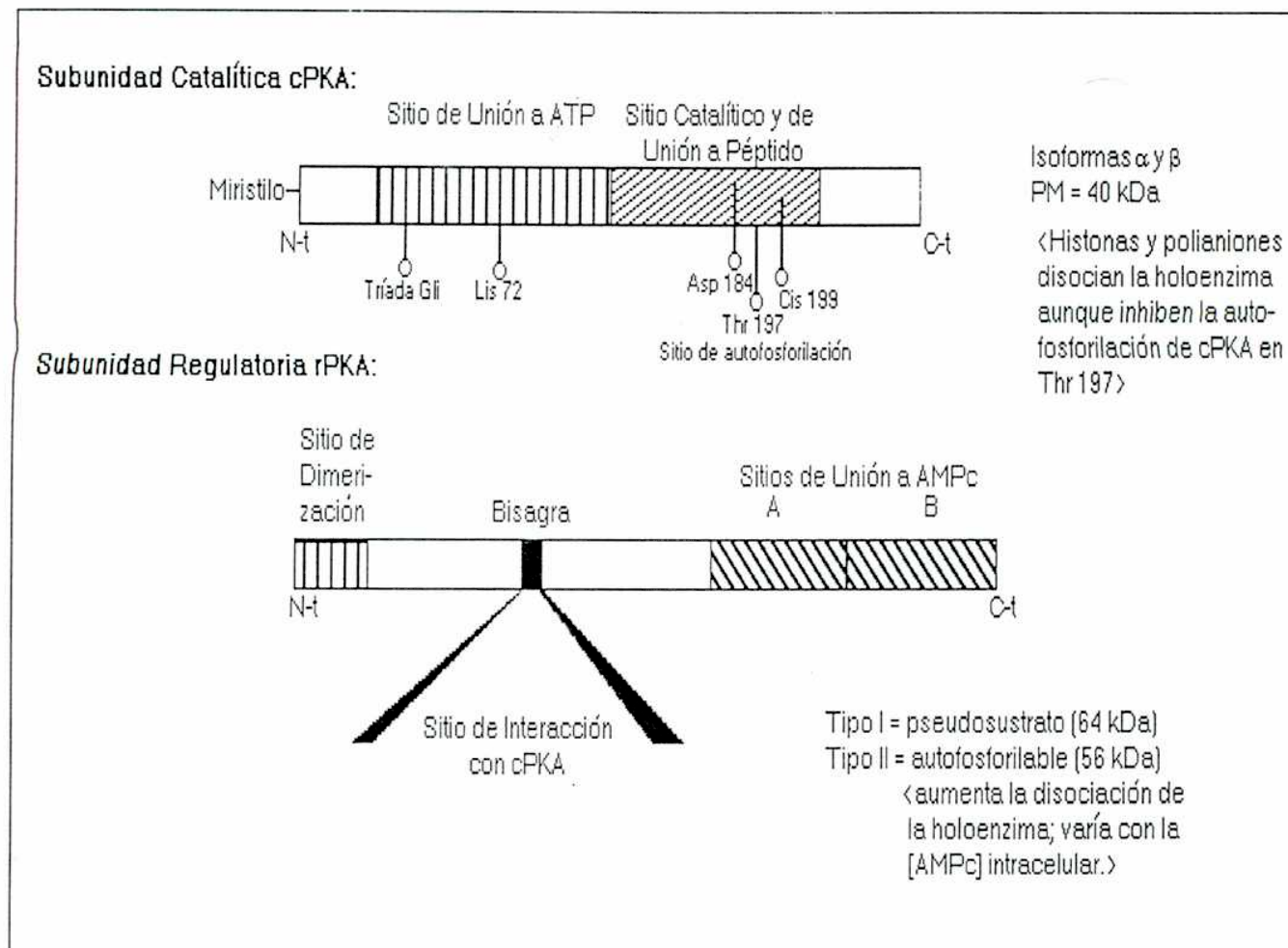


Figura 5: Esquema de las subunidades catalítica y regulatoria de la quinasa dependiente de AMPc.

Se han propuesto tres hipótesis acerca del significado funcional de la existencia de dos cPKA distintas: 1) que hayan sido originadas por eventos de duplicación génica temprana; 2) que cada una tuviera distintas especificidades de sustratos, dado que en el sustrato aceptor existen dos entornos posibles a la SER fosforilable, que son: Arg-Arg-X-Ser o Lys-Arg-X-X-Ser; 3) o que c_{α} PKA interaccionaría con r_I PKA y r_{II} PKA, mientras que c_{β} PKA interaccionaría preferentemente con una isoforma hasta ahora desconocida de rPKA (Uhler y col. 1986a).

7.2. PKA EN EUCARIOTAS INFERIORES

En *Saccharomyces cerevisiae* existen tres genes que codifican para la subunidad cPKA: TPK1, TPK2 y TPK3, mientras que uno solo codifica para rPKA: BCY1 (Toda y col., 1987). En esta levadura el AMPc juega un rol crítico en la progresión del ciclo celular (Natsumoto y col., 1983). Zoller y col. (1988) purificaron y caracterizaron la TPK1, con un PM de 46 kDa, bloqueada en el amino terminal, aunque se desconoce si está miristoilada, con una pobre capacidad de autofosforilarse.

En epimastigote de *T. cruzi* de un aislamiento humano de Venezuela se detectó una proteína de unión a AMPc, con un PM de 62 kDa y que no coeluye con los picos de actividad quinasa en DEAE (Rangel-Aldao y col., 1983). En epimastigotes de la cepa infectiva Tul2 de *T. cruzi* se caracterizó una actividad de PKA de tipo II (Ulloa y col., 1986; Ullca y col., 1988). La PKA del parásito se activa a concentraciones nM de AMPc, es específica para fosforilar Kemptido, histona IIAS e histona VII. La holoenzima se disocia en sus componentes cPKA y rPKA puede ser reconstituida por las subunidades separadas tanto de origen homólogo como heterólogo. Se demostró autofosforilación de la subunidad rPKA, y reconocimiento por anticuerpos policlonales dirigidos contra la subunidad r_{II}PKA de corazón bovino de PM 56 kDa.

8.1. QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE CALCIO Y FOSFOLIPIDOS (PKC):

Esta enzima también llamada quinasa de proteínas C (PKC), cataliza específicamente la fosforilación de residuos serina y treonina y su actividad depende de Ca^{2+} y fosfolípidos (Stabel y Parker, 1991). Sin embargo, a la concentración fisiológica de Ca^{2+} la PKC requiere DAG para su activación (Stabel y Parker, 1991). Por lo tanto el DAG ha

sido definido como el segundo mensajero responsable de la activación de la PKC *in vivo* (Nishizuka, 1988).

Existe más de una especie de PKC, ya sea porque son codificadas a partir de distintos genes o porque son producto de procesamiento alternativos de un mismo ARNm. Hasta el momento han sido identificadas 10 subespecies de PKC en distintos tejidos que pueden ser divididas en tres grupos. El grupo PKCc está compuesto por las cuatro PKC clásicas o convencionales (α , β I, β II y γ); el grupo PKCn está formado por las recientemente clonadas (δ , ϵ , η (L) y θ ; y el grupo PKCa está formado por dos PKC atípicas (ζ y λ) (Stabel y Parker, 1991). Todas las PKC están constituidas por una única cadena polipeptídica. Las PKC α , β y γ poseen cuatro zonas conservadas (C1-C4) y cuatro variables (V1-V4), como se ve en la Figura 6. Las PKC δ , ϵ y ζ son más parecidas entre sí, careciendo de zona C2. Las áreas conservadas (C) representarían regiones de la molécula involucradas en funciones comunes a todas las PKC, como por ejemplo las zonas del dominio catalítico. Los bloques menos conservados de secuencias (V) entre las regiones conservadas (C) podrían representar secuencias espaciadoras que le permitieran cierta flexibilidad a los dominios del polipéptido responsables de propiedades específicas en distintas PKC (Stabel y Parker, 1991).

La región conservada C1, presente en todos los miembros de la familia, excepto en la PKC ζ , contiene una región de pseudosustrato y dos tandem de una secuencia rica en cisteínas. La región de pseudosustrato contiene una secuencia consenso para la fosforilación pero ningún residuo fosforilable (presenta una Ala en vez de una Ser), postulándose que controlaría la actividad catalítica bloqueando el

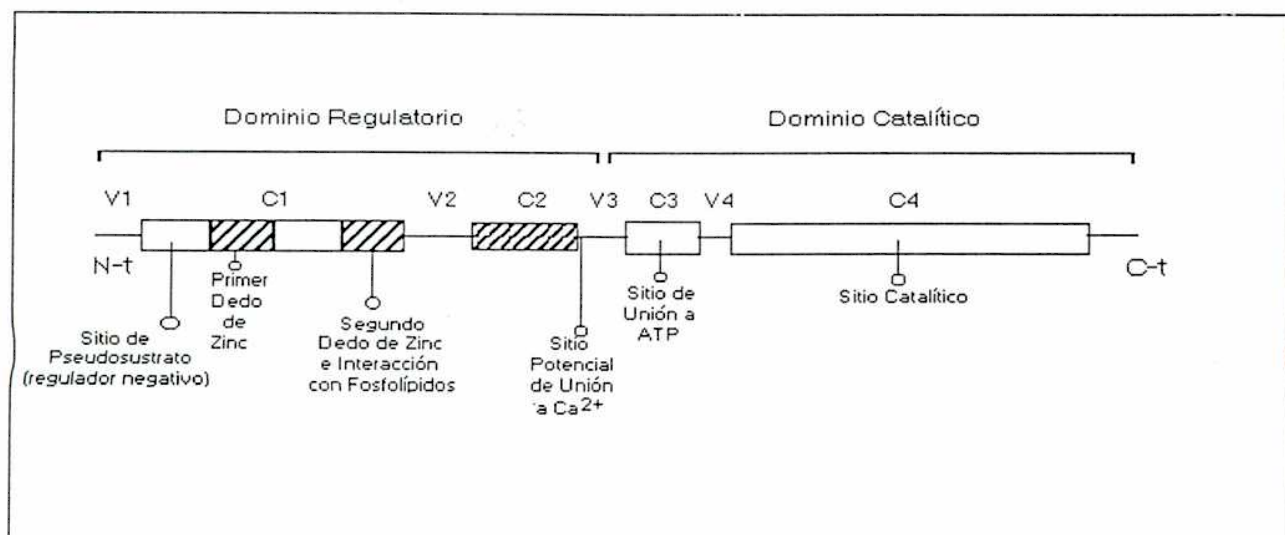
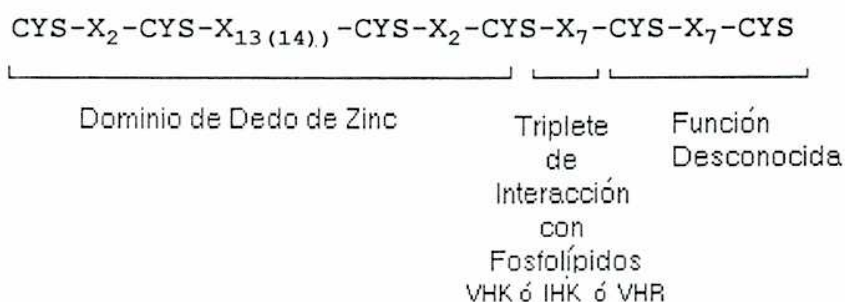


Figura 6: Estructura de la quinasa de proteínas tipo C, PKC. Organización de sus dominios.

acceso del sustrato al ocupar el sitio catalítico (Stabel y Parker, 1991). El sitio de pseudosustrato está seguido por los dedos de Zinc con una distancia altamente conservada entre el residuo de Ala de la región de pseudosustrato y el primer dedo de Zinc. El consenso para dedos de Zinc es:



Las estructuras de dedos de Zinc no sólo son importantes para la unión secuencia-específica del factor al ADN o al ARN sino también para interacciones proteína-proteína. La secuencia del dedo de Zinc de PKC es del tipo "Cys-Cys", representada por la superfamilia de receptores de esteroides y la proteína ElA de Adenovirus (Berg, 1990). Las primeras cuatro Cys están encargadas de coordinar el Zinc (Stabel y

Parker, 1991). Las Cys restantes servirían a alguna función desconocida, siendo que este tipo de dedo de Zinc extendido fue encontrado en otras moléculas no relacionadas, como la DAG quinasa (Sakane y col., 1990; Schaap y col., 1990), una proteína de unión a ésteres de forbol, llamada "n-chimaerin" (Hall y col., 1990) y la familia Raf de quinasas de proteínas (Rapp y col., 1988).

La PKC ζ contiene sólo una de estas secuencias y su masa es relativamente menor. La secuencia rica en cisteínas se parece a la región consenso de unión al ADN, "Dedo de Cisteína-Zinc-ADN", que se encuentra en muchas metaloproteínas y en proteínas que se unen al ADN, reguladas transcripcionalmente (Stabel y Parker, 1991). No hay evidencias que indiquen que la PKC se une al ADN aunque se conoce que esta enzima es capaz de migrar al núcleo (Stabel y Parker, 1991).

El triplete de aminoácidos VHK, IHK o VHR está embebido en la estructura de la extensión del primer dedo de Zinc, tres aminoácidos hacia el carboxilo terminal de la última Cys del dedo de Zinc, y se ha sugerido que estaría involucrado en interacciones con fosfolípidos, por analogía a que el mismo triplete ha sido encontrado en la región catalítica de la fosfolipasa A₂ (Stabel y Parker, 1991).

Mediante deleciones del segundo dedo de Zinc de PKC α se postuló que éste estaría involucrado en la unión a ésteres de forbol (Kaibuchi y col., 1989). Los ésteres de forbol son compuestos derivados del aceite de semilla de crotón y fueron inicialmente reportados como promotores de tumores en varios tipos celulares. Los tratamientos con ésteres de forbol pueden alterar la morfología celular, la diferenciación, el metabolismo del Ca²⁺, la secreción, la endocitosis y la adhesión, la organización citoesqueletal (Carvalho y de Souza, 1987) y la estructura y fluidez de membrana (Vannier-Santos y col.,

1988). Los ésteres de forbol activarían a la PKC por dos vías distintas. Una manera de activación reversible postula que los ésteres de forbol reducirían los requerimientos de PKC por Ca^{2+} y fosfatidilserina, causando un cambio conformacional en el dominio regulatorio, induciendo una disociación del sitio de pseudosustrato del dominio catalítico (Nishizuka, 1988). Los ésteres de forbol, la fosfatidilserina y el Ca^{2+} formarían un complejo ternario con la enzima, en donde los ésteres de forbol proveerían los sitios para coordinar el Ca^{2+} (Stabel y Parker, 1991). El camino irreversible de activación de PKC representaría la inserción de PKC en la bicapa lipídica, luego de lo cual permanecería activada independientemente de la presencia continua de ésteres de forbol o Ca^{2+} (Stabel y Parker, 1991). Entonces, así como la respuesta a corto plazo inducida por los ésteres de forbol correspondería a efectos de fosforilación específicos, las respuestas a largo plazo reflejarían las consecuencias expresadas más lentamente de un estado de fosforilación aumentado y mantenido (Blumberg, 1991). Otra hipótesis postula que existe un nivel basal de actividad de PKC y que los efectos crónicos de los tratamientos con ésteres de forbol representarían una pérdida de la actividad a través de una regulación negativa de PKC, debido a aumento en la proteólisis o por un aumento en el nivel basal de fosforilación de algún sustrato de PKC (Stabel y Parker, 1991). Por otro lado, los ésteres de forbol causan inserción de PKC en la bicapa lipídica por arriba de $1\ \mu\text{M}$, lo cual está muy por encima de lo necesario para activar la enzima, que se encuentra en el rango nM (Blumberg, 1991). Ya que diferentes entornos celulares proveen distintos patrones de inducción de la regulación negativa, se postula

que para los distintos tipos de PKC se hallarían involucrados distintos caminos (Stabel y Parker, 1991).

El dominio C2 se encuentra sólo presente en el grupo PKCa. En las PKC α y PKC β , inmediatamente hacia el carboxilo terminal del dominio conservado C2, existe un sitio potencial de unión a Ca²⁺ del tipo "EF-Hand" (Stabel y Parker, 1991). El papel del Ca²⁺ en la regulación de la actividad de PKC no ha sido dilucidado aún. Estudios *in vitro* demostraron que el DAG disminuyen el requerimiento de Ca²⁺ para la actividad de PKC a los niveles presentes en el citoplasma de células no estimuladas (Stabel y Parker, 1991).

La mitad carboxilo terminal, que contiene las regiones C3 y C4 parece ser el dominio catalítico ya que presenta alta homología con los dominios de otras quinasas (Stabel y Parker, 1991). La región conservada C3 contiene la secuencia de unión a ATP (Stabel y Parker, 1991).

La zona regulatoria y el dominio con actividad catalítica pueden ser clivados por una proteasa Ca²⁺-dependiente, llamada CALPAINA, generando una PKC constitutiva e irreversiblemente activada y un dominio con unión a ésteres de forbol (Blumberg, 1991).

La autofosforilación de PKC ha sido ampliamente documentada aunque sus consecuencias sobre la actividad enzimática y sobre los requerimientos de Ca²⁺ y ésteres de forbol están aún en discusión (Freisenwinkel y col., 1991).

Los distintos tipos de PKC poseen una expresión tejido específica y ciertas diferencias en sus propiedades enzimáticas (Stabel y Parker, 1991). Es posible que algunas especies de PKC sean activadas en diferentes fases de una respuesta celular por distintos metabolitos fosfolipídicos, tales como el DAG, ácido araquidónico y lipoxina A,

los cuales aparecen como consecuencia de la estimulación de ciertos receptores (Blumberg, 1991).

8.2. PKC EN EUCARIOTAS INFERIORES:

La búsqueda y aislamiento de enzimas tipo PKC en eucariotas inferiores se ha enfocado en los últimos años en la identificación de nuevos clones en bibliotecas genómicas, que presentaran homología con las ya identificadas de mamíferos. En la Tabla 2 se muestra un sumario de las PKC clonadas en eucariotas inferiores (Stabel y Parker, 1991). Si los grupos de PKC a y b tuvieron ancestros comunes, entonces la divergencia de los dos grupos debe haber ocurrido antes de que los ancestros de mamíferos y artrópodos divergieran (Stabel y Parker, 1991).

En tripanosomátidos se describieron algunos caminos donde está involucrada la PKC. En *Leishmania donovani* se conoce que durante la infección en los macrófagos huéspedes se inhibe selectivamente la expresión génica de c-fos mediada por la PKC del fagocito, una respuesta normal de los macrófagos frente a la activación con lipopolisacárido. Además la inhibición de la PKC del macrófago aumenta la internalización así como los niveles de infección con *L.donovani* (Moore y col., 1993). Aparentemente, esto ocurriría por un defecto en la activación y translocación a la membrana de PKC en los macrófagos infectados (Olivier y co., 1992).

En formas epimastigote de *T.cruzi* se demostró la presencia de PKC (Gómez y col., 1989), y una enzima tipo PKC en *T.brucei* (Keith y col., 1990). La PKC en epimastigotes *T.cruzi* se encuentra tanto en forma soluble como asociada a membrana.

Especie	Nomenclatura	Aminoácidos de la prot. predicha	Homología más cercana al tipo de mamíferos	Función
<i>Xenopus</i>	X-PKCI	676	α β (93% C1; 80% C2; 85% C4)	?
	X-PKCII	671	idem	?
<i>Drosophila</i>	53E(br)=d	639	poseen C2 (α β) y no V4 (γ)	cerebro adulto
	53E(ey)	700	idem, duplic.gén.de 53E(br)	fotorrecepción
	98F	634	δ (carece de C2)	cerebro adulto
<i>C.elegans</i>	tpa-1	526	41% C1 α , 53% C4 α , pseudosust.	Une PMA. Rol ?
	unc-13	1743	Une PMA, DG y Ca^{2+}	Desarrollo neuronal motor y sensor [4].
<i>S.cerevisiae</i>	PKC1	1151 [131 kDa]	51% C4 de α/β 1,2 dedos Zn^{2+} y sitio pseudosustrato	Esencial en sint.ADN, división y crecimiento
	PKC	90 kDa	Purificada; Ca^{2+} /PS/DG sens. insensible a PMA	Fosforila MBP
	PKC2	994 [115kDa]	37% C4, 32% C1 α/β tipo nPKC	Metabolismo de aminoácidos [3]
<i>D.discoideum</i>	PKC		PMA sens, Ca^{2+} -indep. [1]	Regulación recepto res de AMPc [2].

Tabla 2: Tipos de PKC clonadas o purificadas en eucariotas inferiores

[1] Ludérus y col. (1989) *FEBS Lett.* 253, 71-75.[2] Van Haastert y col. (1985) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 128, 185-192.[3] Simon y col. (1993) *Current Biol.* 3, 813-821.[4] Maruyama y Brenner (1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88, 5729-5733.

Un 60 % de la enzima se encontraría en estado activo. La PKC de epimastigotes de *T.cruzi* requiere Ca^{2+} y fosfatidilserina, puede ser estimulada por DAG y PMA, así como inhibida por polimixina B o staurosporina (Gómez y col., 1989).

9. OTRAS FOSFORILACIONES EN TRIPANOSOMATIDOS:

El rol de las quinasas de proteínas en organismos que divergen tempranamente en el linaje eucariótico se encuentra relativamente poco explorado. Dos quinasas independientes de nucleótidos cíclicos se

describieron en *L.donovani*, una en la membrana externa del parásito (Das y col., 1986a) y otra en la fracción soluble del mismo (Banerjee y Sarkar, 1990). Los autores sugieren que esta enzima jugaría un rol fisiopatológico dentro de la célula huésped, postulando una inactivación por fosforilación de las enzimas lisosomales del huésped. En otros trabajos se demostró que existe una ectoquinasa en *L.donovani* que fosforila proteínas del sistema de complemento de la célula de mamífero (Lester y col., 1990; Hermoso y col., 1991), que aumenta en la fase estacionaria (Sacks y Perkins, 1984; Glew y col., 1988), lo cual contribuiría al aumento de la virulencia (Das y col., 1986a). Además, en promastigotes de *L.donovani* se encontró una quinasa de proteínas que se inhibe por heparina. El parásito tendría receptores para heparina y los glicosoaminoglicanos jugarían un rol importante en la relación huésped-parásito (Mukhopadhyay y col., 1980). En *Leishmania major* se demostró recientemente que la fosforilación de proteínas juega un rol esencial en los caminos de transducción de señales, dado que se detectó un patrón de proteínas fosforiladas en Ser/Thr reguladas diferencialmente durante el ciclo de vida, probablemente debido a la acción de fosfatasas reguladas mas que a la acción de quinasas de proteínas estadio-específicas (Dell y Engel, 1994). En *T.gambienese* se demostró la presencia de múltiples quinasas (Walter, 1980), todas independientes de AMPc. A pesar de ello se detecta unión a AMPc, pero sin que se la pueda correlacionar con una actividad de AC, PDE ni PKA, dado que no coinciden los PM ni las Ka para el nucleótido (Walter, 1978).

Durante la infección *T.b.brucei* liberara triptofol, un metabolito del triptofano, al torrente sanguíneo del huésped. El triptofol eleva los niveles intracelulares de AMPc del parásito, unas 4 o 5 veces luego de

30 minutos de exposición *in vitro*, sin presentar efectos adversos en la viabilidad celular o en el metabolismo glucolítico (Manicini y Patton, 1981). En *T.brucei* se detectó que la actividad de seis quinasas de proteínas Ser/Thr estaban reguladas durante el desarrollo y con distintos niveles de regulación. En células en división se detectó una quinasa de proteínas de 89 kDa (Parsons y col., 1993), se observó un aumento de la fosforilación de un conjunto de proteínas entre 44-46 kDa en Tyr durante la diferenciación de las formas sanguíneas a las procíclicas de *T.brucei* (Parsons y col., 1990; Parsons y col., 1994), y una quinasa de proteínas en Ser/Thr, llamada Nrk, expresada constitutivamente durante el desarrollo del parásito (Gale y Parsons, 1993). Es posible que las quinasas de proteínas jueguen un rol pivotante en la proliferación y diferenciación de protozoarios.

10.1. TRAFICO VESICULAR DEL CAMINO ENDOCITICO Y DEL DE SECRECION:

Todas las células deben comunicarse con su entorno. Para ello, las células eucarióticas han evolucionado un elaborado sistema de membranas que les permiten tomar macromoléculas del entorno por un proceso llamado endocitosis, conducir las a compartimientos intracelulares que contengan enzimas digestivas, y enviar los metabolitos producidos por la digestión desde los lisosomas al citosol o a otros compartimientos, donde puedan ser utilizados o almacenados. El mismo sistema de membranas permite regular el envío de proteínas y carbohidratos sintetizados *de novo* hacia el exterior o a otros compartimientos, por un proceso llamado exocitosis, durante el cual las moléculas también pueden ser modificadas.

El camino endocítico involucra un número de estructuras unidas a membrana que permiten la distribución de ligandos a distintos destinos intracelulares y el reciclado de receptores a la superficie celular de donde provenían o por transcitosis a otro dominio de la membrana.

En la Figura 7 se describen los compartimientos celulares principales involucrados en la vía endo-exocítica (Rothman, 1994).

10.2. ENDOCITOSIS: TRANSPORTE DESDE LA MEMBRANA VIA ENDOSOMAS:

La endocitosis de fase fluida es el proceso por el cual las sustancias disueltas en el líquido extracelular son internalizadas, pudiendo ser simplemente atrapadas por pinocitosis o específicamente reconocidas por receptores. La pinocitosis es un proceso constitutivo y continuo, en donde la célula ingiere pedazos de su membrana plasmática en forma de pequeñas vesículas pinocíticas que son luego retornadas a la superficie celular. La endocitosis mediada por receptor provee un excelente mecanismo concentrador, que incrementa la eficiencia de internalización de ligandos particulares más de 1000 veces, de tal manera que sólo una pequeña parte de componentes del fluido extracelular sea tomado específicamente en grandes cantidades sin tomar el correspondiente gran volumen de líquido extracelular.

En la Figura 7 se resumen algunos de los eventos que pueden postularse durante la endocitosis de fase fluida mediada por receptor (Rothman, 1994), como la formación de las vesículas recubiertas de clatrina, donde se acumulan los complejos ligando-receptor, pérdida de la cubierta de las vesículas, fusión entre sí o con endosomas tempranos (Mayorga y col., 1988), fusión entre endosomas tempranos, con vesículas derivadas del Golgi o con endosomas transportadores,

desacoplamiento de los complejos ligando-receptor y la selección de los receptores a ser reciclados y de las moléculas a proseguir en el camino endocítico, fusión de vesículas reciclantes con la membrana plasmática independientemente de los microtúbulo mediante vesículas recubiertas del complejo de coatómeros-ARF, comienzo de la digestión de las moléculas no recicladas en los endosomas tardíos, con pH~5.5-6, pasaje a un compartimiento pre-lisosomal, en donde las hidrolasas lisosomales sintetizadas de novo provenientes del Trans-Golgi se unirían al R-M6P, y finalmente pasaje por fusión de membranas a la estación terminal del camino endocítico, los lisosomas, en donde ocurre la digestión intracelular de macromoléculas (Rothman, 1994).

10.3.1. REGULACION DEL CAMINO ENDOCITICO:

La fusión de endosomas no sólo requiere de la temperatura apropiada, fuerza iónica y energía, sino también de factores proteicos citosólicos y asociados a membrana. Dado que existen muchos sistemas de membranas distintos dentro de la célula el proceso de anclaje debe ser altamente selectivo. Ciertas proteínas fusogénicas especializadas estarían encargadas de ese proceso. Muchos pasos de los eventos de fusión requieren de una proteína sensible a NEM con actividad ATPasa, NSF, que se une a la membrana en presencia de proteínas de unión a NSF soluble, llamadas SNAPs, y receptores de NSF asociados a membrana. Se han identificado proteínas receptoras de los SNAPs, a las que se llamó SNAREs, y que al unir a las SNAPs, permitirían la unión a NSF.

Las SNAPs se unirían a SNAREs de la vesícula dadora, v-SNAREs, y a receptores de las membranas blanco, t-SNAREs. Así los complejos de vSNARE/SNAPs-NSF/tSNARE y otras proteínas aún no identificadas catalizarían la fusión de las dos bicapas lipídicas.

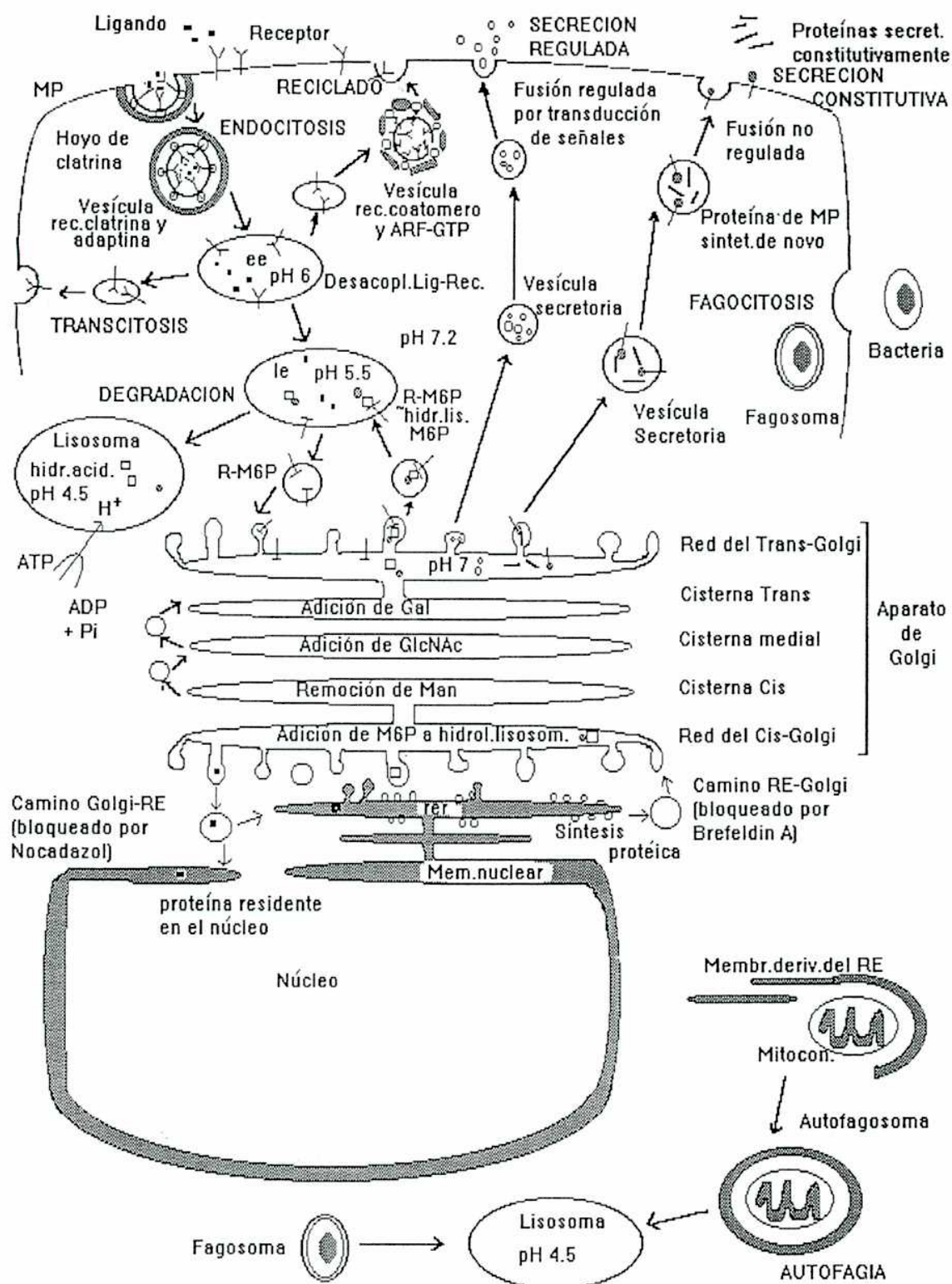


Figura 7: Compartimientos subcelulares principales del tráfico vesicular de una célula eucariota superior.

Luego NSF hidrolizaría el ATP, Rab pasaría por algún mecanismo a su estado GDP inactivo, y el complejo se desensamblaría una vez que las dos membranas fusionaran. También formarían parte de la maquinaria fusogénica las proteínas de unión a GTP: ARF, Rab y proteínas G heterotriméricas (Colombo y col., 1992; Rothman, 1994).

NSF es un componente de los complejos fusogénicos que funcionan entre el RE y los compartimientos del cis, medio y trans-Golgi, así como para la fusión entre endosomas tempranos in vitro (Díaz y col., 1989). En la Figura 8 se muestra un modelo de la fusión de vesículas involucrando algunos de los componentes conocidos hasta hoy en día (Rothman, 1994).

10.3.2. PROTEÍNAS G EN EL TRANSPORTE VESICULAR:

El transporte vesicular depende de proteínas regulatorias de unión a GTP, proteínas G, que actúan como interruptores moleculares que cambian rápidamente de su forma activa unida al GTP a una forma inactiva unida a GDP (Bourne y col., 1991). Las proteínas G operan en un ciclo que típicamente depende de dos componentes auxiliares: una proteína de liberación del nucleótido de guanina (GNRP) que cataliza el intercambio GDP por GTP, y una proteína con actividad de GTPasa (GAP), que gatillaría la hidrólisis del GTP unido a la proteína G.

La superfamilia de las GTPasas que unen e hidrolizan GTP incluyen las proteínas G heterotriméricas (40-50 kDa), compuestas por subunidades α , β y γ , y las monoméricas de bajo peso molecular (20-25 kDa), llamadas sG, que presentan clara homología con las proteínas codificadas por el oncogen Ras. Ambas clases estarían involucradas en el transporte vesicular.

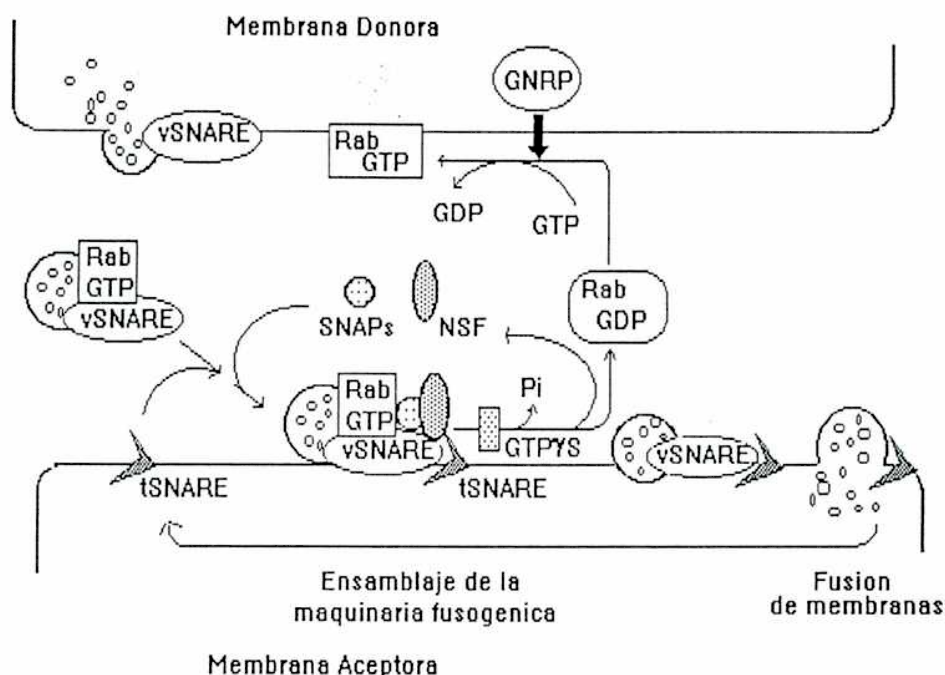


Figura 8: Modelo de fusión de vesículas mediado por proteínas citosólicas y unidas a membranas (Bourne, 1991).

La superfamilia Ras puede dividirse en tres categorías principales, basadas en su grado de similitud. A su vez cada familia puede ser dividida en las subfamilias Ras, Rho y Rab (Spiegel y col., 1991). Las sG de la familia Ras estarían relacionadas a actividades transformantes, las de la familia Rho jugarían un rol en el control de la organización del citoesqueleto de las células y las de la familia Rab se encontrarían asociadas con membranas de distintos compartimientos intracelulares, particularmente en vesículas secretorias y endosomales de células de mamíferos (Spiegel, 1991). Rab5 presenta funciones en la fusión de endosomas tempranos mientras que Rab4 estaría asociada con una población de endosomas que participan en el reciclado de receptores de transferrina (Rothman, 1994).

Existen evidencias que proteínas G heterotriméricas tendrían funciones en el transporte vesicular. El GTPγS, un análogo no hidrolizable del GTP, inhibe la fusión de endosomas tempranos *in vitro* a concentraciones saturantes de citosol, pero la estimula a concentraciones de proteínas que son incapaces de promover completa actividad fusogénica. Más aún, el GTPγS estabiliza la agregación de endosomas, un paso que parece preceder a la fusión de endosomas *per se*. Esto sugeriría que una o varias proteínas de unión a GTP mediarían la unión de factores citosólicos requeridos para la fusión a las membranas endosomales (Mayorga y col., 1989b). El fluoruro de aluminio, AlF_4^- , que sólo puede activar a proteínas G triméricas, afecta al camino endocítico, inhibiendo la fusión de endosomas tempranos (Mayorga y col., 1989a). La presencia de subunidades $G\alpha$ en compartimientos intracelulares específicos sugiere una función de las proteínas G en el tráfico de membranas (Mayorga y col., 1989a). Aún no está claro si las proteínas G triméricas involucradas en la fusión son las mismas que están acopladas al receptor. El mastoparén es un tetradecapéptido anfifílico componente de la toxina del veneno de avispa que acelera el intercambio de nucleótidos particularmente en $G\alpha_o$ y $G\alpha_i$ por un mecanismo virtualmente idéntico al de la unión ligando-receptor, con una EC_{50} entre 5-10 μM (Colombo y col., 1992). El mastoparén a 10 μM inhibe la fusión de endosomas tempranos *in vitro* y revierte los efectos de GTPγS. La adición de subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G al ensayo de fusión antagonizan el efecto estimulatorio del GTPγS, confirmando la participación de proteínas G triméricas en la fusión de endosomas tempranos (Colombo y col., 1992).

Los factores que participan en el transporte vesicular entre los sacos del aparato de Golgi interactúan con las membranas por medio de

proteínas G heterotriméricas. La liberación de la proteína de cubierta β -COP (β "coat protein" de los complejo coatómeros, relacionada al transporte vesicular no selectivo) por brefeldina A es inhibida por GTP γ S y AlF_4^- (Rothman, 1994). El GTP γ S induciría la unión de β -COP y ARF, una sG, a las membranas y el agregado de subunidades $\beta\gamma$ lo inhibiría (Rothman, 1994). En la Figura 9 se describe la localización subcelular de algunas proteínas de la superfamilia de las GTPasas en la regulación del tráfico vesicular.

10.3.3. PROTEINAS DE UNION A CALCIO EN LA FUSION DE MEMBRANAS:

La concentración de Ca^{2+} libre citosólico ha sido postulada como un regulador importante de la estructura del citoesqueleto y de funciones mótiles, como la fagocitosis (Burgoyne y Clague, 1994). Un número importante de proteínas asociadas a la actina, tales como la gelsolina y miosina son reguladas por el Ca^{2+} (Burgoyne y Clague, 1994). Una clase de proteínas de unión a Ca^{2+} , la cromobindina, la calpactina y la sinexina, se encuentran involucradas en la fusión de gránulos secretorios (Burgoyne y Clague, 1994). Kruskal y Maxfield demostraron que la concentración intracelular de Ca^{2+} aumenta 4 veces (de 100 nM en condiciones no estimuladas y sin contacto con ninguna superficie a 400 nM promedio, cuando entra en contacto con una superficie o una molécula esté o no opsonizada) y oscila antes y durante la fagocitosis (Burgoyne y Clague, 1994).

