

Tesis de Posgrado

Estudio de aspectos estructurales y propiedades antigenicas de la cistein proteinasa principal (cruzipaina) de Trypanosoma cruzi

Martinez, Javier Augusto

1995

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

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

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

Cita tipo APA:

Martinez, Javier Augusto. (1995). Estudio de aspectos estructurales y propiedades antigenicas de la cistein proteinasa principal (cruzipaina) de Trypanosoma cruzi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2703_Martinez.pdf

Cita tipo Chicago:

Martinez, Javier Augusto. "Estudio de aspectos estructurales y propiedades antigenicas de la cistein proteinasa principal (cruzipaina) de Trypanosoma cruzi". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2703_Martinez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ESTUDIO DE ASPECTOS ESTRUCTURALES
Y PROPIEDADES ANTIGENICAS
DE LA CISTEIN PROTEINASA PRINCIPAL
(CRUZIPAINA)
DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

Autor: JAVIER AUGUSTO MARTINEZ

Director: JUAN JOSE CAZZULO

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
"LUIS FEDERICO LELOIR", FUNDACION CAMPOMAR**

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
(ORIENTACION CIENCIAS QUIMICAS)**

1995

Tesis
Nº 2703

42



I am a biologist, a molecular biologist, I have wanted to understand the nature of *life*, the extraordinary properties of living organisms, and their abilities to grow in a patterned way, to act in a seemingly purposeful manner, to reproduce themselves faithfully and yet to change, to evolve, gradually over myriads of generations. It has been my extraordinary fortune to live in the greatest period thus far in the history of biological science (perhaps it will be seen as the greatest period ever): the era when the machinery of life became evident, when enzymes and genes and viruses became tangible, when subcellular structures, fibers, particles, channels, and vesicles emerged discretely from the obscurity of "protoplasm." During my lifetime, our understanding of the nature of life has advanced incomparably, and it has been my privilege to participate in that achievement.

Robert L. Sinsheimer, in "The strands of a life. The Science of DNA and the Art of Education."

a mis padres
a mi abuelo Yayo

A MODO DE AGRADECIMIENTO...

A fines de 1987, cursando el cuarto año de la licenciatura en Ciencias Biológicas, pensé que era hora de aprender a trabajar en investigación. Así conocí al Dr. Cazzulo, en el ahora ex-edificio de la Fundación Campomar de la calle Obligado.

Recuerdo que en aquellos momentos el ingreso al Instituto de Investigaciones Bioquímicas para efectuar pasantías o seminarios de licenciatura no era usual. Por aquel temprano permiso, y por haberme permitido continuar los estudios de Doctorado, quiero expresar mi agradecimiento a la Comisión Directiva de la Fundación Campomar y a la Universidad de Buenos Aires, por la adjudicación de las Becas de Estudiantes y de Graduados, que me dieron sustento económico durante este período.

Continuando con la historia, el Dr. Cazzulo me admitió en su laboratorio para colaborar en los experimentos y para aportar alguna que otra idea.... Para ser sincero, dicha colaboración también incluyó la destrucción organizada de material de vidrio y otras cosas!

Como final de una etapa de trabajo y aprendizaje, quiero agradecerle su interminable paciencia y destacar su inteligencia y capacidad de trabajo. Más importante aún, el Dr. Cazzulo ha demostrado (no sólo a mi) ser un excelente ser humano.

Gracias, Doctor, por todo este tiempo de trabajo, esfuerzo y amistad.

El Dr. Alberto Carlos Frasch ha sido mi co-director de Beca, brindándome siempre su atención y su trato cordial.

Va aquí mi agradecimiento por haberme permitido trabajar en su laboratorio y por sus consejos y enseñanzas en su área específica: la biología molecular.

En el año 1992 conocí al que sería "mi tercer director": el Dr. Ulf Pettersson, Jefe del Departamento de Medicina Genética del Biomedical Center, Universidad de Uppsala. El Dr. Pettersson ha sido muy gentil y

amable conmigo y con todos los argentinos que trabajaron en su laboratorio. En especial le agradezco su disposición para la discusión de los avances en mis trabajos, pese a su "agenda siempre urgente".

Junto al Dr. Cazzulo conocí a su esposa, la Dra. Berta Franke de Cazzulo, a quien agradezco toda la compañía y ayuda que me brindó, especialmente en el manejo de los parásitos. Se que alguna que otra vez (las +) use sus pipeteros... o dejé algo sucio... pero fue hace tiempo. Se habrá olvidado? Perdón...

Lilian Nehlin: Lili, esta tesis es también para vos, con ejemplar incluido! Sabés que mucho de lo que aquí se escribe te lo debo a vos, por todo el amor que me diste y por tu dedicación para convertirme en sueco "por adopción". Como una muestra, aquí están los trypanosomas tan lindos que pintaste con acuarelas y que ilustran este trabajo...gracias!

A mis amigos de siempre, Mirtha Brignoni y Sergio Iglesias, por todo su apoyo en la ciencia y en la VIDA. Aún sin compartir un laboratorio, o trabajando en otro lado, son esas grandes amistades...

A Patricia Barderi y Fernán Agüero, por su amistad. Mejor dicho, por su AMISTAD, porque los llevo bien adentro. Cómo agradecerles cuánto me ayudaron en los momentos de soledad en el "norte"? Y los faxes, los regalos, y su presencia, siempre y ante todo.

A mis amigos del Instituto, con los que compartí y comparto muchos momentos de charla y trabajo: María Laura Cremona, Marcelo Guerín, Fabiana Fernández, Dr. Manuel García Patrone, Karin Hagelin y Marcelo Sousa.

A mis compañeros del laboratorio... son muchos: del 302 (el mío), Cristina Cazzulo, Vilma Duschak, Carlos Labriola, Juan Mucci, Denise Muñoz y Liliana Sferco; del 112, Carlos Buscaglia, Oscar Campetella, Javier Di Noia, Susana Leguizamón, Roberto Macina, Guido Pollevick,

Beatríz Reyes y Daniel Sanchez. Y de otros laboratorios, Cristina Bertinetti, Carolina Ceriani, Sandra Fanchiotti, Alejandra Guerchikoff, Federico Katzen, Silvana Merello, Verónica Pascuchelli, Alejandro Rabossi, Marcelo Rodriguez, Roberto Rodriguez Suarez (Totó), Andrea Rostchild, Sergio Trombetta y Pablo Wappner.

A mis compañeros del Laboratorio de Parásitos del Departamento de Medicina Genética: Jan Henriksson, con quien he forjado una amistad en idioma neutral (!) en el laboratorio y fuera de él, como las escapadas al lago durante algunos tórridos mediodías del verano y las noches del Mundial (oioioioi!!!). María Rydaker, una excelente y bondadosa persona, que siempre me ayudó de una u otra manera. Y otro argentino, Esteban Bontempi, del Instituto Fatale Chabén, con el que compartí muchos momentos en el laboratorio. Esteban me enseñó todo lo necesario para manejar en el Biomedical Center... lo cual no es fácil.

A todos ustedes, tack so mycket, es decir, gracias!

Por todos los momentos vividos, y los que vendrán... quiero dedicarles este trabajo a la "banda latina de Uppsala": Manuel Raíces, my brother cubano; Carlos Ros, del Real; los uruguayos Claudia Rabino, Carlos Robello, Marcelo Vispo y Jorge Goñez; Jan Olof Nehlin, de Venezuela y Suecia; y a la banda argentina, Marcela Baudo, Jorge Blackhall, Diana Flego, Diana Hansen, Betina Porcel, Alejandro Tozzini y a "los pichos y Catu".

A Carl Risinger, Anders Blomqvist, Ann Sofie Engström, y a los profesores Ulf Landegreen, Ulf Gyllensten y Ulf Hellman (3U) por la amistad y la colaboración que me brindaron.

ABREVIATURAS Y ACLARACIONES

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADNk	ADN kinetoplástico
ARN	ácido ribonucleico
BAPA	benzoilargininaparanitroanilida
BCIP	5-bromo,4-cloro,3-indolil-fosfato
BSA	seroalbúmina bovina
°C	grados centígrados
D.O.	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilén diamino tetracético
HCl	ácido clorhídrico
Ig	inmunoglobulina
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactósido
kDa	kiloDaltones
LDL	receptor de lipoproteínas de baja densidad
mg	miligramos
ml	mililitros
mM	milimolar
mg	microgramo
ml	microlitro
mM	micromolar
NaCl	cloruro de sodio
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido
NBT	azul de tetrazolio
nM	nanomolar
NP-40	nonidet P-40 (octilfenoxi-poliétoxietanol)
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pCMB	paracloromercuribenzoato
pCMPS	paracloromercurifenilsulfonato
PCR	reacción de la polimerasa en cadena

PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro
PVDF	polivinildifluoruro
SDS	dodecil sulfato de sodio
splicing	corte y unión de moléculas de ARN
TBS	amortiguador tris salino
TEMED	N,N,N',N' tetrametil etilendiamina
TLCK	tosillisilclorometilcetona
TPCK	tosilfenilalanilclorometilcetona
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1-3-propanodiol
ufp	unidad formadora de placas de lisis
VSG	glicoproteínas variables de superficie
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactosa

Las siguientes publicaciones, correspondientes al Seminario de Licenciatura, contienen resultados que se mencionan o incluyen (*) en esta Tesis Doctoral.

Bontempi, E., Martínez, J. and Cazzulo, J.J. (1989). Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **33**, 43-48.

Martínez, J., Silberstein, E., and Cazzulo J.J. (1989). Cysteine proteinase activities in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*: an electrophoretic study. **An. Asoc. Quím. Arg.**, **77**, 113-117.

Cazzulo, J.J., Cazzulo Franke, M.C., Martínez, J. and Franke de Cazzulo, B. (1990b). Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **Bioch. Biophys. Acta**, **1037**, 186-191.

* Campetella, O., Martínez, J. and Cazzulo, J.J. (1990). A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.**, **67**, 145-150.

Las publicaciones que siguen a continuación fueron efectuadas durante el período de realización de esta Tesis Doctoral. Algunas de ellas (*) contienen resultados del mencionado trabajo de investigación. Otras (+) incluyen resultados que sólo se mencionan o discuten.

* Martínez, J., Campetella, O., Frasch, A.C.C. and Cazzulo, J.J. (1991). The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is antigenic in human infections. **Inf. Immun.**, **59**, 4275-4277.

* Martínez, J. and Cazzulo, J.J. (1992a). Anomalous electrophoretic behaviour of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* in relation to its apparent molecular mass. **FEMS Microbiol. Lett.**, **95**, 225-230.

* Martínez, J. and Cazzulo, J.J. (1992b). Variations in electrophoretic mobility, staining with silver nitrate and immunoreactivity of the major cysteine proteinase cruzipain from *Trypanosoma cruzi* run under reducing or non-reducing conditions. **An. Asoc. Quim. Arg.**, **80**, 227-233.

* Cazzulo, J.J., Martínez, J., Parodi, A.J.A., Wernstedt, C. and Hellman, U. (1992). On the post-translational modifications at the C-terminal domain of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.**, **100**, 411-416.

* Martínez, J., Campetella, O., Frasch, A.C.C. and Cazzulo, J.J. (1993). The reactivity of sera from chagasic patients against different fragments of cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*, suggests the presence of defined antigenic and catalytic domains. **Immunol. Lett.**, **35**, 191-196.

+ Barderi, P., Labriola, C., Martínez, J., Coira, A., Bravo, M., Raimondi, A. and Cazzulo, J.J. (1993). Improved purification methods for the NADP-linked glutamate dehydrogenase, cruzipain, and its C-terminal domain from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **An. Asoc. Quim. Arg.**, **81**, 88-89.

+ Malchiodi, E.L., Chiaramonte, M.G., Martínez, J.A., Zwirner, N.W., Margni, R.A. and Cazzulo, J.J. (1993). Identity of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* and an antigen (Ag 163B6) isolated with a monoclonal antibody. **Immunol. Lett.**, **35**, 59-62.

+ Franke de Cazzulo, B.M., Martínez, J., North, M.J., Coombs, G.H. and Cazzulo, J.J. (1994). Effect of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.**, **124**, 81-86.

+ Robertson, C.D., Martínez, J., Cazzulo, J.J. and Coombs, G.H. (1994). Analysis of the cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma cruzi* using specific antisera. **FEMS Microbiol. Lett.**, **124**, 191-194.

+ Martínez, J., Henriksson, J., Rydaker, M., Cazzulo, J.J. and Pettersson, U. (1995). Genes for cysteine proteinases from *Trypanosoma rangeli*.
Enviado a publicación.

INDICE GENERAL



INTRODUCCION

1-72

Los trypanosomas

1-12

El ADN kinetoplástico. 2

¿Qué significa editar una molécula de ARN? 3

El advenimiento de la "genética reversa". 4

Un proceso esencial: el *trans*-splicing. 4

Los ARNs mensajeros de los trypanosomátidos son policistrónicos. 6

¿Dos reacciones acopladas? 6

¿Dónde están y cómo son los promotores de los trypanosomátidos? 7

Una glicólisis compartimentalizada. 8

La membrana plasmática de los trypanosomátidos. 8

El bolsillo flagelar. 9

Las proteínas variables de superficie de los trypanosomas africanos. 9

Trypanosoma cruzi posee antígenos invariantes. 10

Antígenos de *T. cruzi*: repeticiones y familias. 11

SAPA/*trans*-sialidasa: un rasgo saliente de *Trypanosoma cruzi*. 11

Otros antígenos. 12

Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* e interacción hospedador-parásito

13-19

El hospedador vertebrado. 13

El hospedador invertebrado. 13

Los cuatro estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. 13

El proceso de invasión. 17

La enfermedad de Chagas	20-25
Mecanismos de transmisión. 20	
Las etapas de la enfermedad. 21	
Las mujeres embarazadas. 22	
El parásito y su comportamiento intracelular. 22	
Enfermedad de Chagas y autoinmunidad. 23	
La infección en las zonas rurales. 24	
Diagnóstico y tratamiento. 24	
El desarrollo de una vacuna. 25	
 Proteinasas	 26-42
Clasificación de las proteinasas. 27	
Serín proteinasas. 28	
Aspartil proteinasas. 29	
Metaloproteinasas. 30	
Cisteín proteinasas. 31	
Proteinasas no clasificadas. 32	
Inhibidores proteicos de proteinasas. 34	
Inhibidores no proteicos de proteinasas. 34	
Inhibidores de cisteín proteinasas. 35	
Métodos para el análisis de las proteinasas. 36	
El aporte de los vectores de expresión: ventajas y desventajas. 37	
¿Cómo expresar una proteínasa activa? 38	
La expresión de las proteinasas y un problema extra. 39	
El diseño de drogas específicas. 41	
 Las enzimas lisosomales y su destino intracelular	 43-44
Existen mecanismos de transporte alternativos para las enzimas lisosomales. 44	
 Proteinasas de protozoos parásitos	 45-46
Las proteinasas y su creciente interés. 45	
El predominio de las cisteín proteinasas. 45	

Proteinasas de *Trypanosoma cruzi*.

Cisteín proteinasas. 47

47-49

Otras proteinasas de *Trypanosoma cruzi*. 48

**Cruzipaína: cisteín proteinasa principal
de *Trypanosoma cruzi***

50-72

Los primeros estudios. 50

Nuevos métodos para la purificación
de la cruzipaína. 51

La cruzipaína es una glicoproteína
de la superfamilia de la papaína. 51

Localización subcelular de la cruzipaína. 53

Actividad proteolítica en geles
con sustrato incorporado. 54

Avances en la determinación de la secuencia
aminoacídica de la cruzipaína. 55

La cruzipaína puede autoproteolizarse. 55

La extensión C-terminal y sus
modificaciones post-traduccionales. 56

La extensión C-terminal: secuencia de ADN
y peso molecular en geles de poliacrilamida. 59

Clonado del gen de la cruzipaína. 61

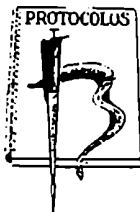
Propiedades enzimáticas de la cruzipaína:

a) especificidad de sustrato. 68

b) efecto de inhibidores y agentes caotrópicos. 69

Efecto *in vivo* e *in vitro* de inhibidores
de la cruzipaína. 69

Características inmunológicas de la cruzipaína:
identidad con antígenos de *Trypanosoma cruzi*. 71

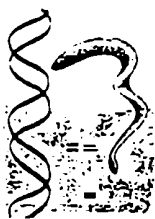


MATERIALES Y METODOS

73-97

- Parásitos: cepas, clones y formas del desarrollo. **73**
- Recuento de los parásitos. **74**
- Purificación de la cruzipaína. **74**
- Determinación de la actividad de la cruzipaína *in vitro*. **75**
- Inmunoprecipitación y detección de actividad de la cruzipaína. **76**
- Ensayo de fosforilación de la cruzipaína *in vivo*. **76**
- Secuenciación de péptidos. **77**
- Reacción de β -eliminación. **77**
- Clivaje de residuos metionina con bromuro de cianógeno. **77**
- Tratamiento con Endo- β -N-acetylglucosaminidasa H. **78**
- Autoproteólisis de la cruzipaína. **78**
- Purificación de la extensión C-terminal. **78**
- Sueros. **79**
- Determinación de la concentración de proteínas. **79**
- Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. **79**
- Electroforesis en geles con sustrato incorporado. **80**
- Tinción de geles de poliacrilamida con Coomassie Blue. **80**
- Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata. **80**
- Preparación de bacterias *Escherichia coli* Y1090 para la infección con fagos. **81**
- Expresión de proteínas recombinantes en el fago lambda gt11. **81**
- Preparación de lisados de bacterias *Escherichia coli* Y1090 para la adsorción de sueros. **82**
- Western Blot (electrotransferencia de proteínas). **82**

Revelado de filtros de nitrocelulosa conteniendo
proteínas purificadas con sueros y proteína A¹²⁵I. **83**
Revelado de filtros de nitrocelulosa conteniendo
proteínas recombinantes con sueros y proteína A¹²⁵I. **83**
Revelado de filtros de nitrocelulosa con sueros
y fosfatasa alcalina. **83**
Adsorción de sueros con antígenos recombinantes
de *T. cruzi*. **84**
Selección de anticuerpos. **84**
Inducción de bacterias *Escherichia coli* HB101
conteniendo vectores de expresión. **85**
Purificación de cuerpos de inclusión. **85**
Aislamiento y purificación de ADN de
epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. **86**
Minipreparación de plásmido. **87**
Obtención de ARN. **87**
Purificación de oligonucleótidos. **88**
Cuantificación de oligonucleótidos purificados. **88**
Cuantificación de ADN. **88**
Cuantificación de ARN. **88**
Digestión de ADN genómico y plasmídico. **89**
Geles de agarosa. **89**
Purificación de fragmentos de ADN
a partir de geles de agarosa. **89**
Transcripción reversa. **90**
Secuenciación de ADN. **90**
Geles de acrilamida para la secuenciación de ADN.
Ligación de moléculas de ADN. **92**
Transformación de bacterias competentes. **93**
PCR sobre colonias. **94**
Reacción de PCR. **94**
Secuenciación automática de ADN. **94**



RESULTADOS

98-173

Antigenicidad y modelo estructural de la cruzipaína

98-114

La cruzipaína es antigénica en la infección natural. **98**

¿Es genuina la inmunoreactividad de los sueros
chagásicos crónicos contra la cruzipaína? **102**

¿Cuál es la causa de la reacción cruzada entre
la cruzipaína y los antígenos 13 y 36? **102**

La extensión C-terminal es antigénica. **104**

¿Existe un dominio inmunogénico en la cruzipaína? **104**

En busca de un modelo estructural para la cruzipaína. **109**

Comportamiento anómalo en geles de poliacrilamida

114-128

¿Cuál es el peso molecular aparente
de la cruzipaína? **114**

¿Por qué los pesos moleculares aparentes en geles
con sustrato incorporado son menores a los obtenidos
en geles normales? **116**

¿Cuál es el comportamiento electroforético
de la extensión C-terminal? **122**

Westerns blots como un método alternativo para
detectar a la cruzipaína y a su extensión C-terminal. **126**

Algunas características estructurales de la extensión C-terminal de la cruzipaína

128-134

Purificación de la extensión C-terminal. **128**

La extensión C-terminal tiene modificaciones
post-traduccionales. **130**

¿Las treoninas están O-glicosiladas? **131**

¿Las treoninas están fosforiladas? **132**

La extensión C-terminal está N-glicosilada. **132**

La extensión C-terminal tiene puentes disulfuro. **133**

**La extensión C-terminal y su influencia
en las isoformas de la cruzipaína** **135-149**

Transcripción reversa y PCR. 136

Detección de polimorfismos con enzimas de restricción. 139

La Taq polimerasa introduce nucleótidos equivocados. 143

La secuenciación detectó más polimorfismos. 144

¿Cuántas isoformas tiene la extensión C-terminal? 147

**Polimorfismos en el dominio catalítico
de la cruzipaína** **150-161**

Un mapeo con enzimas de restricción. 151

Comparando los polimorfismos hallados
en los dos dominios de la cruzipaína. 158

Se extiende el análisis con enzimas de restricción. 158

**Expresión de la cruzipaína en los distintos
estadios y cepas de *Trypanosoma cruzi*** **161-173**

Actividad en geles con sustrato incorporado. 161

Detección de isoformas en ensayos de Western Blot. 164

¿Existen polimorfismos en los genes de
cruzipaína de RA y Sylvio X-10/7? 167

DISCUSION **174-200**



Antigenicidad de la cruzipaína. 174

Comportamiento electroforético anómalo
de la cruzipaína. 177

Algunas características estructurales
del dominio C-terminal. 182

Polimorfismos en el dominio C-terminal. 183

Polimorfismos en el dominio catalítico. 188

Expresión de la cruzipaína en distintos
estadios y cepas de *Trypanosoma cruzi*. 192