En presencia de concentraciones mM de Ca^{2+} , se observa fusión aún en la presencia de un sistema depletante de ATP. De manera similar se puede observar fusión en ausencia de ATP cuando se excluye al EGTA de la solución de homogenización. Esto sugiere que un mecanismo de fusión que no requiere energía y que sería mediado en alguna forma por el Ca^{2+}

podría existir en este sistema (Mayorga y col., 1989c). La fusión dependiente de ATP se ve poco afectada por cambios en el pH entre 6.5 y 7. Sin embargo por debajo de pH 6.5 aumenta la fusión ATP-independiente. A bajo pH el Ca^{2+} es más eficiente en promover la fusión de endosomas tempranos sugiriendo la presencia de una proteína con capacidad fusogénica asociada a los gránulos secretorios que pueda tener un rol en la fusión mediada por Ca^{2+} (Burgoyne y Clague, 1994). Cuando se incluye EGTA en la solución de homogeneización y en la reacción de fusión, la adición de ATP es un requerimiento absoluto para que ocurra la fusión. Así, se sugirió la existencia de dos caminos independientes reguladores de la fusión de endosomas tempranos. Uno de los caminos sería Ca^{2+} -independiente e involucraría al factor NSF. El segundo camino sería NSF-independiente pero Ca^{2+} -dependiente, como se ve en la Figura 9 (Burgoyne y Clague, 1994).

La idea de que las anexinas, una amplia familia de proteínas de unión a Ca^{2+} y fosfolípidos, pudieran estar involucradas en el tráfico vesicular se desarrolló a partir de la observación de que estas proteínas estarían involucradas no sólo en unir fosfolípidos sino también en agregar vesículas fosfolipídicas (Burgoyne y Clague, 1994). Observaciones iniciales sugirieron que la anexina II, conocida también como Calpactina I, estaba relacionada a procesos exocíticos a concentraciones menores a μM de Ca^{2+} , es decir fisiológicas (Burgoyne y Clague, 1994). Por otro lado, también se describió que la anexina II debe estar fosforilada por PKC para ejercer su rol en la maquinaria exocítica (Sarafian y col., 1991). La fusión Ca^{2+} -dependiente se aboliría con un anticuerpo anti Anexina II o lavando los endosomas previamente a la fusión con EDTA, un tratamiento que remueve las anexinas, y pudo ser reconstituida por la adición de anexina II y

ácido araquidónico (Burgoyne y Clague, 1994). Hasta ahora se conocen diez anexinas con expresión diferencial en distintos tejidos de mamíferos (Burgoyne y Clague, 1994). Las anexinas también han sido descritas en *Drosophila*, *Hydra* y *Dictyostelium* sp. (Creutz, 1992).

En la Figura 9 se muestra la localización subcelular de las Anexinas involucradas en la regulación del camino secretorio y del endocítico.

10.3.4. ROL DE LOS LIPIDOS DE MEMBRANA EN LA FUSION DE VESICULAS:

Ciertos lípidos fusogénicos podrían jugar un rol en la fusión de membranas. Los ácidos grasos libres aumentan la fusión inducida por catión de gránulos cromafines preagregados con Ca^{2+} y sinexina o calpactina (Creutz, 1992). La liberación de ácido araquidónico (AA) también ha sido asociada con la secreción de células cromafines y durante la degranulación de neutrófilos y durante la fusión de endosomas tempranos (Mayorga y col., 1993). La familia de las fosfolipasas intracelulares de tipo A2, PLA2, exhibe especificidad para la liberación de AA y lisofosfolípidos, dos moléculas que pueden afectar la estabilidad de membranas (Mayer y Marshall, 1993). Por otro lado, las PLA2 que liberan AA requieren concentraciones μM de Ca^{2+} , probablemente para la interacción con las membranas más que para la hidrólisis de fosfolípidos. Ciertos receptores de membrana también se encuentran acoplados a una actividad de PLA2 vía proteínas G (Gupta y col., 1990; Currie y col., 1992).

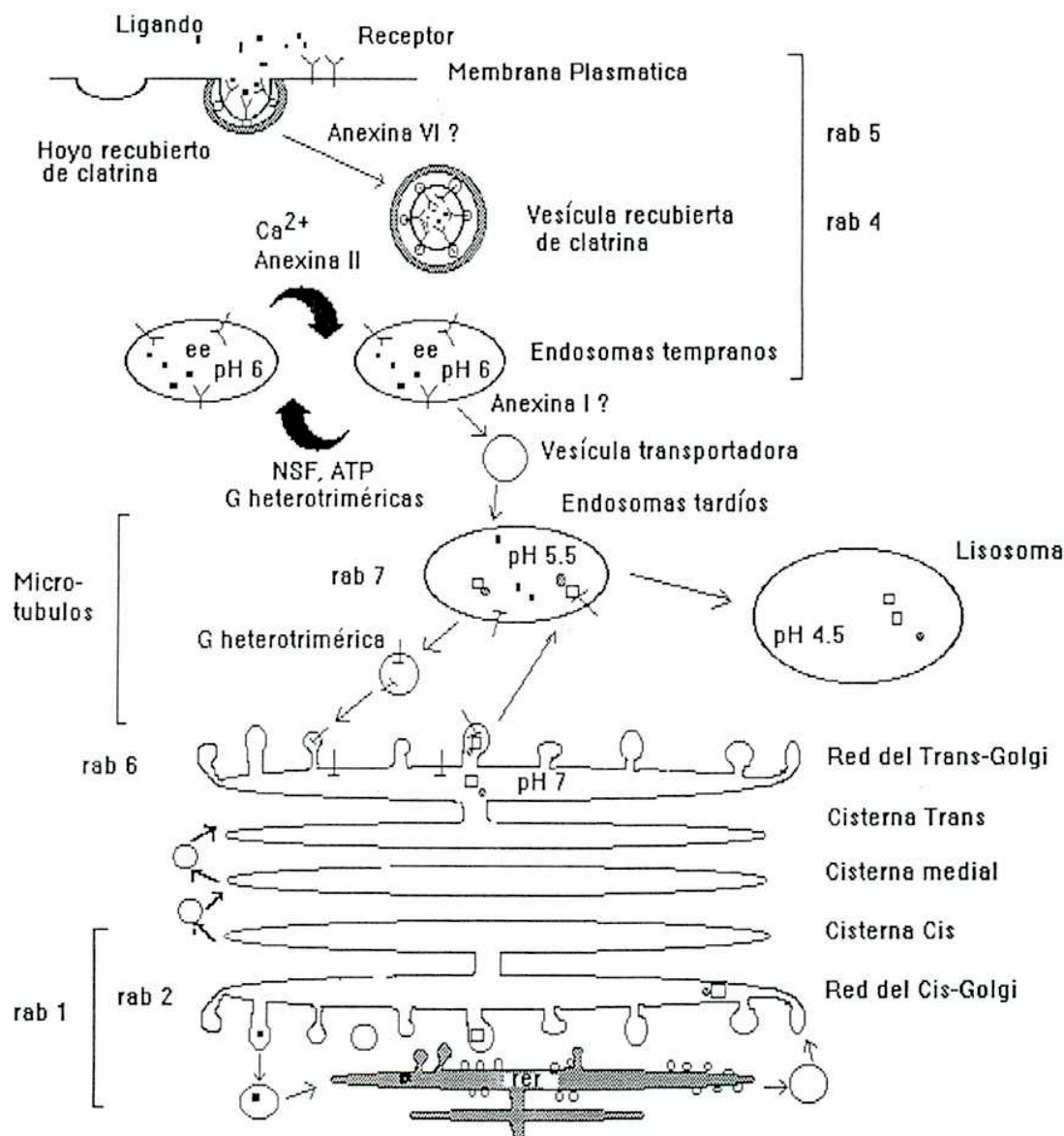


Figura 9: Localización subcelular de las proteínas G heterotriméricas, Rab y Anexinas involucradas en la regulación del camino secretorio y del endocítico.

10.3.5. REGULACION DE LA FUSION DE ENDOSOMAS POR FOSFORILACION DE PROTEINAS:

La fosforilación de proteínas también regula la actividad de la PLA2 en ciertos sistemas. Existen evidencias de que una elevación en el contenido de AMPc producido por el agregado de prostaciclina, reduce

la actividad de PLC, lo cual resulta en una marcada fosforilación de una sG de la familia Ras, con un aumento de 22 a 24 kDa en su PM y translocación de la membrana al citosol (Lapetina y col., 1989). Por otro lado, las subunidades $G_{i\alpha}$ y G_{at} son fosforilados en Ser por PKC *in vitro*. Las formas holoenzimáticas son pobremente fosforiladas respecto de las subunidades α libres (Zick y col., 1986).

La mitosis de células animales es la única condición fisiológica en donde los pasos de internalización, el transporte de membranas entre el RE y la MP, y el reciclado de receptores se encuentran arrestados sin manipulación experimental (Warren, 1985). Al mismo tiempo el complejo de Golgi (Lucocq y col., 1989), la envoltura nuclear (Gerace y Burke, 1988) y el RE se fragmentan. La fragmentación del Golgi facilitaría una partición equitativa entre las células hijas. De hecho se ha postulado que tanto la inhibición del tráfico de membrana como la fragmentación del Golgi durante la mitosis son debido a una inhibición de la fusión de vesículas, en tanto que el brote vesicular continúa realizándose (Warren, 1985). Existe evidencia encontrada acerca de cuales moléculas serían las responsables de controlar todos estos procesos de una manera coordinada durante la división celular. Cierta evidencia indica que la quinasa de proteínas cdc2 mediaría la inhibición de la fusión de vesículas endocíticas y posiblemente otros eventos de fusión en el tráfico de membranas (Tuomikoski y col., 1989). Datos posteriores sugieren que la quinasa cdc2 no sería la única responsable, ya que eventos de fosforilación adicionales estarían involucrados en la inhibición de la fusión de vesículas (Woodman y col., 1992)

11. ENSAYOS DE FUSION DE ENDOSOMAS EN SISTEMAS LIBRES DE CELULAS:

La fusión de vesículas puede ser definida como el evento que conduce a la formación de un compartimiento rodeado de una sola membrana a partir de dos o más vesículas, sin pérdida significativa de su contenido intravesicular. Los mecanismos y la regulación de los eventos de fusión todavía se hallan en estudio. Para el estudio de estos procesos se han desarrollado ensayos de reconstitución de fusión de endosomas en sistemas libres de células. Entre los métodos desarrollados para determinar la fusión de vesículas, las técnicas de fluorescencia han demostrado ser las más útiles. Davey y col. (1985) estudiaron la fusión entre vesículas endocíticas conteniendo al virus Seimlik Forest, cuyas glicoproteínas de cubierta habían sido marcadas radiactivamente con ácido siálico tritiado, y vesículas endocíticas que contenían al virus de la plaga de Fowl, el cual expresa actividad de neuraminidasa sobre su superficie (Mayorga y col., 1989c). La liberación de ácido siálico servía como medida de la fusión entre vesículas. Gruenber y Howell (1986) usaron la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), localizada en endosomas purificados, como sonda de fusión con vesículas que contenían lactoperoxidasa incorporada por endocitosis de fase fluida. La fusión era medida por la incorporación de ^{125}I en la proteína VSV-G. Braell (1987) diseñó un ensayo basado en dos moléculas, avidina- β galactosidasa e IgG biotinilada, que eran incorporadas en los endosomas por endocitosis de fase fluida, y formaban un complejo enzimáticamente activo, cuando se hallaban presentes en el mismo compartimiento. Finalmente, Woodman y Warren (1988) usaron anticuerpos anti-transferrina y transferrina radiactiva, como sondas para medir la fusión entre endosomas. El ensayo de fusión de endosomas usado en esta tesis está basado en el

método descrito por Mayorga y col., (1989c). Dos proteínas: un anticuerpo monoclonal IgG manosilado (Man-IgG) desarrollado contra dinitrofenol (DNP) y β -glucuronidasa derivatizada con DNP, DNP- β Glu, son eficientemente internalizadas por líneas celulares de macrófagos que expresen el receptor a M6P, formando un complejo inmune estable cuando se localizan en el mismo compartimiento. El complejo puede ser cuantificado usando un sustrato fluorescente de β -glucuronidasa. Las vesículas que se forman en la membrana plasmática son altamente fusogénicas. Esta propiedad es transiente y altamente específica, ya que los endosomas tempranos no son capaces de fusionarse con compartimientos más tardíos de la vía endosomal. Este ensayo es muy sensible, reproducible y relativamente barato. Todos los ensayos para medir la fusión de endosomas en sistemas libres de células han producido resultados similares aunque usaran sondas diferentes, distintas maneras de medir la fusión, diferentes líneas celulares, y diferentes maneras de entrar al camino endocítico. Esto sugiere que el proceso de fusión reconstituido en el tubo de ensayo es un paso relevante y reproducible durante la endocitosis y no un artefacto de un ensayo *in vitro* particular.

12. ENDOCITOSIS EN EUCARIOTAS INFERIORES:

Desde los primeros experimentos de Oates y Touster (1980) sobre la reconstitución de la fusión de fagolisosomas en *Acanthamoeba*, poco se ha publicado sobre la endocitosis en sistemas libres de células en sistemas de eucariotas inferiores.

Dictyostelium discoideum se alimenta exclusivamente por pinocitosis y fagocitosis a una velocidad de 2 a 10 veces más rápida que la encontrada para macrófagos y fibroblastos (Thilo y Vogel, 1985). Esto

proveyó un buen modelo para el estudio de los pasos endocíticos en sistemas libres de células. Se verificó que la fusión ATP-dependiente ocurría óptimamente a un pH 6.5-7.5, fisiológicamente relevante (Lenhard y col., 1992). Las concentraciones de Na^+ (3 mM) y las de K^+ (46 mM) de *D.discoideum* son significativamente menores que las del citosol de una célula de origen mamífero. Las diferencias en las condiciones iónicas encontradas *in vivo* reflejarían las diferencias en los requerimientos iónicos encontrados *in vitro* para los procesos de fusión. Por otro lado, un aumento en las concentraciones de K^+ también inhiben la fusión *in vitro* de fagolisosmas de *Acanthamoeba* (Oates y Touster, 1980). Una posible explicación sería que las altas concentraciones salinas son no fisiológicas y por lo tanto adversas en la reacción *in vitro*. Alternativamente, cambios transientes en la fuerza iónica podrían ser una respuesta fisiológica que ocurriera *in vivo* como una manera de regular la fusión entre endosomas tempranos (Lenhard y col., 1992). Al igual que las células de mamíferos, *D.discoideum* requiere para la fusión entre endosomas tempranos proteínas de unión a GTP y un factor sensible a NEM. Así, el mecanismo regulador de la fusión de endosomas tempranos estaría conservado a lo largo de la evolución (Lenhard y col., 1992).

En el protozoario *Paramecium multimicronucleatum* se identificaron no sólo hoyos recubiertos de clatrina que encerraban marcadores de fase fluida sino también dos subpoblaciones de vesículas transportadoras pre-endosomales y derivadas de endosomas tempranos relacionadas al tráfico entrante y saliente de endosomas tempranos (Allen y col., 1992).

Muchos organismos patógenos ingeridos por macrófagos en cultivo, como *Toxoplasma gondii*, son internalizados por fagocitosis aunque sin

embargo luego no se fusionan con lisosomas. Una hipótesis largo tiempo sostenida es que la inhibición de la fusión de las VP con los lisosomas se debe a la descarga de NH_3 por el parásito al entorno intracelular del huésped (Gordon y col., 1980). Más recientemente se verificó que *T.gondii*, una vez en la VP, secreta vesículas membranosas que forman una red reticulada dentro de la vacuola y un conjunto discreto de proteínas solubles incluyendo una CaBP de 22 kDa. Esta membrana intrafagosomal ayudaría a evadir los eventos microbiocidas durante la internalización al macrófago y proveería un sistema de transporte de nutrientes (Sibley y col., 1986).

En *T.brucei rhodesiense* se han detectado vesículas recubiertas transportadoras de receptores, brotando y entrando al bolsillo flagelar, sistema tubulovesicular, lisosomas y endosomas (Brickman y Balber, 1993). En *Leishmania major* se ha clonado un homólogo a la proteína Rab1 A, que estaría presente como marcador del aparato de Golgi (Cappai y col., 1993).

Trypanosoma cruzi es una célula altamente polarizada en donde la endocitosis ocurre solamente en la región anterior en el citostoma y en la membrana a través del bolsillo flagelar, que son las dos áreas en donde el citoesqueleto celular, formado por microtúbulos subpeliculares, estaría ausente (Joiner y col., 1988). En ensayos recientes se pudo demostrar que transferrina marcada con oro era ingerida por estas zonas a través de vesículas descubiertas de clatrina y llevada a reservosomas (Soares y col., 1992). Los reservosomas se mostraron como grandes organelas ácidas, pH 6, localizadas en la parte posterior de la célula, sin marcadores típicos como hidrolasas ni marcadores lisosomales, pero rico en cistein-proteinasa, lo cual sugeriría que es un compartimiento pre-lisosomal.

Dado que la cisteín proteinasa no contiene residuos manosa y no se detecta por inmunocitoquímica R-M6P, entonces el envío de enzimas lisosomales ocurriría por caminos distintos a los existentes en eucariotas superiores (Soares y col., 1992).

Es de importancia médica inmediata el hecho de que ciertos patógenos pueden aparentemente sobrevivir en los macrófagos al prevenir la fusión fagolisosoma-lisosoma (Hart D'arcy y col., 1987), o bien como en el caso de *T.cruzi* promover, inmediatamente luego de la internalización, la fusión con lisosomas maduros, sin pasar por el camino endocítico clásico vesicular (Tardieux y col., 1992). Ya que la fusión entre endosomas tempranos puede ser reconstituida *in vitro* en ensayos libres de células, podrían proveerse respuestas acerca de los mecanismos contralores de los eventos de fusión y su inhibición por agentes patogénicos (Gruenberg y Howell, 1989).

OBJETIVOS

I. Estudio de la capacidad endocítica de MØ infectados con *T.cruzi*:

a- Caracterización del proceso endocítico de MØ infectados con *T.cruzi*. Estudiar los pasos tempranos de la internalización de *T.cruzi* en células huéspedes como un enfoque para entender su capacidad de evasión de la respuesta lítica celular durante la infección.

b- Caracterizar los pasos tempranos de la endocitosis en *T.cruzi* y los mecanismos involucrados en su regulación.

II- Identificación de los marcadores fosforilados de diferentes estadios del ciclo de vida del parásito *T.cruzi*:

a- Caracterizar y purificar la subunidad catalítica de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc del parásito unicelular *T.cruzi*.

b- La detección de blancos endógenos de PKA y PKC como marcadores de cada estadio de desarrollo que pudieran estar relacionados con la diferenciación y crecimiento del parásito.

c- Estudio de las quinasas de proteínas PKA y PKC en cada estadio de vida de *T.cruzi* usando anticuerpos mono y policlonales.

MATERIALES Y METODOS

1.1. CRECIMIENTO Y PURIFICACION DE PARASITOS:

Se usaron formas epimastigote de *T.cruzi* (E) de cepas Tul 2, RA, Dm28c o CL como fuente de parásitos, de acuerdo a lo descripto previamente (Ulloa y col., 1988; Gómez y col., 1989; Segura y col., 1980; Contreras y col., 1985b; Cazzulo y col., 1985). El cultivo de *T.cruzi* requiere medios muy ricos y complejos. Necesita como fuente de energía glucosa o algún otro sustrato hidrocarbonado, como citrato, acetato, succinato o glucosamina. Es importante la presencia de todos los aminoácidos, purinas, pirimidinas y cantidades apreciables de cloruro de sodio y fosfato diácido de potasio. Un componente fundamental para el crecimiento es la hemina, ya que *T.cruzi* es incapaz de sintetizar el anillo de las porfirinas (Dvorak y col., 1988). Según el medio de cultivo se debe adicionar suero fetal bovino, como fuente de factores de crecimiento. El pH óptimo para el crecimiento es 7.4 dado por el tampón HEPES y NaHCO_3 . La temperatura no debe superar los 30°C en los cultivos de epimastigotes.

Los parásitos usados para la purificación de la cPKA fueron epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuén 2, los cuales se cultivan por 7 días a 28°C hasta la fase exponencial tardía en medio monofásico axénico. Todos los componentes de este medio, incluyendo sales, hemina, peptona, triptosa, extractos de hígado, cerebro, corazón o levadura fueron autoclavados por 15 min a 118°C, previamente a su uso (Wynne de Martini y col., 1980). A partir de aquí todos los procedimientos se realizaron a 4°C, a excepción de cuando así se indique. Los parásitos se colectan por centrifugación a 1000 x g durante 10 min, se lavan tres veces con una solución de 0.25 M sacarosa y 5 mM KCl, y se homogeneizan en la misma solución en una

relación de 10 ml de buffer por gramo de peso húmedo con una prensa Sorvall-Ribi operada a 5000 lb/in², bajo atmósfera de nitrógeno. Dicho homogenato se centrifuga 10 min a 1000 x g, y el precipitado de restos celulares se descarta. Al sobrenadante se adiciona una mezcla de inhibidores de proteasas (Cocktail de Inhibidores de Proteasas I) y se centrifuga durante 60 min a 105000 x g. El sobrenadante (*fracción S100*) es procesado inmediatamente para evitar degradación proteolítica.

Los tripomastigotes sanguíneos (TS) de cepas RA, usados tanto para los ensayos de fosforilación como para los de fusión entre endosomas tempranos, se obtuvieron de ratones Rockland infectados en el pico de parasitemia y se purificaron de acuerdo a Mortatti y Munck (1985) con algunas modificaciones. Para cada paso de purificación se realizaron controles de eficiencia y recuento del número de parásitos en cámara de Neübauer. La sangre infectada fue extraída por punción intraocular o cardíaca, usando pipetas Pasteurs heparinizadas. La sangre heparinizada (40 x 10⁶ TS/ml sangre) se centrifugó 20 min a 100 x g. El precipitado y sobrenadante obtenidos se incuban juntos durante 30 min a 37°C. Luego, se retira dicho sobrenadante conteniendo la mayor parte de los TS originales y se lo siembra sobre un gradiente de densidad de Ficoll:diatrizoato de meglumina (F:M) (6:1) en PBS, previamente esterilizado por filtración, y con una densidad de $\delta = 1.078$. Los parásitos se enfocan en una interfase amarillenta bien definida, ($\delta = 1.064-1.069$), luego de la centrifugación a 37°C durante 20 min a 300 x g en un rotor de ángulo flotante. La interfase se remueve cuidadosamente y se lava dos veces con D-MEM y 5 % SFB-Ø (para los ensayos de fusión) o con MEM-libre de fosfatos (para los ensayos

de fosforilación *in vivo*) ambos equilibrados con 25 mM HEPES a pH 7.2. Finalmente los parásitos fueron resuspendidos a una concentración final de $0.5-1 \times 10^7$ TS/0.1 ml, en la respectiva solución de lavado. Los TS, 98 % puros, no mostraban alteración en la motilidad ni en su capacidad infectiva. Las modificaciones introducidas al protocolo de Mortatti y Munck (1985) permiten la recuperación del 80 % del contenido inicial de parásitos en la sangre extraída, mejorando así el rendimiento de parásitos obtenidos por métodos de purificación anteriores.

Para la obtención de parásitos muertos usados en los ensayos de fusión entre endosomas tempranos se inactivó los TS de la cepa RA durante 30 min a 57°C, observándose por microscopía una pérdida permanente de motilidad.

Los epimastigotes usados para los ensayos de fosforilación pertenecieron al clon CL, mantenidos por pasajes semanales en medio BHT, descrito previamente (Cazzulo y col., 1985), y al clon RA, mantenidos por pasajes semanales en medios bifásicos (Isola y col., 1986b).

Los amastigotes del clon RA usados para los ensayos de fosforilación fueron cedidos por el Dr. Cazzulo (F.Campomar) y obtenidos de células en cultivo.

1.2. DIFERENCIACION *In Vitro*:

Para la obtención de TM para los ensayos de fusión se usaron Epis del clon Dm28c, mantenidos por pasajes semanales en medio BHT y

transformados espontáneamente en tripomastigotes metacíclicos (TM), como fue descrito previamente (Cazzulo y col., 1985). Los TM del clon Dm28c fueron seleccionados por su capacidad de diferenciarse *in vitro* a formas metacíclicas al final de una curva exponencial de crecimiento y por su alta tasa de morbilidad (40%) en ratones infectados (Contreras y col., 1985b).

La TM de la cepa RA usados para los ensayos de fosforilación *in vitro* fueron obtenidos de acuerdo a dos técnicas. Los TM diferenciados espontáneamente fueron obtenidos por cultivo de epimastigotes en medio Grace modificado durante 7 días hasta la fase estacionaria de crecimiento y posterior enriquecimiento en TM por calentamiento a 37°C, durante 30 min, como ya había sido descrito (Isola y col., 1986b y 1989).

La otra técnica usada, tanto para epimastigotes de la cepa CL como para la RA, involucró ensayos de estimulación de la metaciclogénesis por distintos agregados. Los parásitos obtenidos fueron usados para ensayos de fosforilación *in vivo* e *in vitro*. Epimastigotes de la cepa CL o de la cepa RA crecidos en agitación en medio BHT (Cazzulo y col., 1985) a 28°C fueron cosechados al final de la fase exponencial de crecimiento, centrifugados a 10000 x g durante 10 min a 4°C, y resuspendidos en medio fresco a una densidad de 20×10^6 epimastigotes/ml en 5 ml de medio. Las células fueron adicionadas con agregados de dibutiril AMPc, dbA, [concentraciones finales: 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M y 1 mM], PMA disuelto en DMSO [concentraciones finales: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M y 10 μ M], o DMSO esterilizados por filtración e incubadas a 28°C en frascos de cultivo Falcon cerrados (superficie 25 cm²) durante 15 días. Las alícuotas para las

determinaciones de número de parásitos, % TM y ensayos de fosforilación fueron retiradas en esterilidad. El conteo diferencial de células fue realizado en cámaras hematocitométricas de Neübauer.

2. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR:

Se emplearon métodos ya descriptos de fraccionamiento subcelular (Gómez y col., 1989; Ogueta y col., 1994). Los parásitos fueron resuspendidos en 10 ml/g peso húmedo Buffer O, suplementado con cocktail de inhibidores de proteasas I, y se rompieron por ciclos de congelamiento-descongelamiento (cuatro o más). Al homogenato se lo centrifuga seis veces sucesivas, como se indica en la Figura 10. Cada fracción sedimentada es resuspendida en 10 ml/g de peso húmedo de Buffer O suplementado con el cocktail de inhibidores de proteasas I. Ensayos previos permitieron determinar a cual fracción subcelular correspondía cada sedimento, mediante el uso de marcadores enzimáticos (Gómez y col., 1989).

A su vez el sedimento nuclear puede ser sembrado en un gradiente discontinuo de 1.3 M, 1.6 M, 1.9 M y 2.2 M sacarosa hecho con en el mismo Buffer O, adicionado con 0.15 M NaCl, para evitar agregados, y centrifugado a 90000 x g en un rotor de ángulo flotante Sw40 Ti durante 120 min a 4°C. Se obtienen tres fracciones: una interfase entre 1.3 y 1.6 M sacarosa que contiene los quinetoplastos, la interfase entre 1.6 y 1.9 M sacarosa conteniendo los flagelos y axonemas, y la interfase entre 1.9 y 2.2 M conteniendo los núcleos, como ya fue descripto (Ogueta y col., 1994). Para la determinación de actividades enzimáticas o de sustratos fosforilables tanto los núcleos como los quinetoplastos fueron incubados a 4°C con 0.1 mg/ml de DNAasa I y 10 mM MgCl₂ durante 72 hs. Posteriormente, se centrifugó a 12000 x

g durante 60 min a 4°C en un rotor de ángulo fijo, y se separó el sobrenadante que contiene las proteínas extraídas.

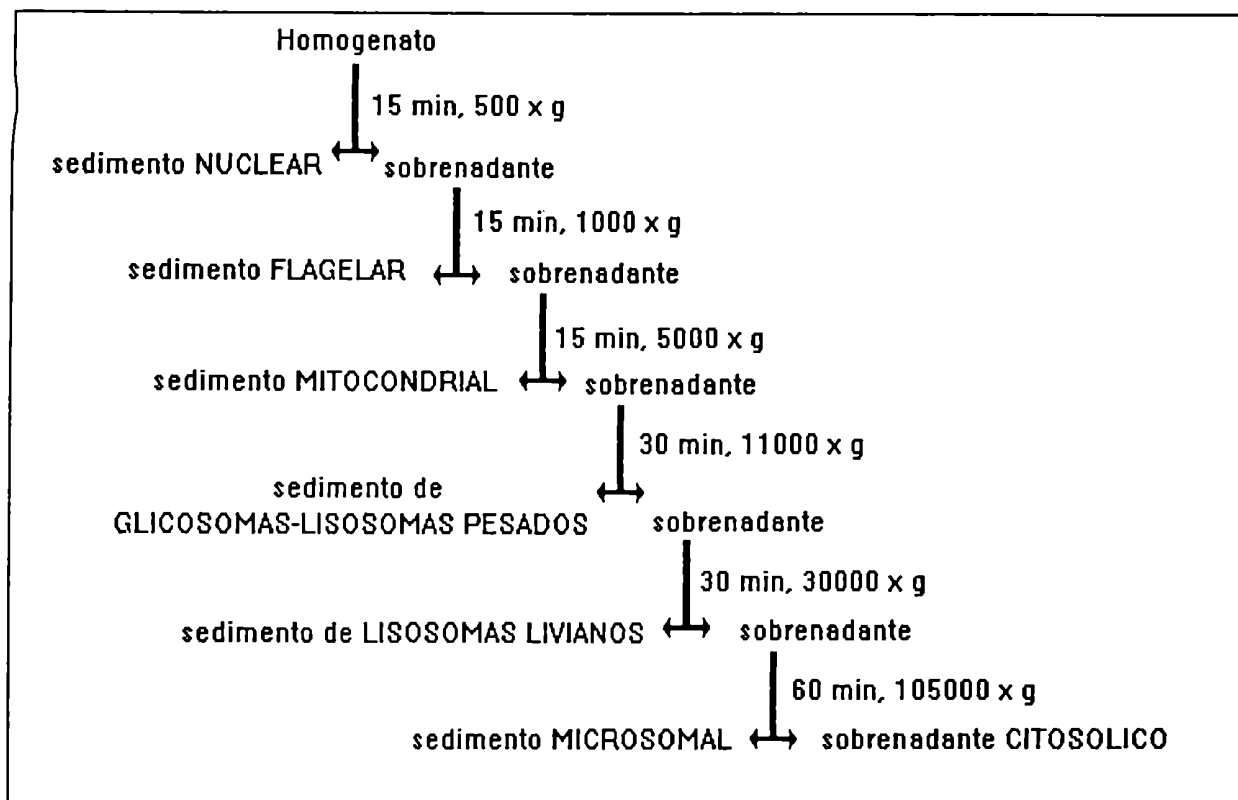


Figura 10: Fraccionamiento subcelular de epimastigotes de *T. cruzi*.

3. DETECCION DE SUSTRATOS PROTEICOS ENDOGENOS FOSFORILADOS:

3.1. *In vitro*:

Extractos celulares y fracciones subcelulares de epimastigotes, amastigotes, TM y TS se fosforilaron con ATP[$\gamma^{32}\text{P}$] bajo distintas condiciones: depleción del Ca^{2+} libre por EGTA, adición del éster de forbol PMA, como activador del sistema PKC, o agregado de PKC α de ratón (purificada), AMPc como activador del sistema de PKA, o agregado de cPKA purificada a partir de corazón bovino, y ATP frío, como competidor del ATP radiactivo. Para conocer si los extractos del

parásito tenían sustratos fosforilables por PKA o PKC se adicionaron las enzimas PKC α y cPKA purificadas de mamíferos. Los extractos se analizaron en SDS-PAGE y el gel se sometió a radioautografía. Los sustratos fosforilados se seleccionaron de acuerdo a dos criterios: aquellos que son específicos de estadio y/o que su marcación se modulara por segundos mensajeros, de acuerdo a análisis por "scanner". Se compararon los péptidos fosforilables y la expresión de quinasas endógenas más importantes de los cuatro distintos estadios de *T. cruzi*, epimastigotes, amastigotes, TS y TM por densitometría láser e inmunoblotting usando anticuerpos contra PKA y PKC de eucariotas superiores, respectivamente. En todas las calles de los geles se usó la misma concentración de proteínas (50 μ g). Las áreas correspondientes a las bandas detectadas luego de la autorradiografía fueron cuantificadas usando un densitómetro láser Ultrosan, modelo LKB 2202, conectado a un integrador, modelo LKB 2220, LKB-Pharmacia, Suecia.

Las condiciones experimentales elegidas consideraron la minimización de la proteólisis endógena, por lisado rápido de las células aún vivas en cracking buffer conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas I y luego calentado 10 min a 100°C para lisar las células.

3.2. *In vivo*:

Se marcaron parásitos por distintos tiempos, empleando [32 Pi] en un medio depletado de fosfatos (MEM libre de fosfatos), de acuerdo al esquema de la Figura 11. Los tiempos más largos muestran péptidos fosforilados con bajo turnover del fosfato. Los péptidos se analizarán de acuerdo a lo descripto en la sección *In vitro*. Usando fosforilación *in vivo* y métodos de pulso y caza, se siguió dicha

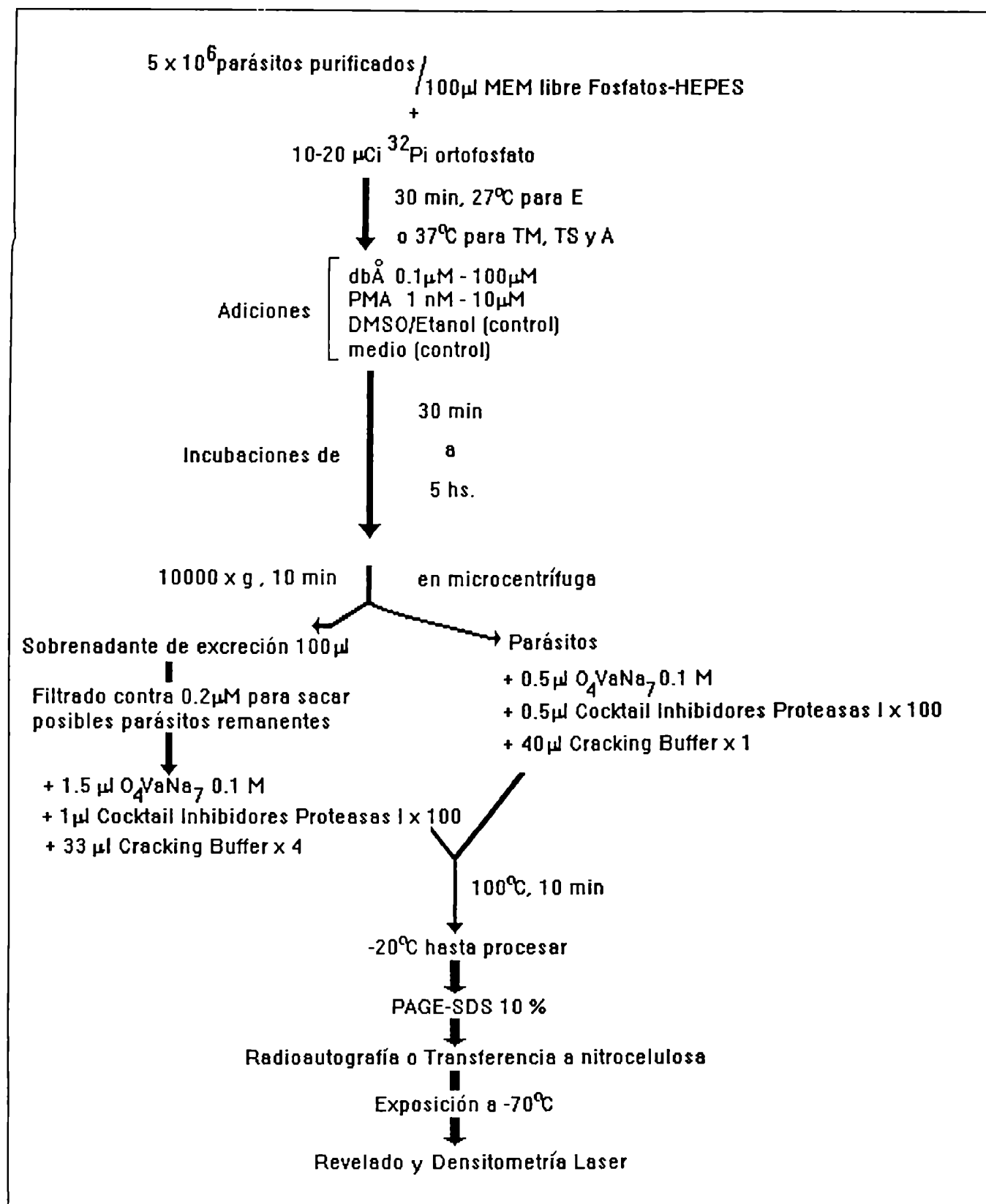


Figura 11: Esquema de marcación *in vivo* de los distintos estadios de *T. cruzi*.

evolución de las proteínas en el ciclo de vida del parásito. Los estímulos usados para identificar los blancos específicos de las cascadas reguladas por PKA o PKC fueron dibutiril AMPc (*dbA*) y *PMA*, respectivamente, en las concentraciones indicadas en cada figura de los resultados. Los sustratos fosforilados se determinaron por densitometría láser al igual que en la sección anterior.

4. CULTIVO DE CELULAS

La línea celular de macrófagos murinos del clon J774-E (receptor a manosa positivo), derivadas de la línea celular J774-A.1 de monocitos-macrófagos murinos (ATCC TIB 67), fueron crecidas en D-MEM, suplementado con 10 % SFB-Ø, 6 µg/ml 6-TG, 100 µg/ml streptomycin y 105 U/ml de penicilina (Diment y col., 1987). Luego que las células llegaran a confluencia se cosecharon con PBS-EDTA, se centrifugaron a 200 x g, 10 min, se lavaron con medio fresco y se plaquearon a la densidad requerida para los ensayos, como se detalla más adelante.

5. GENERACION DE SONDAS:

5.1. ANTICUERPO MONOCLONAL MANOSILADO ANTI-DNP (MAN-IgG ANTI DNP)

El anticuerpo monoclonal manosilado (Man-AcM) de ratón IgG contra DNP (HDP-1), purificado del medio de cultivo de una línea celular hibridoma, fue donado por el Dr. Luis Mayorga (Univ.Nac.Cuyo, Cátedra de Histología y Embriología, Fac.Cs.Médicas). Los Man-AcM anti DNP son estables a 4°C por semanas y pueden ser mantenidos indefinidamente a -20°C.

5.2. β-GLUCURONIDASA DERIVATIZADA CON DNP:

La enzima β-glucuronidasa (β-Glu) fue purificada a partir de glándulas

prepucciales de rata hembra (Keller y Touster, 1975). La β -Glu puede ser derivatizada con DNP sin pérdida sustancial de su actividad enzimática. Para obtener una preparación activa e inmunoprecipitable en un 80 % usando anticuerpos anti DNP, se mezclaron 2 mg/ml de la enzima con 4% v/v dinitrofenil fluoruro en 0.05 M buffer citrato-pirofosfato (pH 8), a temperatura ambiente por 60 min en agitación fuerte. Se centrifugó en una microcentrífuga y el sobrenadante conteniendo la enzima se dializó contra PBS y se guardó alicuotado en 50 % v/v glicerol a -20°C . Sus propiedades enzimáticas y capacidades inmunoprecipitantes fueron ensayadas antes de su uso en un ensayo de fusión.

La enzima DNP- β -Glu se une con alta afinidad a AcM anti DNP, y dicha afinidad es relativamente independiente del pH. A pH 5 la cantidad de enzima que es inmunoprecipitable es sólo un 20 % menor que la que se obtiene a pH 7. Esto es importante dado que se supone que las sondas interactuarán en compartimientos endocíticos ácidos. Otra característica importante de ambas sondas es que no son degradadas en los pasos tempranos de la endocitosis.

5.3. BSA DERIVATIZADA CON DNP:

La seroalbumina bovina (BSA) se derivatizó con DNP usando el mismo procedimiento que para β -Glu.

6.1. PREPARACION DE *S.aureus* PARA COLECTAR COMPLEJOS INMUNES:

S.aureus COWAN I (SAC; ATCC 12598, NCTC 8530) expresa aproximadamente 40000 moléculas de proteína A sobre su superficie celular, la cual es capaz de unir anticuerpos con alta afinidad de acuerdo a la especie del animal de donde provenga el anticuerpo (Richman y col., 1982).

Para anticuerpos de alta afinidad 10 µl de una suspensión saturada 10 % p/v de SAC unen 10-15 µg de anticuerpo. Por otro lado, las bacterias ofrecen la ventaja de proveer una fase sólida fácilmente manipulable.

Se sembró una placa de agar sangre para obtener colonias aisladas de *S.aureus* COWAN I. Una única colonia fue usada para hacer un pre-inóculo de 50 ml de medio Pennasay, y se cultivó durante toda la noche con aireación. Los 50 ml fueron usados para inocular 500 ml del mismo medio, que se cultivó a saturación, con aireación. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 7000 x g. El pellet fue resuspendido en 10 % peso húmedo/v PBS con 0.02 % p/v azida sódica. Se trasladó la suspensión a un quitasato y se agregó formaldehído hasta 1.5 % v/v final, con agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 90 min. Las células se cosecharon a 7000 x g y se resuspendieron en 10 % peso húmedo/v PBS adicionado con 0.02 % p/v azida sódica. La suspensión se trasladó a un kitasato, se incubó a 80°C, durante al menos 10 min, y luego se transfirió a 4°C. Luego de los tratamientos con formaldehído y calor, los SAC muertos son no patogénicos, y la proteína A se encuentra renaturalizada, con máxima capacidad de unión a anticuerpos. Dicha suspensión de SAC muertos se guardó alicuotada a -70°C por más de un año.

6.2. SAC-IgG_{Conejo}~IgG_{Ratón}:

Se incubaron 2 µl de 10 % p/v suspensión SAC muertos con 1 µl de IgG conejo-IgG ratón (original IgG conejo 4 mg/ml) durante 1 h a temperatura ambiente. Se centrifugó en una microcentrífuga de mesa a máxima velocidad y el precipitado se lavó 3 veces con Solución de Solubilización. Luego se resuspendió en 100 µl del mismo buffer.

7.1. PREPARACION DE VESICULAS CARGADAS:

Las dos sondas (Man-AcM anti DNP y DNP- β -Glu), obtenidas como se describió anteriormente, son reconocidas por el receptor de manosa del

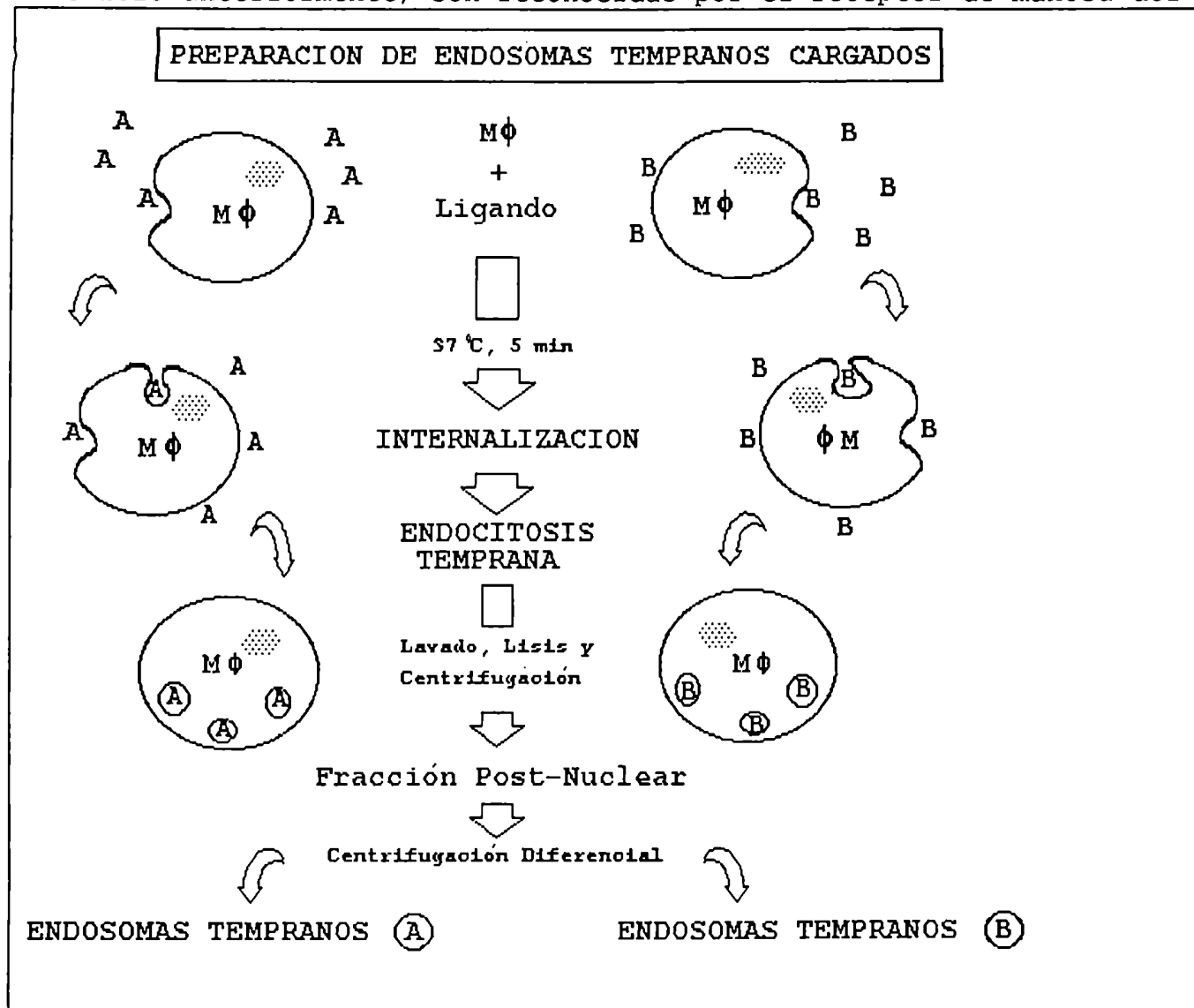


Figura 12: Esquema del protocolo para la obtención de endosomas tempranos cargados con las moléculas marcadoras.

clon J774-E de la línea de macrófagos murinos, MØ (Diment y col., 1987). La Figura 12 esquematiza los pasos realizados para la obtención de los endosomas cargados.

A partir de células MØ a las que se les permitió internalizar las sondas por 5 minutos a 37°C en Medio de Incorporación se obtuvieron preparaciones standard de vesículas. Las células se lavaron dos veces con este medio, se centrifugaron a 800 x g por 5 min y se resuspendieron en medio pre-calentado a 37°C, a razón de 2×10^7 células/ml conteniendo 10 µg/ml de Man-IgG o 20 µg/ml de DNP-β-Glu. Luego de 5 minutos a 37°C las células se diluyeron con el mismo medio frío y se lavaron a 4°C, primero con el Medio de Incorporación, luego con PBS-EDTA, y finalmente con Solución de Solubilización. Luego de estos lavados más del 90 % de los ligandos asociados a las células era intracelular. El Man-AcM fue ofrecido en menor concentración ya que su afinidad por el receptor a manosa es mayor que la de la DNP-β-Glu (Mayorga y col., 1989c).

7.2. HOMOGEGINIZACION Y FRACCIONAMIENTO PARA LA OBTENCION DE VESICULAS CARGADAS:

Para generar homogenatos con buena preparación de vesículas a partir de células normales sin infectar se usó el siguiente método. El aparato consiste en dos jeringas plásticas de 3 ml con agujas de 27-gauge conectadas por un tubo de plástico (diámetro interno 0.25 mm). Todos los pasos a continuación fueron llevados a cabo a 4°C. Las células cargadas con las sondas marcadoras respectivas fueron resuspendidas en Buffer de Homogeginización (5×10^7 células/ml) y cargadas en una jeringa. Luego se forzó a que la suspensión pasara de una jeringa a la otra lo mas rápido posible, de 8 a 12 veces. Bajo las condiciones de este trabajo menos del 10% de las células excluyen el azul de tripan y menos de 30% de los ligandos internalizados se encuentra en el compartimiento extravesicular luego de la

homogeinización. El homogenato fue luego centrifugado a baja velocidad (800 x g durante 5 min) para eliminar células enteras y núcleos. Dicha fracción post nuclear (FPN), concentrada a 4 mg/ml, fue guardada a 4°C para su uso inmediato o almacenada en nitrógeno líquido hasta 1 año.

Los endosomas conteniendo las sondas se purificaron de factores citosólicos interfirientes a partir de las FPN de la siguiente manera. Dos alícuotas (0.2 ml) de FPN, cada una conteniendo una sonda distinta, se centrifugaron durante 5 min a 33000 x g a 4°C. El sobrenadante resultante fue vuelto a centrifugar por 5 min a 60000 x g en un rotor de ángulo flotante. El pellet obtenido, altamente enriquecido en endosomas tempranos, fue resuspendido en Solución de Solubilización. La mayor parte de las vesículas fusogénicas sedimentan a esta velocidad y permanecen fusogénicas luego de ser resuspendidas en el buffer (Mayorga y col., 1989c).

8.1. ENSAYO DE FUSION ENTRE ENDOSOMAS TEMPRANOS:

En la Figura 13 se muestra un esquema del ensayo de fusión de endosomas, resumiendo los requerimientos para la fusión (Díaz y col., 1988; Mayorga y col., 1989c). En un ensayo habitual para la reconstitución de la fusión de endosomas tempranos, las vesículas conteniendo Man-IgG~DNP fueron mezcladas con las que contienen DNP- β -Glu en un volumen final de 20 μ l a 37°C durante 30 minutos en Medio de Fusión. El medio también puede contener (cuando así se lo indica) un Sistema Regenerante de ATP. Las reacciones de fusión se detuvieron a 4°C. Para precipitar los complejos inmunes formados, se solubilizaron las vesículas por adición de 150 μ l de Solución de Solubilización, 50 μ g/ml DNP-BSA y 100 μ l de SAC-IgG_{Conejo}~IgG_{Ratón}.

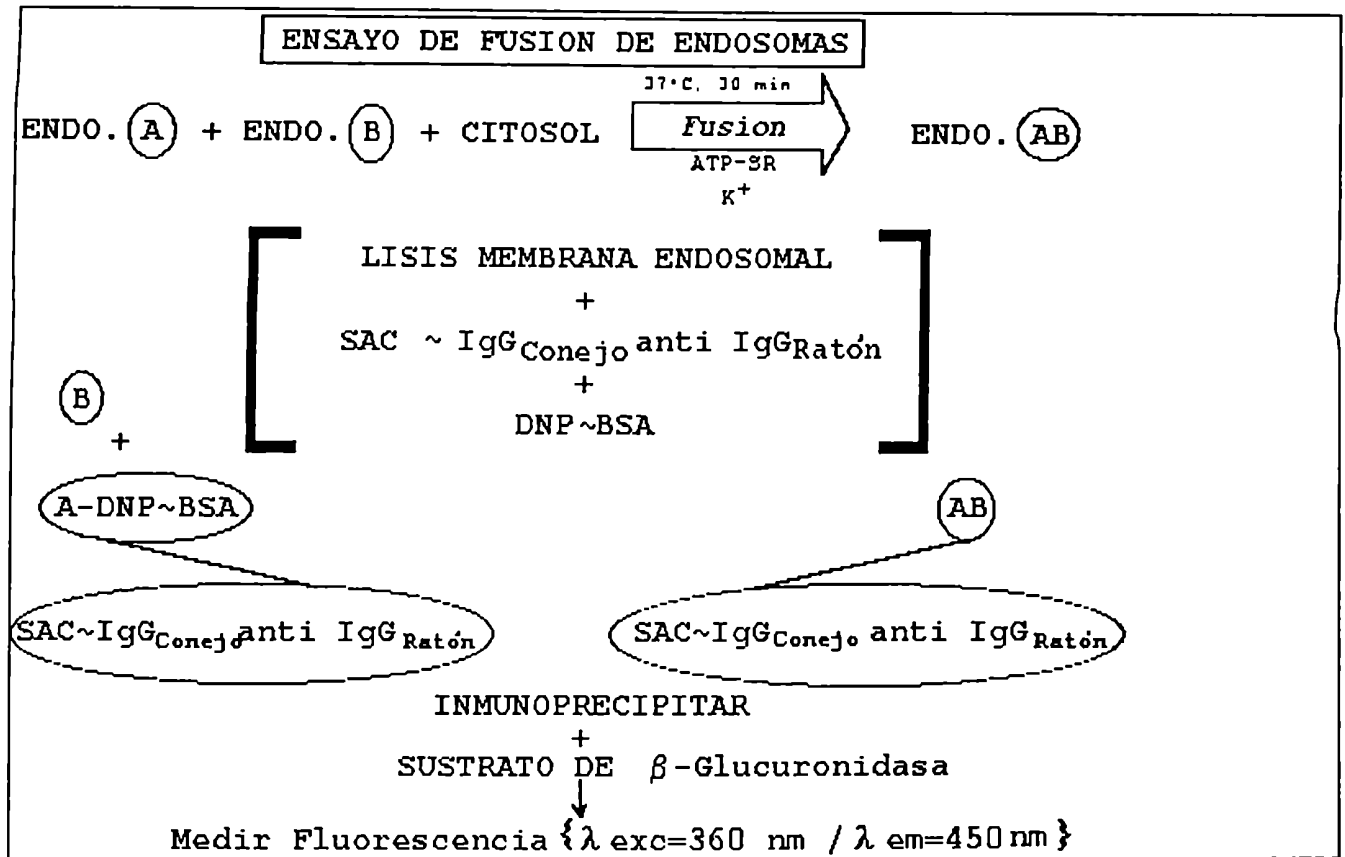


Figura 13: Esquema de protocolo para el ensayo de fusión entre endosomas tempranos. A es anticuerpos Man-IgG~DNP y B es DNP- β -Glu.

Se incubaron las muestras por 30 min a 4°C diluidas con 1 ml de Solución de Solubilización y se centrifugaron a 1500 x g por 5 min. Los inmunoprecipitados unidos a Staph A se lavaron dos veces con 1 ml de Solución de Solubilización. Para cuantificar el complejo inmune formado, los precipitados se resuspendieron en 100 μ l de Solución de Solubilización y 100 μ l del sustrato MUBGlu. Las muestras fueron incubadas por 2 hs a 37°C, y la reacción se detuvo con 1 ml de Buffer Glicina. La fluorescencia de la umbeliferona fue medida en un espectrofotofluorómetro a $\lambda_{excitación} = 360 \text{ nm}$ y $\lambda_{emisión} = 455 \text{ nm}$, sin filtros. Para FPN o vesículas purificadas se pudo obtener buena fusión mezclando 30-50 μ g de proteína total de cada preparación vesicular en un volumen final de 20 μ l.

8.2. CONTROLES PARA EL ENSAYO DE FUSION DE ENDOSOMAS TEMPRANOS:

Los siguientes controles se llevaron a cabo en cada experimento de acuerdo a técnicas ya descriptas (Mayorga y col., 1989c):

1) Agregado de Solución de Solubilización durante la reacción de fusión (es decir en presencia de detergentes): miden la formación extravesicular de complejos inmunes. La presencia de DNP-BSA en el medio de estos ensayos mantiene la actividad de estos tubos bastante baja.

2) Agregado de Solución de Solubilización durante la reacción de fusión pero sin la presencia de DNP-BSA: miden la formación de complejo inmune total en el sistema. Frecuentemente la eficiencia de la fusión es expresada como un porcentaje de esta cantidad, ya que representa la actividad que podría resultar de una mezcla completa de los compartimientos conteniendo los marcadores. En realidad dicha cantidad estará sobrestimada, ya que parte de los ligandos se encuentra libre en el espacio extravesicular.

3) Vesículas de un ligando mezclados con una solución de la sonda complementaria, en presencia o ausencia de detergentes: miden la proporción de una sonda dada en vesículas cerradas.

9. ENSAYOS DE INTERACCION MACROFAGOS-PARASITOS:

La infección de macrófagos se efectuó de acuerdo a Araújo-Jorge y col. (1989) con las siguientes modificaciones. Las células del clon J774-E fueron plaqueadas a una densidad de 1×10^6 células/placa como una monocapa en D-MEM y 5 % SFB-Ø, para prevenir la lisis por la vía alternativa del complemento de los parásitos. Las relaciones de parásito:macrófago usadas fueron 10:1, 5:1 y 1:1. Dicha relación, así como el número de macrófagos totales usados fueron establecidos de

manera que se obtuviera una máxima tasa de infección *in vitro*, un número medio de 5-7 parásitos por célula infectada y más de un 85 % de macrófagos infectados, por análisis al azar de al menos 100 células. Los ensayos de interacción entre los TS de la cepa RA (tanto las formas vivas como las muertas) y los macrófagos se llevó a cabo durante 60 min a 37°C. En el caso de los TM del clon Dm28c, los ensayos de interacción se llevaron a cabo hasta 7 hs, para una mejor tasa de internalización. Luego del ensayo de interacción las monocapas fueron lavadas tres veces con Solución de Solubilización, siendo levantadas en el mismo medio. Las células se centrifugan a 2000 x g y se resuspenden en un mínimo volumen de Solución de Solubilización adicionado con un Cocktail de Inhibidores de Proteasas II. Todos los ensayos de interacción fueron seguidos por microscopía óptica (400 x).

10. PREPARACIONES DE CITOSOL FILTRADO:

La disrupción celular de los parásitos y de los macrófagos normales o infectados se realizó mediante al menos 4 ciclos de congelamiento-descongelamiento en nitrógeno líquido.

Las alícuotas de citosol (0.2 ml) obtenidas como sobrenadantes de 45000 x g fueron sembradas sobre 1 ml de Sephadex G-25, previamente equilibradas en Solución de Solubilización, y centrifugadas a 100 x g por 5 min para obtener un volumen muerto libre de partículas menores que 1 kDa, tales como sales, nucleótidos, azúcares, etc. Esta condición resulta imprescindible para poder asegurar una medición precisa de los efectos de los agregados sobre la fusión de endosomas (Mayorga y col., 1989c). Estas alícuotas fueron almacenadas a -20°C.

11. PREPARACION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA DE LA QUINASA DE PROTEINAS AMPc-DEPENDIENTE DE *T.cruzi*:

11 .1. CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA:

Los siguientes pasos de purificación se llevaron a cabo de acuerdo al método ya descrito para obtener la holoenzima PKA de *T.cruzi* (Ulloa y col., 1988). La fracción S100 obtenida de epimastigotes de la cepa Tulahuén 2 de *T.cruzi* (150 ml, 2.5 mg/ml proteínas) fue cargada en una columna de DEAE-celulosa (15 x 2.7 cm) equilibrada en Buffer A. La columna fue lavada con 200 ml de buffer A y eluida con 500 ml de un gradiente lineal 0-0.5 M NaCl en el mismo Buffer A. Se colectaron fracciones de 8 ml a una velocidad de 0.5 ml/min. Las fracciones con actividad de quinasa de proteínas activable por AMPc (pico II) eluyeron a 0.28-0.32 M NaCl, se juntaron, concentraron contra 2 M sacarosa en Buffer A, y fueron exhaustivamente dializadas contra Buffer A (referido como "*preparación de la DEAE-celulosa*")

11.2. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN AMPc-AGAROSA:

La preparación de la DEAE-celulosa fue posteriormente sometida a cromatografía en AMPc-agarosa (Dills y col., 1979), modificado como sigue. La columna (0.5 x 4 cm) equilibrada en Buffer B fue cargada con 1 ml de la preparación de la DEAE-celulosa (concentrada a 20 mg/ml de proteína), lavada con 10 ml de Buffer B, 4 ml de Buffer B conteniendo 0.5 M NaCl, y luego con otros 5 ml de buffer B. La elución final fue llevada a cabo con 4 ml de Buffer B, conteniendo 8 M urea. El percolado y las primeras fracciones del lavado fueron agrupadas, concentradas por diálisis contra 2 M sacarosa en Buffer B, y dializadas exhaustivamente contra el mismo buffer ("*percolado de la AMPc-agarosa*"). El eluido de 8 M urea fue también dializado contra

Buffer B adicionado con 0.05 % p/v carbón activado, seguido por varios cambios con Buffer B solo ("*componente regulatorio*").

11.3. CROMATOGRAFIA EN SEPHACRYL S-300 (FILTRACION EN GELES):

Para la obtención de la holoenzima, se sembró 1 ml de la preparación de DEAE-celulosa concentrada (20 mg/ml) en una columna de Sephacryl S-300 (1.2 x 21 cm), previamente equilibrada con Buffer A y 0.15 M NaCl. En paralelo, para disociar la subunidad catalítica de la regulatoria, se preincubó la muestra concentrada con 0.5 M NaCl, 1.5 mg/ml Histona IIA y 1 μ M AMPc, durante 30 min a 4°C. Luego se sembró en la columna previamente equilibrada en Buffer A y 0.5 M NaCl.

Se colectaron fracciones de 0.5 ml a un flujo de 0.3 ml/min. Se separaron y reunieron las fracciones con actividad de quinasa AMPc-dependiente (Ulloa y col., 1988). Todas las fracciones así reunidas se guardaron a -20°C, hasta 2 meses sin pérdida significativa de la actividad. Se resolvió en la elución de cada columna. En la columna corrida en condiciones no disociantes se obtuvo un pico con actividad de quinasa activable por AMPc coeluyendo con fracciones capaces de unir AMPc, mostrando un radio de Stokes $a = 5 \pm 0.1$ nm semejante al obtenido en el ensayo anterior. En la columna corrida en condiciones disociantes se obtuvo otro pico de actividad fosfotransferasa AMPc-independiente (llamado *cPKA S300 disociante*), desplazado de un pico de unión a AMPc, con un $a = 2.8 \pm 0.2$ nm, coincidiendo este último dato con el estimado anteriormente (Ulloa y col., 1988).

11.4. PURIFICACION POR GRADIENTE DE DENSIDAD DE SACAROSA

11.4.1. GRADIENTE DE DENSIDAD DE SACAROSA

La cPKA del "percolado de la AMPc-agarosa" fue purificada por

centrifugación en gradientes de sacarosa discontinuos 5-20 % p/v hechos en Buffer D, tanto en H_2O como en D_2O . La centrifugación fue llevada a cabo en un rotor de ángulo flotante, durante 18 h a 150000 x g. Se colectaron fracciones de 0.2 ml mediante el uso de una bomba peristáltica desde el fondo de los tubos del gradiente a una velocidad de 0.5 ml/min, en frío.

11.4.2. CALCULO DE LOS PARAMETROS HIDRODINAMICOS:

11.4.2.1. CALCULO DE LAS CONSTANTES DE SEDIMENTACION:

Las constantes de sedimentación fueron calculadas según Martin y Ames (1971), usando citocromo c (1.71 S), málico dehidrogenasa (4.32 S), láctico dehidrogenasa (7.3 S) y catalasa (11.3 S) como marcadores internos de proteínas. El CITc se midió por absorbancia a 410 nm (banda de Soret). El resto de las actividades de las proteínas marcadoras usadas se determinó de acuerdo a Ulloa y col. (1988), como sigue. La actividad de MDH se determinó midiendo el consumo de NADH en presencia de oxalacetato, por disminución de la absorbancia del NADH a 340 nm. La actividad de LDH se determinó midiendo el consumo de NADH en presencia de piruvato, por disminución de la absorbancia del NADH a 340 nm. La actividad de CAT se determinó midiendo la oxidación de ioduro a iodo, acoplada a la reducción de H_2O_2 . Los valores de los coeficientes de sedimentación se obtuvieron a partir de los datos de sedimentación de las proteínas marcadoras en gradientes de sacarosa, corridas en paralelo. Al graficar la distancia que dichas proteínas marcadoras recorrieron desde la superficie del gradiente en función de sus respectivos coeficientes de sedimentación se obtuvo una función lineal en donde se interpolaron los valores de las proteínas incógnita.

11.4.2.2. CALCULO DEL PESO MOLECULAR:

El peso molecular de la holoenzima y de la subunidad catalítica se calculó usando el método de Siegel y Monty (1966), aplicando la fórmula:

$$PM = \frac{6 \cdot \pi \cdot N \cdot \eta_{20,w}}{(1 - v) \cdot \rho_{20,w}} \cdot S_{20,w} \cdot a$$

Donde: π es 3.1416, N es el número de Avogadro, $\eta_{20,w}$ es la viscosidad del H_2O a $20^\circ C$ (1.1×10^{-2} g/cm.seg), a es el radio de Stokes, $S_{20,w}$ es el coeficiente de sedimentación en H_2O a $20^\circ C$, v es el volumen específico parcial y $\rho_{20,w}$ es la densidad del H_2O a $20^\circ C$ (0.9888 g/cm).

11.4.2.3. CALCULO DEL COEFICIENTE FRICCIONAL:

Así mismo se calculó el coeficiente de fricción de la proteína aplicando los parámetros arriba calculados en la siguiente fórmula (Siegel y Monty, 1966):

$$f/f_o = a \cdot \left[(4 \cdot \pi \cdot N) / (3 \cdot \eta \cdot PM) \right]^{1/3}$$

Siendo f el coeficiente de fricción de la proteína y f_o el coeficiente de fricción de la proteína esférica y anhidra de igual masa.

11.4.2.4 CALCULO DEL RADIO DE STOKES:

Los valores de los radios de Stokes de las proteínas marcadoras se obtuvieron, usando los valores de coeficiente de difusión corregidos tabulados ($D_{20,w}$), mediante la siguiente formula de Haga y col. (1977):

$$a = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta_{20,w} \cdot D_{20,w}}$$

En donde k es la constante de Boltzman, $\eta_{20,w}$ es la viscosidad del H_2O a $20^\circ C$, T es 293 K, $D_{20,w}$ es el coeficiente de difusión en H_2O a $20^\circ C$ corregido y tabulado para dichas proteínas marcadoras, y π es 3.1416

Por otro lado, se realizó un cálculo estimativo del radio de Stokes usando los datos de elución por Sephacryl S-300 (Ulloa y col., 1988). A dicha columna equilibrada en el buffer respectivo se le determinó, mediante el uso de marcadores coloreados, el volumen de exclusión (V_o), con azul de dextrano, y el volumen total (V_t), con CoCl_2 . Las proteínas marcadoras que se usaron fueron: catalasa (hígado de vaca), láctico dehidrogenasa (músculo de conejo), málico dehidrogenasa (corazón porcino) y citocromo c (corazón equino).

Se midió el volumen de elución normalizado respecto del volumen de exclusión (K_{el}), obtenidos con las proteínas marcadoras de parámetros moleculares conocidos. El valor del radio de Stokes se estimó graficando K_{el} vs. a , considerando que:

$$K_{el} = \frac{V_e}{V_o}$$

En donde V_e es el volumen de elución de la proteína, V_o es el volumen de exclusión de la columna, V_t es el volumen total, K_{el} es la constante de elución, y a es el radio de Stokes.

Los parámetros hidrodinámicos y moleculares de las proteínas marcadoras, usados para los cálculos antes detallados, se resumen en la siguiente tabla:

	$S_{20,w}$ (S)	v (g/ml)	a (nm)	PM (kDa)
CIT.c	1.71	0.73	1.87	13.37
MDH	4.32	0.74	3.69	70
LDH	7.3	0.74	4.75	142
CAT	11.3	0.73	5.21	247

11.5. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE CARBOXIMETIL-CELULOSA:

El "percolado de la AMPc-agarosa" fue sometido a un paso siguiente de purificación de la cPKA, de acuerdo a Kinzel y col. (1987) con algunas modificaciones. Luego de dializar una alícuota del "percolado de la AMPc-agarosa" (0.4 mg de proteína) durante 24 hs contra Buffer C, se sembró sobre una columna de CM-celulosa (1.2 x 14 cm) equilibrada previamente en Buffer C. La columna se lavó con 50 ml de dicho buffer y se eluyó con 60 ml de un gradiente lineal de fosfato de sodio (5-120 mM) en Buffer C. La actividad enzimática fue recuperada en el percolado y en un único pico eluido a 30 mM fosfato de sodio (referido como "*fraccion de la CM-celulosa*").

11.6. PURIFICACION DE SUBUNIDADES DE LA PKA DE CORAZON BOVINO:

Los procedimientos usados para la purificación de cPKA fueron llevados a cabo a 4°C. Se partió de 600 g de corazón bovino y se procesó de acuerdo a Reimann y Beham (1983), lográndose una purificación de 1000 veces con un rendimiento del 30 %. A las fracciones que demostraron mayor pureza por análisis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 10 % y mayor actividad de quinasa de proteínas sobre Histona H IIA se las agrupó como "*cPKA de corazón bovino*" y se llevó a 20 % glicerol. La enzima se guardó alícuotada y congelada a -20°C, ya que repetidos congelamientos y descongelamientos la inactivan.

Los procedimientos usados para la purificación de rPKA fueron los descritos por Rannels y col. (1983). A las fracciones que demostraron mayor pureza, por análisis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 10 %, y mayor actividad de unión a AMPc-³H se las

concentró y alicuotó en 50 % v/v glicerol final y 1 mM Benzamidina. Dichas fracciones, llamadas "*R_{II}PKA* de corazón bovino", fueron guardadas a -20°C, hasta 2 años sin pérdida de actividad.

11.7. RECONSTITUCION DE LA HOLOENZIMA DE *Trypanosoma cruzi*

Concentraciones aproximadamente equimoleculares de la preparación de subunidad catalítica (36 µg proteína del gradiente de sacarosa) y de subunidad regulatoria (130 µg del eluido de AMPc-agarosa) fueron incubadas durante 30 min a 4°C, en un volumen total de 100 µl. La mezcla fue luego sometida a centrifugación en gradientes de sacarosa.

12. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE QUINASA DE PROTEINAS

Los ensayos standard de actividad de quinasa de proteínas fueron desarrollados esencialmente como ya fue descrito (Ulloa y col., 1988). Brevemente las reacciones contienen las fracciones a dosar en buffer E con 3 mg/ml *Histona H IIA*, con la adición o no de 1 µM AMPc, en un volumen final de 100 µl. La reacción se inició con el agregado del Buffer E con ATP[γ³²P], se detuvo vertiendo alícuotas de 50 µl sobre papel de fosfocelulosa P81 (2 x 2 cm), y se sumergió inmediatamente en 75 mM H₃PO₄ previamente enfriado a 4°C, seguido por 3 lavados en la misma solución (Roskoski, 1983). Los filtros de fosfocelulosa se secaron y se midió la radioactividad, usando OT como solución centelladora.

Cuando se usó *Kemptido* como sustrato aceptor de fosfatos, la reacción se llevó a cabo mezclando las fracciones con el buffer E y 25 µM *Kemptido*, en un volumen final de 50 µl y se detuvo vertiendo una alícuota de 30 µl de la reacción sobre los filtros de fosfocelulosa.

Las condiciones de los ensayos fueron seleccionadas de tal manera que

la actividad enzimática tuviera una dependencia lineal con el tiempo de incubación y la concentración de enzima. Los parámetros cinéticos fueron calculados usando los gráficos de dobles-recíprocas de Lineweaver-Burk.

Los ensayos para la *determinación del K_m para el ATP* se realizaron en Buffer N en un volumen final de 100 μ l, comenzando la reacción con el agregado de la enzima purificada de *T.cruzi* y terminando la reacción vertiendo alícuotas de 50 μ l en el papel de P81.

Los *ensayos de competición con nucleótidos difosfato o trifosfato* que no fueran el ATP se llevaron a cabo por la adición de concentraciones crecientes del correspondiente nucleótido a la mezcla standard de reacción.

Los *ensayos de inhibición con el inhibidor de la proteína quinasa (PKI)* se llevaron a cabo preincubando durante 5 min a 30°C las preparaciones de la subunidad catalítica con 60 nM de PKI puro de músculo esquelético de conejo (PKI 1-19) o con 10 nM de PKI crudo de corazón bovino (PKI de Walsh) en una mezcla de reacción con el buffer F. La reacción se inició con la adición de 3 mg/ml de Histona IIA durante 10 min a 30°C en un volumen total de 100 μ l, y se detuvo como se describió anteriormente.

13. ENSAYO DE UNION DE AMPc:

Este ensayo se realizó de acuerdo al método de Døskeland y Ueland (1977) como se describió en Ulloa y col. (1988). La fracción proteica a medir se incubó durante 16 hs a 4°C con 50 μ l de mezcla de reacción, conteniendo 50 mM $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}/\text{PO}_4\text{NaH}_2$ pH 6.8, 1 mg/ml BSA y 0.03 μ M ^3H -AMPc (actividad específica 31 Ci/mmol) en un volumen total de 100 μ l. Como control para determinar la especificidad de unión del ^3H -AMPc, dichas

fracciones fueron incubadas en paralelo con la mezcla de reacción y 0.1 mM AMPc no radioactivo. Luego de la incubación, las reacciones se detuvieron con 1 ml de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 80 % frío, filtración por Millipore (HAWP-02500 tipo HA de 0.45 μm), y se lavó 2 veces con 2 ml cada vez de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 60 %. Los filtros se secaron y se contó la radioactividad sumergiéndolos en 1 ml de mezcla centelladora OTT.

14. WESTERN BLOTS

Las diferentes fracciones proteicas fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (*PAGE-SDS*) y los polipéptidos resueltos se electrotransfirieron bajo condiciones semi-secas a hojas de nitrocelulosa por el método de Kyhse-Andersen (1984). Las membranas fueron bloqueadas usando TBS-Leche o TBS-Tween, según se indique. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente. Luego de la incubación durante 1 h con el correspondiente anticuerpo en la dilución indicada, las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas con TBS-Tween, e incubadas durante 1 h con un anticuerpo biotinilado IgG (cadenas livianas y pesadas) con especificidad contra el primer anticuerpo, tomándose en cuenta el origen del mismo. La detección se llevo a cabo usando el método standard de fosfatasa alcalina del kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, USA). Luego de la incubación con el segundo anticuerpo biotinilado, las membranas se enjuagan con TBS y se incuban durante 1 h con la solución AB, preparada 30 min antes e incubada a temperatura ambiente. Las membranas se lavan 3 veces con TBS y otras 3 veces con Buffer L. Finalmente las tiras de nitrocelulosa se revelaron incubándolas durante tiempos variables, según la cantidad de proteína específica cargada, en Buffer M, y cuidando que no recibieran luz directa. La reacción se detiene con 5

mM EDTA pH 8. En todos los experimentos se usó como control suero pre-inmune de conejo o de ratón según el origen del primer anticuerpo.

15. ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACION

Se mezclaron alícuotas de las preparaciones de epimastigotes de *T.cruzi* o de las preparaciones de corazón bovino (0.45 ml) con 0.5 ml de la Solución de Detergentes. Se agregó la dilución del anticuerpo policlonal de conejo o del suero pre-inmune de conejo y la mezcla se incubó durante 2 hs en agitación a temperatura ambiente en un volumen total de 1 ml. Luego de adicionar 100 µl de *Proteína A Sepharosa-CL4B* a la anterior mezcla, se siguió incubando durante 1 h a 4°C. Se centrifugó en una microcentrífuga a máxima velocidad durante 5 min y los precipitados se lavaron 4 veces con la mezcla de detergentes. Los sobrenadantes se guardaron para ser usados como controles negativos. Las fracciones así inmunoprecipitadas y los sobrenadantes se analizaron por PAGE-SDS. Los geles fueron transferidos a nitrocelulosa, y las membranas fueron posteriormente incubadas con los correspondientes anticuerpos.

16. METODOS ANALITICOS:

16.1. MEDICION DE PROTEINAS:

La concentración de proteínas fue determinada de acuerdo a Lowry y col. (1951), usando seroalbúmina bovina como standard.

16.2. ELECTROFORESIS EN GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA:

Se realizaron geles disociantes planos (9 x 8 x 0.1 cm). La composición del gel separador fue 10 % p/v acrilamida, 0.27 % p/v bisacrilamida, 0.1 % p/v SDS, 0.39 M Tris-HCl pH 8.8, 0.025 % v/v

TEMED y 0.1 p/v persulfato de amonio. La composición del gel concentrador fue 5 % p/v acrilamida, 0.13 % p/v bisacrilamida, 0.1 % p/v SDS, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.05 % v/v TEMED y 0.1 % p/v persulfato de amonio (Laemmli, 1970).

Se mezcló un volumen de la muestra (no mayor que 100 μ l y de, al menos, 10 μ g de proteína), con "Cracking Buffer" (concentración final 1 x). Se calentó a 100°C durante 10 min, y se sembró en las calles del gel concentrador. Las corridas se realizaron a 50 mAmp.

16.3. TINCION CON COOMASSIE BLUE:

Una vez terminada la corrida electroforética los geles se fijan y tiñen en Solución de Teñido a temperatura ambiente con agitación suave. Luego se lavan en Solución Desteñidora. Los geles así fijados y teñidos son secados sobre papel Whatman 3 MM, a 80°C, durante 2 hs. Alternativamente son luego expuestos sobre películas radiográficas durante el tiempo que se indique a -70°C, con pantalla amplificadora.

16.4. TINCION CON ROJO PONCEAU:

Una vez transferidos los geles a membranas de nitrocelulosa se los incuba con Rojo Ponceau, durante 5 min a temperatura ambiente con agitación. Luego se destiñe en H₂O deionizada, pudiendo visualizarse la calidad y cantidad de las bandas transferidas. Dicho colorante desaparece durante el resto de las incubaciones para revelado por Western Blot.

16.5. TINCION CON PLATA:

Una vez terminada la corrida electroforética los geles se incuban en Solución de Fijado durante 1 h con agitación. Luego se lava repetidas

veces con H₂O deionizada y se fija durante 30 min con 10 % v/v glutaraldehído fresco en agitación para aumentar la sensibilidad del ensayo. Se realizan 4 lavados de 15 min con H₂O deionizada para eliminar el exceso de glutaraldehído. Luego se agrega la Solución de Plata y se deja desarrollar durante 30 min, en agitación. Se enjuaga 3 veces con H₂O deionizada, durante 10 min cada vez. Finalmente se agrega la Solución de Revelado y la reacción se detiene con ácido acético 7 % v/v. Los geles así teñidos son secados sobre papel Whatman 3 MM a 80 °C durante 2 hs.

17. COMPOSICION DE LAS SOLUCIONES USADAS:

BCIP: 60 mg/ml Br-Cl-Indoil-fosfato en 100 % v/v dimetilformamida

Buffer A: 20 mM PIPES pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 % v/v glicerol, 0.1 mM PMSF, 25 U/ml Trasylol.

Buffer B: 20 mM PIPES pH 6.5., 2 mM EDTA, 2 mM β-ME, 5 % v/v glicerol, 1 mM Benzamidina, 0.1 mM TLCK.

Buffer C: 5 mM PO₄Na₂H/PO₄NaH₂ pH.6.8, 15 mM β-ME, 2 mM EDTA.