CONCLUSIONES

201-203

BIBLIOGRAFIA

204-224

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

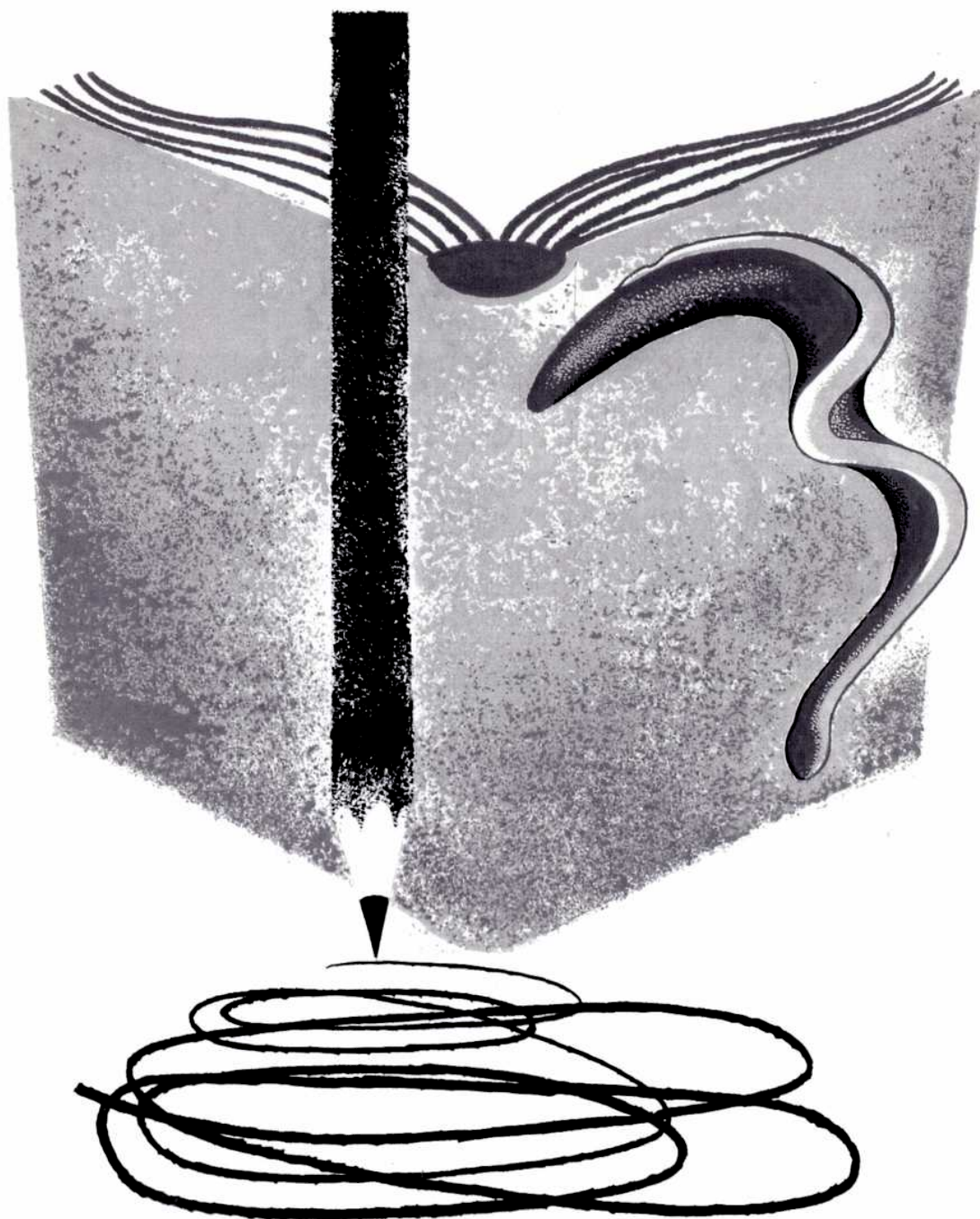
FIGURAS

Figura 1.5	Figura 16. 117	Figura 29. 149
Figura 2a. 14	Figura 17. 118	Figura 30. 150
Figura 2b. 15	Figura 18a. 120	Figura 31a. 152
Figura 3. 52	Figura 18b. 121	Figura 31b. 153
Figura 4. 57	Figura 19. 123	Figura 32a. 155
Figura 5. 58	Figura 20. 124	Figura 32b. 156
Figura 6. 60	Figura 21a. 127	Figura 33. 159
Figura 7. 62	Figura 21b. 127	Figura 34a. 162
Figura 8. 64-67	Figura 22. 129	Figura 34b. 163
Figura 9. 99	Figura 23a. 131	Figura 35a. 165
Figura 10. 103	Figura 23b. 131	Figura 35b. 165
Figura 11. 105	Figura 24. 134	Figura 36. 166
Figura 12a. 107	Figura 25. 137	Figura 37. 168
Figura 12b. 107	Figura 26. 138	Figura 38. 171
Figura 13. 108	Figura 27. 140	Figura 39. 172
Figura 14. 113	Figura 28a. 141	Figura 40. 173
Figura 15. 115	Figura 28b. 142	Figura 41. 195-197

TABLAS

Tabla 1. 101
Tabla 2. 110
Tabla 3. 111
Tabla 4. 144
Tabla 5. 146

INTRODUCCION





Los trypanosomas:

Los trypanosomas son protozoos parásitos flagelados pertenecientes al orden Kinetoplástida y causantes de enfermedades del hombre y de los animales domésticos en amplias regiones del planeta.

Existen hoy un sinnúmero de proyectos destinados al diseño de drogas y vacunas eficientes para su tratamiento.

Los estudios efectuados en tal sentido han permitido acrecentar el conocimiento de su biología y paralelamente han evidenciado procesos que hasta el presente son únicos y característicos de estos parásitos.

A continuación se describen brevemente las características de algunos de los principales miembros del orden Kinetoplástida.

Dos especies de trypanosomas, *T. brucei* y *T. cruzi*, son causantes de graves enfermedades en las zonas tropicales de África y América respectivamente.

Trypanosoma brucei es un amplio complejo de especies y sub-especies, cuya virulencia varía en los distintos hospedadores. Las infecciones humanas, causadas por *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*, resultan en la "enfermedad del sueño", que lleva al coma y posteriormente a la muerte (Cox, 1993). Se informan 25.000 casos nuevos cada año y existen actualmente contadas drogas eficientes y seguras para combatir a la enfermedad, como la suramina. Quizás el mayor inconveniente radica en la biología misma del parásito, que hace muy difícil el desarrollo de una vacuna.

Trypanosoma cruzi es el causante de la enfermedad de Chagas, un proceso crónico y debilitante que afecta, según datos recientes a 20 millones de personas en América Latina. En Argentina, diversos estudios específicos realizados en la población estiman en 2 millones el número de personas infectadas, en un área que abarca dos tercios de la superficie del país (Carlomagno *et al.*, 1989).



Los esfuerzos por desarrollar una vacuna se renuevan año tras año, pero hasta el presente no se han obtenido resultados satisfactorios.

Leishmania sp. constituye un género amplio y complejo de parásitos intracelulares obligados. Prevalen en las regiones templadas y tropicales e infectan al hombre causando tres tipos de enfermedades: la leishmaniasis visceral o kala azar, importante causa de mortalidad en grandes áreas de India, Africa, América Latina y el litoral mediterráneo, causada por *L. donovani* y *L. chagasi*; la leishmaniasis cutánea, más común, de menor impacto mortal y causante de lesiones cutáneas usualmente crónicas (varias especies, entre ellas *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazoniensis* y *L. pifanoi*); y la leishmaniasis mucocutánea o espundia, causada por *L. braziliensis* en áreas endémicas de América Latina, que produce lesiones destructivas en la nariz, la faringe, los labios y en la cara (Jeronimo and Pearson, 1992; Cox, 1993).

Las únicas drogas accesibles son altamente tóxicas. Por ello, la Organización Mundial de la Salud está promoviendo el desarrollo de una vacuna que estimule una apropiada respuesta inmune. En este marco, Afonso *et al.* (1994) han reportado el rol adyuvante de la interleukina-12 en una vacuna contra *Leishmania major*.

La clasificación de los trypanosomas dentro del orden Kinetoplástida apunta a la existencia de una malla de ADN mitocondrial, ubicada en un sector especializado de la mitocondria, llamado kinetoplasto.

El ADN kinetoplástico:

Con un número aproximado de 10000 minicírculos y 50 maxicírculos entrelazados formando una gran red, el ADN kinetoplástico o ADN mitocondrial de los trypanosomas y de otros miembros del orden Kinetoplástida constituye una de las estructuras más exóticas de los seres vivos.

Los maxicírculos contienen genes que codifican ARNs ribosomales y subunidades de proteínas mitocondriales como la citocromo oxidasa y la



NADH deshidrogenasa. En cambio, la función de los minicírculos fue un enigma durante mucho tiempo, pero hoy se sabe que codifican pequeños ARNs guías (gARNs) que funcionan como templados específicos en el editado de ARNs mensajeros de genes mitocondriales crípticos (Borst, 1991).

¿Qué significa editar una molécula de ARN?

El editado es un proceso post-transcripcional que tiene lugar en la mitocondria de los trypanosomátidos y resulta en la adición o la remoción de uridinas a una molécula de ARN mensajero. Dicho proceso puede llevar a la formación de nuevos codones de iniciación para la traducción mitocondrial, la corrección a nivel de ARN de genes cuyo marco de lectura está desplazado, e incluso a la formación de marcos de lectura completos (Hajduk, 1993). La información para el editado correcto de los mensajeros mitocondriales proviene de los ARNs guías, complementarios a dichos mensajeros (Seiwert and Stuart, 1994), y en el proceso parece estar asociado un complejo de alto peso molecular, llamado editosoma, que contiene ARNs guías específicos, ARNs mensajeros no editados y proteínas.

Se ha visto que las secuencias de los minicírculos de *T. brucei* son más heterogéneas que las de *Leishmania* y *Crithidia*. Este hallazgo se corresponde con las evidencias de un mayor editado en *T. brucei*. La heterogeneidad en los minicírculos se requiere entonces para generar suficiente información para el editado correcto de los ARNs mensajeros codificados por los maxicírculos. Del mismo modo se explica la ausencia de heterogeneidad en los minicírculos de los trypanosomas que carecen de maxicírculos funcionales, como *T. equiperdum* o *T. vivax* (Borst, 1991).

El editado genera polipéptidos funcionales a partir de genes que no lo son, pero no existe una razón que explique por qué los mensajeros mitocondriales no son codificados directamente por genes funcionales. Es difícil imaginar una ventaja selectiva inmediata para este proceso que



explique su aparición y conservación a lo largo de la evolución (Covello and Gray, 1993).

El advenimiento de la “genética reversa”:

La biología molecular de los trypanosomátidos ha tomado un nuevo impulso a partir de los avances en materia de “genética reversa”, es decir, la introducción de secuencias de ADN foráneas o del parásito por métodos de transformación similares a los utilizados en células eucarióticas y levaduras (Borst and Nussenzweig, 1992).

El desarrollo de nuevos y eficientes métodos de transfección de trypanosomátidos ha permitido en la actualidad un estudio detallado *in vivo* de la transcripción, el procesamiento del ARN y la función de ciertas proteínas.

Vainstein *et al*, (1994) han reportado el bombardeo de *Crithidia fasciculata* con micropartículas de tungsteno revestidas de ADN plasmídico. Los resultados obtenidos demuestran que esta técnica es viable, efectiva y constituye una alternativa simple al conocido método de electroporación.

La transformación puede ser mediada por la integración en *T. brucei* (ten Asbroek *et al.*, 1990; Lee and Van der Ploeg, 1990), *T. cruzi* (Otsu *et al.*, 1993; Hariharan *et al.*, 1993) y en *Leishmania* (Cruz and Beverley, 1990; Tobin *et al.*, 1991), la cual ocurre en todos los casos por recombinación homóloga; o por un vector episomal en *T. cruzi* (Kelly *et al.*, 1992), *Leishmania* (Kelly *et al*, 1992; Kapler *et al.*, 1990; Laban *et al.*, 1990) y *T. brucei* (Patnaik *et al*, 1993).

Un proceso esencial: el *trans*-splicing.

El estudio de la genética molecular de los trypanosomátidos ha deparado muchas sorpresas. Una de ellas es la ausencia de intrones. Otra no menor que la anterior es el hallazgo de que todos los ARNs mensajeros se generan por el ligado de dos transcriptos en un proceso conocido como *trans*-splicing. Como resultado, todos los ARNs mensajeros



tienen una secuencia de 39 nucleótidos en común en el extremo 5'. Dicha secuencia recibe el nombre de minixón. No es codificante y deriva de un transcripto de 140 nucleótidos llamado med ARN (donor de minixón) (Laird, 1989).

La figura 1 describe este mecanismo.

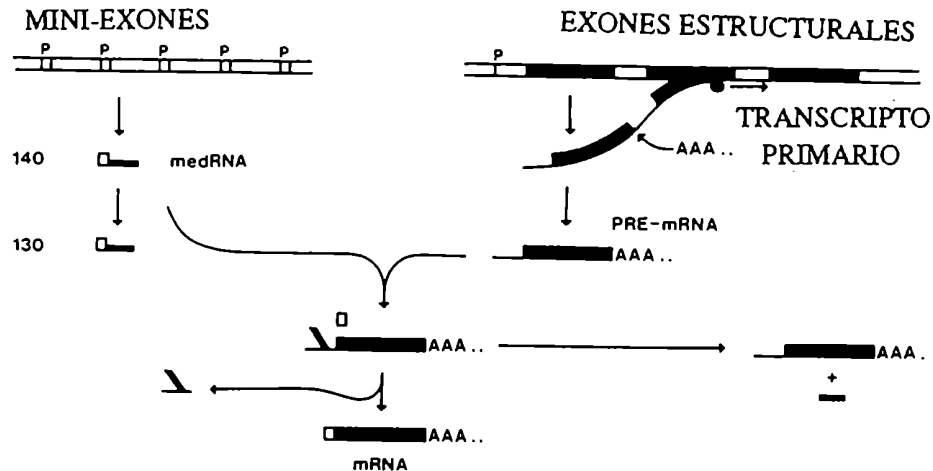
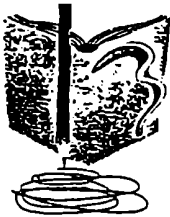


Figura 1: Representación esquemática del mecanismo de *trans*-splicing y transcripción policistrónica en trypanosomas.

Las letras "P" indican la posición de los promotores. El transcripto primario es de tipo policistrónico. El *trans*-splicing entre el ARN donador del minixón (med RNA) y el pre-mensajero poliadenilado (PRE-mRNA) resulta en la producción de ARNs maduros que tienen el minixón de 39 pb en su extremo 5' (caja blanca), el exón codificante (caja negra) y una secuencia poli A en su extremo 3' (Laird, 1989).



Los ARNs mensajeros de los trypanosomátidos son policistrónicos:

La transcripción en los trypanosomas procede sin interrupciones a través de distintos cistrones, lo cual lleva a la generación de ARNs mensajeros policistrónicos. Una vez sintetizados sufren dos modificaciones: la adición de una secuencia de adeninas (poli A) en el extremo 3' no codificante y el *trans*-splicing del miniexón en una secuencia AG del extremo 5' no codificante. De esta manera un único precursor dará origen a distintas moléculas de ARN mensajero, todas ellas modificadas en ambos extremos.

¿Dos reacciones acopladas?

La conversión de un ARN policistrónico en monocistrónico requiere de al menos un corte en la región que separa ambos cistrones (región intergénica). Sin embargo son dos los cortes que ocurren, uno de ellos asociado al *trans*-splicing, algunos nucleótidos río arriba del inicio del mensaje, y el otro asociado a la poliadenilación y ubicado no más allá de mil nucleótidos en dirección 5' al sitio de adición del miniexón.

Se ha identificado al dinucleótido AG y a una secuencia rica en pirimidinas como secuencias blanco del *trans*-splicing en *Leishmania* y en trypanosomas, lo cual recuerda al *cis*-splicing que tiene lugar en mamíferos. Por el contrario, no se han hallado secuencias conservadas para la poliadenilación (Borst, 1986; Kapler *et al*, 1990 a)

La ausencia de estas secuencias y la proximidad entre los sitios aceptores de *trans*-splicing y poliadenilación llevó a pensar en un posible acoplamiento entre dichos procesos. Los experimentos realizados a tal efecto sugieren que el sitio de poliadenilación estaría determinado por el sitio aceptor de *trans*-splicing ubicado río abajo, y que el reconocimiento de este último es el evento clave para la generación de ARNs monocistrónicos (LeBowitz *et al*, 1993; Vassella *et al*, 1994; Matthews *et al*, 1994).



Dónde están y cómo son los promotores de los trypanosomátidos.

El *trans*-splicing de los ARNs mensajeros “borra” las secuencias correspondientes al inicio de la transcripción de un gen, dificultando así el rastreo de la posición de sus secuencias promotoras y reguladoras.

Hasta el momento se han identificado los promotores de los genes que codifican a las proteínas VSG (glicoproteínas variables de superficie) y PARP (proteínas repetitivas acídicas procíclicas) de *T. brucei*. Las primeras se expresan en los llamados “sitios de expresión”, de posición telomérica, y están reguladas por promotores situados en muchos casos a decenas de miles de pares de bases de distancia (Overath *et al.*, 1994).

En *T. cruzi* se ha identificado el sitio de iniciación de la transcripción del gen codificante del ARN ribosomal 18S. Sin embargo no se obtuvo consenso alguno cuando las supuestas secuencias promotoras, ubicadas en las regiones -200 a +50 del sitio de iniciación de la transcripción, fueron comparadas con las descritas en *Trypanosoma brucei* y *Crithidia fasciculata*. No obstante, se encontraron algunas secuencias repetidas ubicadas río arriba de las promotoras, que evidenciaron homología con aquellas y con las presentes en los promotores de los mencionados trypanosomátidos (Dietrich *et al.*, 1993).

En cualquier otro organismo procariótico o eucariótico, el control de la iniciación de la transcripción juega un papel primordial en la regulación de la expresión génica. Aún siendo este el caso en trypanosomas, nadie hasta el momento ha podido demostrar algún tipo de regulación de la ARN polimerasa II.

La transcripción en los trypanosomas está mediada por tres ARN polimerasas, al igual que en el resto de los eucariotes. Si bien la ARN polimerasa II es la encargada de transcribir los genes codificantes de proteínas, se ha visto que en *T. brucei* esa tarea es compartida, para algunos genes, con la ARN polimerasa I (Chung *et al.*, 1992).



A modo de resumen, estos son los rasgos salientes de la genética molecular de los trypanosomátidos:

- * Un ADN mitocondrial “incompleto” que luego de ser transcripto debe ser editado para adquirir funcionalidad.
- * Un genoma carente de intrones.
- * ARNs mensajeros policistrónicos que se convierten en monocistrónicos antes de ser traducidos.
- * Un miniexon que ocupa el extremo 5' de todos los ARNs mensajeros.
- * La posible interacción entre las maquinarias que ejecutan el *trans*-splicing y la poliadenilación.
- * Promotores y factores de transcripción todavía desconocidos.

Veamos ahora algunas características excluyentes de la biología celular de los trypanosomátidos.

Una glicólisis compartimentalizada:

Los trypanosomas han desarrollado microcuerpos llamados glicosomas altamente especializados que contienen gran parte del sistema glicolítico. En particular, poseen nueve enzimas encargadas de la conversión de glucosa y glicerol en fosfoglicerato (Oppenheimer, 1988).

Están presentes en todos los trypanosomátidos y recientemente se demostró su estrecha relación con los peroxisomas de animales y hongos (Keller *et al.*, 1991). Fueron descritos en primer término en *T. brucei* y luego en otros trypanosomátidos.

La membrana plasmática de los trypanosomátidos:

La membrana plasmática de los trypanosomas posee un vasto repertorio de adaptaciones a la vida parasitaria. En ella residen moléculas que funcionan en la captación de nutrientes y en la interacción con el hospedador.



El bolsillo flagelar:

Esta estructura, cuyas características principales están conservadas en todo el orden Kinetoplástica, se forma a partir de una invaginación de la membrana plasmática alrededor del flagelo (Webster and Russell, 1993).

En la apertura del bolsillo flagelar, donde el flagelo emerge del cuerpo celular, existe una zona de engrosamiento del flagelo que le sirve de anclaje y limita el acceso de material a la cavidad.

En los trypanosomátidos el citoesqueleto, formado por una red submembranar de microtúbulos, desaparece por debajo del bolsillo flagelar, quizás en directa relación con la actividad endocítica mediada, entre otros, por los receptores de LDL y transferrina (Overath *et al.*, 1994). El receptor de lipoproteínas de baja densidad ha sido detectado mediante técnicas de inmunofluorescencia e inmunocitoquímica en el citostoma y en el bolsillo flagelar de los epimastigotes, y en menor medida en amastigotes y trypomastigotes (Cunha e Silva and de Souza, 1993).

El bolsillo flagelar de los trypanosomátidos es un área especializada de la membrana plasmática. Los esfuerzos por comprender cómo está organizada y qué funciones cumple brindarán nuevas herramientas para el análisis de los mecanismos de supervivencia desarrollados por los trypanosomátidos en los variados ambientes que ocupan. El interés está centrado sin dudas en el diseño de drogas específicas contra los receptores mencionados o en el desarrollo de vacunas que generen anticuerpos contra ellos, ya que carecen de reacción cruzada con sus pares de los mamíferos.

Las proteínas variables de superficie de los trypanosomas africanos:

Trypanosoma brucei vive y se divide extracelularmente en la sangre y por lo tanto está continuamente expuesto a la respuesta inmune humoral del hospedador. Para evadirla cuenta con un mecanismo que ha sido llamado “variación antigénica”. Cada trypanosoma posee un número muy grande de genes codificantes de glicoproteínas variables de superficie



(VSG), que son antigénicas en la infección natural. En cada célula, y en un momento determinado, se expresa una y sólo una de esas proteínas en un denominado sitio de expresión (ES), localizado en los telómeros de los cromosomas. Al ser sintetizadas cuentan con un extremo C-terminal hidrofóbico que es reemplazado por un residuo glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el retículo endoplásmico. La proteína VSG resultante se transloca a la membrana plasmática por exocitosis a partir del bolsillo flagelar y luego difunde lateralmente al resto del cuerpo celular y al flagelo, formando una cubierta densa de 10^7 moléculas. El hospedador genera anticuerpos contra la VSG que se está expresando en ese momento y elimina a los trypanosomas mediante la fagocitosis ejecutada por los macrófagos o a través de la lisis mediada por el sistema de complemento. Sin embargo, por inserción de otro gen codificante de VSG en el ES o por la activación de otro ES, algunos parásitos pueden expresar una nueva VSG y multiplicarse sin ser reconocidos por el hospedador. La infección se convierte en crónica pues la población de parásitos siempre cuenta con organismos cubiertos con una VSG contra la cual no se han desarrollado aún anticuerpos específicos.

***Trypanosoma cruzi* posee antígenos invariantes:**

Un parásito que se multiplica intracelularmente no necesita de un mecanismo de variación antigénica para evadir a la respuesta inmune del hospedador. En particular, el estadio trypomastigote de *Trypanosoma cruzi* utiliza a la sangre como un mero vehículo para la infección de una nueva célula, en la cual se diferenciará al estadio amastigote, y este comenzará a duplicarse hasta el momento en que se diferencien nuevamente a trypomastigotes, se liberen al torrente sanguíneo por lisis celular e invadan una nueva célula.



Antígenos de *T. cruzi*: repeticiones y familias.

Desde el año 1986 (Peterson *et al.*, 1986) se han identificado y secuenciado parcial o totalmente diversos antígenos de *T. cruzi* (Frasch *et al.*, 1991). Los resultados obtenidos permiten establecer dos características principales de estos antígenos: en primer lugar, muchos de ellos contienen secuencias de aminoácidos repetidas (Ibañez *et al.*, 1988; Frasch *et al.*, 1991). En segundo lugar, el análisis de las secuencias no repetidas demuestra que varios de ellos pertenecen a grandes familias de proteínas.

Las repeticiones de aminoácidos tienen tamaños variables, desde 5 a 68 residuos, y el número de repeticiones presentes en un determinado antígeno puede variar en las distintas cepas, o en una misma cepa si es que existe más de un gen (Macina *et al.*, 1989).

Las citadas repeticiones son probablemente epitopes reconocidos por los linfocitos B (Frasch and Reyes, 1990).

SAPA/*trans*-sialidasa: un rasgo saliente de *Trypanosoma cruzi*.

El antígeno SAPA (shed acute phase antigen) es detectado muy temprano después de la infección en humanos (incluyendo las infecciones congénitas) y en animales (Affranchino *et al.*, 1989; Reyes *et al.*, 1990; Leguizamón *et al.*, 1991)

Es un grupo de 3 a 6 moléculas codificadas por distintos genes, cuyo peso molecular varía entre 160 y 200 kDa (Pollevick *et al.*, 1991; Affranchino *et al.*, 1991). Están ancladas a la membrana plasmática por un residuo GPI y se liberan al medio por acción de una fosfolipasa específica (Affranchino *et al.*, 1989).

Recientemente se descubrió que este antígeno es la *trans*-sialidasa de *T. cruzi* (Parodi *et al.*, 1992; Uemura *et al.*, 1992; Cazzulo and Frasch, 1992) y que como veremos más adelante constituye una pieza fundamental en el establecimiento de la infección.



Otros antígenos:

Entre los antígenos de *T. cruzi* están aquellos que no se localizan en la membrana plasmática, sino en el interior de la célula, como el antígeno 30/CRA/JL8/TCR27 (Frasch *et al.*, 1991), la proteína P ribosomal (Levin *et al.*, 1993), y la cisteín proteinasa principal (cruzipaína), hallada en los lisosomas y de forma transiente en la superficie celular (Bontempi *et al.*, 1989; Souto-Patrón *et al.*, 1990).