Buffer D: 20 mM PIPES pH 6.5, 0.15 M NaCl.

Buffer E (concentraciones finales): 20 mM MOPS pH 6.9., 5 mM MgCl₂, 50 μM ATP[γ³²P] (Actividad especifica 100 cpm/pmol), 10 mM NaF, 0.2 mM MIX.

Buffer F (concentraciones finales): 25 mM MOPS pH 6.8, 0.25 mg/ml BSA, 10 mM NaF, 4 mM β-ME, 5 mM MgCl₂, 50 μM ATP[γ³²P] (Actividad especifica 100 cpm/pmol).

Buffer G (autofosforilación): 20 mM MOPS pH 6.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 10 μM ATP [γ³²P] (actividad especifica 100 cpm/pmol).

Buffer Glicina: 83 mM Na₂CO₃ ajustado a pH 9.6 con NaOH, 133 mM glicina, 67 mM NaCl.

Buffer H: 10 mM PO₄Na₂H/PO₄NaH₂ pH 6.8, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT

Buffer I: 55 mM PO₄Na₂H/PO₄NaH₂ pH 6.8, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT

Buffer J: 10 mM PO₄K₂H/PO₄KH₂ pH 6.8, 1 mM EDTA

Buffer L: 0.1 M Tris-HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂

Buffer M: 66 µl NBT, 33 µl BCIP, 10 ml Buffer L

Buffer N (concentraciones finales; *K_m* para ATP): 20 mM MOPS pH 6.8, 5 mM MgCl₂, 1.5-3 mg/ml Histona IIA, 10 mM NaF, 0.5 µCi ATP[γ ³²P] (actividad específica 100 cpm/pmol), 10 µg BSA.

Buffer O: 0.25 µM sacarosa y 5 mM KCl.

Cocktail de Inhibidores de Proteasas I (concentraciones finales): 20 mM Tris-HCl pH 7, 0.1 mM PMSF, 25 U/ml Trasylol, 0.01 % p/v Leupeptina, 0.2 mg/ml p/v STI, 0.5 mM TLCK, 1 mM Benzamidina.

Cocktail de Inhibidores de Proteasas II (concentraciones finales): 20 mM Tris-HCl pH 7, 0.1 mM PMSF, 20 µg/ml p/v STI, 0.5 mM TLCK, 1 mM benzamidina, 10 µg/ml p/v leupeptina.

Cracking buffer (1x): 30 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % p/v SDS, 2.5 % v/v β-ME, 10 % v/v glicerol, 0.001 % p/v azul de bromofenol.

LIT: medio de infusión de hígado y triptosa.

Medio de Incorporación: a-MEM con 10 mM HEPES y 10 mM TES, suplementada con 10 mg/ml BSA.

Medio de Fusión: 20 mM HEPES pH 7, 0.25 M sacarosa, 0.5 mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 50 µg/ml DNP-BSA.

NBT: 50 mg/ml nitroblue tetrazolium en 70% v/v dimetilformamida

OT: 0.08 % p/v PPO, 0.04 % p/v POPOP, 100 % v/v tolueno.

OTT: 100 % Triton X-100 OT = 1 2

PBS (1x): 8 g NaCl, 2 g KCl, 1.5 g Na₂HPO₄ y 2 g KH₂PO₄

PBS-EDTA: PBS adicionado con 1 mM EDTA.

Pennasay: 0.15 % p/v extracto de carne, 0.15 % p/v extracto de levadura, 0.5 % p/v peptona, 0.1 % p/v glucosa, 0.35 % p/v NaCl, 0.37 % p/v K₂HPO₄, 0.13 % p/v KH₂PO₄.

R rojo Ponceau: 0.5 % p/v Red Ponceau S en 1 % v/v ácido acético glacial.

SFB-Ø: se inactiva el complemento del suero fetal bovino mediante incubación a 56 °C durante 30 min. Dicho suero inactivado se guarda alícuotado a -20°C. Para evitar la formación de precipitados las alícuotas fueron descongeladas una única vez.

Sistema Regenerante de ATP: 1 mM ATP, 8 mM creatina fosfato, 31 U/ml de creatina fosfoquinasa.

Solución AB: 2 gotas de reactivo A (avidina DH) se mezclan con 10 ml de TBS. Luego se agregan 2 gotas de reactivo B (fosfatasa alcalina H biotinilada), se mezcla y se deja incubando a temperatura ambiente por 30 min, de acuerdo al kit de Vecta Laboratories.

Solución de Azul de Tripan: 0.25 % p/v azul de tripan en PBS estéril o con 0.02 % p/v azida sódica

Solución de Desteñido: 45 % v/v metanol, 10 % v/v ácido acético glacial.

Solución de Detergentes: 0.5 M Tris-HCl pH 7.4, 0.1 % p/v SDS, 1 % v/v Triton X-100, 0.5 % v/v Nonidet P40, 0.15 M NaCl, 20 mM EDTA, 1 mM PMSF, 20 mM Benzamidina.

Solución de Plata: Mezclar 4.6 ml NaOH 1 N con 300 µl NH₃ fresco. Agregar a dicha solución 0.9 ml AgNO₃ 20 % p/v y luego 16.5 ml de etanol 20 % v/v.

Solución de Homogeinización: 20 mM HEPES/KOH pH 7, 0.25 M sacarosa, 0.5 mM EGTA.

Solución de Revelado: 2.5 ml etanol absoluto, 125 µl formaldehído 3.7 % fresco, 125 µl ácido cítrico 1 % p/v, H₂O c.s.p. 25 ml

Solución de Solubilización: 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 % v/v Triton X-100, 0.2 % p/v cloruro de metilbencetonio, 1 mM EDTA, 0.1 % BSA, 150 mM NaCl.

Solución de Teñido: 0.25 % p/v Azul brillante de Coomassie R 250, 45 % v/v metanol, 10 % v/v ácido acético glacial.

***Staphilococcus aureus* A:** Staph A muertos en suspension al 10 % p/v PBS adicionado con 0.02 % p/v azida sódica.

MUB-Glu: 4 mM MUBGluc en 0.1 M buffer aceto-acetato pH 4.5.

TAUP: 190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 8 mM PO₄K₂H/PO₄KH₂ pH 6 y 10 mM L-prolina (Contreras y col., 1985b).

TBS (1X): 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 % p/v glicina.

TBS-Leche: TBS con la adición de 5 % p/v leche en polvo descremada.

TBS-Tween: TBS con la adición de 0.05 % v/v Tween 20.

RESULTADOS
Y
DISCUSION

I. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ENDOCITICA DE MACROFAGOS INFECTADOS CON *T.cruzi*:

Diversas evidencias indican que la entrada de *Trypanosoma cruzi* en los macrófagos, MØ (Araújo-Jorge y col., 1989), estaría mediada por una interacción inicial ligando-receptor y en zonas de la membrana pobres en lisosomas (Schenkman y col., 1991; Tardieux y col., 1992). Los tripomastigotes de *T.cruzi* entran a las células fagocíticas mediante la formación de una vacuola ácida parasitofórica, VP (Zingales y Colli, 1985; Ley y col., 1990), que muy temprano luego de la invasión fusiona con lisosomas (Milder y Kloetzel, 1979; Tardieux y col., 1992). Así mismo, los parásitos pueden liberar sustancias que inhiban las funciones celulares del huésped (Rimoldi y col., 1988). Solamente los tripomastigotes (ya sea TS o TM) y no los epimastigotes (E) evaden la degradación lisosomal al lizar la membrana de la VP y escapar al citoplasma, en donde pasarán a la forma amastigote y se dividirán perpetuando la infección (Nogueira y Cohen, 1976; Hall y col., 1991). Para analizar los eventos que pudieran estar involucrados en el proceso que permite a los tripomastigotes evitar el proceso fagocítico normal, se analizó la capacidad fusogénica entre endosomas tempranos en MØ infectados.

1. ESTUDIO DE LA FUSION DE ENDOSOMAS TEMPRANOS EN MØ NORMALES:

Existen múltiples sistemas descriptos para determinar la fusión entre endosomas tempranos *in vitro*, la cual ha sido ampliamente caracterizada, como se detalla en la introducción (Mayorga y col., 1989c). Para poder determinar una variación en la capacidad endocítica de MØ infectados con *T.cruzi*, primeramente se reprodujo la caracterización de los factores solubles relacionados a dicha

capacidad en MØ sin infectar. Haciendo un breve resumen, el ensayo de fusión de endosomas tempranos *in vitro* (Mayorga y col., 1989c) utiliza dos sondas: un anticuerpo monoclonal dirigido contra DNP derivatizado con manosa (Man-AcM-DNP) y β -Glucuronidasa derivatizada con DNP (DNP- β Glu), una glicoproteína reconocida por el receptor a manosa 6-fosfato. Estas dos sondas son internalizadas por separado en MØ, durante 5 min a 37°C, localizándose en vesículas caracterizadas como endosomas tempranos. Luego de la fusión entre subpoblaciones de endosomas tempranos cargados con sondas distintas, las dos sondas son capaces de formar un complejo inmune estable. Este fenómeno en MØ normales es dependiente de la temperatura y el tiempo, requiere un sistema regenerante de ATP y ATP (llamado ATP-SR), iones y extractos citosólicos (Diaz y col., 1988). A su vez es regulable por proteínas de unión a GTP (Colombo y col. 1992) y por proteínas de unión a calcio (Burgoyne y Clague, 1994).

En la Figura 15 se muestran los resultados obtenidos usando citosoles filtrados de MØ como fuente de proteínas solubles para el ensayo de fusión entre endosomas tempranos, incubados o no con la adición de 10 μ M GTP γ S, un análogo no hidrolizable del GTP. Este afecta la fusión de vesículas *in vitro* de dos maneras: en presencia de altas concentraciones de citosol inhibe la fusión de vesículas *in vitro*, pero aumentando el proceso fusogénico bajo condiciones donde la concentración de proteínas citosólicas es el factor limitante, como ya había sido descrito (Mayorga y col., 1989). Mas aún, el GTP γ S estimula la fusión aún en ausencia de citosol. Esto indicaría que al menos algunos de los factores requeridos para la fusión ya estarían presentes en las membranas de las vesículas. Es decir, una o mas

proteínas de unión a GTP estimularían la unión de factores citosólicos requeridos para la fusión vesicular a las membranas endosomales, como ya fue sugerido anteriormente (Mayorga y col., 1989b; Lenhard y col., 1992). Como se ve en la Figura 15 el GTP γ S regula la fusión entre endosomas tempranos de forma dual como fue descrito previamente (Mayorga y col., 1989b).

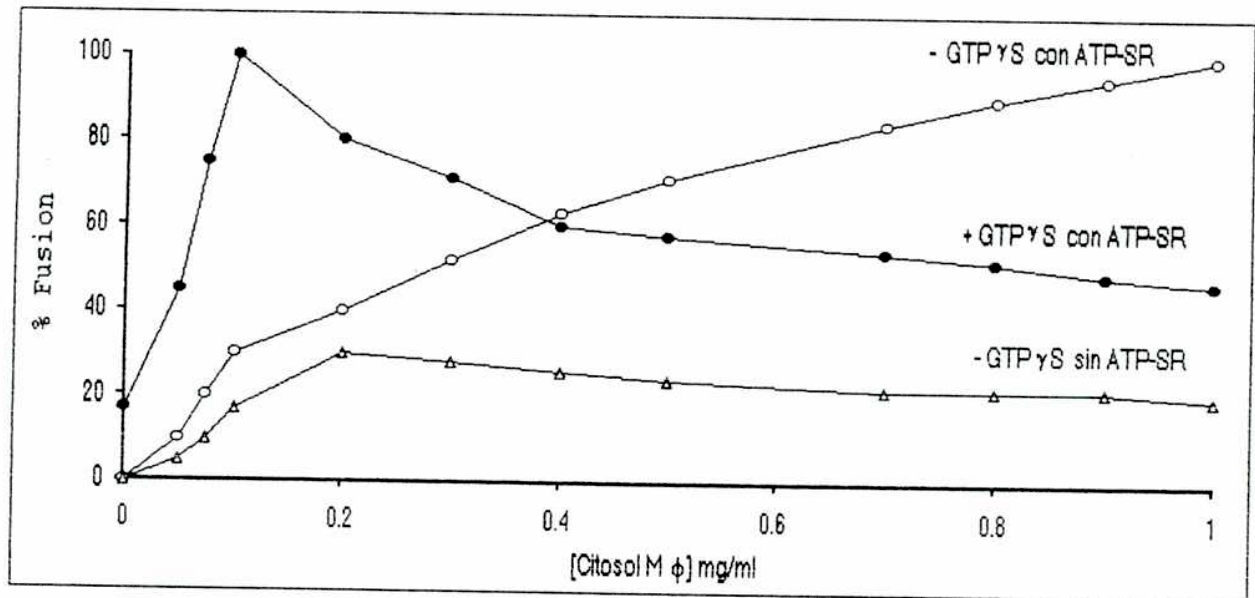


Figura 15: Efecto dual de proteínas G sobre la actividad fusogénica entre endosomas tempranos mediada por citosol de MØ normales. Los símbolos indican (-○-) fusión en medio con sistema ATP-SR, sin adiciones; (-●-) fusión en medio con ATP-SR y 10 μ M GTP γ S; (-Δ-) fusión en medio sin ATP-SR y sin adiciones. La figura representa valores obtenidos por quintuplicado a partir de distintas fracciones de citosol filtrado por Sephadex G-25, como se indica en materiales y métodos.

En el experimento de la Figura 16 se demuestra el efecto de proteínas de unión a Calcio en el camino endocítico. En la Figura 16 puede observarse que la adición de 1 mM Ca^{2+} a un sistema libre sin ATP-SR promueve un incremento en la fusión de vesículas tempranas aún a bajas concentraciones de proteínas citosólicas. Estos mismos eventos fueron

explicados por la presencia de una proteína de unión a Ca^{2+} , la anexina II (Burgoyne y Clague, 1994). La presencia de ATP-SR junto con el Ca^{2+} genera una curva con mucho menor capacidad fusogénica, similar a la curva obtenida en condiciones basales sin energía ni otros cofactores. Estos mismos resultados fueron recientemente presentados (Mayorga y col., 1993), sugiriéndose la existencia de dos caminos excluyentes regulatorios de la fusión de endosomas tempranos. Uno sería [NSF~ATP-SR-dependiente] y [Ca^{2+} -independiente] y el otro sería [NSF~ATP-SR-independiente] pero [Ca^{2+} -dependiente] (Mayorga y col., 1993; Burgoyne y Clague, 1994). Sin embargo mayores estudios son requeridos para definir la relación entre estos dos caminos y la regulación coordinada que de ellos resulte sobre el camino endocítico.

2.1. INHIBICION DE LA FUSION DE ENDOSOMAS TEMPRANOS EN MØ INFECTADOS CON TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS, MØ-TS. PERDIDA DEL EFECTO INHIBIDOR DEL GTPγS:

La capacidad fusogénica de los citosoles de MØ murinos infectados con *T. cruzi* se midió en presencia o ausencia de GTPγS, usando el sistema de fusión de vesículas *in vitro*.

En el panel A de la Figura 17 puede verse que bajas concentraciones de citosol de MØ-TS (0.05-0.1 mg/ml) desarrollan más alta capacidad fusogénica que la mediada por citosol de MØ normales (Figura 15). A mayores concentraciones de citosol (a partir de 0.2 mg/ml) la actividad fusogénica inicial del MØ-TS se ve completamente abolida comparado tanto con el control del MØ normal como con el de los MØ mock-infectados (Figuras 15 y 17.B.). La adición de 10 μM GTPγS aumentó consistentemente la actividad fusogénica aún a bajas concentraciones de proteínas (Figura 17.A.).

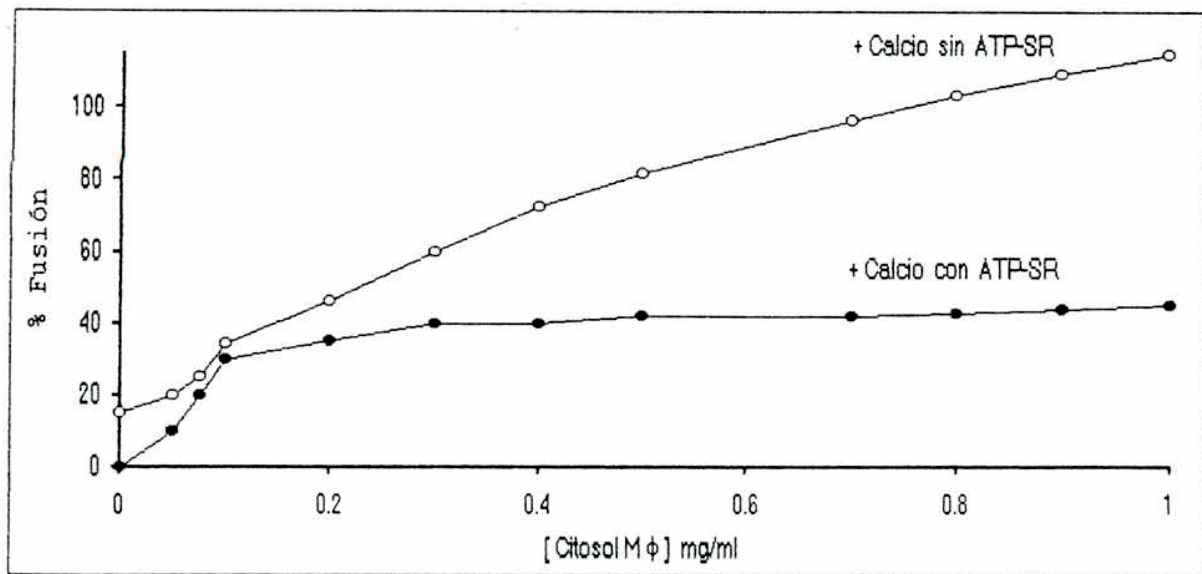


Figura 16: Activación por Ca^{2+} de la actividad fusogénica entre endosomas tempranos mediada por citosol de MØ normales. Los símbolos indican (-o-) fusión en medio con sistema ATP-SR, sin adiciones; (-●-) fusión en medio con ATP-SR y 10 μM GTP γS ; (-Δ-) fusión en medio sin ATP-SR y sin adiciones. La figura representa valores obtenidos por quintuplicado a partir de distintas fracciones de citosol filtrado por Sephadex G-25, como se indica en materiales y métodos.

Es decir, que los citosoles de MØ-TS perdieron la regulación inhibitoria por proteínas de unión a GTP, viéndose que sin agregados los citosoles de MØ-TS son incapaces de promover la fusión de endosomas tempranos, paso fundamental inicial en la vía degradatoria.

2.2. INHIBICION DE LA FUSION DE ENDOSOMAS TEMPRANOS MEDIADA POR CITOSOL DE MØ INFECTADOS CON TRIPOMASTIGOTES METACICLICOS, MØ-TM. PERDIDA DEL EFECTO GTP γS :

La Figura 17.A muestra que la capacidad fusogénica mediada por citosol de MØ-TM se encuentra inhibida a todo lo largo de la curva de citosol,

comparada con la de MØ normales (Figura 15) o la de MØ mock-infectados (Figura 17.B). La capacidad fusogénica de los MØ-TM se vió estimulada

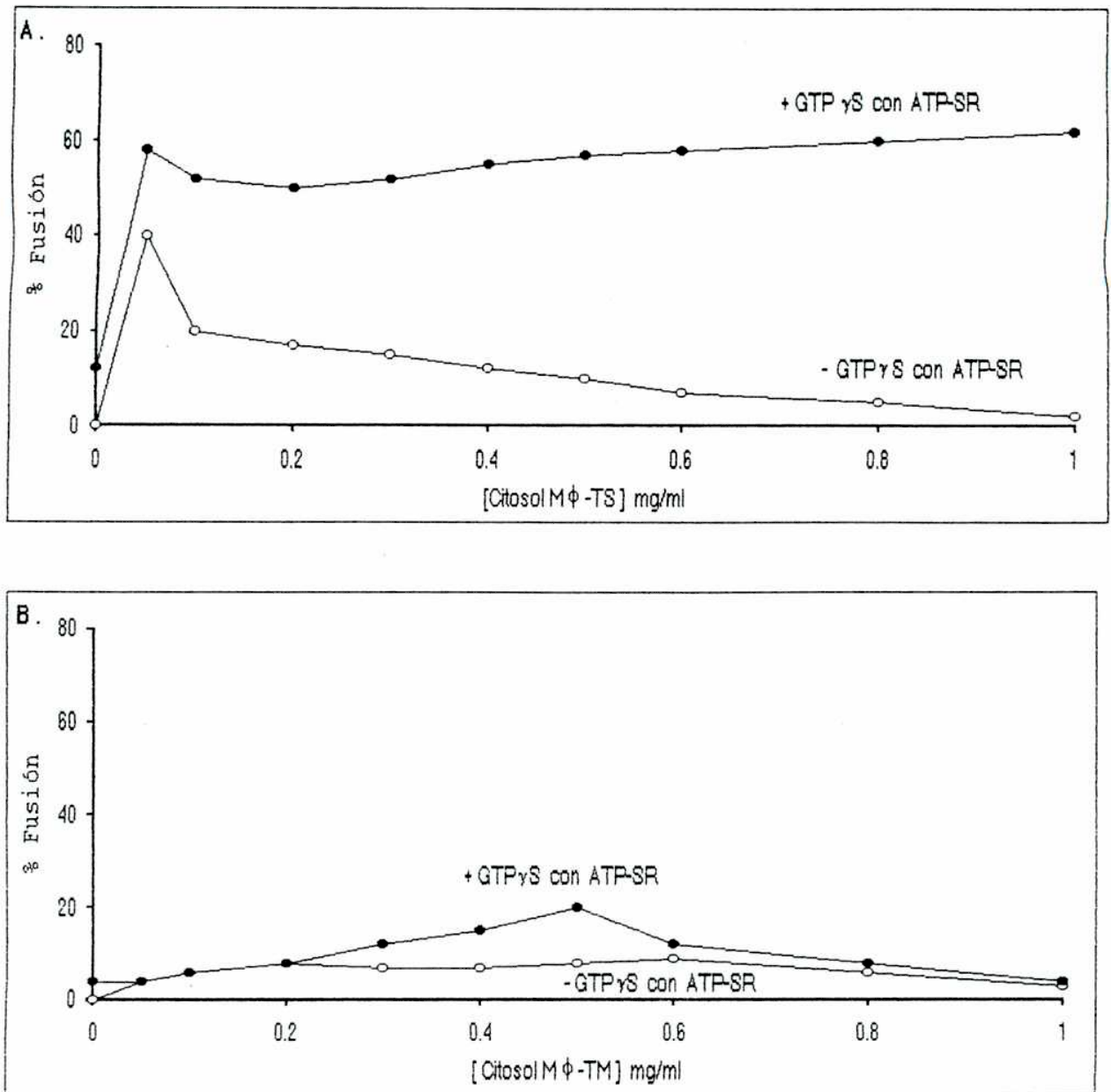


Figura 17: Inhibición de la fusión entre endosomas tempranos mediada por citosol de MØ infectados con tripomastigotes. Panel A: actividad de citosoles filtrados de MØ-TS en presencia (-●-) o ausencia (-○-) de 10 μ M GTP γ S. En el panel B: actividad de citosoles filtrados de MØ-TM en presencia (-●-) o ausencia (-○-) de 10 μ M GTP γ S. Ambas figuras representan valores obtenidos por cuadruplicado a partir de distintas fracciones de citosol filtrado por Sephadex G-25, como se indica en materiales y métodos.

aunque pobremente, por la adición de 10 μ M GTP γ S (de un 10% a un 20% fusión). Es decir, que los citosoles de MØ-TM al igual que los de MØ-TS son incapaces de promover la fusión entre endosomas tempranos. Esto podría deberse, al menos en parte, a la desaparición del efecto de ciertas proteínas G involucradas en la regulación de la maquinaria endocítica del MØ huésped normal.

2.3. EFECTO DUAL NORMAL DEL GTP γ S SOBRE LA FUSION DE ENDOSOMAS TEMPRANOS EN MØ QUE ENDOCITARON TRIPOMASTIGOTES MUERTOS, MØ MOCK-INFECTADOS:

Para realizar el ensayo de mock-infección los parásitos fueron inactivados por incubación a 57°C hasta que evidenciaran una pérdida permanente de movilidad, como se describe en materiales y métodos. Luego se realizó el ensayo de interacción acostumbrado de estos parásitos no móviles con los macrófagos, bajo las mismas condiciones que los ensayos de interacción con parásitos móviles.

La Figura 18 muestra que los citosoles de los MØ mock-infectados, usados como control de los experimentos anteriores, no presentan ningún cambio en su perfil de actividad fusogénica ni en los procesos fusogénicos mediados por GTP en comparación a citosoles de MØ normales sin infectar (Figura 15). Es decir que la inhibición de la capacidad fusogénica obtenida en los MØ infectados es específica y producto de un intercambio activo de señales entre el parásito vivo y la maquinaria endocítica del MØ.

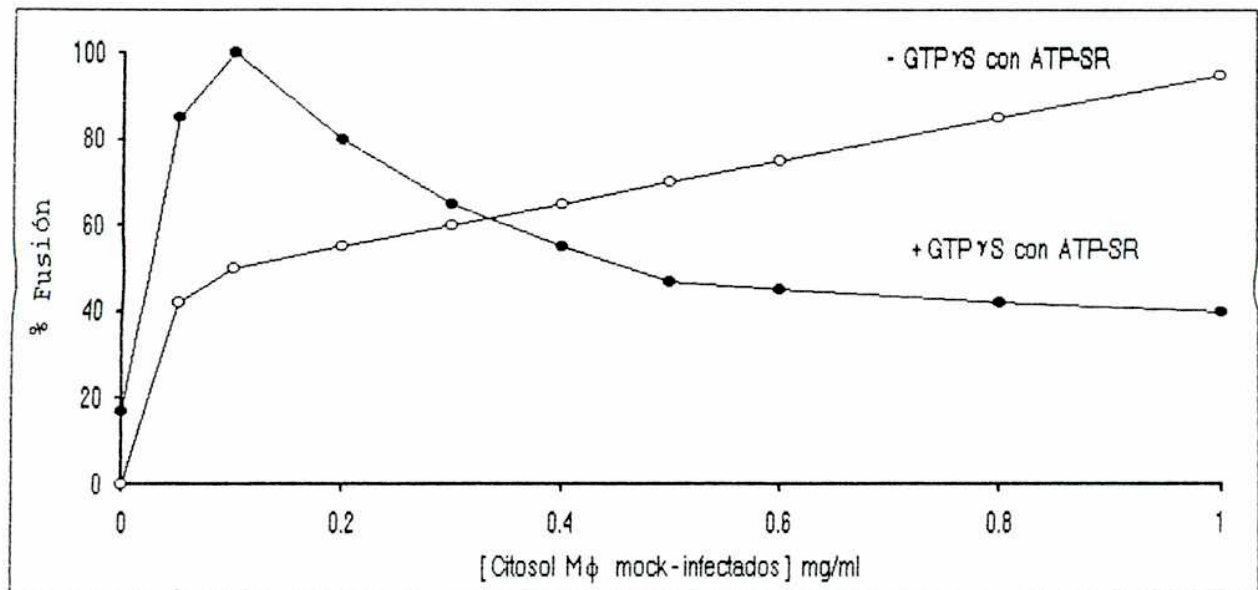


Figura 18: Efecto dual normal de las proteínas G sobre la actividad fusogénica de endosomas tempranos mediada por citosol de MØ mock-infectados. Los símbolos indican (-o-) fusión en medio con sistema ATP-SR, sin adiciones; (-●-) fusión en medio con ATP-SR y 10 μ M GTP γ S. La figura representa valores obtenidos por triplicado a partir de distintas fracciones de citosol filtrado por Sephadex G-25, como se indica en materiales y métodos.

2.4. ACTIVACION NORMAL POR CALCIO DE LA FUSION DE ENDOSOMAS TEMPRANOS MEDIADA POR CITOSOL DE MØ-TM y MØ-TS:

Para verificar el estado de otros componentes involucrados en la maquinaria endocítica se ensayó la capacidad fusogénica entre endosomas tempranos mediada por citosoles de MØ infectados en sistemas libres de energía adicionados con Ca^{2+} . En la Figura 20 se grafica la capacidad fusogénica mediada por citosol de MØ infectados con tripomastigotes, obteniéndose resultados similares para citosoles de MØ-TM como para los de MØ-TS. La fusión en medios ATP-SR sin adiciones se encuentra inhibida, como ya se mostró en la Figura 17.A.

La adición de 1 mM Ca^{2+} a un sistema sin ATP-SR, promueve un incremento en la fusión de vesículas tempranas, al igual que en MØ normales (Figura 16). Aunque a bajas concentraciones de proteínas citosólicas la estimulación no es tan pronunciada como en los controles sin infectar, los resultados sugieren que la regulación por proteínas de unión a Calcio no se ve afectada en la célula huésped infectada por el parásito *Trypanosoma cruzi*.

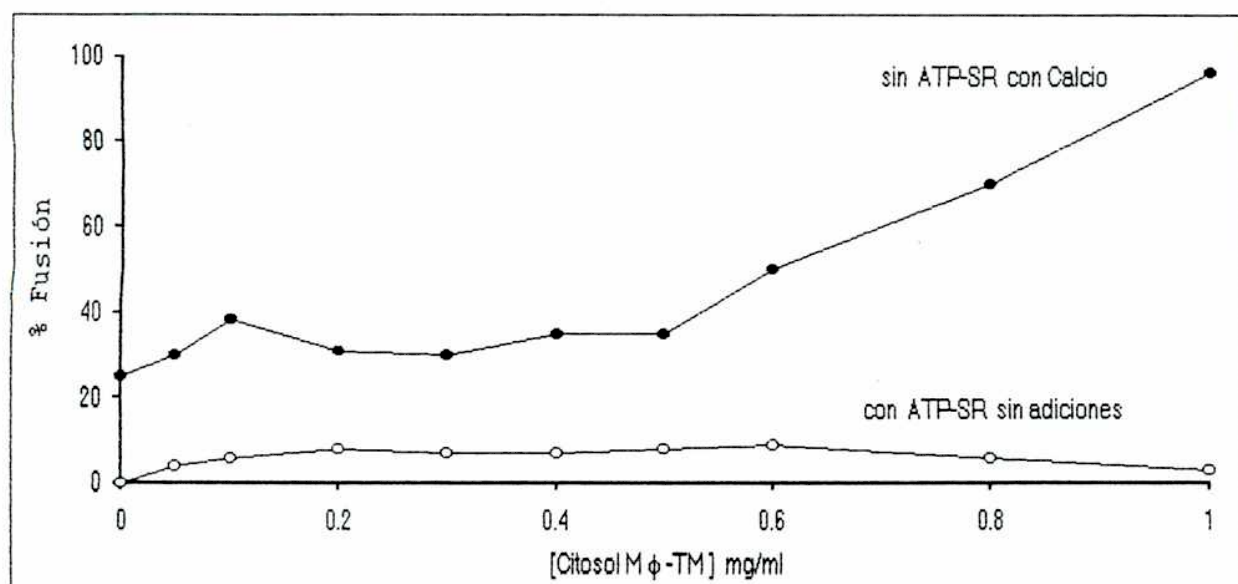


Figura 19: Efecto del Ca^{2+} sobre la actividad fusogénica de endosomas tempranos mediada por citosol de MØ-TM. Los símbolos indican (-o-) fusión en medio con sistema ATP-SR, sin adiciones; (-●-) fusión en medio sin ATP-SR y 1 mM Ca^{2+} . La figura representa valores obtenidos por triplicado a partir de distintas fracciones de citosol filtrado por Sephadex G-25, como se indica en materiales y métodos.

3. ESTUDIO DE LA FUSION DE ENDOSOMAS TEMPRANOS MEDIADA POR CITOSOL DE *T. cruzi*..:

La habilidad normal de los macrófagos para realizar procesos fagocíticos se ve inhibida cuando internalizan tripomastigotes metacíclicos o sanguíneos de *Trypanosoma cruzi*. Esto podría ser

consecuencia de: 1- una interacción directa de metabolitos secretados por el parásito con las proteínas de la maquinaria fusogénica intrínsecas del MØ, o 2- debido a la síntesis de novo, activación de proteínas inhibitorias de la fusión, o inactivación de proteínas activatorias de la fusión. Podría argüirse que la inhibición de la fusión mediada por los citosoles de MØ-TM o MØ-TS se debiera a obtenciones espurias de dichos citosoles, por mezcla con citosol del parásito. Para esclarecer este punto primero se determinó la concentración de proteínas de MØ y parásitos, usando el método de Lowry, obteniéndose:

Tipo Celular y cant.	[Proteínas] mg/ml
1 x 10 ⁶ MØ (J774-E)	0.5±0.15
1 x 10 ⁹ TS o TM o E	2.0±0.70

Considerando que la tasa de internalización obtenida fue de 10 parasitos por MØ, como se describe en materiales y métodos, entonces la concentración de proteínas que estos parásitos podrían aportar al entorno citosólico del MØ huésped sería de un 0.2-0.3 % de la proteína total, lo cual sugeriría que las alteraciones en la maquinaria fusogénica de los MØ infectados reflejaría actividades de proteínas regulatorias más que cantidades de proteínas aportadas por el parásito, consecuencia de artefactos en la preparación de citosoles de MØ infectados. Sin embargo, con la finalidad de esclarecer completamente si esta pérdida de habilidad en el MØ infectado es específica o artificiosa, se ensayaron los citosoles de los parásitos

como fuente de proteínas para los ensayos de fusión entre endosomas tempranos en presencia o ausencia de GTP γ S.

Al mismo tiempo, estos ensayos permitieron determinar si existe una actividad fusogénica de endosomas tempranos mediada por proteínas citosólicas propias del parásito *T.cruzi*, análoga a la de otros organismos.

3.1. EFECTO ESTIMULADOR DEL GTP γ S SOBRE LA FUSION DE ENDOSOMAS TEMPRANOS MEDIADA POR CITOSOL DE TRIPOMASTIGOTES:

En la Figura 20 se observa que bajas concentraciones de citosol de TS presentan una alta capacidad fusogénica, en tanto que a esas concentraciones un MØ normal no lo hace (Figura 15). Todo a lo largo de la curva de concentración de citosol el GTP γ S presenta un efecto activador de la fusión. Este efecto podría deberse a la presencia de proteínas G propias de *T.cruzi* encargadas de promover la fusión entre endosomas tempranos.

Los citosoles preparados a partir de TM presentaron baja capacidad fusogénica, aún a altas concentraciones de proteínas, como se ve en la Figura 21. La presencia o ausencia de GTP γ S tampoco modifica la forma de la curva. En este estadio de vida del parásito parece perderse la regulación del proceso de fusión de endosomas temprano por proteínas G. Es decir, en los TM parece expresarse un nuevo sistema de fusion GTP-independiente. Dado que los citosoles de MØ infectados presentan mucho más inhibida su capacidad fusogénica que los citosoles de parásitos solos, dicha inhibición sería específica de la interacción entre la célula huésped y el parásito y no un artificio de la técnica.

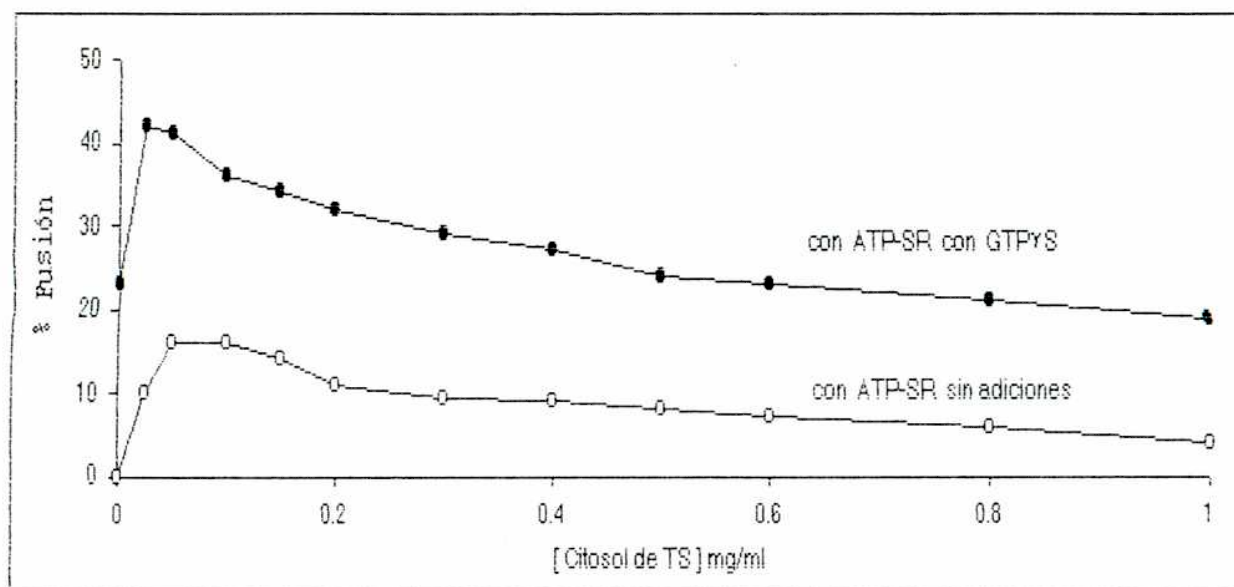


Figura 20: Efecto del GTP γ S sobre la actividad fusogénica de endosomas tempranos mediada por citosol de Tripomastigotes. Los símbolos indican (-o-) fusión en medio con sistema ATP-SR, sin adiciones; (-●-) fusión en medio con ATP-SR y 10 μ M GTP γ S. La figura representa valores obtenidos por triplicado a partir de distintas fracciones de citosol filtrado por Sephadex G-25, como se indica en materiales y métodos.

3.2. FUSION DE ENDOSOMAS TEMPRANOS DE MACROFAGOS NORMALES COMPETIDOS CON CITOSOL DE TRIPOMASTIGOTES DE *T. cruzi*.

Para elucidar completamente el grado de inhibición que las proteínas propias del parásito pudieran ejercer sobre la maquinaria fusogénica del huésped, se probó el efecto de la adición en concentraciones crecientes de citosol de *T. cruzi* sobre 0.1 mg/ml de citosol de MØ pre-activado con 10 μ M GTP γ S. Se seleccionó este modelo representante de una actividad fusogénica del 100 % para evitar usar muy altas concentraciones de proteínas (1 mg/ml en ausencia de GTP γ S) y así poder medir la influencia que la maquinaria GTP-independiente del TM ejerce sobre el MØ. La Figura 21 muestra el efecto de concentraciones

crecientes de citosol de TM sobre citosol de MØ normales pre-activados con 100 % de actividad fusogénica (0.1 mg/ml citosol filtrado de MØ con adición de 10 μ M GTP γ S). Se observó una muy marcada disminución de la capacidad fusogénica de los MØ normales al aumentar la concentración de citosol de TM. Los citosoles de TS mostraron un patrón similar.

En el caso de los MØ infectados el aporte de proteína por los parásitos sería un 0.2-0.3 % del total del contenido protéico, como se calculó más arriba. Así, 0.05 mg/ml de citosol del parásito deberían bajar la capacidad fusogénica del MØ a los mismos niveles que en el MØ infectado, es decir a 10 % fusión, como se vió en la Figura 17.A., en vez de a 95 % capacidad fusogénica como se ve en esta Figura 21. Hace falta agregar 0.6 mg/ml de proteína del TM para bajar la capacidad fusogénica del MØ normal a la misma obtenida en MØ infectados. Por lo tanto, la inhibición de la capacidad fusogénica de los MØ-TM reflejaría la aparición de nuevos factores, productos de la interacción huésped-parásito, más que a la suplementación de factores de la maquinaria GTP-independiente del TM. Estos factores podrían ser proteínas Gai, ya descritas en *T.cruzi* (Coso y col., 1992), u otros factores inhibitorios de la fusión entre endosomas tempranos en el MØ huésped.

Estos resultados descartan definitivamente la posibilidad de mezcla de citosoles del MØ y del parásito durante el proceso de obtención de citosol de MØ infectado, siendo por tanto específica la inhibición de la fusión mediada por citosol de MØ infectados.

3.3. EFECTO ESTIMULADOR DEL GTP γ S SOBRE LA FUSION DE ENDOSOMAS TEMPRANOS MEDIADA POR CITOSOL DE EPIMASTIGOTES, E, DE *T.cruzi*:

En la Figura 22 se ve que bajas concentraciones de citosol de epimastigotes presentan una alta capacidad fusogénica. Al igual que los TS, el GTP γ S presenta un efecto sólo activador de la fusión mediada por citosol de epimastigotes. Este efecto podría asimismo deberse a la presencia de proteínas G activatorias de la fusión de endosomas tempranos, expresadas en estos dos estadios de vida del parásito.

3.4. EFECTO ESTIMULADOR DEL CALCIO SOBRE LA FUSION DE ENDOSOMAS TEMPRANOS MEDIADA POR CITOSOL DE TRIPOMASTIGOTES DE *T.cruzi*:

En la Figura 23 se grafica el efecto del Ca²⁺ sobre la capacidad fusogénica mediada por citosol de TM. Resultados similares se observan para citosoles de TS. La fusión en medios ATP-SR sin adiciones es alta a bajas concentraciones de proteína, como ya se mostró en la Figura 21, en tanto que la adición de 1 mM Ca²⁺ en un sistema sin ATP-SR, promovió un incremento en la fusión de vesículas tempranas todo a lo largo de la curva, de manera similar a lo que ocurre en fagocitos profesionales. Es decir, en el parásito existirían proteínas de unión a Calcio estimuladoras de la fusión entre endosomas tempranos.

3.5. EFECTO ESTIMULADOR DEL CALCIO SOBRE LA FUSION DE ENDOSOMAS TEMPRANOS MEDIADA POR CITOSOL DE EPIMASTIGOTES, E, DE *T.cruzi*:

En la Figura 24 se grafica el efecto del Ca²⁺ sobre la capacidad fusogénica mediada por citosol de Epimastigotes. Al igual que los resultados obtenidos con los citosoles de los otros estadios del parásito la fusión en medios ATP-SR sin adiciones es alta a bajas concentraciones de proteína, Figura 22, y la adición de 1 mM Ca²⁺ en un

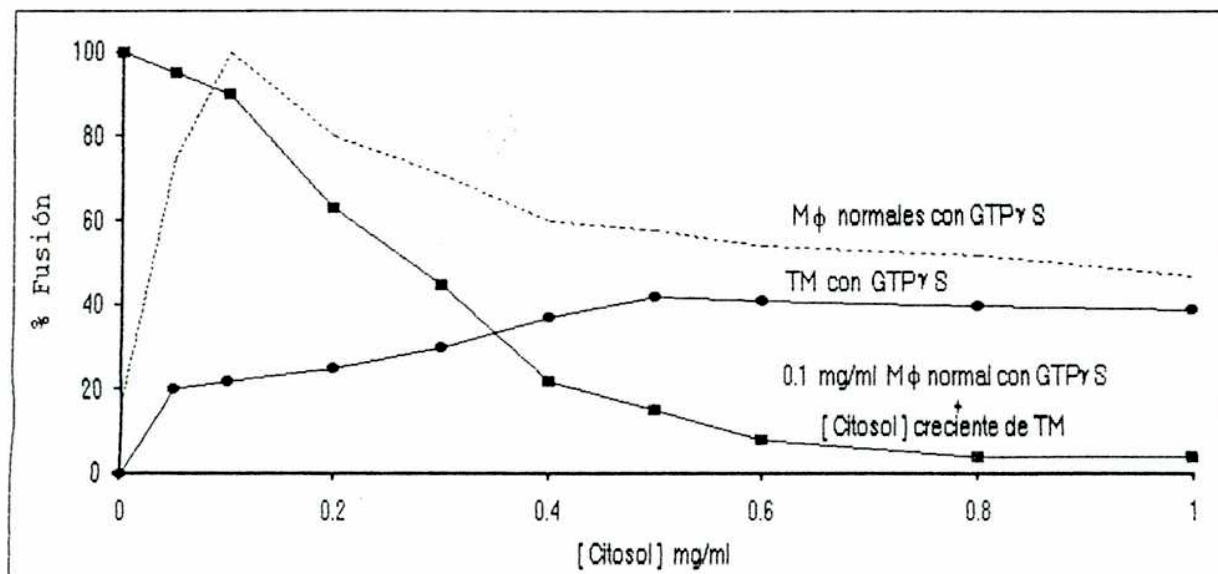


Figura 21: Inhibición de la fusión entre endosomas tempranos por citosol de MØ normales en presencia de citosol de TM o TS de *T. cruzi*. Los símbolos indican (—■—) 0.1 mg/ml citosol filtrado de MØ normales adicionados con 10 μ M GTP γ S en función de concentraciones crecientes de citosol filtrado de TM de *T. cruzi*, (—●—) citosol filtrado de TM sólo en sistema ATP-SR adicionado con 10 μ M GTP γ S, (---) citosol filtrado de MØ en sistema ATP-SR adicionado con 10 μ M GTP γ S. Los resultados muestran valores obtenidos por triplicado.

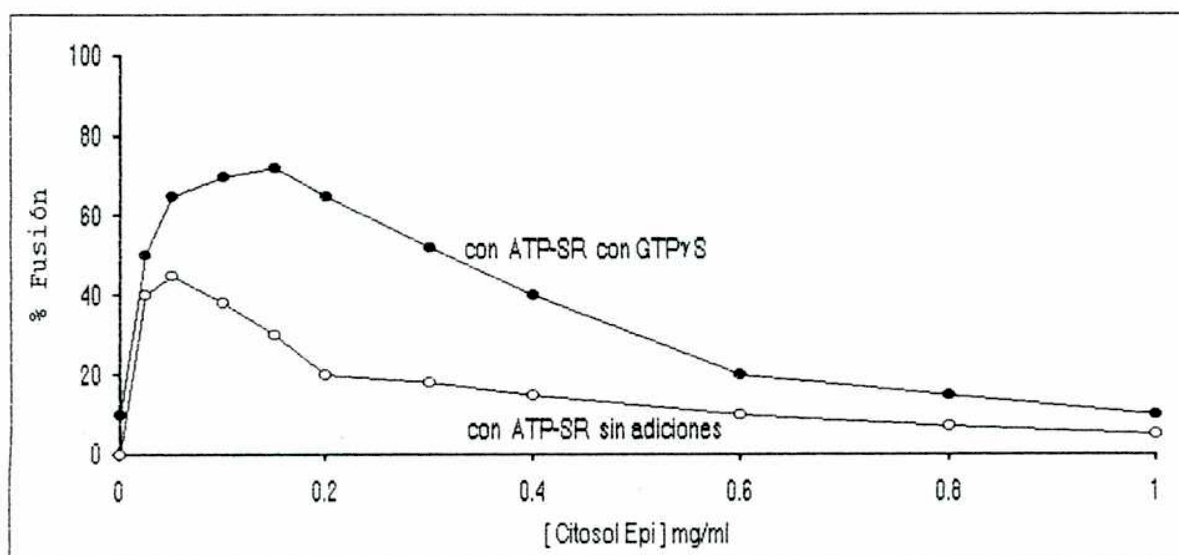


Figura 22: Efecto del GTP γ S sobre la actividad fusogénica de endosomas tempranos mediada por citosol de Epimastigotes. Los símbolos indican (—○—) fusión en medio con sistema ATP-SR, sin adiciones; (—●—) fusión en medio con ATP-SR y 10 μ M GTP γ S. La figura representa valores obtenidos por cuadruplicado a partir de distintas fracciones de citosol filtrado por Sephadex G-25, como se indica en materiales y métodos.

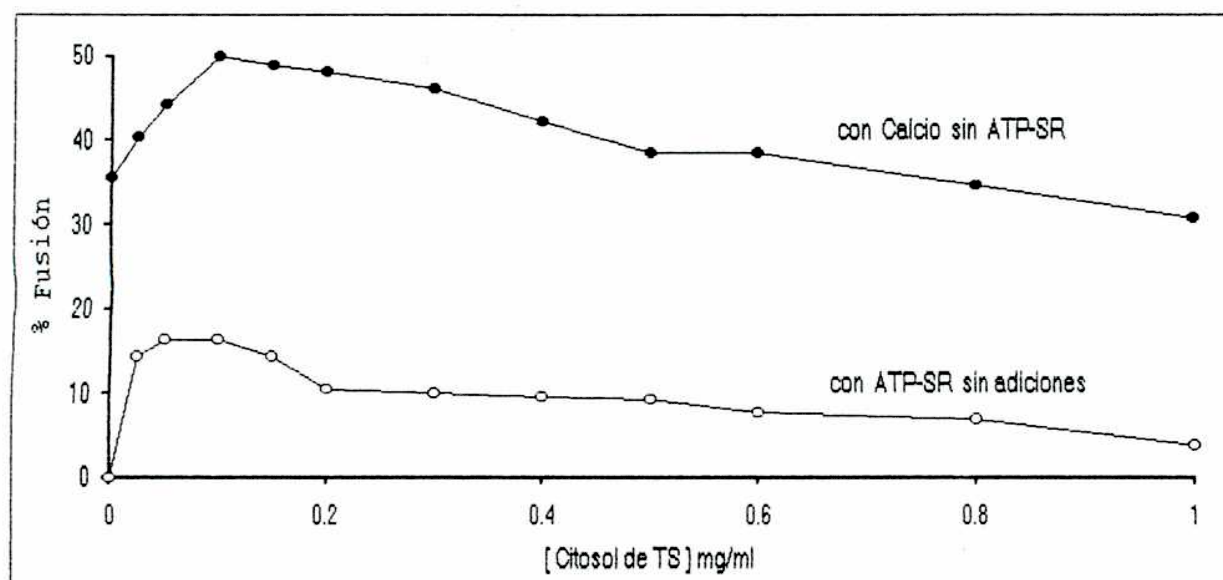


Figura 23: Efecto del Ca^{2+} sobre la actividad fusogénica de endosomas tempranos mediada por citosol de Tripomastigotes. Los símbolos indican (-o-) fusión en medio con sistema ATP-SR, sin adiciones; (-●-) fusión en medio sin ATP-SR y 1 mM Ca^{2+} . La figura representa valores obtenidos por triplicado a partir de distintas fracciones de citosol filtrado por Sephadex G-25, como se indica en materiales y métodos.

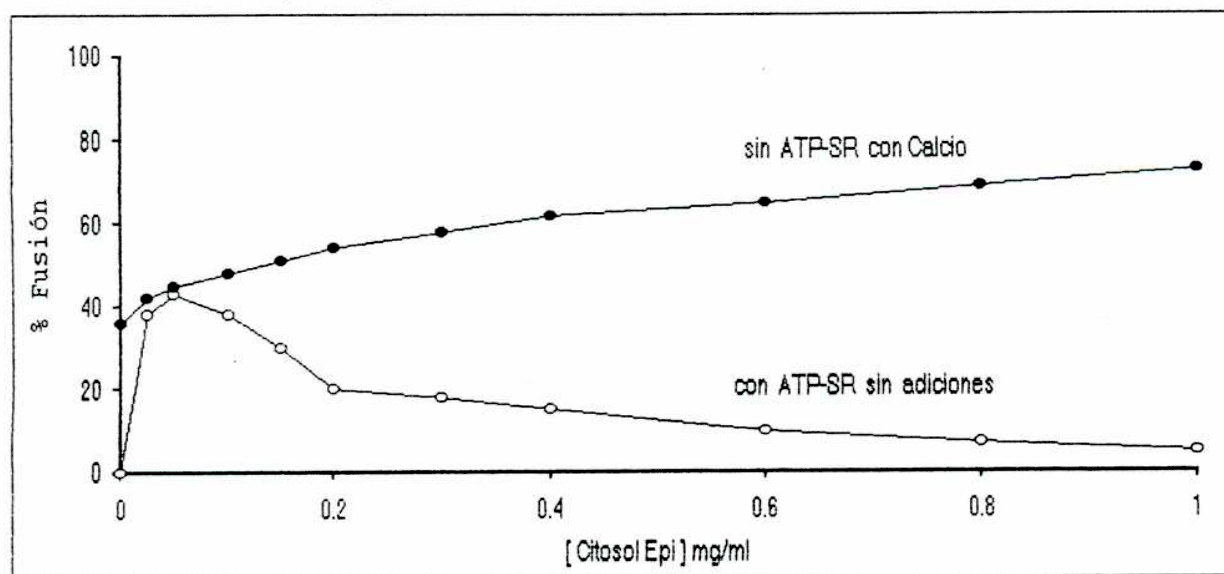


Figura 24: Efecto del Ca^{2+} sobre la actividad fusogénica de endosomas tempranos mediada por citosol de Epimastigotes. Los símbolos indican (-o-) fusión en medio con sistema ATP-SR, sin adiciones; (-●-) fusión en medio sin ATP-SR y 1 mM Ca^{2+} . La figura representa valores obtenidos por triplicado a partir de distintas fracciones de citosol filtrado por Sephadex G-25, como se indica en materiales y métodos.

sistema sin ATP-SR, induce un incremento en la fusión de vesículas tempranas todo a lo largo de la curva. Así, los tres estadios ensayados de *T.cruzi* tendrían proteínas de unión a Calcio reguladoras de procesos fusogénicos.

II- REGULACION ESTADIO ESPECIFICA DE LA FOSFORILACION DE PROTEINAS DURANTE EL CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*:

1. CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y PURIFICACION A HOMOGENEIDAD DE LA SUBUNIDAD CATALITICA DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMPc DE *Trypanosoma cruzi*:

En este trabajo se obtuvo la cPKA del parásito *T.cruzi* en estado homogéneo, realizando varios pasos de purificación adicionales a los ya descriptos para la obtención de holoenzima PKA en el parásito (Ulloa y col., 1988), y que se detallan a continuación.

1.1. CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA:

Para purificar a homogeneidad la cPKA del parásito se usó la técnica preliminar descrita en nuestro laboratorio para obtener la holoenzima parcialmente purificada (Ulloa y col., 1988). Como fue indicado en materiales y métodos, al extracto crudo citosólico, *S100*, bajo condiciones controladas de *pH* (Peters y col., 1977) e *inhibidores de proteasas* (Cazzulo, 1984), fue diluido en *Buffer A* y sembrado en una columna de DEAE-celulosa. Si se omite alguna de estas condiciones durante el procesado del *S100* apareceran en los siguientes pasos de purificación distintas formas enzimáticas, producto de una fuerte actividad proteolítica endógena. A su vez pudimos demostrar que el *pH* de trabajo elegido también estaría relacionado con un aumento en el rendimiento.

En la Figura 25 se observa la actividad de quinasa de proteínas, utilizando como sustrato Histona H IIA, mostrando el perfil ya conocido de elución a 0.15-0.2 M y 0.30-0.32 M NaCl (Ulloa y col., 1988). Sólo el *pico II* se estimuló en presencia de 1 μ M de AMPc,

indicando que se trataba de una actividad de **quinasa regulable por AMPc**. El pico mayoritario de unión específica a AMPc coeluye con el pico II de actividad de quinasa, llamado **fracción de DEAE-celulosa**, mientras que se evidencia un pico minoritario de unión a AMPc desplazado del pico I con actividad de quinasa a 0.25 M NaCl. En trabajos anteriores (Ulloa y col., 1988) se demostró la presencia de actividad tipo PKA_{II}, caracterizándose la subunidad regulatoria de dicha quinasa, siendo de tipo R_{II}, con PM 56 kDa, como fue descripto en la sección 7.3. de la Introducción.

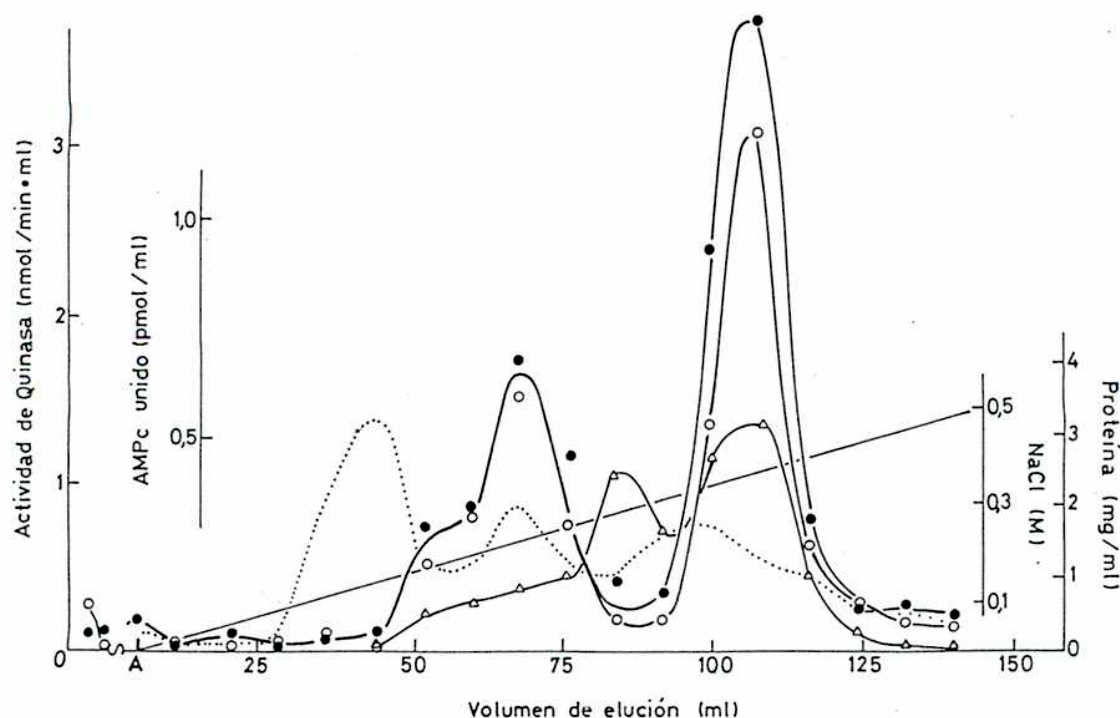


Figura 25: Perfil de elución en DEAE-celulosa de S100 de *T. cruzi* cepa Tul 2. La actividad de quinasa se determinó usando como sustrato Histona IIA en presencia (-●-) o ausencia (-○-) de 1 μ M AMPc. Los símbolos representan capacidad de unión específica a AMPc (-△-), concentración de proteínas (···) y gradiente lineal 0-0.5 M NaCl (—).

1.2. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN AMPc-AGAROSA:

Con el objetivo de obtener la subunidad catalítica libre se sembró la fracción de DEAE-celulosa precipitada al 60 % de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en una columna de AMPc-agarosa equilibrada en Buffer B. La Figura 26 muestra el perfil de elución conseguido. Se obtuvo un pico en el percolado con actividad fosfotransferasa AMPc-independiente, llamado *percolado de AMPc-agarosa*. La columna se eluyó con Buffer B adicionado con 0.5 M NaCl, obteniéndose la actividad de cPKA libre de actividad de unión a AMPc- ^3H . Una elución porsterior con Buffer B y 8M urea permitió recuperar un pico con capacidad de unión a AMPc y ninguna actividad de quinasa de proteínas, llamado *rPKA de AMPc-agarosa*.

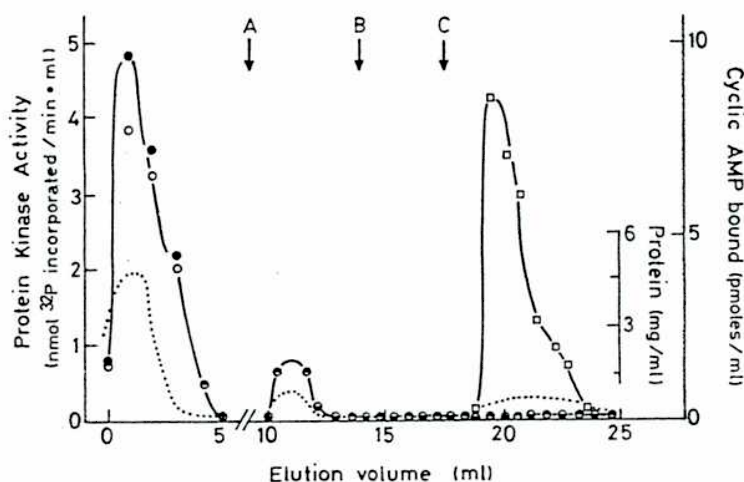


Figura 26: Cromatografía de afinidad en AMPc-agarosa de la fracción de DEAE-celulosa de *T. cruzi*. La actividad de PKA fue medida en presencia (-●-) o ausencia (-○-) de 1 μM AMPc. Los símbolos indican (-Δ-) actividad de unión específica a AMPc, (···) concentración de proteínas. Las letras indican los pasos de elución con Buffer B conteniendo (B) o no 0.5 M NaCl (A) y el mismo buffer conteniendo 8 M urea (C).

1.3. PURIFICACION POR GRADIENTES DE DENSIDAD DE SACAROSA:

1.3.1. DETERMINACION DE PARAMETROS HIDRODINAMICOS DE cPKA DE *Trypanosoma cruzi*:

La subunidad cPKA del parásito obtenida la fracción del percolado de la AMPc-agarosa fue sembrada en un gradiente de sacarosa discontinuo 5 a 20 % en Buffer D, con la finalidad de calcular los parámetros hidrodinámicos de la cPKA de *T.cruzi*. Se resolvió un pico mayoritario con actividad de quinasa de proteínas con una constante de sedimentación de 2.8 ± 0.3 S, como se muestra en el panel B de la Figura 27. La actividad de quinasa de proteínas de esta fracción correspondería sólo a la subunidad catalítica ya que la adición de AMPc al ensayo no modificó la actividad fosfotransferasa. Usando estos datos y como fue detallado en materiales y métodos, considerando un radio de Stokes de 2.8 ± 0.2 nm y un volumen específico parcial de alrededor de 0.74 ml/g se pudo calcular que la cPKA de *Trypanosoma cruzi* tendría un PM aproximado de 40000 ± 3000 con un coeficiente friccional f/f_0 1.3, como se resume en la Tabla 4.

1.4.2. RECONSTITUCION DE LA HOLOENZIMA DE *Trypanosoma cruzi* Y DETERMINACION DE SUS PARAMETROS HIDRODINAMICOS:

Para dar mayor apoyo a la autenticidad de esta PKA de *T.cruzi* como holoenzima y para determinar la naturaleza de su estructura cuaternaria, la subunidad catalítica del pico de 2.8 S del gradiente de sacarosa anterior fue preincubado con la preparación de rPKA de AMPc-agarosa homóloga durante 30 min a 4°C, como se detalla en materiales y métodos. Luego fueron ensayadas *in vitro* o sembradas en un gradiente de sacarosa semi-discontinuo 5 a 20 %, recuperándose tanto la actividad

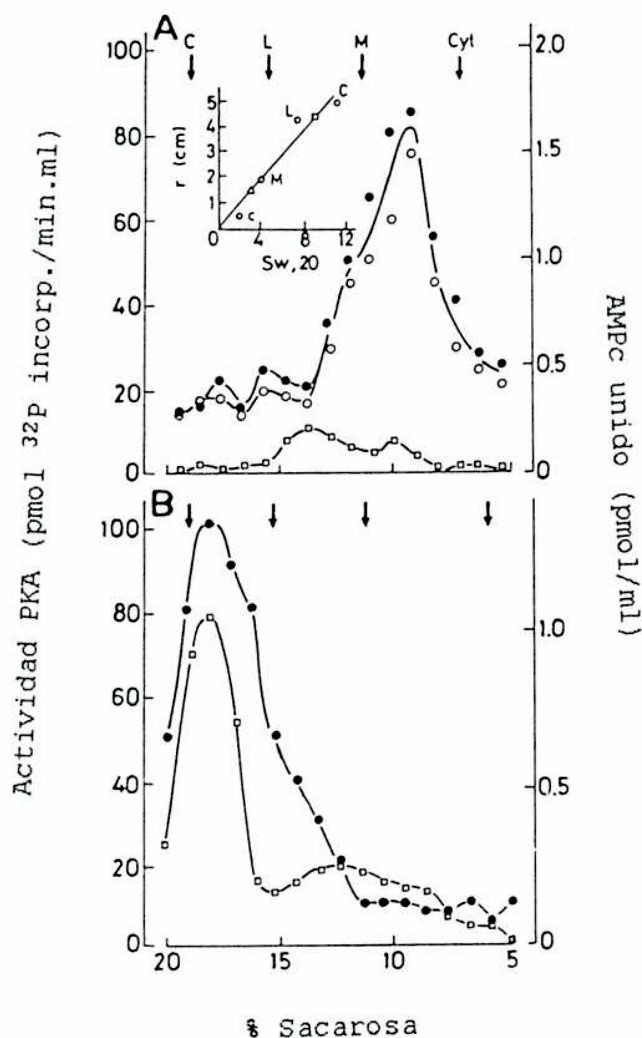


Figura 27: Centrifugación en gradiente de sacarosa de la fracción percolado de AMPc-agarosa de *T.cruzi* sola (panel A) o incubada (panel B) con rPKA de AMPc-agarosa de *T.cruzi*. Los símbolos son los mismos que en la Figura 15. Las letras C, L, M y c indican la posición en el gradiente de los marcadores Catalasa, LDH, MDH y citocromo c, respectivamente. El inserto muestra la correlación entre las movilidades a lo largo del gradiente y las constantes de sedimentación para (O) los marcadores, (□) la holoenzima PKA de *T.cruzi*, y (Δ) la cPKA de *T.cruzi*.

de quinasa de proteínas activable por AMPc como la de unión a AMPc en un único pico (Holoenzima PKA) con una constante de sedimentación de 8.6 ± 1.17 S, como se puede ver en el panel B de la Figura 27. Los resultados de la reconstitución de la holoenzima in vitro pueden verse en la Tabla 3. Estos valores, junto con el valor del radio de Stokes obtenido en el S-300 en condiciones no disociantes de 5 nm y considerando un volumen específico parcial de 0.74 mg/ml, permiten calcular un PM para la holoenzima PKA de *T.cruzi* de 200 kDa y un coeficiente friccional f/f_0 de 5.16, lo cual permite postular que la holoenzima PKA de *T.cruzi* presentaría una estructura tetramérica, similar a la de eucariotas superiores.

Subunidades de <i>T.cruzi</i>	Act.PKA (nmol/min/mg)		AMPc unido pmol/mg
	-AMPc	+ 1 μ M AMPc	
Catalítica	0.2 ± 0.016	0.18 ± 0.021	0
Catalítica + Regulatoria	0.1 ± 0.015	0.18 ± 0.018	98 ± 7.2

Tabla 3. Reconstitución homóloga in vitro de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc de *T.cruzi* usando las fracciones r_{II} PKA de AMPc-agarosa y la fracción 2.8 S recuperada del gradiente de sacarosa. La reconstitución se llevó a cabo preincubando todos los componentes (excepto el ATP[γ^{32} P]) 20 min a 0°C. Se usó kemptido 25 μ M como sustrato. Se muestran los resultados obtenidos de cuatro experimentos

1.5. CROMATOGRAFIA EN CM-CELULOSA:

La cPKA del parásito del percolado de AMPc-agarosa fue purificada a homogeneidad por cromatografía en CM-celulosa. Una fracción del percolado de la AMPc-agarosa (0.4 mg de proteína) dializada contra Buffer C, se sembró sobre una columna de CM-celulosa previamente equilibrada en dicho buffer. La columna se eluyó con un gradiente

lineal de 5-120 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ en buffer C. La actividad enzimática AMPc-independiente fue recuperada en el percolado (A en la Figura 28) junto con la mayor parte de la proteína y en un único pico (B en la Figura 28) eluido a 30 mM fosfato de sodio, llamándose a este último fracción de CM-celulosa. Alícuotas de los dos picos fueron reveladas por Western blot usando anticuerpos contra cPKA de corazón bovino. La fracción B demostró estar aparentemente purificada a homogeneidad, por tinción con plata de esta fracción cromatografiada en PAGE-SDS, y ser reconocida por los anticuerpos contra cPKA de mamíferos, como se ve en el inserto de la Figura 28.

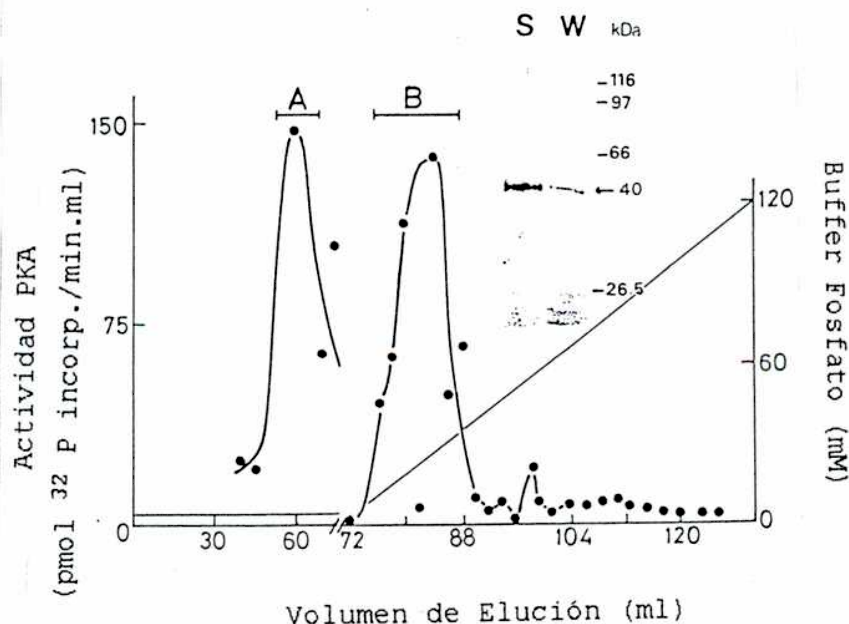


Figura 28: Cromatografía en Carboximetil-celulosa del percolado de AMPc-agarosa de *T. cruzi*. La actividad de quinasa se determinó usando como sustrato Histona IIA(-●-). La adición de 1 μM AMPc al ensayo no modificó la actividad fosfotransferasa. Los símbolos indican: (—) gradiente lineal de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ en buffer C, A fracción percolada de la columna, B pico de elución a 30 mM del buffer C fosfato. En el inserto los símbolos significan: S tinción con plata de la fracción B de esta columna, W western blot de la fracción B de esta columna revelado con anticuerpos dirigidos contra cPKA de corazón bovino, kDa son los PM de los marcadores corridos en paralelo.

2. ANALISIS DEL RENDIMIENTO Y GRADO DE PURIFICACION DE cPKA de *T.cruzi*:

En la Tabla 4 se resumen los resultados de los sucesivos pasos de purificación descritos para la subunidad cPKA de *T.cruzi*. Se logró una purificación de unas 350 veces de cPKA con una recuperación aproximada del 3 %. De todas maneras, si asumimos por los resultados obtenidos en los geles teñidos con plata que la enzima, como proteína (en vez de como actividad enzimática), pudo ser cuantitativamente recuperada luego de los procedimientos antes descritos, entonces el grado de purificación obtenido sería de 1500 veces.

Fracción	At U ^a	Ae U/mg	Purific. veces	Rendimiento %
S100	30.0	0.08	1.0	100
DEAE-cel.	4.8	1.44	18.0	16.0
Perc.AMPc-ag.	3.6	1.50	18.8	12.0
CM-celulosa	0.9	28.12	351.0	3.0

Tabla 4: Purificación de la subunidad catalítica de la quinasa de proteínas A, cPKA, de *Trypanosoma cruzi*. ^a Una unidad se define como 1 nmol de fosfato ³²P incorporado por minuto usando kemptido como sustrato.

3. DETERMINACION DE PESO MOLECULAR EN PAGE-SDS DE cPKA DE *T.cruzi*:

las fracciones más puras obtenidas de cPKA del parásito fueron sometidas a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida para confirmar los valores de PM calculados a partir de parámetros hidrodinámicos, determinados a partir de la cromatografía en Sephacryl S-300 (no mostrado, detallado en ítem 11.3 de materiales y métodos) y la centrifugación en gradientes de sacarosa. Se usaron

las fracciones correspondientes al pico de 2.8 S del gradiente de sacarosa y la fracción B de la CM-celulosa. En la Figura 29, mediante tinción con nitrato de plata, así como con Azul Brillante de Coomassie, se pudo revelar una banda mayoritaria en las fracciones purificadas de *T.cruzi* con movilidad similar a la cPKA control de corazón bovino, purificada como fue descrito en materiales y métodos.

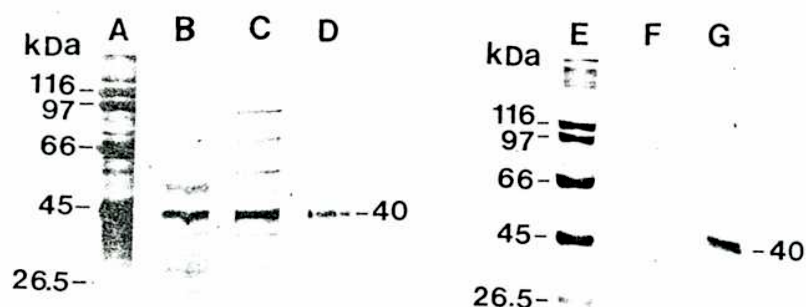


Figura 29: PAGE-SDS 10 % de las preparaciones de la subunidad catalítica cPKA de *T.cruzi* teñidas con nitrato de plata (calles A-D) o con Coomassie Blue R-250 (calles E-G) como se describe en materiales y métodos. Las letras indican: B y F 72 µg de proteína de la fracción 2.8 S del gradiente de sacarosa de *T.cruzi*, D 1 µg de la fracción B de CM-celulosa de *T.cruzi*, C y G 5 µg de cPKA purificada a partir de corazón bovino como se indica en materiales y métodos. Las calles A y E muestran los marcadores moleculares donde β-galactosidasa de *Escherichia coli* es 116 kDa, fosforilasa b de músculo esquelético de conejo es 97.4 kDa, seroalbúmina bovina es 66 kDa, ovoalbúmina es 45 kDa y triosafosfato isomerasa de músculo esquelético de conejo es 26.5 kDa.

4. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS CON ACTIVIDAD DE cPKA DE *Trypanosoma cruzi*:

Las fracciones de DEAE-celulosa y del percolado de la AMPc-agarosa de *T.cruzi*, así como también un control de cPKA de corazón bovino, fueron sometidas a inmunoprecipitación usando anticuerpos policlonal IgG purificados por afinidad contra cPKA de corazón bovino (5 µg/ml). Los complejos resultantes fueron luego sometidos a electroforesis en PAGE-SDS 7 % y posterior análisis por Western blot usando el mismo anticuerpo policlonal (1:250), como se indica en materiales y métodos. Las fracciones purificadas del parásito pudieron ser inmunoprecipitadas mostrando inmunoreactividad a nivel de una única banda específica de 40 kDa, al igual que la cPKA del control de corazón bovino, como se ve en la Figura 30.

Las preparaciones de todos los pasos de purificación y un control de cPKA de corazón bovino fueron sometidos a PAGE-SDS 10 % y posterior revelado usando la técnica de Western blot con el mismo anticuerpo arriba mencionado policlonal purificado dirigido contra cPKA de corazón bovino (1:250). La Figura 31 muestra que en todos los pasos de purificación se evidenció una banda de 40 kDa de peso molecular, de igual movilidad electroforética que el control. Es decir, la proteína purificada del parásito *T.cruzi* con actividad de cPKA y capaz de reconstituir una unidad física funcional de holoenzima, luego de ser incubada con subunidad regulatoria r_{II} PKA homóloga, presenta epitopes conformacionales conservados con la misma cPKA de mamíferos.

Figura 30: Western blot de las preparaciones purificadas de cPKA inmunoprecipitadas de corazón bovino (calle A), percolado de AMPc-agarosa de *T.cruzi* (calle B) y preparación de DEAE-celulosa de *T.cruzi* (calle C). Se indica la posición de los marcadores de peso molecular. Las condiciones de inmunoprecipitación y western blot se describen en materiales y métodos.

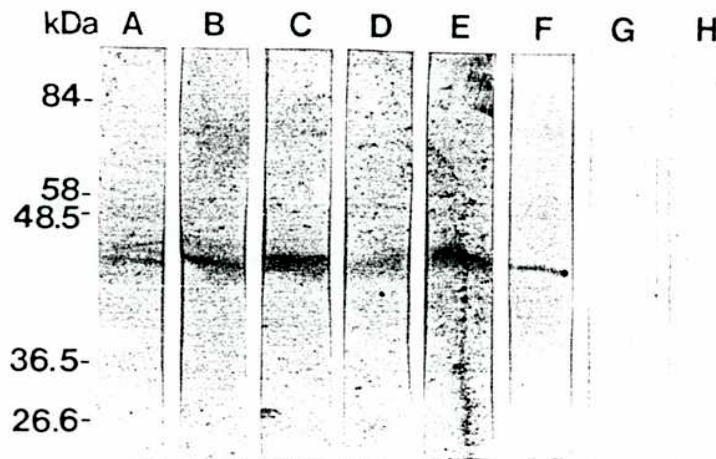
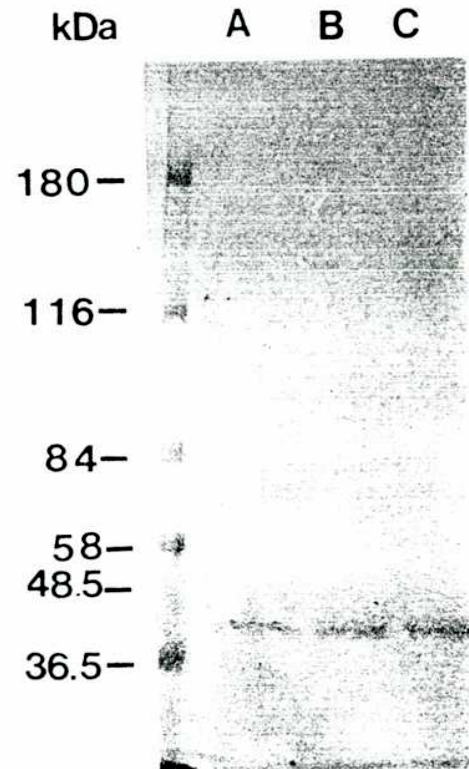


Figura 31: Western blot de todas las fracciones purificadas con actividad de cPKA de *T.cruzi*. Las letras indican: A y H preparación de DEAE-celulosa de *T.cruzi*, B es cPKA S-300 disociante de *T.cruzi*, C es el percolado de AMPc-agarosa de *T.cruzi*, D es la fracción del paso A de elución en la AMPc-agarosa de *T.cruzi*, E y G son cPKA purificada a partir de corazón bovino, F es la fracción B de la CM-celulosa de *T.cruzi*. Las calles A-F fueron reveladas con el anticuerpo policlonal purificado contra cPKA de corazón bovino. Las calles G y H fueron reveladas usando suero pre-inmune de conejo. Las condiciones se describen en materiales y métodos.

5. RESUMEN DE PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE cPKA DE *Trypanosoma cruzi*:

Las evidencias reportadas aquí indican que la subunidad catalítica de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc de *T.cruzi*, cPKA, posee parámetros moleculares e hidrodinámicos similares a los de la misma subunidad de corazón bovino. En la Tabla 5 se muestran los parámetros de cPKA de *T.cruzi* comparados con los de corazón bovino y los de otros eucariotas inferiores. La comparación de los parámetros hidrodinámicos así como los datos correspondientes a la caracterización bioquímica e inmunológica nos permiten sugerir que, al igual que la holoenzima de corazón bovino, la PKA de *Trypanosoma cruzi* como holoenzima no activada se encuentra en forma de tetramero R_2C_2 .