Se conoce la función de unos pocos antígenos de *T. cruzi*. Es sabido que las proteínas de “heat shock” son antigénicas en la infección natural (Dragón *et al.*, 1987; Requena *et al.*, 1988; Engman *et al.*, 1989). Asimismo se ha sugerido que la proteína P ribosomal es responsable de reacciones autoinmunes (Levin *et al.*, 1989). La glicoproteína GP57/51, descrita como un antígeno por Scharfstein *et al.* (1988) y por Murta *et al.* (1990) es en realidad la cisteín proteinasa principal de *T. cruzi*, que como veremos en próximas secciones, es la cruzipaína hallada por Cazzulo *et al.*, (1989).



Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* e interacción hospedador-parásito:

Trypanosoma cruzi presenta un ciclo de vida complejo que se desarrolla en un mamífero y un insecto vector.

El hospedador vertebrado:

Trypanosoma cruzi puede penetrar y replicarse en un número variado de células de mamífero, desarrollando una infección que en el ser humano puede extenderse por décadas.

A diferencia de otros protozoos parásitos, *Trypanosoma cruzi* no es inoculado directamente en la circulación del hospedador mamífero, sino depositado sobre su piel junto con las heces durante la ingesta de sangre (Ortega-Barria and Pereira, 1992; Avila, 1992).

El hospedador invertebrado:

El hospedador invertebrado del parásito es el insecto reduvino *Triatoma sp*, conocido vulgarmente como vinchuca. De hábitos hematófagos, se infecta al ingerir trypanosomas presentes en la sangre periférica del hospedador vertebrado.

Los cuatro estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*:

Los trypanosomas ingeridos por la vinchuca al alimentarse de la sangre de un animal infectado corresponden a la forma trypomastigote (figura 2a). Son incapaces de dividirse y se caracterizan por la presencia de un flagelo que nace en la parte posterior del parásito y corre a lo largo del cuerpo celular formando la llamada membrana ondulante (figura 2b).

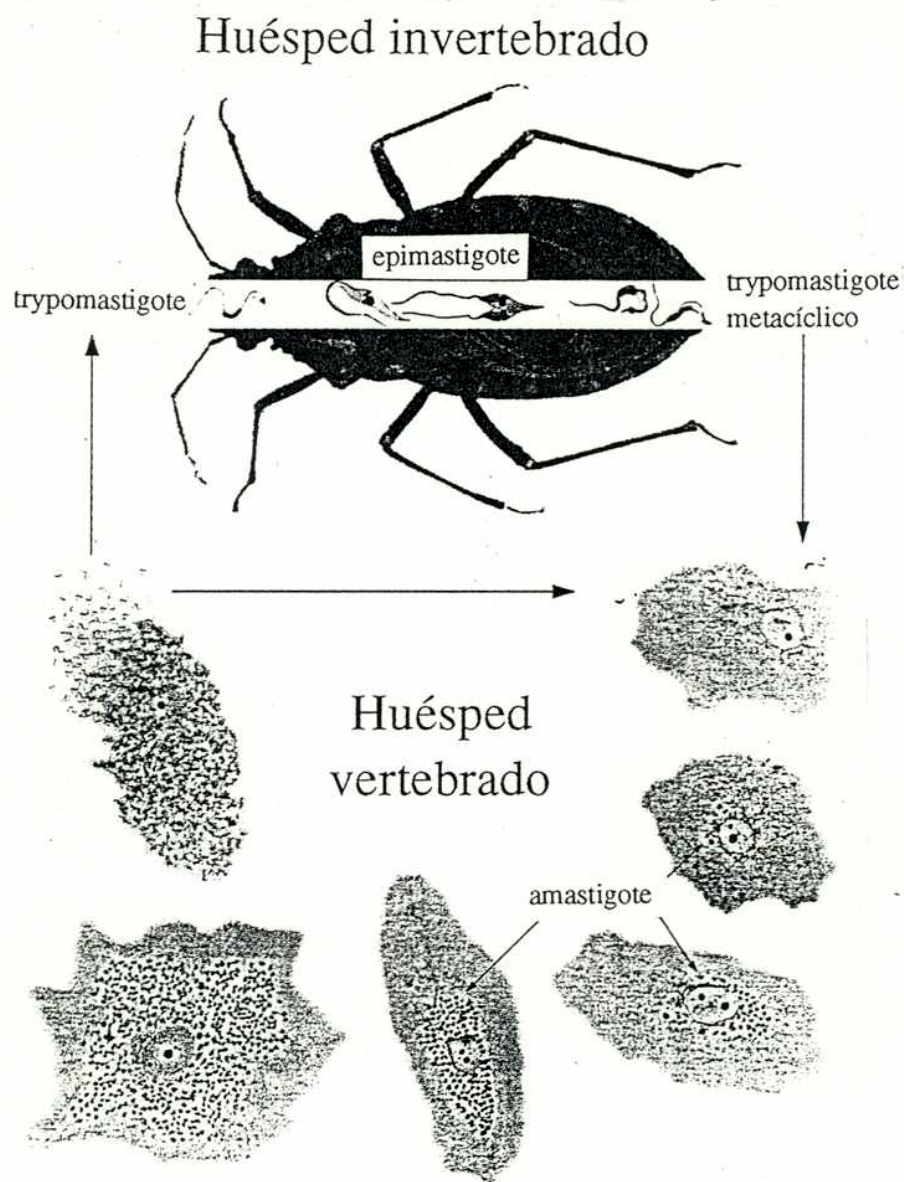


Figura 2a: Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*.
(Colli, 1993).

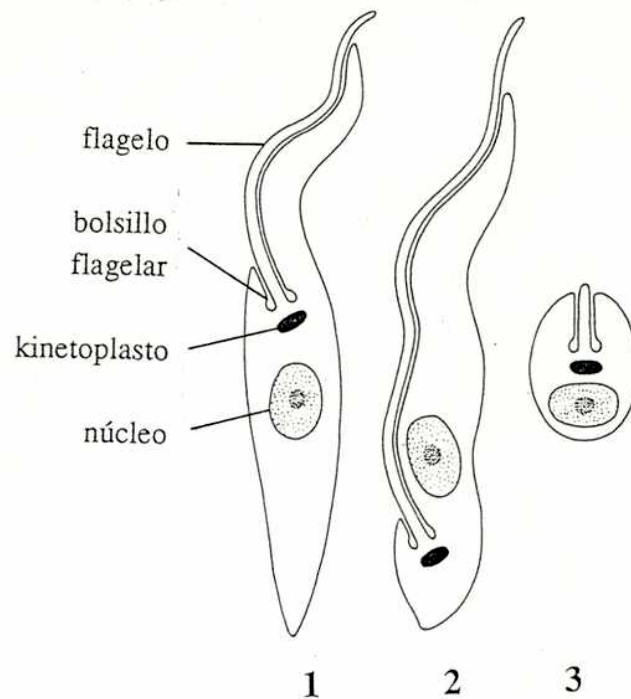
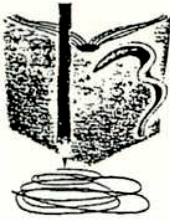


Figura2b: Formas del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.
1, epimastigote; 2, trypomastigote; 3, amastigote.
(Cox, 1993).

Los trypomastigotes sanguíneos llegan al intestino de la vinchuca y la mayoría de ellos se diferencia al estadio epimastigote al cabo de aproximadamente 24 horas de producida la ingesta. En los epimastigotes el flagelo emerge del extremo anterior de la célula. Esta forma se divide activamente en el intestino por fisión binaria y mantiene así un estado permanente de infección en el insecto. No es infectiva para el hospedador mamífero y es similar a la forma que se cultiva en medios axénicos indefinidos.

En el recto de la vinchuca algunos epimastigotes se diferencian a trypomastigotes metacíclicos, que se eliminan con las heces y la orina durante o después de la ingesta de sangre. Los trypomastigotes



metacíclicos son infectivos y llegan a la sangre del hospedador vertebrado a través de microescoriaciones de la piel o de las mucosas, pero no se multiplican en ella. Para hacerlo invaden rápidamente células de distintos tejidos.

A tres horas de la penetración los trypomastigotes se diferencian a amastigotes y así permanecen quiescentes durante horas antes de comenzar a duplicarse. La duración de esta fase "lag" y el tiempo de duplicación de los amastigotes depende del clon del parásito, y se correlaciona con el tiempo de duplicación de los epimastigotes en cultivo. El número de ciclos replicativos estimados a partir del número total de amastigotes producidos por un trypomastigote varía entre 6 y 7 para el clon CA-I 72 y entre 8 y 9 para el clon Miranda (Engel *et al.*, 1985).

Finalmente, y varias horas antes de que se produzca la lisis celular, los amastigotes (aproximadamente 500) se diferencian a trypomastigotes, que se liberan al torrente sanguíneo por la ruptura celular y pueden reiniciar el ciclo infectando una nueva célula o eventualmente ser ingeridos por una vinchuca, reiniciando el ciclo de vida en el insecto vector.

Los trypomastigotes, tanto metacíclicos o sanguíneos, sobreviven a la fagocitosis de los macrófagos escapando de la vacuola fagocítica hacia el citosol. Los epimastigotes, en cambio, son muertos y digeridos por los macrófagos (Nogueira and Cohn, 1976; Avila, 1983). Aparentemente los trypomastigotes liberan alguna/s hidrolasas ácidas que les posibilitan escapar de la vacuola fagocítica (Ley *et al.*, 1990). Los trypomastigotes pueden también penetrar células no fagocíticas mediante la adhesión y la inducción de la endocitosis (ver más adelante).

Todas las formas de desarrollo del parásito pueden ser obtenidas en el laboratorio, tal como se detalla en la sección "Materiales y Métodos".

Los epimastigotes se cultivan en medio axénico.



Los trypomastigotes metacíclicos se obtienen por diferenciación de epimastigotes de cultivos axénicos. Entre los factores que rigen este proceso vale mencionar a un péptido del intestino de *Triatoma infestans*, recientemente identificado, que activa la adenilato ciclasa de membranas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y estimula la diferenciación (Fraidenraich *et al.*, 1993).

La principal fuente de trypomastigotes en un laboratorio es la sangre de animales infectados y el sobrenadante de monocapas de células infectadas. En el segundo caso pueden observarse al microscopio óptico, en forma simultánea, células no infectadas, otras redondeadas y llenas de amastigotes, y trypomastigotes en el sobrenadante como consecuencia de la ruptura de células infectadas. Los amastigotes también se obtienen a partir de monocapas infectadas.

El proceso de invasión:

La membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi* tiene moléculas (péptidos y carbohidratos) que participan en distintas etapas de la invasión a la célula hospedadora. Algunas intervienen en la adhesión del parásito, otras en su internalización y una vez en el interior de la célula, algunas moléculas participan en el escape de la vacuola fagocítica.

Trypanosoma cruzi tiene la capacidad de invadir y replicarse en células fagocíticas o no fagocíticas del hospedador mamífero. Producida la penetración, el trypanosoma queda encerrado en una vacuola fagocítica de la cual escapa rápidamente hacia el citoplasma.

El ácido siálico es un componente esencial del proceso invasivo.

Los receptores de *T. cruzi* presentes en la superficie de las células de mamíferos están sialilados y se ha visto que su remoción afecta a la invasión. Por otro lado, existen evidencias de que la presencia de ácido siálico en la superficie del trypanosoma beneficia dicho proceso (Schenkman and Eichinger, 1993).

Los amastigotes intracelulares no expresan actividad *trans*-sialidasa, pero sí los trypomastigotes liberados a causa de la lisis celular, que



expresan altos niveles de dicha actividad. No contienen ácido siálico en su superficie pero lo adquieren después de estar en contacto con membranas de células del hospedador, componentes de la matriz extracelular y glicoproteínas del suero.

La *trans*-sialidasa ciertamente participa en la invasión y posiblemente en el proceso de escape de la vacuola parasitófora, pero es claro que no es el único factor involucrado en estos procesos. Además cumple una función importante en la resistencia a la lisis mediada por complemento y en la circulación del parásito dentro de sus hospedadores (Schenkman and Eichinger, 1993).