Fuente	$S_{w, 20}$ S	a nm	f/fo	PM kDa	Ref.
Corazón Bovino	3.6	3.0	1.1	38	[1]
<i>T.cruzi</i>	2.8	2.8	1.3	40	[2]
<i>D.discoideum</i>	2.7	2.7	1.2	33	[3]
<i>N.crassa</i>	3.8	3.0	1.2	55	[4]
<i>M.rouxii</i>	3.5	2.8	1.2	44	[5]

Tabla 5: Parámetros moleculares e hidrodinámicos de la holoenzima de PKA de *T.cruzi* comparada con la de corazón bovino y los de otros eucariotas inferiores.

- [1] Erlichman y col. (1973) *J.Biol.Chem.* 248, 7607-7609; Nigg y col. (1985) *EMBO J.* 11, 2801-2806; Sudgen y col. (1976) *Biochem.J.* 159, 409-442.
 [2] Esta tesis y Ulloa y col., 1988.
 [3] Majerfeld y col. (1984) *J.Biol.Chem.* 259, 654-661; Gunzburg y col. (1986) *EMBO J.* 2, 363-367
 [4] Glikin y col. (1982) *Mol.Cell Biochem.* 46, 121-127.
 [5] Moreno y Passeron (1980) *Arch.Biochem.Biophys.* 199, 321-330; Pastori y col. (1985) *Mol.Cell.Biochem.* 69, 55-66.

6. ESTUDIOS DE ESPECIFICIDAD Y PARAMETROS CINETICOS DE cPKA DE *Trypanosoma cruzi*:

6.1 Km PARA EL ATP:

Los requerimientos de ATP óptimos para la actividad de quinasa de proteínas sobre la subunidad catalítica de cPKA purificada de la fracción 2.8 S del gradiente de sacarosa fueron determinados usando Buffer N y 3 mg/ml Histona IIA, iniciando el ensayo con el agregado de enzima 7.6 µg/ensayo. Las condiciones de ensayo fueron seleccionadas de tal manera que la actividad enzimática tuviera una dependencia lineal con el tiempo de incubación y la concentración de enzima. Los parámetros cinéticos fueron calculados sobre los gráficos de dobles-recíprocas de Lineweaver-Burk, como se ve en la Figura 3 y se resumen en la Tabla 6.

6.2. Km PARA SUSTRATOS:

La concentración óptima del sustrato Histona IIA para la actividad de quinasa de proteínas de la subunidad catalítica de PKA purificada de la fracción 2.8 S del gradiente de sacarosa fue determinada usando Buffer E, 50 µM ATP, iniciando el ensayo con el agregado de 7.6 µg de enzima. Las condiciones de ensayo fueron seleccionadas de tal manera que la actividad enzimática tuviera una dependencia lineal con el tiempo de incubación y la concentración de enzima. Los parámetros cinéticos fueron calculados por los gráficos de dobles recíprocas de Lineweaver-Burk. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 33 y los valores cinéticos se resumen en la Tabla 6.

La concentración óptima del sustrato Kemptido para la actividad de quinasa de proteínas de la subunidad catalítica de PKA purificada de la fracción 2.8 S del gradiente de sacarosa fue determinada usando

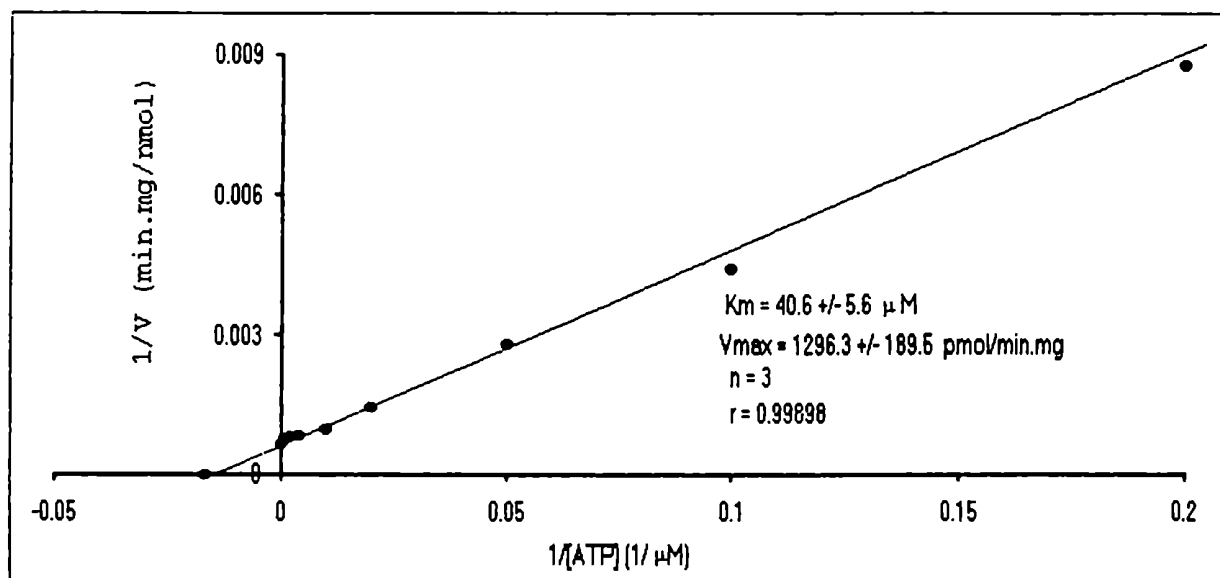


Figura 32: Actividad de cPKA de la fracción 2.8 S del gradiente de sacarosa de *T. cruzi* a diferentes concentraciones de ATP representada en un gráfico de dobles recíprocas. La enzima se ensayó con distintas concentraciones de ATP y manteniendo constantes las concentraciones del resto de los reactivos, como se indica en materiales y métodos. El inserto muestra los valores para K_m y V_{max} deducidos de la interpolación de los datos, con sus errores estándar. La curva representa valores obtenidos por triplicado para distintas preparaciones de enzima.

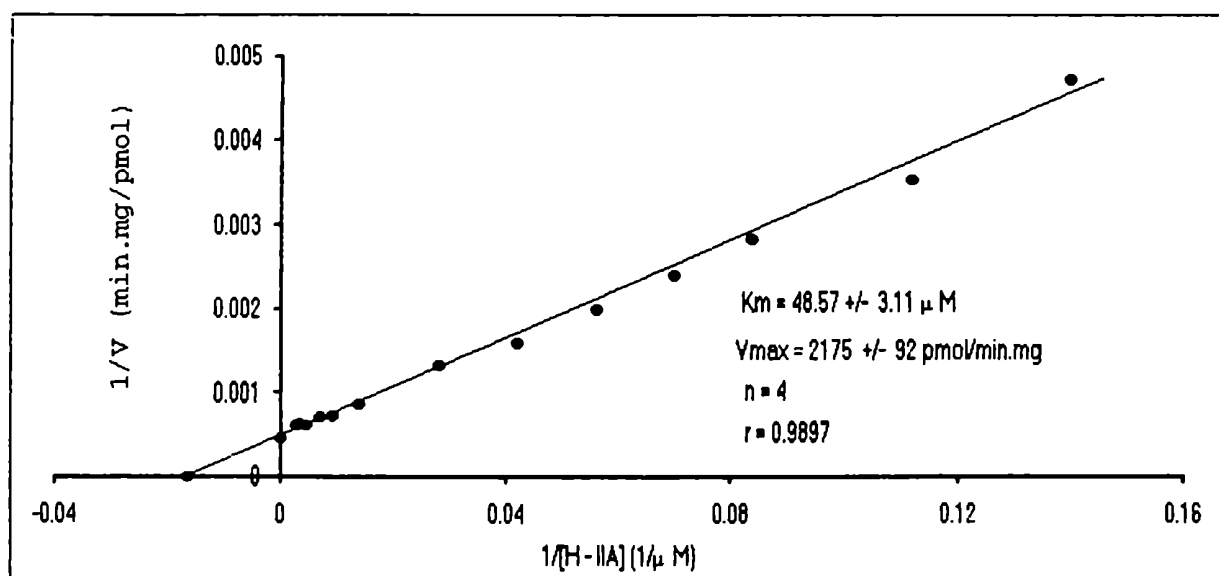


Figura 33: Actividad de cPKA de la fracción 2.8 S del gradiente de sacarosa de *T. cruzi* a diferentes concentraciones de Histona IIA representada en un gráfico de dobles recíprocos. La enzima se ensayó con distintas concentraciones de Histona IIA, manteniendo constantes las concentraciones del resto de los reactivos, como se indica en materiales y métodos. El inserto muestra los valores para K_m y V_{max} deducidos de la interpolación de los datos, con sus errores estándar. La curva representa valores obtenidos por cuadruplicado para distintas preparaciones de enzima.

Buffer E, con 50 μM ATP, iniciando el ensayo con el agregado de la enzima 7.6 μg /ensayo. Las condiciones de ensayo fueron seleccionadas de tal manera que la actividad enzimática tuviera una dependencia lineal con el tiempo de incubación y la concentración de enzima. Los parámetros cinéticos fueron calculados por los gráficos de dobles recíprocas según Lineweaver-Burk. Los resultados se ven en la Figura 34, y los valores cinéticos se resumen en la Tabla 6.

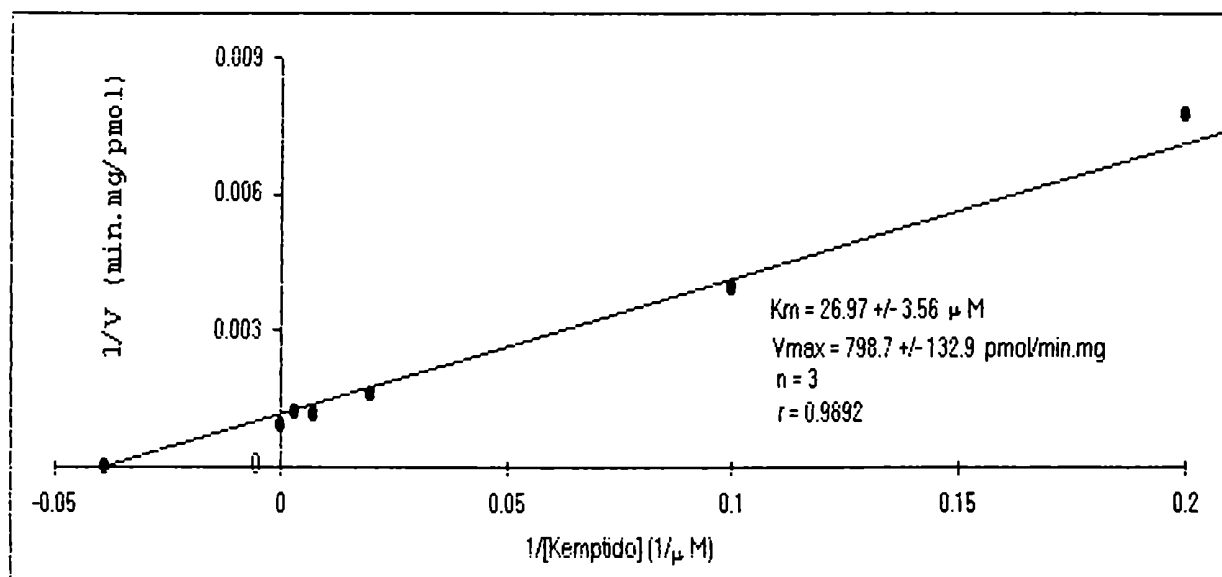


Figura 34: Actividad de cPKA de la fracción 2.8 S del gradiente de sacarosa de *T.cruzi* a diferentes concentraciones de Kemptido representada en un gráfico de dobles recíprocas. La enzima se ensayó con distintas concentraciones de Kemptido, manteniendo constantes las concentraciones del resto de los reactivos, como se indica en materiales y métodos. El inserto muestra los valores para K_m y V_{max} deducidos de la interpolación de los datos, con sus errores estándar. La curva representa valores obtenidos por cuadruplicado para distintas preparaciones de enzima.

6.3. DETERMINACION DE INHIBICION POR PKI:

Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo preincubando la fracción 2.8 S del gradiente de sacarosa de *T.cruzi* con PKI puro de músculo esquelético de conejo (PKI 1-19) o con PKI crudo de corazón bovino (PKI

de Walsh), usando como sustrato 3 mg/ml Histona IIA. Los blancos de reacción no variaron al ser realizados con H IIA en presencia o ausencia del PKI. Las condiciones de ensayo fueron seleccionadas de tal manera que la actividad enzimática tuviera una dependencia lineal con el tiempo de incubación y la concentración de enzima. Los resultados se ven en la Figura 35. El inhibidor para la quinasa de proteínas PKA de eucariotas superiores mostró una pobre capacidad inhibitoria de la actividad cPKA de *Trypanosoma cruzi*, tanto el crudo como el purificado, no mayor que un 35 % para las concentraciones ensayadas, como se resume en la Tabla 6.

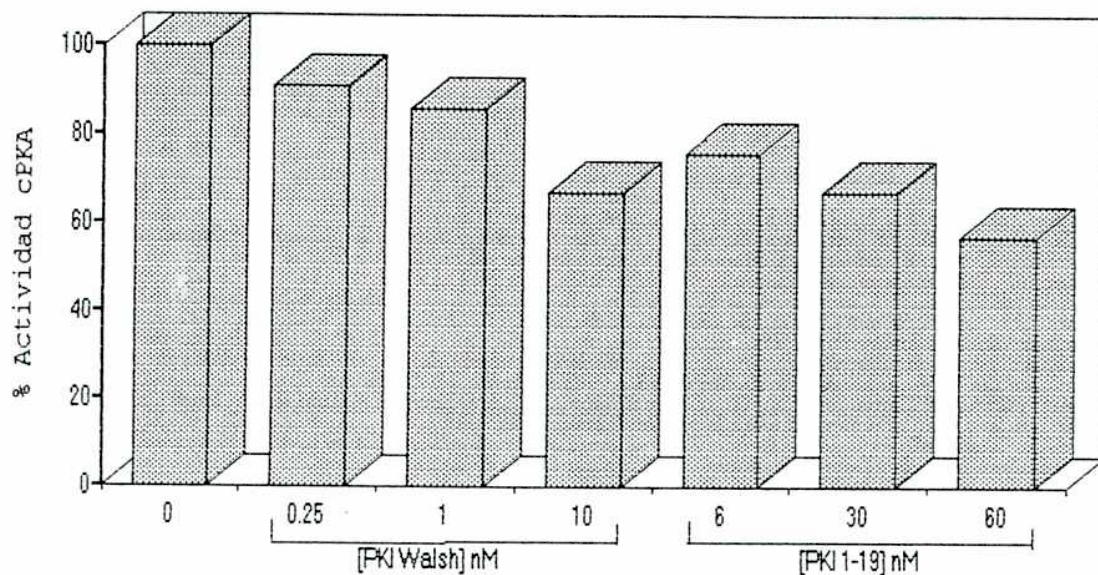


Figura 35: Actividad de cPKA de la fracción 2.8 S del gradiente de sacarosa de *T. cruzi* a diferentes concentraciones de Inhibidores de PKA de músculo esquelético PKI. La enzima se ensayó con distintas concentraciones de PKI de Walsh (0.25-10 nM) o de PKI 1-19 (6-60 nM), usando 3 mg/ml H IIA y manteniendo constantes las concentraciones del resto de los reactivos, como se indica en materiales y métodos. El histograma representa valores obtenidos por cuadruplicado para dos preparaciones de enzima.

6.4. DETERMINACION DE ESPECIFICIDAD POR NUCLEOTIDO:

Los ensayos de competicion de ATP con nucleótidos difosfato o trifosfato se llevaron a cabo con la adición de concentraciones crecientes del correspondiente nucleótido a la mezcla estandard de reacción en buffer E, que contiene 50 μM ATP, usando Histona IIA como sustrato y como fuente de enzima 7.6 μg de la fracción 2.8 S del gradiente de sacarosa de *T.cruzi*. Las condiciones de ensayo fueron seleccionadas de tal manera que la actividad enzimatica tuviera una dependencia lineal con el tiempo de incubación y la concentracion de enzima. Los resultados se ven en la Figura 36. La actividad de fosfotransferasa no fue afectada por la presencia de los nucleótidos GTP, UTP, CTP y GDP a concentraciones entre 50 y 250 μM . El nucleótido difosfato ADP ejerció cierta inhibición sobre la reacción probablemente debido a su competición con el ATP como ya fue demostrado por Whitehouse y col. (1983) para la subunidad catalítica de PKA de corazón bovino. Es decir que la enzima cPKA presenta especificidad por ATP.

7. RESUMEN DE PARAMETROS CINETICOS DE cPKA DE *T.cruzi*:

La Tabla 6 muestra un resumen de los análisis de los datos obtenidos para la subunidad catalítica de PKA purificada de *Trypanosoma cruzi*, acerca de los requerimientos de ATP y las concentraciones óptimas de Histona IIAS, Kemptido y para el inhibidor de Walsh PKI:

Alicuotas de las fracciones B de la CM-celulosa y del 2.8 S del gradiente de sacarosa de *T.cruzi* fueron transferidas a PVDF y sometidas a degradación parcial por el método de Edman. Estudios preliminares sugieren que el amino terminal estaría bloqueado.

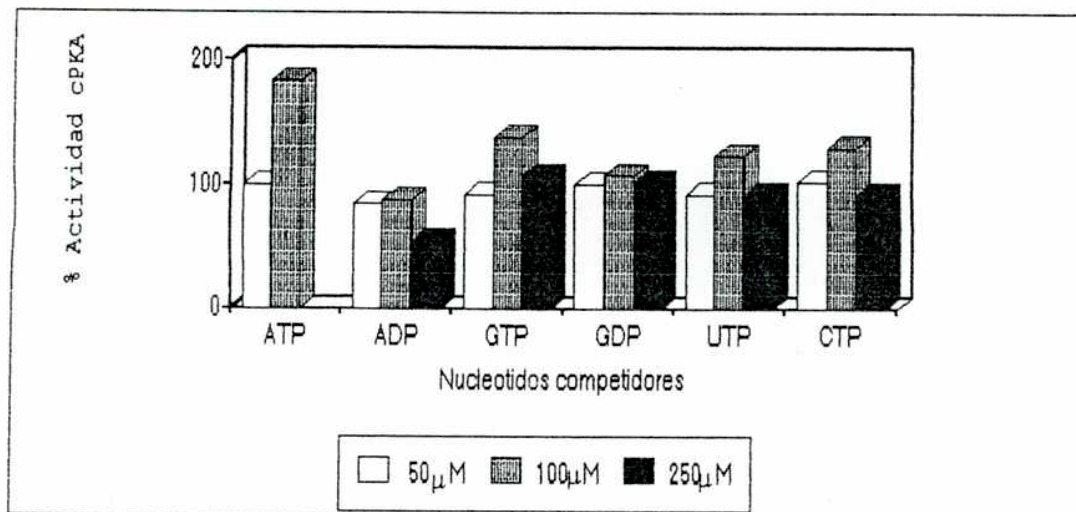


Figura 36: Efecto de los nucleótidos di y tri fosfato en la actividad de cPKA de la fracción 2.8 S del gradiente de sacarosa de *T.cruzi*. La enzima se ensayó con distintas concentraciones de ATP, ADP, GTP, GDP, UTP y CTP, usando 3 mg/ml H IIA y manteniendo constantes las concentraciones del resto de los reactivos. Todos los nucleótidos, excepto el ATP, fueron competidos contra 50 μ M ATP[γ^{32} P]. El histograma representa valores obtenidos por duplicado.

Parámetros cinéticos e hidrodinámicos	<i>T.cruzi</i>	Corazón Bovino
Peso Molecular de la subunidad (PAGE-SDS)	40.000 Da	40.000 Da
Estado de agregación nativo	monómero	monómero
Km ATP	40 μ M	7.6 μ M
Km Kemptido	25.7 μ M	4.7 μ M
Km Histone H II-AS	48.6 μ M	50 μ M
Sensible a inhibición por PKI Walsh	No	Sí
NH2-terminal modification	bloqueada	miristoilada

Tabla 6: Propiedades bioquímicas de la subunidad cPKA purificada a homogeneidad de *Trypanosoma cruzi* comparada a la de mamíferos.

Dado sus características bioquímicas se puede inferir que la subunidad catalítica de la quinasa de proteínas AMPc-dependiente de *T.cruzi* presenta sólo una divergencia limitada de la enzima de mamíferos, pudiendo esperarse que cumpla roles similares a ésta.

8. EFECTO DE LOS SEGUNDOS MENSAJEROS SOBRE LA TRANSFORMACION DE EPIMASTIGOTES DE *T.cruzi*:

Para estudiar los mecanismos por los cuales *T.cruzi* desarrolla sus transformaciones morfológicas, se hace necesario obtener patrones bioquímicos estadio-específicos, que sean constantes para aislamientos de distribución geográfica u origen de huésped distintos. En este trabajo se caracterizaron y compararon extensivamente los más importantes polipéptidos fosforilables de los cuatro distintos estadios de *T.cruzi*, E, A, TS y TM, de la cepa RA y el clon CL, por electroforesis desnaturalizantes, PAGE-SDS, teñido con Coomassie-Blue, radioautografía, densitometría laser e inmunoblotting usando anticuerpos contra PKA y PKC de eucariotas superiores.

Ya se sabía que para ciertas cepas de *T.cruzi* la estimulación de epimastigotes con estimuladores de las cascadas de transducción de señales inducía la metaciclogénesis (Gonzalez-Perdomo y col., 1988; Isola y Lammel, 1993). Para poder estudiar el rol de las quinasas de proteínas que pudieran estar activadas por segundos mensajeros, primero se reprodujeron dichos resultados de estimulación de la metaciclogénesis.

8.1. ESTIMULACION DE LA METACICLOGENESIS POR DIBUTIRIL AMPc:

Alicuotas de epimastigotes del clon CL crecidos en medio líquido con agitación se sometieron a estimulación con concentraciones crecientes de dbÅ entre 1 μ M y 1 mM, un análogo permeable de AMPc, o sin agregados y fueron crecidos en medio sin agitación a 27°C durante 12 días. El dbÅ ejerció un efecto estimulador tanto sobre el número de parásitos como sobre la metaciclogénesis respecto de los parásitos

control, como se ve en la Figura 37. Todas las concentraciones usadas de dbÅ modificaron esos parámetros en igual magnitud y mostraron diferencias significativas respecto del control. Así, pudo reproducirse una estimulación de la metaciclologénesis por el agregado de dbÅ, como había sido descrito anteriormente para la cepa Dm28c de *T.cruzi* (Gonzalez-Perdomo y col., 1988), aunque en mucho menor grado, lográndose sólo un 25 % de TM, 12 días después del agregado.

8.2. ESTIMULACION DE LA METACICLOGENESIS POR ESTERES DE FORBOL:

Alícuotas de epimastigotes del clón CL crecidos en medio líquido con agitación se sometieron a estimulación con concentraciones crecientes de PMA entre 1 nM y 10 µM o con el agregado de DMSO/Etanol (solvente del PMA), y fueron crecidos en medio sin agitación a 27°C durante 12 días. La Figura 38 muestra que el PMA estimuló la metaciclologénesis respecto de los parásitos crecidos con el medio control DMSO. Todas las concentraciones usadas de PMA modificaron esos parámetros en igual magnitud y mostraron diferencias significativas respecto del control. Más aún, la estimulación con PMA resultó ser mejor inductor de los procesos metaciclologénicos que el dbÅ. Así, pudo reproducirse la estimulación de la metaciclologénesis por el agregado de PMA obtenida por Isola y Lammel (1993) en la cepa RA de *T.cruzi* con igual rendimiento en el % de TM bajo condiciones semejantes.

9. ENSAYOS DE FOSFORILACION *In Vivo* DE LOS DISTINTOS ESTADIOS DE *T.cruzi*:

Con el objeto de estudiar la relación entre la aparición de nuevos sustratos de quinasas durante todo el ciclo del parásito y su función en la metaciclologénesis, y considerando que pudo reproducirse el efecto

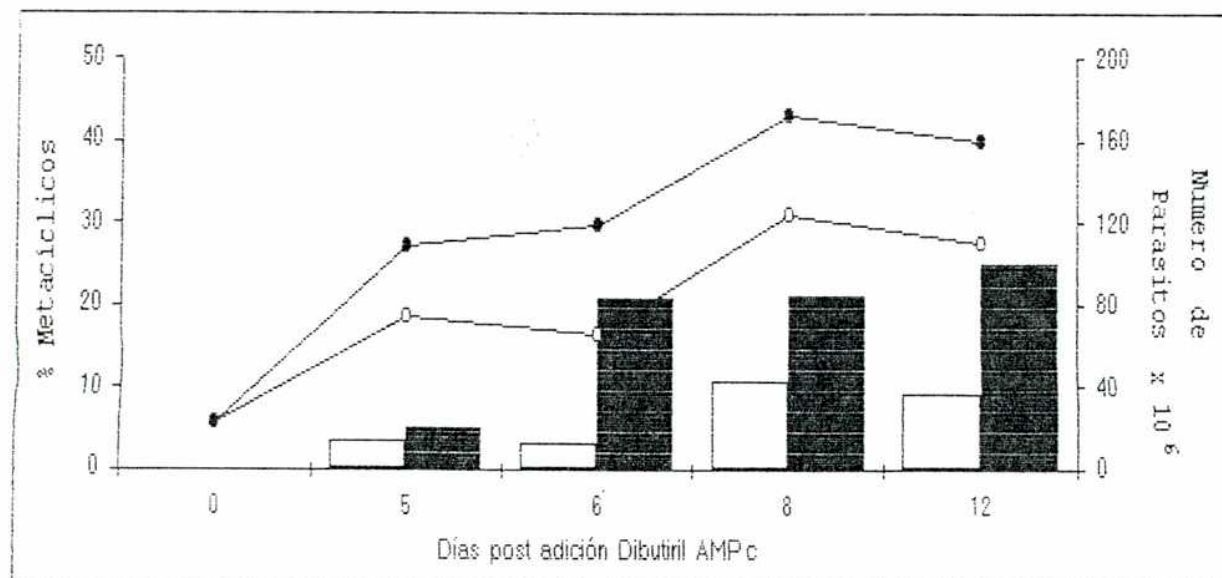


Figura 37: Estimulación de la metacicloogénesis por Dibutiril AMPc en Epimastigotes de *T. cruzi*. Los símbolos indican (-O-) número de parásitos totales en medio sin adiciones; (-●-) número de parásitos totales en medio adicionado con dbA. Las **barras negras** indican % tripomastigotes metacíclicos en medio con dbA, por conteo al microscopio óptico. Las **barras blancas** indican % de metacíclicos obtenidos en medio sin suplementos. Los resultados muestran los valores significativos obtenidos para cuatro experimentos independientes.

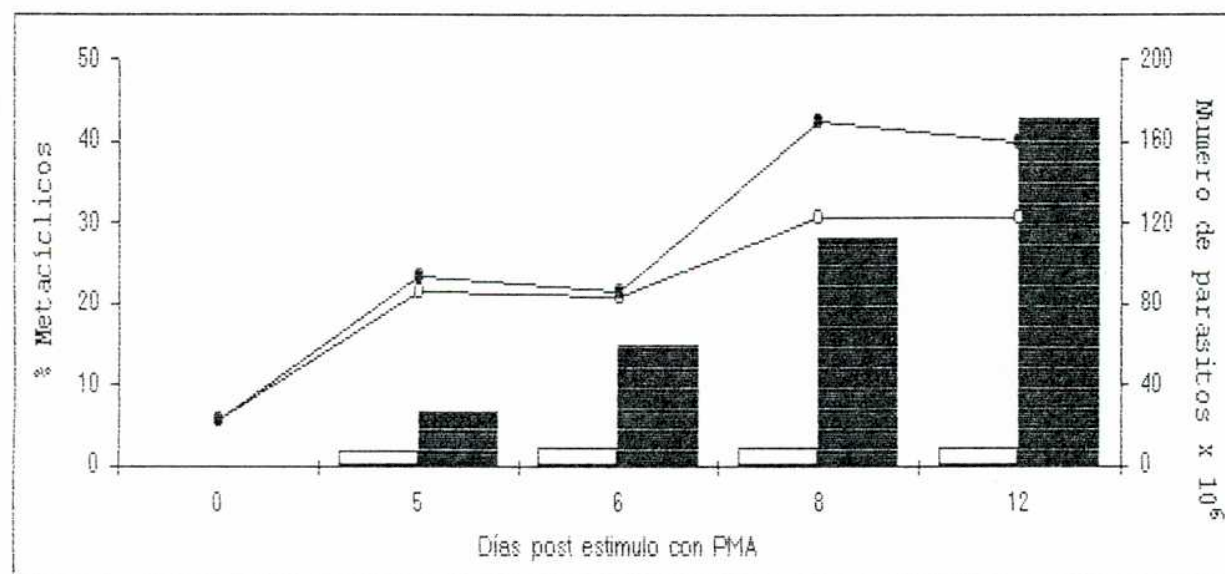


Figura 38: Estimulación de la metacicloogénesis por PMA en Epimastigotes de *T. cruzi*. Los símbolos indican (-O-) número de parásitos totales en medio sin adiciones; (-●-) número de parásitos totales en medio adicionado con PMA. Las **barras negras** indican % tripomastigotes metacíclicos en medio con PMA, por conteo al microscopio óptico. Las **barras blancas** indican % de metacíclicos obtenidos en medio sin suplementos. Los resultados muestran los valores obtenidos para cuatro experimentos independientes.

estimulador de la metaciclologénesis tanto por AMPc como por PMA, se llevaron a cabo estudios de fosforilación *in vivo* usando el método de marcación por pulso y caza con [^{32}Pi], sobre epimastigotes de las cepas CL y RA estimulados a lo largo de su crecimiento con dbÅ o PMA en distintas concentraciones, al igual que en los ensayos realizados en las Figuras 37 y 38.

Brevemente, el ensayo consistió en tomar una alícuota de los epimastigotes crecidos con las adiciones mencionadas a distintos tiempos durante la curva de crecimiento, realizar un pulso de [^{32}Pi] sobre estos parásitos resuspendidos en medio mínimo libre de fosfatos durante 30 minutos, procediéndose luego al agregado de dosis crecientes de dibutiril AMP cíclico 0.1 μM - 1 mM o del éster de forbol PMA 1 nM - 10 μM . El estímulo se frena a distintos tiempos (0 a 5 hs) por centrifugación a 2000 x g para sedimentar las células. Las condiciones experimentales elegidas consideraron la minimización de la proteólisis endógena, por lisado rápido de las células sedimentadas aún vivas en cracking buffer conteniendo inhibidores de proteasas, luego hervido por 3 min a 100°C para lisar las células, y electroforesis inmediatamente en PAGE-SDS (Téllez-Iñón y col., 1992). En todas las calles de los geles se usó la misma concentración de proteínas (50 μg). Por densitometría laser de las autoradiografías se cuantifica el porcentaje del área total marcada.

9.1. FOSFORILACIONES ESPECIFICAS DEL ESTADIO EPIMASTIGOTE (p54 Y p35):

Ensayos de fosforilación *in vivo* e *in vitro* permitieron identificar proteínas fosforilables estadio específicas. En la Figura 39 epimastigotes crecidos con los agregados dbÅ y PMA, tomados del Día 4

post-adiciones, en los que aún no se evidenciaban TM, ya mostraban variaciones en el patrón de fosforilación *in vivo*, en el rango entre 16 y 48 kDa, respecto de los parásitos con medio de crecimiento control. Los sobrenadantes obtenidos luego de la fosforilación no demostraron secretar proteínas fosforiladas (no se muestra).

En la Figura 40 puede verse que el patrón de proteínas de un lisado de parásitos del Día 4 post-estimulación no presenta diferencias respecto de cultivos adicionados, en tanto que los sobrenadantes de excreción de parásitos estimulados con dbA presentan una proteína mayoritaria de 30 kDa, que no parece tener relación con procesos de fosforilación. Los patrones de proteínas por tinción con Coomassie Blue resultan ser similares a los descriptos anteriormente para otras 12 cepas de *T.cruzi* (Rangel-Aldao y col., 1986).

Los patrones obtenidos por marcación *in vivo* pudieron ser reproducidos *in vitro* con la adición de cPKA o PKC α heterólogas para epimastigotes del clon CL y RA, como se detalla en materiales y métodos. En la Tabla 7 se resumen las proteínas fosforiladas más importantes detectables por "scanning láser" de las autorradiografías. Este tipo de análisis por scanning laser permitió asignar con mayor precisión los PM aproximados a los fosfopéptidos entre los distintos ensayos de marcación *in vivo* e *in vitro*. Fundamentalmente las membranas de epimastigotes mostraron una mayor densidad de proteínas fosforilables por el agregado de cPKA en los PM mencionados entre 16-48 kDa. En tanto que en la fosforilación con agregado de PKC α exógena se fosforilaron sustratos de más altos PM. De los resultados en la Tabla 7 se podría deducir que sólo las fosfoproteínas de PM 35 y 44 kDa serían sustratos específicos de PKA y PKC, ya que no se encuentran

fosforilados espontáneamente, y pueden ser fosforiladas por el agregado exógeno de esas quinasas con localizaciones subcelulares

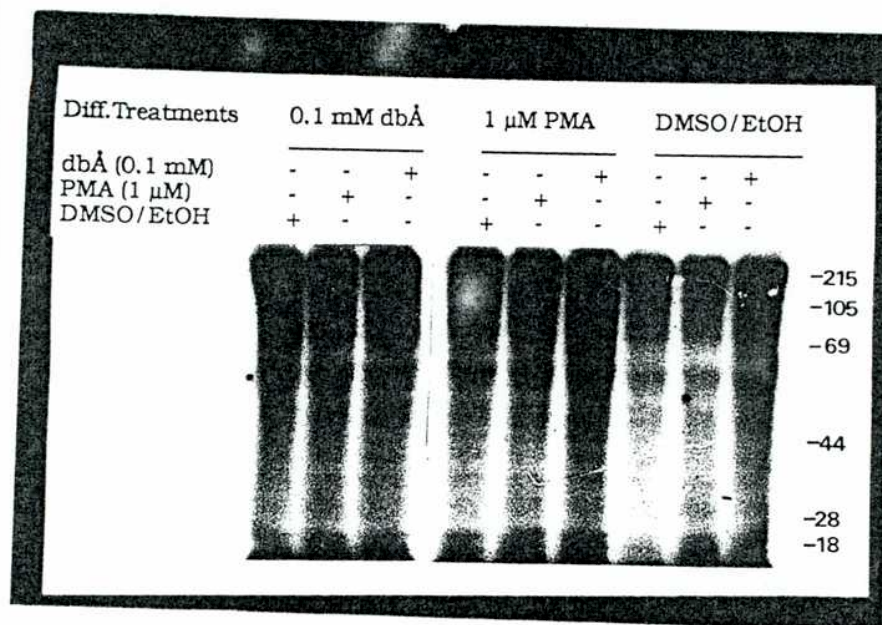


Figura 39: Aumento de la fosforilación de proteínas entre 16-48 kDa de epimastigotes crecidos en medio con PMA. Alícuotas de epimastigotes del Día 4 post-adiciones (cantidades sobre la línea) fueron fosforiladas *in vivo* volviendo a suplementar los estímulos, durante 3 hs a 27°C y como se indica en materiales y métodos, fueron lisadas y sometidas a PAGE-SDS 10 % y posterior radioautografía. Los símbolos indican (+) suplementación o no (-) del estímulo durante el ensayo de marcación. Sobre las líneas se indica el tratamiento al cual habían sido sometidos por 4 días los parásitos. A la derecha de la foto se indican los PM en kDa de marcadores moleculares corridos en paralelo. Los resultados representan los resultados obtenidos en cuatro experimentos independientes.

precisas, lo cual también ocurre en la fosforilación *in vivo* estimulada por dbA o PMA (indicadas con asteriscos en la Tabla 7). Una caracterización más detallada de estos fosfopéptidos permitirá decidir su verdadera naturaleza y rol metabólico.

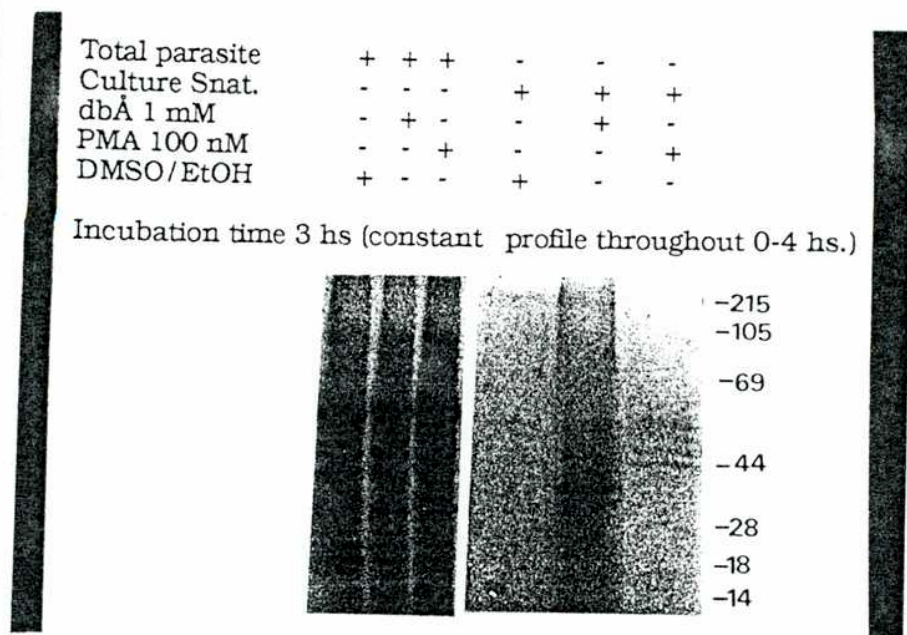


Figura 40: Conservación del patrón de proteínas totales entre epimastigotes del Día 4 no diferenciadores y los que entrarán a la metaciclologénesis con aparición de una proteína de ~30 kDa en el sobrenadante de epimastigotes crecidos en medio con dbA. Alícuotas de epimastigotes del Día 4 post-adiciones fueron fosforiladas *in vivo* volviendo a suplementar los estímulos como se indica en la figura, durante 3 hs a 27°C, fueron lisadas y sometidas a PAGE-SDS 10 % y posterior tinción con Coomassie Blue. Los símbolos son los mismos que en la Figura 39. Los resultados representan los resultados obtenidos en cuatro experimentos independientes.