La invasión por *T. cruzi* es por lo tanto un proceso activo y de eventos simultáneos. En primer lugar, el parásito deberá adherirse a moléculas ricas en ácido siálico, proteoglicanos o moléculas en la matriz extracelular, como el colágeno y la fibronectina. En el proceso de penetración parecen sucederse reacciones de sialidación y *trans*-sialidación de las moléculas del parásito y de la célula huésped (Schenkman and Eichinger, 1993). Luego de atravesar la membrana plasmática, el trypomastigote se encontrará en un ambiente hostil: el fagolisosoma o vacuola parasitófora, que está adosada a la membrana plasmática y tiene un pH ácido.

A través de experimentos de tipo morfológico y farmacológico *in vitro* se demostró que la invasión de los trypanosomas resulta favorecida cuando los lisosomas son inducidos a migrar desde la zona perinuclear hacia la periferia celular, e inhibida si se depletan los lisosomas periféricos. Los resultados indican que el mecanismo de invasión que utiliza *T. cruzi* implica el reclutamiento localizado de lisosomas y una fusión temprana de ellos con la membrana plasmática en el lugar de la invasión (Tardieux *et al.*, 1992; Andrews, 1993). Por lo tanto, la membrana requerida para la penetración del trypomastigote se origina mediante la fusión gradual de lisosomas en el momento en que el parásito entra en la célula.



La *trans*-sialidasa está involucrada en el escape de la vacuola parasitófora a través de la remoción del ácido siálico de las glicoproteínas lisosomales. Además, *Trypanosoma cruzi* posee una proteína llamada Tc-TOX, relacionada inmunológicamente con el factor C9 del sistema de complemento. Es una toxina ácida formadora de poros transmembranares, también conocida como penetrina (Andrews *et al.*, 1990).

Los experimentos realizados con agentes que inhiben la acidificación bloquean la salida de los parásitos hacia el citoplasma (Ley *et al.*, 1990) y sugieren entonces un rol para Tc-TOX en la disrupción de las membranas vacuolares.



La Enfermedad de Chagas:

También conocida como trypanosomiasis americana, la enfermedad de Chagas es uno de los problemas sanitarios más graves que sufre América Latina.

El agente causal es el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, y el insecto que lo transmite es el *Triatoma infestans*, más conocido como vinchuca.

Los ecótopos del *T. cruzi* son los más diversos en América, en sus nidos naturales, desde los desiertos norteamericanos hasta los altiplanos andinos, de la catinga seca del noreste brasileño al monte amazónico, al cerrado centrobrasileño, al Chaco y a la pampa (Pinto Dias, 1992).

La enfermedad de Chagas es una afección intimamente ligada con la problemática económico-social que aqueja a los países de América Latina. Las condiciones de pobreza y la baja calidad de vida reinantes en esta zona generan un ambiente propicio para el insecto transmisor. Así lo define Pinto Días:

“La enfermedad de Chagas es un problema restringido a los países latinoamericanos y constituye un reto y un desafío a sus gobernantes y científicos. Es como un signo del mismo subdesarrollo latinoamericano, al lado de la deuda, de la baja producción, del bajo ingreso, de la mortalidad infantil, etc. Sin embargo, merced a la voluntad política, la esquizotripanosis es un problema pasible de soluciones a corto y mediano plazo...” (Pinto Dias, 1992).

Mecanismos de transmisión:

El principal factor de transmisión del *Trypanosoma cruzi* es la picadura de la vinchuca. En cada ingesta de sangre la vinchuca deposita sus heces sobre la piel del mamífero y el trypanosoma penetra por las microescoriaciones que la víctima genera en su piel través del rascado o por casualidad, al poner en contacto las heces del insecto con mucosas o conjuntivas.



El éxito de la infección es reducido si se lo compara con la tripanosomiasis africana y la leishmaniasis, transmitidas por inoculación directa de los parásitos vía la saliva del insecto vector.

El segundo mecanismo de transmisión de la enfermedad es la transfusión de sangre infectada, que ocurre con frecuencia y es la responsable de miles de casos nuevos cada año. La incidencia está estrechamente relacionada con los programas de salud en vigencia en las zonas donde se efectúan las transfusiones.

El tercer factor en importancia es la transmisión congénita, que genera hasta 8000 casos nuevos por año en las regiones endémicas (Reyes *et al.*, 1990).

Las etapas de la enfermedad:

La enfermedad de Chagas tiene 3 etapas: una aguda, una indeterminada y una crónica (Carlomagno *et al.*, 1989).

La fase aguda se presenta inmediatamente después de la infección, suele producir manifestaciones específicas, como la oclusión de un ojo o signo de Romagna y va acompañada de una fuerte parasitemia, inmunosupresión y activación policlonal. Una vez concluida la fase aguda, los infectados pasan por un largo período intermedio en el cual no hay manifestaciones clínicas de la infección (Madoery y Madoery, 1992).

En un tercio de la población infectada se desarrollan los síntomas propios de la etapa crónica, como la miocardiopatía o las patologías del aparato digestivo con diversos grados de severidad.

La infección en los adultos suele pasar desapercibida. En los niños, en cambio, es alta la probabilidad de desarrollar los síntomas de la etapa aguda, en la cual los parásitos pueden ser detectados en la sangre. Si bien en algunos casos la fase aguda resulta fatal, en la mayoría de los enfermos la respuesta inmune logra reducir el nivel de parasitemia a niveles indetectables, y el hospedador entra en la etapa crónica de la enfermedad.



Las mujeres embarazadas:

La infección en una futura madre puede afectar al embarazo y modular el desarrollo de la inmunidad en el niño (Brabin, 1993).

La infección transplacentaria no es infrecuente, y ocurre en el 0,7% a 10,5% de los niños nacidos de madres seropositivas. Estas tasas de infección son altas si se las compara con las de otras enfermedades causadas por protozoarios, en las cuales el pasaje está frecuentemente asociado a madres con infecciones agudas y bajos niveles de inmunidad.

Las mujeres con infecciones crónicas son propensas a transmitir la infección en sucesivos embarazos, mientras que en el modelo murino no existe transmisión en animales crónicos.

La infección transplacentaria es una de las consecuencias de la infección materna, pero no se sabe aún de qué manera afecta al niño el continuo contacto en el útero con antígenos, anticuerpos, citoquinas e inmunocomplejos.

El parásito y su comportamiento intracelular:

Las observaciones clínicas y experimentales sugieren que la invasión del parásito causa una disfunción celular y participa en la patogénesis: los amastigotes alteran la homeostasis de la célula huésped y comprometen su funcionalidad.

Se ha visto que la presencia de cientos de amastigotes en el citoplasma no altera la arquitectura celular, pero sí las respuestas bioquímicas y fisiológicas que genera la célula ante las innumerables señales provenientes de la membrana plasmática y con efectos en el interior de la célula.

Evidencias recientes muestran que las células endoteliales de la microvasculatura coronaria son blanco de la infección. Los amastigotes alteran la fisiología de estas células influenciando directamente la homeostasis microvascular. Un ejemplo de ello es que la adherencia plaquetaria a las células endoteliales infectadas es mayor que la observada en células normales. Estos estudios han generado una hipótesis alternativa



para la cardiopatía chagásica: las lesiones en la microcirculación pueden ser la base de la disfunción y la patología del corazón. Los factores que contribuyen a la disfunción endotelial son varios y están directamente asociados con los amastigotes, así como lo están indirectamente con la respuesta inmune. Por lo tanto, la enfermedad de Chagas puede ser vista como una batería de agresiones que en forma progresiva afectarán a la microcirculación del corazón y de otros órganos vitales (Morris *et al.*, 1991).

Enfermedad de Chagas y autoinmunidad:

La enfermedad de Chagas tiene características autoinmunes. Si bien la respuesta inmune inicial logra contener la infección, en su curso aumenta el número de linfocitos que reaccionan en forma cruzada con antígenos de las células del hospedador (Parham, 1992).

Después de la etapa aguda, la respuesta desencadenada por estas “células autoinmunes” lleva inexorablemente a la acumulación de lesiones tisulares y eventualmente al desarrollo de patología.

El debate “enfermedad de Chagas-autoinmunidad” se ha extendido por décadas (Kierszenbaum, 1986; Petry and Eisen, 1989) y llevó a demostrar la existencia de reacciones autoinmunes en humanos y animales infectados por *Trypanosoma cruzi*, además de la identificación de un conjunto de antígenos compartidos por el parásito y las células de mamífero, especialmente en el sistema nervioso (Petry and Eisen, 1989).

Parham (1992) realza la importancia de este debate pues, en el caso de que los linfocitos autorreactivos (y no los parásitos) sean los causantes de la patología, la vacunación induciría la proliferación de las células inmunes que más tarde ocasionarán la enfermedad. Por esta razón la hipótesis autoinmune es prioritaria en los esfuerzos por controlar a la enfermedad.



La infección en las zonas rurales:

El problema sanitario es mayor en el medio rural que en el urbano, ya que la tripanosomiasis americana correspondía originalmente a una infección propia de animales selváticos. Luego el hombre irrumpió en sus medios naturales y motivó que algunas especies del insecto vector se adaptaran a la vivienda humana, en un proceso de “domicialización” (Carlomagno *et al.*, 1989).

Como ya fue señalado, la infección está ligada a carencias nutricionales, enfermedades respiratorias y venéreas, diarreas, todas ellas propias de ambientes económicamente carenciados.

Las distintas especies de la subfamilia *Triatominae* tienen hábitos diferentes, lo cual dificulta el control.

En Argentina, el *Triatoma infestans* es la especie de mayor importancia epidemiológica por su potencial de adaptación a la vivienda humana. Los techos de paja y las paredes de adobe constituyen un habitat ideal para su multiplicación, que también se lleva a cabo en la periferia del domicilio, en los gallineros, palomares, conejeras, corrales, y en los lugares donde duermen los mamíferos silvestres.

La transmisión de la enfermedad del animal al hombre se produce principalmente a través del insecto vector. Los animales domésticos, en especial los perros y los gatos, que conviven con el ser humano, constituyen un reservorio natural y contribuyen al establecimiento de un ciclo hombre-vinchuca-animal.

Diagnóstico y tratamiento:

La detección de la infección por *T. cruzi* en la etapa aguda se realiza mediante la examinación directa de la sangre del paciente.

Cuando la infección se ha convertido en crónica, el trypanosoma desaparece de la sangre para alojarse en los tejidos. Por lo tanto, se debe recurrir a un diagnóstico de tipo inmunológico, en busca de anticuerpos específicos en la sangre del paciente. El diagnóstico parasitológico directo



es posible en alrededor de la mitad de los pacientes crónicos, por xenodiagnóstico o hemocultivo.

Las técnicas de biología molecular e ingeniería genética han permitido el aislamiento de moléculas antigénicas que se utilizan en la actualidad como diagnóstico de la enfermedad y de sus etapas (Frasch *et al*, 1991).

Drogas como el Nifurtimox y el Benznidazol cuentan con numerosas contraindicaciones pero son efectivas en la etapa aguda de la enfermedad. Por el contrario, no hay tratamiento aún para la etapa crónica.

El desarrollo de una vacuna:

Desde hace cerca de 20 años vienen realizándose esfuerzos dirigidos a lograr el control inmunológico de la parasitemia y la muerte causada por *Trypanosoma cruzi* en modelos experimentales. Para ello se han utilizado parásitos atenuados (Basombrío and Arredes, 1987), parásitos muertos (Okania *et al.*, 1982), la fracción flagelar del parásito (Ruiz *et al.*, 1985) y proteínas purificadas (Scott and Snary, 1979). Los resultados muestran la generación de una protección de tipo parcial, aunque no se descarta la posibilidad de encontrar mejores antígenos, adyuvantes o estrategias de inmunización. Sin embargo, las reacciones de autoinmunidad limitarían los intentos de vacunación al uso de proteínas puras, por los motivos ya mencionados de reactividad con antígenos propios.

El desarrollo de la ingeniería genética ha permitido producir antígenos recombinantes, superando así los problemas que genera la purificación de tales proteínas directamente a partir del parásito.