9.2. FOSFORILACIONES ESPECIFICAS DEL ESTADIO TRIPOMASTIGOTE METACICLICO, TM, (p115, p98 Y p21):

Ensayos de fosforilación *in vivo* e *in vitro* permitieron identificar proteínas fosforilables específicas de tripomastigotes metacíclicos. En la Figura 41 puede verse que epimastigotes del clon CL crecidos con los agregados, tomados en el Día 6 post-adiciones, en los que ya había aproximadamente un 20 % de TM (Figuras 37 y 38), muestran cambios sustanciales en los patrones de fosforilación *in vivo*, respecto de los

parásitos con medio de crecimiento control, que siguen presentando el mismo patrón de fosforilación que se puede ver en la Figuras 37. En

PM (kDa)	Autofosforilación		Fosforilación Mediada por		
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	cPKA	PKC	
250	+		+(dbÅ)	+(Cit.PMA)	
150	-	-	+(dbÅ)	+(PMA)	
70-72	+	+(Cit.)	+(dbÅ)	+(PMA)	
54	+	+(Mem.)	+(Mem.y Cit.dbÅ)	+(Cit.PMA)	Δ
48	-		+(dbÅ)	+(PMA)	
44			+(Mem.dbÅ)	+(Cit.PMA)	**
35	-	-	+(Mem.dbÅ)	+(PMA)	**Δ
24	+	+(Mem.)	+(Mem.dbÅ)	+(PMA)	
<18	+	+(Mem.y Cit.)	+(dbÅ)	+(PMA)	

Tabla 7: Análisis cualitativo de las bandas de Fosforilaciones putativamente mediadas por PKC y por PKA en distintos stocks de Epimastigotes de *T.cruzi*. Los símbolos indican (+) presencia detectable al análisis por scanning laser de la radioautografía, (-) ausencia de banda significativamente detectable sobre el fondo. Entre paréntesis se indica si la fosforilación fue lograda con la adición de dbÅ o PMA. En los casos en que la adición de cPKA o PKCα exógena produjeron la fosforilación específica de la banda se indica su localización subcelular, como perteneciente a la fracción citosólica (Cit.) o de membrana (Mem.). Los asteriscos (**) indican fosfoproteínas con más probabilidades de ser sustratos de PKA y PKC, (Δ) fosfoproteínas estadio específicas de epimastigotes, como surge de la comparación de la Tabla 9. Los resultados representan los valores medios de cuatro experimentos.

resumen lo que ocurre es que desaparecen los fosfopéptidos de bajo PM característicos de epimastigotes y aparecen proteínas de alto PM fosforiladas difusamente.

Los patrones de fosforilación se hacen completamente nítidos en el día 8 post-adiciones. En la Figura 42 puede verse como los parásitos de Día 12 post-adiciones con un mayor % TM muestran únicamente 5 fosfopéptidos marcados de muy alto PM, mayores que 100 kDa. Así mismo puede observarse que parásitos con menores % de TM presentan patrones

más difusos, y que en la medida en que el cultivo se va enriqueciendo en las formas infectivas aparecen los fosfopéptidos típicos de alto peso.

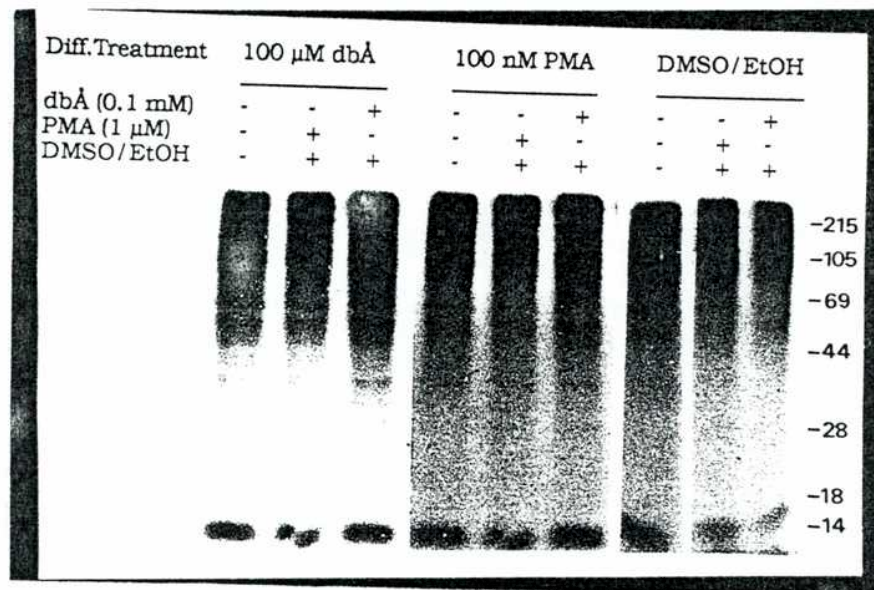


Figura 41: Pérdida de las fosfoproteínas de bajos PM y Aumento de la fosforilación de proteínas entre 100-250 kDa en Epi:TM = 80%:20%. Alícuotas de epimastigotes del Día 6 post-adiciones (cantidades sobre la línea) fueron fosforiladas *in vivo* volviendo a suplementar los estímulos, durante 3 hs a 27°C y como se indica en materiales y métodos, fueron lisadas y sometidas a PAGE-SDS 10 % y posterior radioautografía. Los símbolos son los mismos que en la Figura 39. Sobre las líneas se indica el tratamiento al cual habían sido sometidos por 6 días los parásitos. Los resultados representan los resultados obtenidos en cuatro experimentos independientes.

Tripomastigotes diferenciados espontáneamente mostraron el mismo patrón de fosforilación que los TM diferenciados por el agregado de dbA o PMA, como se ve en la Figura 43. Los niveles de fosforilación

aparecen aún más nítidos debido a un más alto porcentaje de formas metacíclicas.

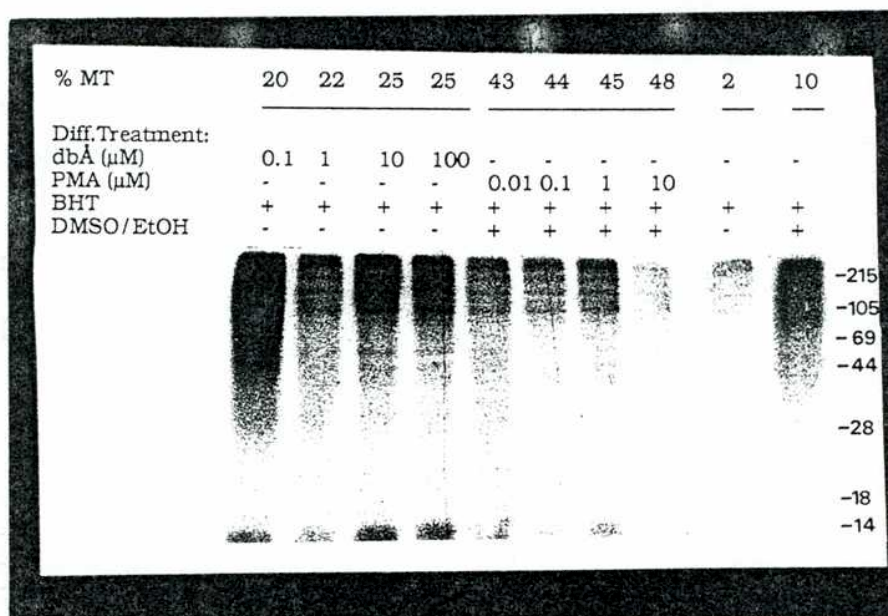


Figura 42: Aumento de la fosforilación de proteínas entre 100-250 kDa en Epi:TM = 60%:40%. Alícuotas de epimastigotes del Día 12 post-adiciones (cantidades sobre la línea) fueron fosforiladas *in vivo* volviendo a suplementar los estímulos, durante 3 hs a 27°C y como se indica en materiales y métodos, fueron lisadas y sometidas a PAGE-SDS 10 % y posterior radioautografía. Los símbolos son los mismos que en la Figura 39. Sobre las líneas se indica el tratamiento al cual habían sido sometidos por 12 días los parásitos. Los resultados representan los resultados obtenidos en cuatro experimentos independientes.

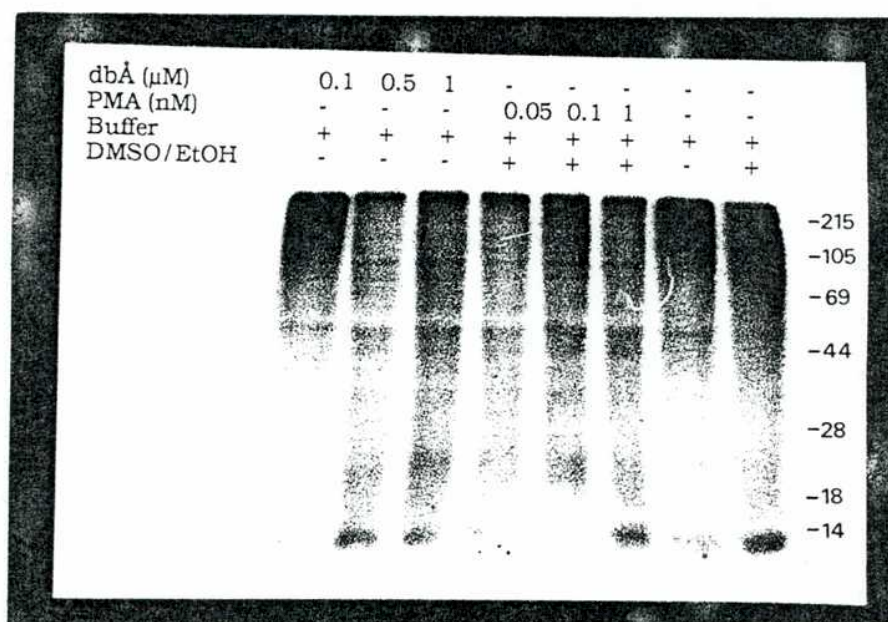


Figura 43: Fosforilación de proteínas entre 100-250 kDa en Epi:TM = 50%:50% diferenciados espontáneamente. Alícuotas de TM diferenciados espontáneamente fueron fosforiladas *in vivo* volviendo a suplementar los estímulos, durante 3 hs a 27°C y como se indica en materiales y métodos, fueron lisadas y sometidas a PAGE-SDS 10 % y posterior radioautografía. Los símbolos indican lo mismo que en la Figura 39. Los resultados representan cuatro experimentos independientes.

Los ensayos de fosforilación *in vitro* de lisados totales de TM diferenciados por agregados o espontáneamente demostraron que sólo los fosfopéptidos de bajo PM serían posibles sustratos de cPKA y PKC, como se ve en la Figura 44.

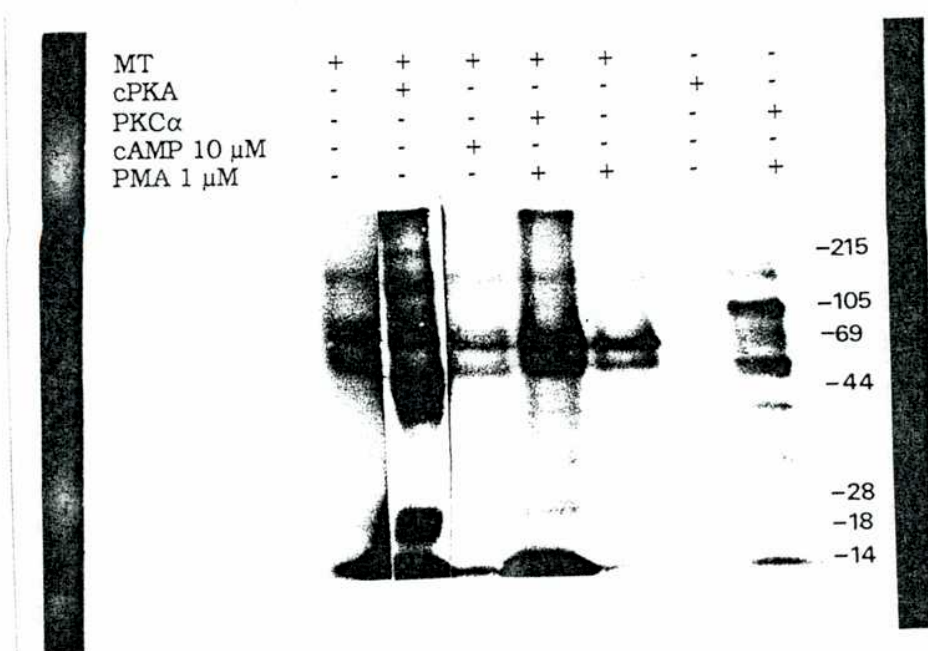


Figura 44: Fosforilación de proteínas de bajo PM p32, p34 y una de muy alto PM p 250 reguladas por PKC y cPKA en extractos totales de TM diferenciados espontáneamente. Alícuotas de extractos totales de TM fueron fosforilados *in vitro* con la adición de cPKA o PKC exógenas, o bien AMPc 10 μ M o 1 μ M PMA, como se describe en materiales y métodos y sometidos a PAGE-SDS 10%. Los símbolos indican lo mismo que la Figura 39. Los resultados representan dos experimentos independientes.

La Tabla 8 resume los resultados de los fosfopéptidos obtenidos por fosforilación *in vivo* e *in vitro* de TM. Las fosfoproteínas p115, p98 y p21 parecerían estar presentes sólo en este estadio del parásito, en tanto que sólo las p250 y p44 serían un posible sustrato regulable por cPKA, reuniendo las características de no estar fosforilado en condiciones basales, ser estimulable por dbÅ y fosforilado por el agregado exógeno de cPKA.. La p32 cumpliría los mismos requisitos pero para ambas quinasas, cPKA y PKC. Al parecer ninguna de las fosfoproteínas putativamente reguladas por PKA y PKC en este estadio tendrían que ver con la especificidad de estadio. Las 3

fosfoproteínas estadio específicas de alto PM estarían reguladas por otros mecanismos de fosforilación-defosforilación.

PM (kDa)	Autofosforilación		Fosforilación Mediada por		
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	cPKA	PKC	
250	+	-	+(dbÅ, cPKA)	+(PMA)	**
150	-	+	+(dbÅ)	+(PMA)	
115	-	-	+(dbÅ, cPKA)	+(PMA)	Δ
98	+	+	+(dbÅ, cPKA)	+(PMA, PKC)	Δ
52	+	+	+(dbÅ, cPKA)	+(PMA, PKC)	
44	-	+	+(dbÅ, cPKA)	+(PMA, PKC)	**
32	-	-	+(dbÅ, cPKA)	+(PMA, PKC)	**
21	+	-	+(dbÅ, cPKA)	+(PMA, PKC)	Δ
<16	+	+	+(dbÅ, cPKA)	+(PMA)	

Tabla 8: Análisis cualitativo de las bandas de Fosforilaciones putativamente mediadas por PKC y por PKA en distintos stocks de *Tripomastigotes Metacíclicos* de *T.cruzi*. Los símbolos indican (+) presencia detectable al análisis por scanning laser de la radioautografía, (-) ausencia de banda significativamente detectable sobre el fondo. Entre paréntesis se indica si la fosforilación fue lograda con la adición de dbÅ o PMA. Los asteriscos (**) indican fosfoproteínas con más probabilidades de ser sustratos de PKA y PKC, (Δ) fosfoproteínas estadio específicas de epimastigotes, como surge de la comparación de la Tabla 9. Los resultados representan los valores medios de tres experimentos.

9.3. AUSENCIA DE FOSFORILACIONES ESPECIFICAS Y ACTIVIDAD PKC EN AMASTIGOTES:

La Figura 45 muestra la marcación por ensayos de fosforilación *in vitro* de amastigotes de la cepa RA en donde puede verse una sola fosfoproteína marcada en condiciones basales, p 70, y que se encuentra presente en todos los estadios, salvo los TM. Una característica notable es la falta de fosfopéptidos regulables por el agregado de PKC α exógena o PMA.

En la Tabla 9 se resumen las fosfoproteínas encontradas, de las cuales todas menos la constitutivamente fosforilada p70 serían regulables por cPKA.

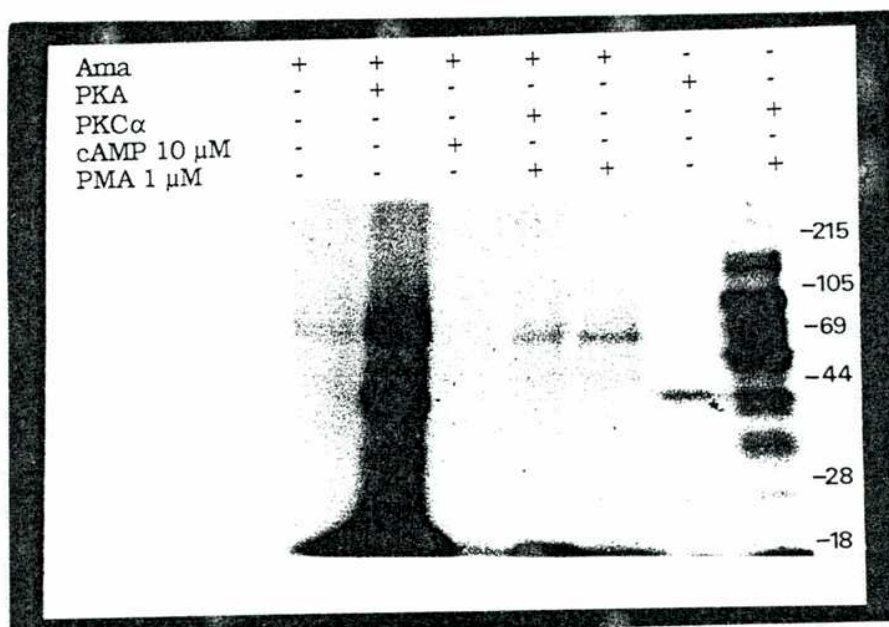


Figura 45: Fosforilación de proteínas no estadio-específicas p 24, p32, p44, p52 p85 pero regulables por cPKA en extractos totales de Amastigotes. Alícuotas de extractos totales de Amas fueron fosforilados *in vitro* con la adición de cPKA o PKC exógenas, o bien AMPc 10 μM o 1 μM PMA, como se describe en materiales y métodos y sometidos a PAGE-SDS 10%. Los símbolos indican lo mismo que en la Figura 39. Los resultados representan dos experimentos independientes.

9.4. FOSFORILACIONES ESPECIFICAS DEL ESTADIO TRIPOMASTIGOTE SANGUINEO, TS, (p98 y p21 tripomastigote-específicas):

La Figura 48 muestra los resultados de la fosforilación *in vivo* de TS extraídos de sangre de ratones infectados en el pico de parasitemia durante 2 hs a 37°C, como se explica en materiales y métodos, pudiendo observarse rangos bien definidos de fosfoproteínas. El agregado de PMA produjo la fosforilación *in vivo* de un p98 y p21 que serían

específicos de los estadios infectivos tripomastigotes. En los TS a diferencia de su contraparte TM si se encuentra el p70.

Los mismos resultados pudieron reproducirse por fosforilación *in vitro* de extractos totales de TS adicionados con cPKA o PKC α , como se ve en la Figura 47. Sin embargo, la estimulación con AMPc o PMA a los extractos lisados no lograron estimular ninguna fosforilación. Sería posible que los fosfopéptidos detectados con la adición de las enzimas purificadas no fueran sustratos

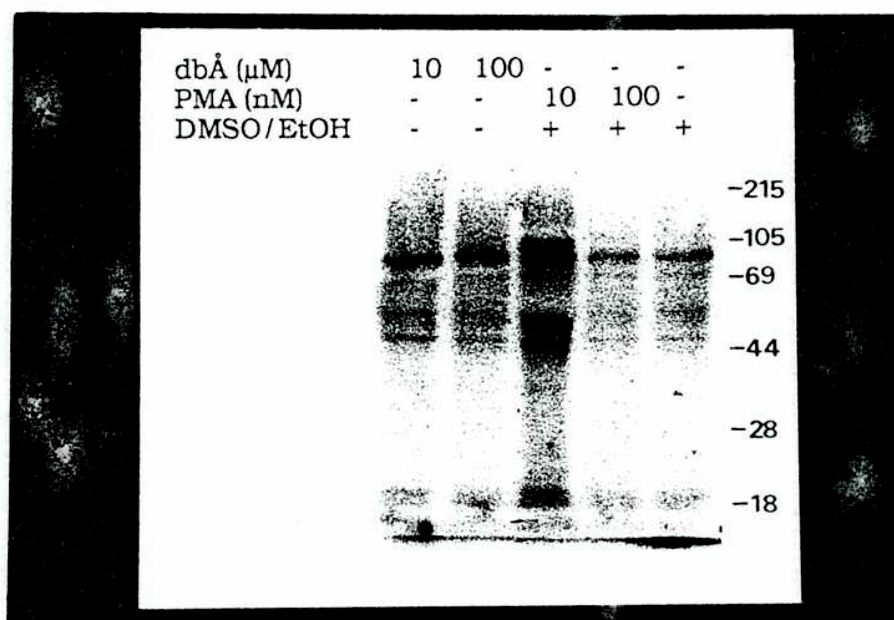


Figura 46: Fosforilación de proteínas p98 y p21 específicas de Tripomastigotes Sanguíneos. Alícuotas de TS purificados de sangre de ratones neonatales en pico de parasitemia fueron fosforiladas *in vivo* suplementadas con dbA o PMA, durante 2 hs a 27°C y como se indica en materiales y métodos, fueron lisadas y sometidas a PAGE-SDS 10 % y posterior radioautografía. Los símbolos indican lo mismo que en la Figura 39. Los resultados representan cinco experimentos independientes.

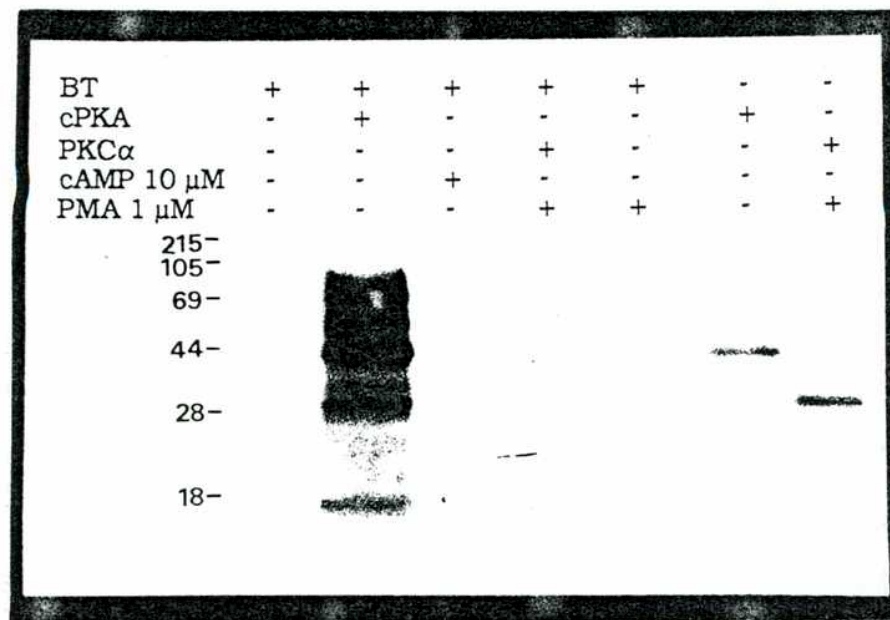


Figura 47: Fosforilación de proteínas no específicas de estadio ni regulables por cPKA y PKC en *Tripomastigotes Sanguíneos*. Extractos totales de TS purificados de sangre de ratones neonatales en pico de parasitemia fueron fosforiladas *in vitro* suplementadas con AMPc, PMA, o la adición de cPKA y PKC α purificadas, sometidas a PAGE-SDS 10 % y posterior radioautografía. Los símbolos indican lo mismo que en la Figura 39. Los resultados representan cuatro experimentos independientes.

10. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LAS QUINASAS PKA Y PKC A LO LARGO DEL CICLO DE VIDA DE *T. cruzi*:

Los resultados del análisis por Western blot acerca de la presencia de las quinasas de proteínas cPKA y PKC detectados por anti-anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina (Blake et al., 1984) en los distintos estadios del parásito revelaron que en existe una regulación estadio específica de las quinasas PKA y PKC de las cepas CL y RA de *T. cruzi*. La subunidad catalítica cPKA de la quinasa de proteínas regulable por AMPc pudo ser detectada en todos los estadios del ciclo

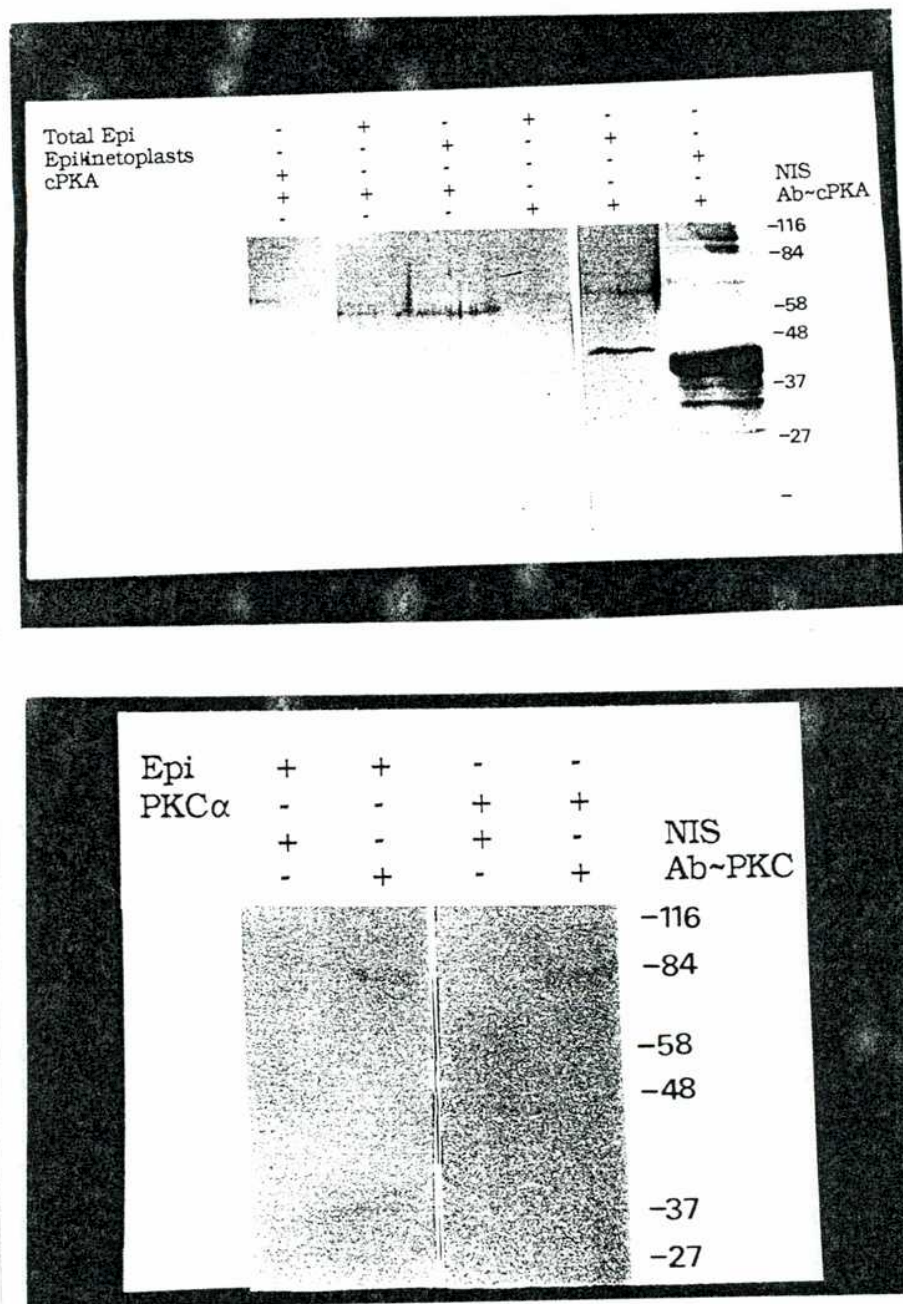


Figura 48: Presencia de cPKA y PKC α en lisados de Epimastigotes detectadas por Inmunoblot. Panel A revelado con anticuerpos policlonales IgG de conejo desarrollados contra cPKA de corazón bovino purificados por afinidad. Panel B: revelado con anticuerpos policlonales IgG de conejo dirigidos contra la isoforma PKC α de ratón. El revelado de las tiras de nitrocelulosa se realizó por anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina como se describió en materiales y métodos. Los símbolos indican (+) agregados o no (-) de los indicados. A la derecha de la foto se indican los PM en kDa de marcadores moleculares corridos en paralelo. Los resultados representan los resultados obtenidos en cuatro experimentos independientes.

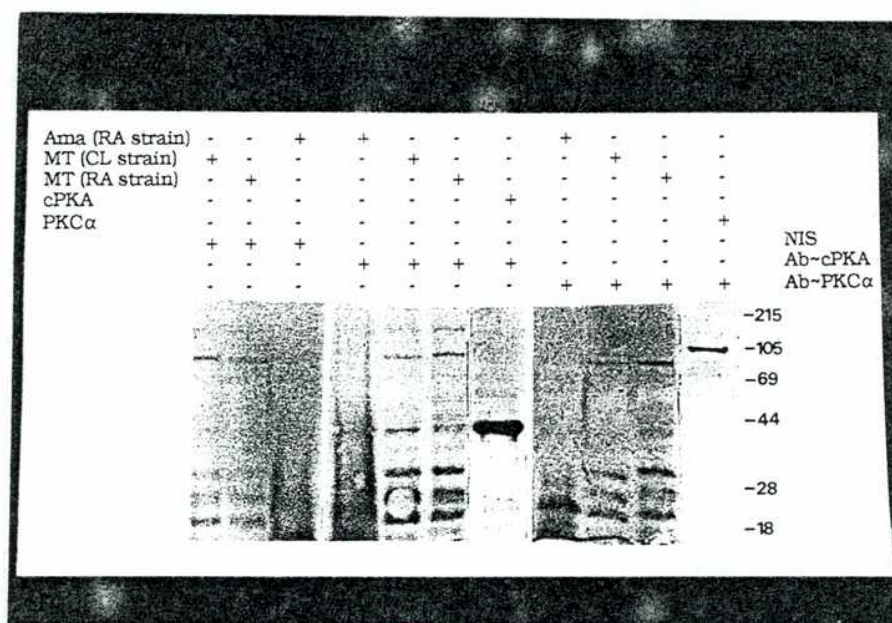


Figura 49: Presencia de cPKA pero no de PKCα en lisados de Amastigotes. Presencia de cPKA y PKCα en Tripomastigotes Metacíclicos detectadas por Inmunoblot. Para el revelado se usaron anticuerpos policlonales IgG de conejo desarrollados contra cPKA de corazón bovino purificados por afinidad, anticuerpos policlonales IgG de conejo dirigidos contra la isoforma PKCα de ratón, y sueros pre-inmunes como control negativo. Los símbolos indican lo mismo que en la Figura 47. Los resultados representan dos experimentos independientes.

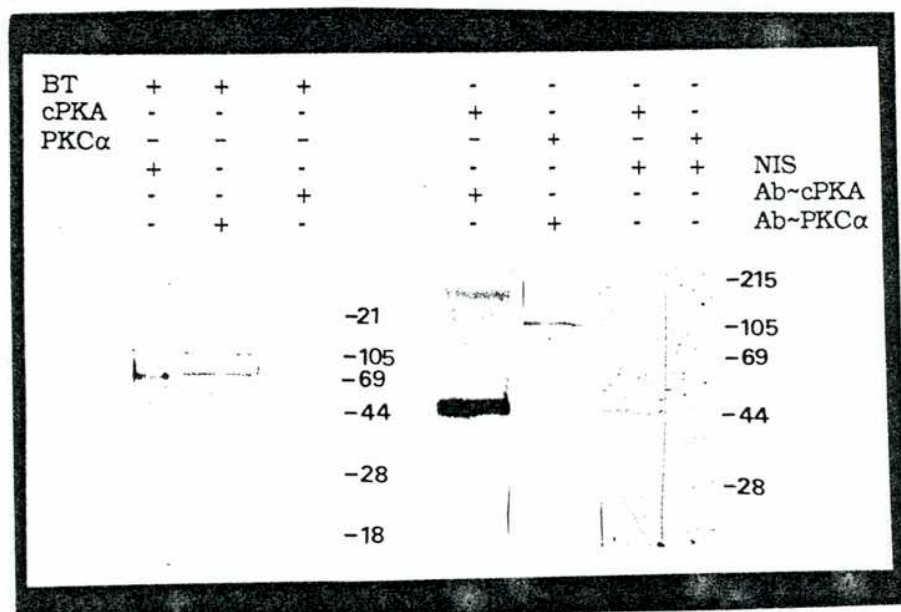


Figura 50: Presencia de cPKA y de PKCα en lisados de Tripomastigotes Sanguíneos detectadas por Inmunoblot. Para el revelado se usaron anticuerpos policlonales IgG de conejo desarrollados contra cPKA de corazón bovino purificados por afinidad, anticuerpos policlonales IgG de conejo dirigidos contra la isoforma PKCα de ratón, y sueros pre-inmunes como control negativo. Los símbolos indican lo mismo que en la Figura 49. Los resultados representan dos experimentos independientes.

de vida de *T. cruzi*, en tanto que la isoforma PKCα pudo ser detectada en formas epi y tripomastigote pero no en amastigotes, corroborando en parte resultados previos obtenidos en epimastigotes de otras cepas del parásito (Gómez y col., 1988, Ulloa y col., 1988). Las Figuras 50, 51 y 52 muestran los resultados obtenidos en los Western blot revelados

con anticuerpos contra cPKA y PKC α para los cuatro estadios de *T.cruzi*. La Tabla 10 muestra un resumen de los resultados obtenidos en los resultados de Western blot revelados contra las quinasas de proteínas PKA y PKC. Al parecer la cPKA se hallaría expresada constitutivamente en tanto que la PKC no se expresaría a niveles detectables por estos ensayos en amastigotes de *T.cruzi*. Es decir, la expresión de PKC se hallaría regulada durante el desarrollo en tanto que la expresión de cPKA sería constitutiva.

CONCLUSIONES

I- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ENDOCITICA DE MACROFAGOS INFECTADOS CON *Trypanosoma cruzi*:

I.1. IMPORTANCIA EN LA PATOGENIA DE LA INHIBICION DE LA FUSION ENTRE ENDOSOMAS TEMPRANOS EN MØ INFECTADOS CON *T.cruzi*:

Los resultados obtenidos muestran que la fusión entre endosomas tempranos está completamente inhibida en los MØ infectados con el estadio infectivo de *T.cruzi*, lo cual sería consecuencia de la interacción entre la maquinaria endocítica del MØ huésped con proteínas secretadas por el parásito. Pudo determinarse una pérdida del efecto dual del GTPγS en MØ infectados, sugiriendo la inactivación de proteínas G inhibitorias de procesos fusogénicos normales. En tanto que la regulación por proteínas G en células infectadas con *T.cruzi* se encuentra modificada en comparación a MØ normales o mock-infectados, la regulación de la fusión entre endosomas tempranos por Ca^{2+} no se ve afectada. Esta inhibición de los procesos reguladores de la endocitosis podrían ser explicados como un requisito para la supervivencia dentro del MØ, evitando el camino endocítico normal. Este tipo de inhibición deja al MØ como una célula arrestada respecto de su función consumidora de energía más importante, la endocitosis. Así, el MØ huésped se comportaría como un simple saco conteniendo una batería completa de metabolitos disponibles para los tripomastigotes durante el proceso patogénico.

I.2. IMPORTANCIA DE LA FUSION ENTRE ENDOSOMAS TEMPRANOS EN EL METABOLISMO DEL PARASITO *T.cruzi*:

Existen evidencias de que la endocitosis ocurre sólo a través del bolsillo flagelar de *T.cruzi*, en donde el citoesqueleto celular estaría ausente (Joiner y col., 1988), a través de vesículas

descubiertas de clatrina (Soares y col., 1992). Los ensayos aquí presentados permitieron probar la existencia de actividad fusogénica de endosomas tempranos mediada por proteínas citosólicas propias del parásito *T.cruzi*, análogamente a lo encontrado en otros eucariotas inferiores, como *Dictyostelium discoideum* (Lenhard y col., 1992), *Paramecium multimicronucleatum* (Allen y col., 1992), *T.brucei rhodesiense* (Brickman y Balber, 1993). Los resultados presentados permiten postular para *T.cruzi* la existencia de una maquinaria fusogénica regulada por Calcio y proteínas G, similar a las descritas en otros organismos. Esto sugiere que tanto los pasos tempranos de la maquinaria endocítica como los mecanismos reguladores de la fusión entre endosomas tempranos estarían conservados a lo largo de la evolución.

Futuros estudios permitirán conocer la identidad de los factores involucrados en la inhibición de la fusión entre endosomas tempranos en los MØ infectados así como en los procesos endocíticos propios del parásito *T.cruzi*. Ambos podrían tener que ver con una estrategia de supervivencia del parásito dentro de la célula huésped.

Estudios preliminares indican que la actividad quinasa de proteínas sobre el sustrato Histona I, tipo cdc2 quinasa, se encuentra inhibida en MØ infectados con *T.cruzi*. Otros estudios preliminares sobre el análisis de los patrones de fosforilación de MØ-TS muestran la aparición de nuevos péptidos fosforilados respecto del control sin infectar o de los parásitos solos. Datos anteriores sugieren que el éster de forbol PMA aumentaría la adhesividad de los parásitos a la célula huésped (Carvalho y de Souza, 1987). Algunos estudios muestran

que MØ-TS tratados con dosis crecientes de PMA aumentan la tasa de infectividad así como la tasa de fosforilación de una proteína endógena p150 y la de una proteína de secreción p54 exclusiva del MØ infectado. Análisis más exhaustivos permitirán determinar si estos fenómenos están involucrados en el control de la fusión de vesículas endocíticas durante y después de la invasión del parásito al MØ y si la fosforilación de proteínas puede afectar a los mecanismos fusogénicos.

II. REGULACION ESTADIO ESPECIFICA DE LA FOSFORILACION DE PROTEINAS DURANTE EL CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*:

II.1. CARACTERIZACION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA DE LA PKA DE *Trypanosoma cruzi* Y ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA HOLOENZIMA:

Trabajos previos en nuestro grupo habían demostraron la presencia de la quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico en el parásito unicelular *Trypanosoma cruzi* en su forma de holoenzima (Ulloa y col., 1988). En este trabajo se cumplieron los siguientes objetivos:

- Se purificó a homogeneidad la subunidad catalítica de la PKA, cPKA, a partir de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Se caracterizó bioquímicamente los parámetros cinéticos a la subunidad cPKA (Km para sustratos, ATP e interacción con el péptido inhibidor PKI de mamíferos).

- Se caracterizaron los parámetros hidrodinámicos de la subunidad catalítica de la PKA del parásito ($S_{w,20}$, a, PM) y compararlos con los parámetros conocidos de distintos eucariotas inferiores y superiores.

- Se caracterizó inmunológicamente a dicha proteína por análisis con anticuerpos policlonales dirigidos contra la misma subunidad de corazón bovino. Las evidencias reportadas indican que cPKA de *T.cruzi* presenta parámetros hidrodinámicos y moleculares similares a los descriptos para la misma subunidad de corazón bovino.

- La holoenzima (R_2C_2) se reconstituyó no sólo como una entidad física sino también como una entidad funcional tanto con subunidades catalítica y regulatoria homólogas (provenientes ambas del parásito) como entre subunidades heterólogas (provenientes del parásito y de corazón bovino).

Esto puso en evidencia la existencia de un sistema que puede mediar la señal de un segundo mensajero, como es el AMPc en el parásito *T.cruzi* y que hasta ahora era desconocida. El hecho de que la subunidad cPKA del parásito sea inhibida por su propio componente regulatorio así como por el de corazón bovino evidencia una conservación de la interacción entre las subunidades catalítica y regulatoria a través de la evolución eucariota. De acuerdo a Hanks y col. (1988), los dominios catalíticos de proteínas quinasas que tengan formas de regulación o especificidades de sustratos similares tienden también a tener una estructura primaria similar y a agruparse dentro del árbol filogenético.

Futuros estudios sobre la regulación transcripcional o traduccional de la expresión de esta quinasa de proteínas dependiente de AMPc o únicamente de su actividad catalítica cPKA permitirán elucidar el o los verdaderos roles que cumple dentro del metabolismo del parásito *T.cruzi*.