Frasch (1991) sugiere que "una vacuna que logre disminuir la parasitemia inicial resultaría en una etapa crónica más leve. Si bien el objetivo final es más ambicioso, una vacuna de este tipo constituiría un éxito parcial en la lucha contra la enfermedad".



Proteinasas:

Las proteinasas son hidrolasas, capaces de catalizar la ruptura hidrolítica de las uniones peptídicas de las proteínas.

Durante muchos años se desestimó el papel de las proteinasas en la regulación de eventos intracelulares.

D.H. Wolf reflexiona acerca de aquellos tiempos: “era difícil pensar en tal función para las proteinasas. ¿Por qué macromoléculas esenciales como las proteínas deberían romperse, si la célula invierte grandes cantidades de energía en su síntesis? El control del metabolismo parecía estar regulado solamente por la síntesis de las enzimas y a través de la unión covalente o no covalente de ligandos. Para muchos investigadores las proteinasas eran catalizadores cuya función consistía en dificultar el trabajo de los bioquímicos interesados en purificar una proteína”.

Los avances realizados en el estudio de las proteinasas han demostrado que juegan un papel vital en la biología celular. Los alguna vez “catalizadores destructivos” son ahora macromoléculas que controlan importantes procesos de la célula (Wolf, 1992).

Con el tiempo se fueron descubriendo nuevas funciones para las proteinasas, que actualmente pueden dividirse en dos categorías.

1) Proteólisis ilimitada, que implica la degradación completa a través de la hidrólisis de un alto número de enlaces peptídicos;

2) Proteólisis limitada, en la cual las proteinasas hidrolizan uno o unos pocos enlaces peptídicos de una determinada proteína.

El primer mecanismo tiene como objeto la degradación de una proteína, exógena o endógena, para utilizar sus aminoácidos en la síntesis de nuevas proteínas. Es esencialmente un papel nutricional.

El segundo, en cambio, cumple diversas funciones que van desde la maduración de una proteína para volverla funcional hasta la modificación de proteínas con el fin de inactivarlas.



Las proteinasas actúan como reguladores en numerosos eventos, por ejemplo en el tráfico de proteínas hacia su localización subcelular, en la maduración y activación de proteínas en dicho compartimiento, en la degradación de proteínas en vacuolas hidrolíticas y en el citoplasma, y en la morfogénesis de parásitos unicelulares y virus (Wolf, 1992).

A su vez las proteinasas están controladas por distintos mecanismos en las células y en la matriz extracelular de los tejidos, que dependen de cada proteinasa en particular, de su forma y de su localización.

Las proteinasas, incluidas las de localización lisosomal, se sintetizan como zimógenos inactivos que luego se activan por un corte proteolítico y/o por un cambio conformacional. Con frecuencia, la activación de un zimógeno requiere de la activación secuencial de otros zimógenos.

La actividad de una proteinasa madura está controlada por el pH, las modificaciones post-traduccionales (fosforilaciones, glicosilaciones, etc.), la localización (en gránulos secretorios, lisosomas o en membranas), la reacción con activadores e inhibidores y la degradación proteolítica (Twining, 1994).

Clasificación de las proteinasas:

Se ha definido el mecanismo catalítico de cuatro tipos de proteinasas: serín, aspartil, metalo y cisteín proteinasas (Barrett and McDonald, 1980; Mason, 1991; Twining, 1994).

También se han identificado otras proteinasas cuyo mecanismo de catálisis es aún desconocido, no correspondiendo a ninguno de los descriptos hasta el momento. Entre estas últimas figuran las peptidasas unidas a membrana que hidrolizan el péptido señal (Dalbey and von Heijne, 1992), las proteinasas presentes en los proteasomas (Rivett, 1993) y el sistema de ubiquitina (Ciechanover and Schwartz, 1994).

Rawlings and Barrett (1993), efectuaron una nueva clasificación mediante la confección de familias evolutivas a partir del análisis de las secuencias aminoacídicas de más de 600 peptidasas.



Este tipo de clasificación, basada en relaciones estructurales y evolutivas, no es compatible con la clasificación de las enzimas basada en las reacciones que catalizan, ya que varias de las familias agrupan enzimas cuya actividad peptidasa difiere marcadamente y, por otro lado, algunas especificidades se encuentran repartidas en distintas familias. Sin embargo, el esquema evolutivo está de acuerdo con el sistema de clasificación por tipo catalítico y tiende a agrupar a las enzimas que se parecen en estructura y mecanismo de catálisis.

Los autores sugieren el uso de esta clasificación como un complemento de aquella basada en el tipo catalítico.

Carrell and Lesk (1994), a través del estudio de las proteinasas 3C de picornavirus, indican que la clasificación en cuatro tipos de proteinasas se ha complicado con el hallazgo de que las subtilisinas (ver más adelante) han evolucionado independientemente hacia la misma tríada catalítica que las quimotripsinas de la familia de las serín proteinasas, y que el desarreglo en tal clasificación es aún mayor con el descubrimiento de una nueva familia de cisteín proteinasas con la misma arquitectura general que las serín proteinasas, pero con una cisteína en lugar de una serina en el centro nucleofílico reactivo.

Veamos las características de las cuatro principales clases de proteinasas, recordando que tal clasificación está basada en la naturaleza del residuo funcional más prominente en el sitio activo (Brandén and Tooze, 1991).

Serín proteinasas:

Las serín proteinasas caracterizadas hasta el momento en procariotes y eucariotes pertenecen a dos superfamilias: la de la quimotripsina, que incluye enzimas digestivas (quimotripsina, tripsina, elastasa), lisosomales, coagulatorias (factores VII, IX, X, XII, trombina, proteína C), fibrinolíticas (urokinasa, activador de plasminógeno de los



tejidos, plasmina) y aquellas secretadas por las células inmunes (factores del sistema de complemento); y la de la subtilisina (furina), que no está evolutivamente relacionada con aquella (Twining, 1994).

Partiendo de proteínas ancestrales no relacionadas, un proceso de convergencia evolutiva ha provisto a ambas de la misma solución estructural para desarrollar un mecanismo catalítico en particular (Brandén and Tooze, 1991)

El mecanismo involucrado en la hidrólisis de la unión peptídica ha sido estudiado en detalle en la superfamilia de la quimotripsina. El sitio activo está formado por una tríada catalítica de residuos serina, histidina y ácido aspártico. Inicialmente el oxhidrilo de la serina ataca al grupo carbonilo de un enlace peptídico, formando un intermediario previo a la hidrólisis que está estabilizado por un puente de hidrógeno con el anión oxígeno. La deacilación del intermediario está catalizada por la adición de un protón proveniente de un grupo imidazol de histidina.

Ambos aminoácidos, serina e histidina, están conservados en todas las serín proteinasas. Sin embargo, las superfamilias mencionadas se diferencian en su estructura y en el orden en el que están dispuestos los residuos catalíticos. En el grupo de la subtilisina el orden en la estructura primaria es: Asp-His-Ser, mientras que en la superfamilia de la quimotripsina es His-Ser-Asp.

Aspartil proteinasas:

Las principales proteinasas de esta clase son las catepsinas D y E humanas, la renina y las enzimas digestivas pepsina y gastricina. La catepsina D es una proteinasa lisosomal que se encuentra en la mayoría de las células, mientras que la catepsinas E es no-lisosomal y se halla en células específicas (Twining, 1994).

El mecanismo de acción de estas proteinasas no se conoce con precisión. Se piensa que actúan por un mecanismo de tipo ácido-base



involucrando a los grupos carboxilos de los dos ácidos aspárticos esenciales, y que demuestran preferencia por los enlaces peptídicos flanqueados por aminoácidos hidrofóbicos.

Son activas a valores de pH menores que 6 y por eso también se las conoce como proteinasas ácidas. Sus pesos moleculares fluctúan entre 30 y 40 kDa. No han sido identificadas en procariotes pero si en eucariotes.

Las aspartil proteinasas son muy similares en estructura primaria. También comparten estructuras de tipo secundario y manifiestan una forma molecular bilobal. A pesar de esta similitud general se encuentran diferencias sustanciales en las propiedades catalíticas, la localización celular y por lo tanto en la función biológica de esta familia de proteinasas (Koelsch *et al.*, 1994).

Metalo proteinasas:

Estas enzimas comprenden a las metalo proteinasas de la matriz y a las proteinasas del tipo de la astacina. Las primeras incluyen, entre otras, a las colagenasas y las gelatinasas A y B (Twining, 1994).

Si bien son enzimas homogéneas, sus estructuras varían de acuerdo a cuáles dominios están presentes. Todos los miembros de este grupo están formados por un propéptido, un dominio catalítico y un dominio que une zinc, pero algunas metalo proteinasas cuentan con dominios accesorios.

La mayoría de las células sintetizan e inmediatamente secretan metalo proteinasas de la matriz en la matriz extracelular. Por el contrario, las células inflamatorias las acumulan.

Las metalo proteinasas coordinan un ion de zinc en el sitio activo con tres residuos de histidina. Se ha propuesto que dicho ion aumenta la reactividad del grupo carbonilo del enlace peptídico a hidrolizar, para así facilitar el ataque nucleofílico de la molécula de agua.

Están ampliamente distribuidas en procariotes y eucariotes. Sin embargo se conoce muy poco de la evolución de este grupo debido a la



escasa información de secuencias aminoacídicas, y a la muy baja homología que presentan, con excepción del motivo involucrado en la unión del Zn^{2+} .

Cisteín proteinasas:

Aparte de las cisteín proteinasas vegetales secretadas, como la papaína S y la actinidaína, existen dos grandes grupos de cisteín proteinasas intracelulares: las catepsinas B, H, L y S, y las calpaínas citosólicas I y II (Twining, 1994).

Las primeras son lisosomales y se hallan presentes en numerosos tejidos, si bien sus niveles varían entre ellos, entre los distintos tipos celulares y entre las células de un mismo tejido.

Las calpaínas constituyen un grupo especial, que requiere de calcio para su actividad. La mayoría de las células contienen dos formas de esta enzima, llamadas I y II, que requieren concentraciones micro y milimolares de calcio, respectivamente. Los niveles relativos de las dos formas difieren entre tipos celulares y entre especies, estando presentes en el nivel más alto en las plaquetas.

Cuentan con tres aminoácidos esenciales para la función catalítica: cisteína, histidina y asparragina. El mecanismo de acción es similar al de las serín proteinasas, excepto en que el ion sulfonio de la cisteína es el encargado de efectuar el ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo del enlace peptídico.

La superfamilia de la papaína, una enzima monomérica de 23,4 kDa, parece ser la familia predominante en los eucariotes. Las catepsinas B, H, L y S tienen una alta homología en la secuencia aminoacídica con la papaína, sugiriendo que han evolucionado a partir de un ancestro común. Además, los aminoácidos que flanquean a la cisteína 25 del sitio activo y a la histidina 159 se han conservado en las cisteín proteinasas lisosomales.



Proteinasas no clasificadas:

Este grupo resulta de la existencia de proteinasas que no han sido purificadas lo suficiente como para asignarles un mecanismo de catálisis determinado o que por sus características no pueden ser clasificadas en ninguno de los 4 grupos descriptos.

Entre ellas puede mencionarse a las peptidasas señal, presentes en procariotes y eucariotes, que remueven el péptido señal de las pre-proteínas cumpliendo una función central en el camino secretorio, así como en el destino de las proteínas del espacio intermembranar de la mitocondria y del lumen de los tilacoides.

Hasta el momento no había sido posible clasificar a las peptidasas señal dentro de una de las familias de proteasas convencionales. Sin embargo datos recientes de alineamiento de secuencias y de mutagénesis dirigida indican que estas enzimas constituirían un nuevo tipo de serín proteinasas, cuyo mecanismo catalítico estaría relacionado con las β -lactamasas (Dalbey and von Heijne, 1992).

El proteasoma es un complejo multicatalítico intracelular de alto peso molecular (700 kDa). Está compuesto de al menos 24 subunidades codificadas por genes miembros de una misma familia, que se disponen formando una estructura de tipo cilíndrica.