II.2. IMPORTANCIA DE LA FOSFORILACION DE PROTEINAS DURANTE LA DIFERENCIACION DE *T.cruzi*:

Los cambios en la bioquímica y la morfología de *T.cruzi* durante su ciclo de vida son probablemente el resultado de cambios programados en la expresión génica en respuesta a cambios en el medio externo del parásito. Se sabe que los caminos de la transducción de señales podrían estar involucrados en esos cambios en la expresión génica. Si, por analogía con otros eucariotas, la fosforilación de proteínas fuera importante para la diferenciación de *T.cruzi*, entonces la actividad de quinasas de proteínas y fosfatasa debería estar regulada

durante el desarrollo del parásito. Distintas quinasas de proteínas fueron caracterizadas en *T.cruzi*, PKA, PKC, CaM KII, cd-K (Ulloa y col., 1988; Gómez y col., 1989; Ogueta y col., 1993; Téllez-Iñón y col. 1992), sin embargo sólo fueron medidas en el estadio replicativo epimastigote. En estos estudios se determinó la existencia de fosforilaciones estadio específicas en el parásito *T.cruzi*. Dado que el ciclo de vida de este parásito puede ser reproducido *in vitro*, se midió la actividad de quinasas de proteínas por estimulaciones específicas así como su presencia por detección con anticuerpos específicos en los cuatro estadios de vida: Epi, TM, Ama y TS. Para verificar cambios en la fosforilación se usaron ensayos de fosforilación *in vivo*, un ensayo de fosforilación de sustratos endógenos *in vitro* por agregado de las quinasas cPKA y PKC α purificadas, análisis por inmunoblot con anticuerpos que reconocieran cPKA y PKC α .

Los ensayos de fosforilación demostraron que el patrón de proteínas fosforiladas estaba regulado durante el ciclo de vida de *T.cruzi*. Se detectaron cambios específicos en la fosforilación de fosfoproteínas detalladas en la Tabla 9. Los datos obtenidos demuestran que durante el ciclo de vida de *T.cruzi* existe una regulación de la fosforilación de proteínas mediada por PKA y PKC. La presencia de estas quinasas PKA y PKC a lo largo del ciclo de vida del parásito y las fosfoproteínas modificadas por ellos podrían jugar un rol significativo en el ciclo de vida del parásito o las interacciones parásito-huésped y estarían reguladas durante el ciclo de vida de *T.cruzi*, como se muestra en la Tabla 10. Es decir que la fosforilación de proteínas juega un rol importante en los caminos de transducción de señales en el parásito *Trypanosoma cruzi*.

PM (kDa)	Autosforilación				PKA				PKC				PM (kDa)
	E	TM	A	TS	E	TM	A	TS	E	TM	A	TS	
250 ----	+	+			+	+			+	+			---- 250
150 ----					+	+			+	+			---- 150
115 ----						+				+			---- 115
98		+				+				+		+	98
85 ----				+			+	+				+	---- 85
70 ----	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	---- 70
54 ----	+				+				+				---- 54
52 ----		+				+	+	+		+		+	---- 52
48 ----					+				+			+	---- 48
44 ----				+	+	+	+	+	+	+			---- 44
35 ----					+				+				---- 35
32 ----						+	+			+			---- 32
24 ----	+				+		+		+				---- 24
21		+				+		+		+		+	21
18 ----				+	+			+	+	+		+	---- 18
16 ----	+	+			+				+				---- 16
<14 ----		+				+				+			---- <14

Tabla 9: Fosfopéptidos estadio específicos y regulables por PKA y PKC durante los estadios de ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Las líneas indican: azul: fosfopéptidos específicos del estadio Epimastigote, fucsia: fosfopéptidos específicos marcadores de Tripomastigotes Metacíclicos, rojo: idem de Tripomastigotes Sanguíneos, negro: fosfopéptidos presentes en varios estadios a la vez. Las columnas de los bordes izquierdo y externo indican los PM asignados a los fosfopéptidos asignados por análisis en scanner laser luego de la comparación entre varios experimentos.

	Epi —	TM —	Ama —	TS —
PKC α	Sí	Sí	No	Sí
cPKA	Sí	Sí	Sí	Sí

Tabla 10: Expresión constitutiva de cPKA y regulada de PKC α durante el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. La Tabla resume los resultados obtenidos por Western blot usando anticuerpos específicos contra dichas quinasas de proteínas.

Estudios futuros permitirán elucidar la identidad de dichos péptidos así como el rol que juegan en los procesos morfogénicos, del metabolismo del parásito, o durante el proceso infectivo a células huésped.

BIBLIOGRAFIA

- Adroher, F.J., Lupiañez, J. y Osuna, A. (1988) *Cell Diff.* 22, 165-170.
- Ajioka, J. y Swindle, J. (1993) *Mol.Biochem.Parasitol.* 57, 127-136.
- Alhanaty, E., Patinkin, J., Tauber-Finkelstein, M. y Shaltiel, S. (1981) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78, 3492-3497.
- Allen, R.D., Schroeder, C.C. y Fok, A.K. (1992) *J.Cell Sci.* 101, 449-461.
- Alves, A.M.B, Tanuri, A., Almeida, D.F., von Krüger, W.M.A. (1993) *Exp.Parasitol.* 77, 246-253.
- Andrews, N.W., Abrams, C.K., Slatin, S.L. y Griffiths, G. (1990) *Cell* 61, 1277-1287.
- Antunes, A. y Oliveira, M.M. (1981) *Comp.Biochem.Physiol.* 70, 327-330.
- Araújo-Jorge, T.C., Sampo, E.P., de Souza, W. y Meirelles, M.N.L.(1989) *Parasitol.Res.* 75, 257-263.
- Armstrong, R.C. y Montminy, M.R. (1993) *Annu.Rev.Neurosci.* 16, 17-29.
- Balch, W.E. (1989) *J.Biol.Chem.* 264, 16965-16968.
- Banerjee, G. y Sarkar, D. (1990) *J. Gen. Microbiol.* 136, 1051-1057.
- Beeke, S.J. y Corbin, J.D. (1986) *Enzymes* 17, 43-111.
- Behnke, J.M. (1990) en "Parasites: Immunity and Pathology. The consequences of parasitic infection in mammals", Taylor & Francis, pags.16-62.
- Benaïm, G., Losada, G., Gadelha, F. y Docampo, R. (1991) *Biochem. J.* 280, 715-720.
- Benaïm, G., Szago, V. y Cornivelli, L. (1987) *Acta Cient.Venez.* 38, 289-291.
- Berg, J.M. (1990) *J.Biol.Chem.* 265, 6513-6516.
- Bloodgood, R.A. (1992) *Exp.Cell Res.* 198, 228-236.
- Blumberg, P.M. (1991) *Molec.Carcinogenesis* 4, 339-344.
- Bonaldo, M.C., Souto-Padrón, T., de Souza, W. y Goldenberg, S.(1988) *J.Cell Biol.* 106, 1349-1358.
- Boné, G.J. y Parent, G. (1963) *J.Gen.Microbiol.* 31, 261-266.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. y McCormick, F. (1991) *Nature* 349, 117-126.
- Brack, C. (1968) *Acta Trop.* 25, 289-356.
- Braell, W.M. (1987) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84, 1137-1141.
- Brener, Z. (1986) *Parasitol.Today* , 196-197
- Brenner, Z. y Chiari, E. (1965) *J.Parasitol.* 45, 215-224.
- Brickman, M.J. y Balber, A.E. (1993) *Exp.Parasitol.* 76, 329-344.

- Burgoyne, R.D. (1992) *TIBS* 17, 87-88.
- Burgoyne, R.D. y Clague, M.J. (1994) *TIBS* 19, 231-232.
- Cappai, R., Osborn, A.H., Gleeson, P.A. y Handman, E. (1993) *Mol.Biochem.Parasitol.* 62, 73-82.
- Carvalho, T.V. y de Souza, W. (1986) *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 81 (Suppl.): 71.
- Carvalho, T.V. y de Souza, W. (1987) *Parasitol.Res.* 74, 11-17.
- Castellani, O., Ribeiro, L.V. y Fernandes, J.F. (1967) *J.Protozool.* 14, 447-451.
- Cazzulo, J.J. (1984) *Comp.Biochem.Physiol* 79B (3), 309-320.
- Cazzulo, J.J., Franke de Cazzulo, B.M., Engel, J.C y Canata, J.J.B. (1985) *Mol.Biochem.Parasitol.* 16, 329-343.
- Chagas, C. (1909) *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 1, 159-218.
- Chiu, Y.S. y Tao, M. (1978) *J.Biol.Chem.* 253, 7145-7148.
- Chung, S.H., Gillespie, R.D. y Swindle, J. (1994) *Mol.Biochem.Parasitol.* 63, 95-107.
- Citri, N. y Grossowicz, N. (1955) *J.Gen.Microbiol.* 13, 273-278.
- Colombo, M.I., Mayorga, L.S., Casey, P.J. y Stahl, P.D (1992) *Science* 255, 1695-1697.
- Connelly, P., Hastings, T.G. y Reimann, E.M. (1986) *J.Biol.Chem.* 261, 2325-2330.
- Contreras, V.T., Morel., C.M. y Goldenberg, S. (1985a) *Mol.Biochem.Parasitol.* 14, 83-96.
- Contreras, V.T., Salles, J.M., Thomas, N., Morel, C.M. y Goldenberg, S. (1985b) *Mol.Biochem.Parasitol.* 16, 315-327.
- Coso, O.A., Diaz Añel, A., Martinetto, H., Muschietti, J.P., Kazanietz, M.G., Fraidenraich, D., Torres, H.N. y Flawia, M.M. (1992) *Biochem.J.* 287, 443-446.
- Crane, M.J. y Dvorak, J.A. (1982) *Mol.Biochem.Parasitol.* 5, 333-341.
- Creutz, C.E. (1981) *J.Cell Biol.* 91, 247-256.
- Creutz, C.E. (1992) *Science* 258, 924-931.
- Currie, S., Smith, G.L., Crichton, C.A., Jackson, C.G., Hallam, C. y Wakelaman, M.J.O. (1992) *J.Biol.Chem.* 267, 6056-6062.
- Das, S., Saha, A.K., Mukhopadhyay, N.K. y Glew, R.H. (1986a) *Biochem.J.* 240, 641-649.

- Das, S., Saha, A.K., Remally, A.T., Glew, R.H. Dowling, J.N., Kajiyoshi, M. y Gottlieb, M. (1986b) *Mol.Biochem.Parasitol.* 20, 143-153.
- De Castro, S.L. y Oliveira, M.M. (1987) *Comp.Biochem.Physiol.* 87C, 5-8.
- Dell, K.R. y Engel, J.N. (1994) *Mol.Biochem.Parasitol.* 64, 283-292.
- Díaz, R., Mayorga, L.S. y Stahl, P.D. (1988) *J.Biol.Chem.* 263, 6093-6100.
- Díaz, R., Mayorga, L.S., Weidman, P.J., Rothman, J.E. y Stahl, P.D. (1989) *Nature* 339, 398-400.
- Dills, W.L., Goodwin, C.D., Lincoln, T.M., Beavo, J.A., Betchel, P.J., Corbin, J.D. y Krebs, E.G. (1979) *Adv.Cyclic Nucleot.Res.* 10, 199-217.
- Diment, S., Leech, M.S. y Stahl, P.D. (1987) *J.Leuk.Biol.* 42, 485-490.
- Docampo, R., Moreno, S.N.J. y Cruz, F.S. (1988) *Mol.Biochem.Parasitol.* 27, 241-248.
- Docampo, R. y Pignataro, O.P. (1991) *Biochem. J.* 275, 407-411.
- Docampo, R. y Vercesi, A.E. (1989) *J.Biol.Chem.* 264, 108-111.
- Dolan, M.T., Reid, C.G. y Voorheis, H.P. (1986) *J.Cell Sci.* 80, 123-140.
- Draetta, G. y Beach, D. (1988) *Cell* 54, 17-26.
- Dumont, J.E., Jauniaux, J.C. y Roger, P.P. (1989) *TIBS* 14, 67-71
- Dumphy, W.G. y Newport, J.W. (1989) *Cell* 58, 181-191.
- Dusanic, D.G. (1980) *J.Parasitol.* 66, 1046-1049.
- Dvorak, J.A., Engel, J.C., Leapman, R.D., Swyt, C.R. y Pella P.A. (1988) *Mol.Biochem.Parasitol.* 31, 19-26.
- de Gunzburg, J., Franke, J., Kessin, R.H. y Véron, M. (1986) *EMBO. J.* 2, 363-367.
- Eisenschlos, C.D., Flawiá, M.M., Torruella, M. y Torres, H.N. (1986) *Biochem.J.* 236, 185.
- Engel, J.C., Franke de Cazzulo, B.M., Stoppani, A.O.M., Cannata, J.J.B. y Cazzulo, J.J. (1987) *Mol.Biochem.Parasitol.* 26, 1-10.
- Erondú, N.E. y Donelson, J.E. (1991) *Mol.Biochem.Parasitol.* 49, 303-314.
- Fernandes, J.F. y Castellani, O. (1966) *Exp.Parasitol.* 18, 195-202.
- First, E.A., Bubis, J. y Taylor, S.S. (1988) *J.Biol.Chem.* 263, 5176-5182.

- Fischer, E., Ouassi, M., Velge, P. Cornette, J. y Kazatchkine, M. (1988) *Immunol.* 65, 299.
- Fox, J.A., Duszenko, M., Ferguson, M.A.J., Low, M.G. y Cross, G.A.M. (1986) *J.Biol.Chem.* 261, 15767-15771.
- Fraidenraich, D., Peña, C., Isola, E.L., Lammel, E.M., Coso, O.A., Diaz Añel, A., Pongor, S., Baralle, F., Torres, H.N. y Flawia, M.M. (1993a) *Proc.Natl.Acad.Sci.* 90, 10140-10144.
- Fraidenraich, D., Peña, C., Isola, E.L., Lammel, E.M., Coso, O.A., Diaz Añel, A., Baralle, F., Torres, H.N. y Flawia, M.M. (1993b) *Biol.Res.* 26, 279-283.
- Frasch, A.C., Goijman, S.C., Cazzulo, J.J. y Stoppani, A.O.M. (1981) *Mol.Biochem.Parasitol.* 4, 163-170.
- Freisenwinkel, I., Reithmacher, D. y Stabel, S. (1991) *FEBS Lett.* 280, 262-266.
- Gale, M.Jr. y Parsons, M. (1993) *Mol.Biochem.Parasitol.* 59, 111-122.
- Gerace, L. y Burke, B. (1988) *Ann.Rev.Cell.Biol.* 4, 336-374.
- Glew, R.H., Saha, A.K., Dao, S., Remaley, A.T. (1988) *Microb.Reviews* 52, 412-432
- Gómez, M.L., Erijman, L., Arauzo, S. Torres, H.N y Téllez-Iñón, M.T. (1989) *Mol.Biochem.Parasitol.* 36, 101-108.
- Goncalves, M.F., Zingales, B. y Colli, W. (1980) *Mol.Biochem.Parasitol.* 1, 107-118.
- Gonzales-Perdomo, M. Romero, P. y Goldenberg, S. (1988) *Exp.Parasitol.* 66, 205-212
- Gonzalez, N.S., Sanchez, D.O., Frasc, A.C.C. y Algranati, I.D. (1984) *Mol.Cell.Biochem.* 63, 157-164.
- González, A., Rosales, J.L., Ley, V. y Díaz, C. (1990) *Mol.Biochem.Parasitol.* 40, 233-244.
- González Cappa, S.M., Bijovsky, A.T., Freilij, H., Muller, L. y Katzin, A.M. (1981) *Medicina* 41, 120-121.
- Gordon, A.H., Hart D'Arcy, P. y Young, M.R. (1980) *Nature* 286, 79-80.
- Gordon, J.I. (1990) *Clin. Res.* 38, 517-528.
- Gruenberg, J.E. y Howell, K.E. (1986) *EMBO J.* 5, 3091-3101
- Gruenberg, J.E., Griffiths, G. y Howell, K.E. (1989) *J.Cell.Biol.* 108, 1301-1316.
- Haga, T., Haga, K. y Gilman, A. (1977) *J.Biol.Chem.* 252, 5776-5785.

- Hall, C., Monfries, C., Smith, P., Lim, H.H., Kozma, R., Ahmed, S., Vanniasingham, V., Leung, T. y Lim, L. (1990) *J.Molec.Biol.* 211, 11-16.
- Hall, B.F., Furtado, G.C., Joiner, K.A. (1991) *J.Immunol.* 147, 4313-4321
- Hall, B.F., Webster, P., Ma, A.K., Joiner, K.A. y Andrews, N.W. (1992) *J.Exp.Med.* 176, 313-325.
- Hames, B.D. y Rickwood, D. (1986) *Gel electrophoresis of proteins-A practical approach*- IRL Press. Oxford, Washington, DC.
- Hancock, K. y Tsang, V.C.M. (1983) *Anal.Biochem.* 133, 157-162.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. y Hunter, T. (1988) *Science* 241, 42-52
- Hart D'arcy, P., Young, M.R., Gordon, A.H. y Sullivan, K.H. (1987) *J.Exp.Med.* 166, 933-946.
- Harth, G., Andrews, N.W., Mills, A.A., Engel, J.C., Smith, R. y McKerrow, J.H. (1993) *Mol.Biochem.Parasitol.* 58, 17-24.
- Heath, S., Hieny, S. y Sher, A. (1990) *Mol.Biochem.Parasitol.* 43, 133-142.
- Hemmings, B.A. (1986) *FEBS* 196, 126-130.
- Hemmings, H.G.Jr., Nairn, A.C., McGuinness, T.L., Haganir, R.L. y Greengard, P. (1989) *FASEB J.* 3, 1583-1592.
- Hereld, D., Hart, G.W. y Englund, P.T. (1988) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85, 8914-8918.
- Hermoso, T., Fishelson, Z., Becker, S.I., Hirschberg, K. y Jaffe, C.L. (1991) *EMBO J.* 10, 4061-4067.
- Hoare, C.A. (1972) Blackwell Scientific Publications. Oxford y Edinburgh 88, 60-80.
- Holwill y McGregor. (1976) *J.Exp.Biol.* 65, 229-242.
- Homsy, J.J., Granger, B. y Krassner, S.M. (1989) *J.Protozool.* 36, 150-153.
- Horowitz, J.A., Wasco, N., Leiser, M. y Orr, G.A. (1988) *J.Biol.Chem.* 263, 2098-2104.
- Isola, E.L.D., Lammel, E.M., Giovanniello, A.M. y Gonzalez Cappa, S.M. (1986b) *J.Parasitol.* 73, 467-469.
- Isola, E.L.D., Lammel, E.M. y Gonzalez Cappa, S.M. (1986a) *Exp. Parasitol.* 62, 329-335.
- Isola, E.L.D., Lammel, E.M. y Redruello, M. (1989) *Rev.Arg. Microbiol.* 21, 9-14.

- Isola, E.L.D., Lammel, E.M. (1993) *Medicina* 53, Supl.1.
- Johnson, R.A. y Walseth, T.F. (1979) *Adv.Cyclic Nucleot.Research* 10, 135-137.
- Joiner, K.A., Dias da Silva, W., Rimoldi, M.T., Hammer, C.H., Sher, A. y Kipnis, T.L. (1988) *J.Biol.Chem.* 263, 11327-11335.
- Kaibuchi, K., Fukumoto, Y., Oku, N., Takai, Y., Arai, K.I. y Muramatsu, M. (1989) *J.Biol.Chem.* 264, 13489-13496.
- Katz, M., Despommier, D.D. y Gwadz, R.W. (1988) en "Parastitic Diseases" 2^{da} Ed. Springer-Verlag, pag. 171.
- Keith, F., Hide, G. y Tait, A. (1990) *Mol.Biochem.Parasitol.* 430, 107-116.
- Keller, R.K. y Touster, O. (1975) *J.Biol.Chem.* 250, 4765-4769.
- Kerboeuf, D., Le Berre, A., Dedieu, J-C., Cohen, J. (1993) *EMBO J.* 12, 3385-3390.
- Kinzel, V., Hotz, A., König, N., Gagelman, M., Pyerin, W., Reed, J., Kübler, D., Hofmann, F., Obst, C., Gensheimer, H.P., Goldblatt, D. y Shaltiel, S. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 253, 341-349.
- Kloetzel, J., Camargo, M.E. y Giovannini, V.L. (1975) *J.Protozool.* 22, 259-261.
- Kmieciak, T.E. y Shalloway, D. (1987) *Cell* 49, 65-73.
- Kobierski, L.A., Chu, H.M., Tan, Y., Comb, M.J. (1991) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88, 10222-10226.
- Kornfeld, S. y Mellman, I (1989) *Annu.Rev.Cell.Biol.* 5, 483-525.
- Krassner, S.M., Chang, J., Pak, S., Luc, K-O y Granger, B. (1993) *J.Euk.Microbiol.* 40, 224-230.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) *J.Biochem.Biophys.Methods* 10, 203-209.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- Lapetina, E.G., Lacal, J.C., Reep, B.R. y Molina y Vedia, L. (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86, 3131-3134.
- Lee, D.C., Carmichael, D.F., Krebs, E.G. y McKnight, G.S. (1983) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80, 3680-3682.
- Lenhard, J.M., Kahn, R.A. y Stahl, P.D. (1992a) *J.Biol.Chem.* 267, 13047-13052.
- Lenhard, J.M., Mayorga, L.S. y Stahl, P.D. (1992) *J.Biol.Chem.* 267, 1896-1903.
- Lester, D.S., Hermoso, T. y Jaffe, C.L. (1990) *Biochem.Biophys. Acta* 1052, 293-298.

- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.H., Leedale, G.F., Loeblich, A.R.III, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vaura, J. y Wallace, F.G. (1980) *J. Protozool.* 27, 37-44.
- Ley, V., Robbins, E.S., Nussenzweig, V. y Andrews, N.W. (1990) *J. Exp. Med.* 171, 401-413.
- Low, H.P., Paulin, J. y Keith, C.H. (1992) *J. Protozool.* 39, 463-470.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lucoq, J.M., Berger, G. y Warren, G. (1989) *J. Cell. Biol.* 109, 463-474.
- Mancini, P.E. y Patton, C.L. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* 3, 19-31
- María, T.A., Alcántara, A. y Brener, Z. (1982) *Acta Trop.* 39, 99-109.
- Martin, R. y Ames, B. (1971) *J. Biol. Chem.* 236, 1372-1379.
- Mason, P.A. y Nelson, D.L. (1989) *Biochimica et Biophysica Acta* 1010, 108-115.
- Mayer, R.J. y Marshall, L.A. (1993) *FASEB J.* 7, 339-348.
- Mayorga, L.S., Díaz, R. y Stahl, P.D. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 17213-17216.
- Mayorga, L., Diaz, R. y Stahl, P. (1989c) *Methods Cell Biol.* 31, 179-196.
- Mayorga, L.S., Diaz, R. y Stahl, P.D. (1989a) *Science* 244, 1475-1477.
- Mayorga, L.S., Diaz, R., Colombo, M.I. y Stahl, P.D. (1989b) *Cell Reg.* 1, 113-124.
- Mayorga, L.S., Colombo, M.I., Lennartz, M., Brown, E.J., Hayat Rahman, K., Weiss, R., Lennon, P. y Stahl, P.D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10255-10259.
- McIntosh, J.R. y Koonce, M.P. (1989) *Science* 246, 622-628
- Meirelles, M.N.L., Araújo-Jorge, T.C., de Souza, W., Moreira, A. y Barbosa, H.S. (1987) *Cell Struct. Func.* 12, 387-393.
- Meirelles, M.N.L., Araújo-Jorge, T.C., Miranda, C.F., de Souza, W. y Barbosa, H.S. (1986) *Eur. J. Cell Biol.* 41, 198-206.
- Milder, R. y Kloetzel, J. (1979) *Parasitology* 80, 139-149.
- Mimms, C.A. (1987) Academic Press, Orlando FL, 65-91.
- Montminy, M.R. y Bilezikjian, L.M. (1987) *Nature* 328, 175-178.
- Moore, K.J., Labrecque, S. y Matlashewski, G. (1993) *J. Immunol.* 150, 4457-4465.

- Morris, S.A., Tanowitz, H., Hatcher, V., Bilezikian, J.P. y Wittner, M. (1988) *Mol.Biochem.Parasitol.* 29, 213-221.
- Morrow, C.D., Flory-Granger, B. y Krassner, S.M. (1981) *Comp. Biochem.Physiol.* 69A, 65-72.
- Mortatti, R.C. y Munck, M.E. (1985) *J.Parasitol.* 71, 520-521.
- Mukhopadhyay, N.K., Shome, K., Hassel, J.R. y Glew, R.H. (1980) *Biochem.J.* 264, 517-525.
- Nagamine, Y. y Reich, E. (1985) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82, 4606-4610.
- Nairn, A.C., Hemmings, H.C.Jr. y Greengard, P. (1985) *Ann.Rev. Biochem.* 54, 931-976.
- Natsumoto, K., Ono, I. e Ishikawa, T. (1983) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 79, 2355.
- Nishizuka, Y (1988) *Nature* 334, 661-665.
- Nogueira, N., Bianco, C. y Cohen, Z. (1975) *J.Exp.Med.* 142, 224-229.
- Nogueira, N. y Cohen, Z. (1976) *J.Exp.Med.* 142, 1402-1410.
- Norris, K.A., Bradt, B., Cooper, N.R. y So, M. (1991) *J.Immunol.* 147, 2240-2247.
- O'Daly, J.A. (1976) *J.Protozool.* 23, 577-583.
- Oates, P.J. y Touster, O. (1980) *J.Cell.Biol.* 85, 804-810.
- Ogueta, S.B., Solari, A., Cazzulo, J.J. y Téllez-Iñón, M.T. (1991) *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 86, Suppl. 1, BQ32.
- Ogueta, S.B., Solari, A. y Téllez-Iñón, M.T. (1994) *FEBS Lett.* 337, 293-297.
- Oliveira, M.M., Antunes, A. y De Mello, F.G. (1984) *Mol.Biochem. Parasitol.* 11, 283-292.
- Olivier, M., Brownsey, R.W. y Reiner, N.E. (1992) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89, 7481-7485.
- Orr, G.A., Tanowitz, H.B., Wittner, M. (1992) *Exp.Parasitol.* 74, 127-133.
- Ortega-Barria, E. y Pereira, M.E.A. (1991) *Cell* 67, 411-421.
- Osuna, A., Castanys, S., Rodriguez-Cabezas, M.N. y Gammaro, F. (1990) *Int.J.Parasitol.* 20, 673-676.
- Palmer, F.B.C. (1973) *Biochim.Biophys. Acta* 316, 296-299.
- Parsons, M., Ledbetter, J.A., Schieven, G.L., Nel, A.E. y Kanner, S.B. (1994) *Mol.Biochem.Parasitol.* 63, 69-78.
- Parsons, M., Valentine, M. y Carter, V. (1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 2656-2660.

- Parsons, M., Valentine, M., Deans, J., Schieven, G.L. y Ledbetter, J.A. (1990) *Mol.Biochem.Parasitol.* 45, 241-248.
- Paul, W.E. (1988) *Immunol.Today* 9, 366-367.
- Peters, K.A., Demaille, J.G. y Fischer, E.H. (1977) *Biochem.* 16, 5691-5696.
- Piuvezam, M.R., Russo, D.M., Burns, J.M., Skeiky, Y.A.W., Grabstein, K.H. y Reed, S.G. (1993) *J.Immunol.* 150, 916-924.
- PNUD\Banco Mundial\OMS, 1979, Acción contra las enfermedades tropicales. 2° informe anual del programa de investigaciones y enseñanza sobre las enfermedades tropicales, 15-16.
- Postan, M., Cheever, A.W., Dvorak, J.A. y McDaniel, J.P. (1986) *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 80, 50-55.
- Rangel-Aldao, R., Allende, O. y Cayama, E. (1985) *Mol.Biochem.Parasitol.* 14, 75-82.
- Rangel-Aldao, R., Allende, O., Triana, F., Piras, R., Henriquez, D. y Piras, M. (1987) *Mol.Biochem.Parasitol.* 22, 39-43.
- Rangel-Aldao, R. y Rosen, O.M. (1977) *J.Biol.Chem.* 252, 7140-7145.
- Rangel-Aldao, R., Tovar, G. y Ledezma-Ruiz, M. (1983) *J.Biol.Chem.* 258, 6979-6983.
- Rannels, S.R., Beasley, A. y Corbin, J.D. (1983) *Methods Enzymol.* 99, 55-62.
- Rapp, U.R., Heidecker, G., Huleihel, M., Cleveland Choi, W.C., Pawson, T., Ihle, J.N. y Anderson, W.B. (1988) *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* LIII, 789-798.
- Refhuss, R.P., Walton, K.M., Loriaux, M.M. y Goodman, R.H. (1991) *J.Biol.Chem.* 266, 18431-18434.
- Reimann, E.M. y Beham, R.A. (1983) *Methods Enzymol.* 99, 51-54.
- Riabowol, K.T., Fink, J.S., Gilman, M.Z., Walsh, D.A., Goodman, R.H. y Feramisco, J.R. (1988) *Nature* 336, 83-86.
- Richman, D.D., Cleveland, P.H., Oxman, M.N. y Johnson, K.M. (1982) *J.Immunol.* 128, 2300-2305.
- Rimoldi, M.T., Sher, A., Hieny, S., Lituchy, A., Hammer, C.H. y Joiner, K.A. (1988) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85, 193-197.
- Roesler, W.J., Vandenbark, G.R. y Hanson, R.W. (1988) *J.Biol.Chem.* 263, 9063-9066.
- Rondinelli, E. (1994) *Parasitol.Today* 5, 172-176.
- Roskoski, R. (1983) *Methods Enzymol.* 99, 3-6.

- Rothman, J.E. (1994) *Nature* 372, 55-63.
- Ruben, L. y Patton, C.L. *Mol. Biochem. (1985) Parasitol.* 17, 331-341.
- Ruben, L., Egwagu, C. y Patton, C.L. (1983) *Biochem.Biophys.Acta* 758, 104-113.
- Sacks, D.L. y Perkins, P.B. (1984) *Science* 223, 1417-1419.
- Sakane, F., Yamada, K., Kanoh, H. Yokoyama, C. y Tanabe, T. (1990) *Nature* 344, 345-348.
- Sarafian, T., Pradel, L-A, Henry, J-P., Aunis, D. y Bader, M-F (1991) *J.Cell Biol.* 114, 1135-1147.
- Schaap, D. de Widt, J., Van der Wal, J., Vanderkerck-Hove, J., Van Damme, J., Gussow, D., Ploegh, H.L., Van Blitterswijk, W.I. y Van der Bend, R.L. (1990) *FEBS Lett.* 275, 151-158.
- Schenkman, S., Diaz, C. y Nussenzweig, V. (1991) *Exp.Parasitol.* 72, 76-86.
- Schenkman, S., Kurosaki, T. Ravetch, J.V. y Nussenzweig, V. (1992) *J.Exp.Med.* 175, 1635-1641.
- Schenkman, S., Yoshida, N. y Cardoso de Almeida, M.L. (1988) *Mol. Biochem.Parasitol.* 29, 141-152.
- Scott, C.W. y Mumby, M.C. (1985) *J.Biol.Chem.* 260, 2274-2282.
- Segura, E.L., Engel, J.C., Katzin, V.J., Subias, E., Isola., E.D., Esteva, M., Lammel, E., Di Rissio, A.M. y Gonzalez Cappa, S.M. (1980) *Medicina* 40, 256-257.
- Sheng, M., McFadden, G., Greenberg, M.E. (1990) *Neuron* 4, 571-582.
- Sher, A., Crane, M.St.J. y Kirchhoff (1983) *J.Protozool.* 30, 278-283.
- Sher, A. y Snary, D. (1982) *Nature* 300, 639-640.
- Shoji, S., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Fischer, E.H. y Titani, K. (1983) *Biochem.* 22, 3702-3709.
- Sibley, L.D., Krahenbul, J.L., Adams, G.M.W y Weidner, E. (1986) *J.Cell Biol.* 103, 867-874.
- Siegel, L. y Monty, K. (1966) *Biochim.Biophys.Acta* 112, 346-362.
- Sikorska, M., Whitfield, J.F. y Roy Walker, P. (1988) *J.Biol.Chem.* 263, 3005-3011.
- Skeiky, Y.A.W., Benson, D.R., Parsons, M., Elkon, K.B. y Reed, S.G. (1992) *J.Exp.Med.* 176, 201-211.
- Smith, C.A. y Rennick, D.M. (1986) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83, 1857-1861.
- Snary, D. (1985) *British Med.Bull.* 41, 144-148.

- Soares, M.J., Souto-Padrón, T. y de Souza, W. (1992) *J.Cell.Sci.* 102, 157-167.
- Spiegel, A.M., Backlund, P.S., Butrynski, J.E., Jones, T.L.Z y Simonds, W.S. (1991) *TIBS* 16, 338-341.
- Stabel, S. y Parker, P.J. (1991) *Pharmac.Ther.* 51, 71-95.
- Strickles, J.E. y Patton, C.L. (1975) *Science* 190, 1110-1112.
- Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J.A., Heuser, J.E. y Andrews, N.W. (1992) *Cell* 71, 1117-1130.
- Tash, J.S., Welsh, M.J. y Means, A.R. (1980) *Cell* 21, 57-65.
- Taylor, S.S., Bubis, J., Toner-Webb, J., Saraswat, L.D., First, E.A., Buechter, J.A., Knighten, D.R. y Sowadski, J. (1988) *FASEB J.* 2, 2677-2685.
- Teixeira, M.L. y Dvorak, J.A. (1985) *J.Protozool.* 32, 339-343.
- Tellez-Iñón, M.T., Ochatt, C.M., Wilkowsky, S., Lammel, E., Isola, E., Mayorga, L.S. y Torres, H.N. (1993) *FASEB J.* 7, A1249.
- Tellez-Iñón, M.T., Ulloa, R.M., Ochatt, C.M. y Ogueta, S.B. (1993) *Santiago Southern Summer Symposia*, 22-23.
- Téllez-Iñón, M.T., Ulloa, R.M., Glikin, G.C. y Torres, H.N. (1985) *Biochem.J.* 232, 425-430.
- Téllez-Iñón, M.T., Ulloa, R.M., Torruella, M. y Torres, H.N. (1985) *Mol.Biochem.Parasitol.* 17, 143-153.
- Thilo, L. y Vogel, G. (1985) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77, 1015-1019.
- Tibayrenc, M. y Ayala, F.J. (1988) *Evolution* 42, 277-292.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. y Wigler, M. (1987) *Cell* 50, 277-287.
- Toner-Webb, J. y Taylor, S.S. (1987) *Biochemistry* 26, 7371-7378.
- Torruella, M., Flawiá, M.M., Eisenschlos, C., Molina y Vedia, L., Rubinstein, C. y Torres, H.N. (1986) *Biochem. J.* 234, 145-150.
- Tschudi, C. y Ullu, E. (1988) *EMBO J.* 7, 455-463.
- Tschudi, C., Young, A.S., Ruben, L., Patton, C.L. y Richards, F.F. (1985) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82, 3998-4002.
- Tuomikoski, T., Felix, M.A., Dorée, M. y Gruenberg, J. (1989) *Nature* 342, 942-945.
- Ucros, H., Granger, B. y Krassner, S.M. (1983) *Trans.R.Soc.Trop. Med.Hyg.* 76, 300-303.
- Uhler, M.D., Carmichael, D.F., Lee, D.C., Chrurp, J.C., Krebs, E.G. y McKnight, G.S. (1986a) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83, 1300-1304.

- Uhler, M.D., Chrivia, J.C. y McKnight, G.S. (1986b) *J.Biol.Chem.* 261, 15360-15363.
- Ulisses de Carvalho, T.M. y de Souza, W. (1989) *Cell Struc.Func.* 14, 383-392.
- Ulloa, R.M., Mesri, E., Esteva, M., Torres, H.N. y Téllez-Iñón, M.T. (1988) *Biochem.J.* 255, 319-326.
- Ulloa, R.M., Torres, H.N., Esteva, M. y Tellez-Iñón, M.T. (1986) *Mem. Inst.Oswaldo Cruz, suppl.* 81, BQ32.
- Vannier-Santos, M.A., Pimenta, P.F.P. y de Souza, W. (1988) *J.Submicrosc.Cytol.Pathol.* 20, 583-593.
- Voorheis, P.H. y Martin, R.B. (1982) *Eur.J.Biochem.* 123, 371-376.
- Walter, R.D. (1980) *Mol.Biochem.Parasitol.* 1, 139-142
- Walter, R.D. (1974) *Hoppe-Seyler's, Z.Physiol.Chem.* 355, 1443-1450.
- Walter, R.D. (1978) *Hoppe Seyler's, Z.Physiol.Chem.* 359, 607-612.
- Walter, R.D. y Oppendoes, F.R. (1982) *Mol.Biochem.Parasitol.* 6, 287-295
- Walter, R.D., Buse, E. y Ebert, F. (1978) *Tropen.Med.Parasitol.* 29, 439-442.
- Walton, G.N. y Gill, G.N. (1981) *J.Biol.Chem.* 256, 1681-1688
- Warren, G. (1985) *Trends Biochem.Sci.* 503, 439-443.
- Wirth, J.J. y Kierszenbaum, F. (1982) *J.Immunol.* 129, 2759-2762.
- Woffendin, C., Chambers, T.C., Schaller, K.L., Leichtling, B.H. y Rickenberg, H.V. (1986) *Dev. Biol.* 115, 1-8.
- Wood, D.E. y Pipkin, C.A. (1969) *Exp.Parasitol.* 24, 176-183.
- Woodman, P.G., Mundy, D.I., Cohen, P. y Warren, G. (1992) *J.Cell.Biol.* 116, 331-338.
- Wynne de Martini, G.J., Abramo Obrego, L., De Rissio, A.M., Alvarez, M. y Mujica, L.P. (1980) *Medicina* 40, 109-114.
- Yakubu, M.A., Majumder, S. y Kierszenbaum, F. (1994) *Mol.Biochem.Parasitol.* 66, 119-125.
- Yamamoto, K.K., Gonzales, G.A., Biggs, W.H. y Montminy, M.R. (1988) *Nature* 334, 494-498.
- Young, S., Parker, P.J., Ullrich, A. y Stabel, S. (1987) *Biochem.J.* 244, 775-779.
- Zick, Y., Sagi-Eisenberg, R., Pines, M., Gierschick, P. y Spiegel, A.M. (1986) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83, 9294-9297.
- Zingales, B., Carniol, C., Abrahamsohn, P.A. y Colli, W. (1979) *Biochem.Biophys.Acta* 550, 233-244.

B. Coll. W. 198
M. J. Kuret. O. Camero

APENDICE

Trabajos realizados durante el período como tesista

- "Ca²⁺-Calmodulin-dependent protein kinase activity in the Ascomycetes *Neurospora crassa*". Ulloa, R.M.; Torres, H.N.; Ochatt, C.M. & Tellez-Iñón, M.T. (1991) *Mol.Cell.Biochem* 102, 155-163.

- "Characterization of the *Trypanosoma cruzi* catalytic subunit of the cyclic AMP dependent protein kinase". Ochatt, C.M.; Ulloa, R.M.; Torres, H.N. & Téllez-Iñón, M.T. (1993) *Mol.Biochem.Parasitol.* 57, 73-81.

"Early endocytic process of *Trypanosoma cruzi* in macrophages". Tellez-Iñón, M.T., Ochatt, C.M., Wilkowsky, S., Lammel, E., Isola, E., Mayorga, L.S. & Torres, H.N. (1993) *FASEB J.* 7, A1249.

- "Inhibition of Early endocytic process *Trypanosoma cruzi* infected macrophages". Ochatt, C.M., Mayorga, L.S., Lammel, E., Isola, E., Wilkowsky, S., Téllez-Iñón, M.T. & Torres, H.N. (1994) Enviado.

- "Stage-Specific Phosphorylations in the parasite *Trypanosoma cruzi*". Ochatt, C.M., Isola, E., Lammel, E., Wilkowsky, S., Téllez-Iñón. En preparación.



Lic. Claudia Margarita Ochatt



Dra. María Teresa Téllez-Iñón

Director de Tesis

y

Consejera de estudios