El peso molecular de los polipéptidos varía en el rango de 22 a 35 kDa, y los puntos isoeléctricos lo hacen entre 4 y 10 (Rivett, 1994). Sin embargo no están siempre presentes en cantidades iguales, y el número parece variar dependiendo de la especie. Existen, además, discrepancias en cuanto a la presencia y cantidad de ARN asociado a los proteasomas.

Se localizan tanto en el núcleo como en el citoplasma de una variedad de células y tejidos.

El proteasoma tiene una propiedad enzimológica inusual si se lo compara con otras proteinasas: puede catalizar la hidrólisis de una unión peptídica tanto en el lado carboxílico de un aminoácido básico, como en el de uno hidrofóbico o ácido.



Las múltiples funciones proteolíticas parecen estar catalizadas en sitios independientes dentro del complejo, pues las diferentes actividades proteolíticas responden de distinta manera a varios inhibidores y activadores. Existirían al menos cinco componentes catalíticos diferentes en el proteasoma de mamíferos, mientras que el más simple, presente en arqueobacterias, contaría con una sola actividad del tipo quimotripsina.

Las actividades multicatalíticas del proteasoma permiten una rápida degradación de una variedad de proteínas intracelulares, que lleva a la aparición de pequeños péptidos ácidos solubles.

Los mecanismos que modulan la función y la localización de los proteasomas son, hasta el momento, solo especulativos (Rivett, 1994).

La ubiquitina modifica un gran número de proteínas y cumple así un papel importante en varios procesos celulares (Ciechanover and Schwartz, 1994). En particular, una de las modificaciones mejor estudiadas es la vinculada a la degradación proteolítica no lisosomal.

Este proceso ocurre en dos etapas, consistentes en la unión covalente de varias moléculas de ubiquitina, en forma ATP dependiente, a la proteína blanco, y la resultante degradación a aminoácidos libres y la reutilización de las moléculas de ubiquitina.

A pesar de los estudios realizados, no se conoce aún cuales son las señales que llevan a una proteína a ser degradada vía este proceso. Otro problema no resuelto es la identidad de los sustratos naturales de la ubiquitina.

Por último, conviene puntualizar la creencia general de que los proteasomas juegan un rol importante en los sistemas proteolíticos no lisosomales dependientes e independientes de ubiquitina. Existe una evidencia directa del rol del proteasoma en la proteólisis dependiente de ubiquitina, que involucraría la asociación de aquel con otros componentes para formar la proteinasa S 26, que recientemente ha sido implicada,



además, en el reciclado de proteínas independientemente del sistema de ubiquitina (Murakami *et al.*, 1992).

Inhibidores proteicos de proteinasas:

La actividad de los inhibidores endógenos de las proteinasas es vital para limitar la actividad potencialmente destructiva de estas enzimas sobre determinadas proteínas blanco (Bode and Huber, 1991). Aparentemente, y al menos en organismos multicelulares, dichos inhibidores son proteicos. Sólo en microorganismos se han detectado péptidos inhibitorios que pueden bloquear la actividad de las proteinasas del huésped.

La mayoría de los inhibidores proteicos caracterizados hasta el momento están dirigidos contra serín proteinasas (Grutter, 1994), aunque también se han identificado y caracterizado un gran número de inhibidores de cisteín proteinasas. Por el contrario sólo se han caracterizado unos pocos inhibidores de metalo y aspartil proteinasas.

Inhibidores no proteicos de proteinasas:

Las proteinasas usualmente se clasifican de acuerdo al efecto que ejercen los inhibidores sobre la actividad enzimática.

Todas las serín proteinasas son inhibidas por DFP (diisopropil-fluorofosfato), la mayoría por PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro) y algunas por clorometilcetonas. Sin embargo, el PMSF y las clorometilcetonas también inhiben a algunas cisteín proteinasas. Estas, por su parte, son inhibidas por bajas concentraciones de pCMB (paracloromercuri-benzoato) y por agentes alquilantes, como el iodoacetato, la iodoacetamida y la N-etilmaleimida (NEM).

Las aspartil proteinasas son específicamente inhibidas por las pepstatinas y por compuestos diazoacetilos.

Las metaloproteinases son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA y la ortofenantrolina.



Los reactivos de sulfhidrilos generalmente son inespecíficos para los residuos de cisteína en el sitio activo, ya que suelen reaccionar con cualquier otro residuo de ese tipo presente en la proteinasa. En la actualidad se cuenta con un reactivo específico del sitio activo, como el E-64 (L-transepoxisuccinilleucilamido(4-guanidino) butano), que reacciona formando un tioéster.

Los quelantes de metales pueden inhibir a las proteinasas activadas por metales además de las metaloproteinases.

Algunos aldehídos peptídicos como leupeptina, antipaina, quimostatina y elastinal, inhiben a las proteinasas a través de la formación de hemiacetales o hemitioacetales con los residuos serina o cisteína del sitio activo (Bond and Butler, 1987).

Inhibidores de cisteín proteinasas:

Los inhibidores más importantes de las cisteín proteinasas de mamíferos son la α 2macroglobulina y la superfamilia de las cistatinas, subdividida en 3 familias de proteínas homólogas en secuencia: las stefinas, las cistatinas propiamente dichas y los kininógenos (Mason, 1991; Turk and Bode, 1991).

La α 2macroglobulina se encuentra en el suero y su mecanismo de inhibición no distingue entre las distintas clases de proteinasas.

Las stefinas son monómeros de un peso molecular de 11 kDa que no contienen puentes disulfuro ni hidratos de carbono (Barrett *et al.*, 1987). Son inhibidores potentes, reversibles y competitivos de las cisteín proteinasas, siendo la constante de inhibición (K_i) de la stefina A humana para la papaína de $1,9 \cdot 10^{-11} M$.

Si bien se ha sugerido que son proteínas intracelulares, también se las encontró en fluídos extracelulares.

Son resistentes al calor y estables a pHs neutro y alcalino.



Las cistatinas son inhibidores potentes de las cisteín proteinasas del tipo de la papaína, que se unen reversiblemente y de forma fuerte y específica a su sitio activo. Están compuestas de 115 aminoácidos y su peso molecular es de aproximadamente 13 kDa. Se encuentran tanto en el citoplasma como secretadas en los fluidos extracelulares.

La cistatina de clara de huevo de gallina es un potente inhibidor de la papaína ($K_i=5.10^{-12}M$) y de otras cisteín proteinasas, como por ejemplo la cruzipaina (Labriola *et al.*, 1993).

Los kininógenos, además de ser inhibidores de cisteín proteinasas de la superfamilia de la papaína, cumplen otras funciones, por ejemplo en la cascada coagulatoria de la sangre y en los procesos inflamatorios. Se conocen 3 clases de kininógenos: H, L y T. Todos ellos están compuestos por una sola cadena polipeptídica, si bien las formas L y H también existen como oligómeros. Estos últimos inhiben fuertemente a la papaína y a la catepsina L y debilmente a las catepsinas H y B. Son proteínas ácidas y se encuentran en el plasma y en otras secreciones de los mamíferos.

En la última década se ha producido un enorme avance en la dilucidación de la estructura y función de las cistatinas. No obstante, se necesitan nuevos estudios para incrementar el conocimiento de la bioquímica y la biología molecular de las cisteín proteinasas y sus inhibidores. Estos progresos generarán las bases para comprender los procesos degradatorios de proteínas en condiciones normales o patológicas. Asimismo, dichos avances permitirán el diseño de nuevos agentes terapéuticos.

Métodos para el análisis de las proteinasas.

Los proyectos en ejecución tienen dos objetivos principales: conocer las funciones que cumplen las proteinasas durante el ciclo de vida del parásito y encontrar inhibidores y sustratos que puedan utilizarse como drogas y pro-drogas antiparasitarias respectivamente.



Una utilidad extra que brinda el conocimiento de las proteinasas está relacionada con las degradaciones proteolíticas que se producen en los intentos de purificación de enzimas, proteínas y antígenos de parásitos.

El desarrollo de geles de poliacrilamida con sustrato incorporado ha permitido descifrar la complejidad de las proteinasas presentes en un protozoo parásito. A esto debemos sumarle el uso de derivados de péptidos fluorogénicos y cromogénicos como sustratos para la identificación de enzimas con distinta especificidad. En conjunto, estas técnicas han provisto una herramienta útil para determinar individualmente la especificidad de las proteinasas sin necesidad de purificarlas (North *et al.*, 1990b).

En la actualidad se tiende cada vez más a obtener las proteinasas en cantidades grandes, aplicando técnicas de ADN recombinante.

El aporte de los vectores de expresión: ventajas y desventajas.

Una vez clonado el gen de una cisteín proteinasa en un vector de expresión adecuado resulta relativamente simple obtener la proteína recombinante en una bacteria. Este sistema brinda la posibilidad de contar con grandes cantidades de la enzima recombinante y purificarla luego de las proteínas de la bacteria.

Sin embargo, la sobreexpresión de una proteína suele llevar a su agregación en cuerpos de inclusión (Mitraki and King, 1989; Schein, 1989). Estas estructuras densas, insolubles y observables al microscopio óptico son aglomeraciones de proteínas en un estado intermedio de plegamiento.

No se conocen con exactitud cuáles son las características de una proteína que deciden su solubilidad o su agregación en cuerpos de inclusión. No obstante, Wilkinson y Harrison, (1991) han determinado algunos de los principales factores involucrados en tal decisión.



¿Cómo expresar una proteinasa activa?

En la mayoría de los casos se pretende que la enzima recombinante purificada sea activa. Vale recordar que estas estrategias de sobreexpresión son esenciales cuando se intenta estudiar la actividad de una enzima que se encuentra en cantidades ínfimas en el organismo que la produce naturalmente.

El problema surge cuando se pretende sobreexpresar una proteinasa activa, que seguramente será nociva para el metabolismo de la bacteria. En este caso, la formación de cuerpos de inclusión es una alternativa eficiente que adopta la bacteria para protegerse de la actividad proteolítica.

Para obtener a la enzima en estado activo se la debe desnaturalizar en altas concentraciones de urea y luego renaturalizar lentamente y en condiciones adecuadas (Hartley *et al.*, 1988; Dombroski *et al.*, 1992).

Dichos procedimientos no siempre resultan satisfactorios. Por otro lado, las cantidades de enzima activa que se recuperan suelen ser pequeñas respecto de la cantidad inicial.

Los resultados obtenidos por muchos laboratorios señalan que lo aplicable a una proteinasa no puede tomarse como regla general para otras proteinasas.

Los avances en materia de expresión de cualquier proteína recombinante suelen producirse por prueba y error.

En definitiva, la generación de grandes cantidades de proteinasas activas por técnicas de ingeniería genética ha resuelto en gran parte los problemas que suscita la purificación de cisteín proteinasas a partir de, en muchos casos, cantidades exiguas de parásitos.

Los estudios realizados sobre las proteinasas recombinantes demostraron que sus características bioquímicas son similares, aunque no idénticas, a las de las enzimas nativas.



La expresión de las proteinasas y un problema extra:

Un factor a tener en cuenta en el caso de las proteinasas es que se sintetizan como precursores, siendo el pro-péptido necesario, entre otras cosas, para el plegado correcto de la enzima.

Las regiones pro tienen un tamaño variable y pueden estar localizadas en el extremo amino o en el carboxilo, o en ambos a la vez, siendo las primeras las más comunes.

Si se pretende expresar una proteinasa recombinante en una bacteria, el gen clonado debe contar con la región pro. Algunos experimentos con proteasas recombinantes han demostrado que la expresión de un gen que carece de la región que codifica al pro-péptido no permite la obtención de la enzima activa.

Los resultados obtenidos indican que el pro-péptido se necesita de forma transiente para el plegado funcional de la enzima, y por lo tanto es razonable suponer que cumple un papel en la maduración o en el plegado del dominio catalítico asociado (Baker *et al.*, 1993).

La expresión en forma activa de algunas cisteín proteinasas como la cathepsina L (Smith and Gottesman, 1989), la papaína (Vernet *et al.*, 1991), la cisteín proteinasa de *T. brucei* (Pamer *et al.*, 1991) y la cruzipaina (Eakin *et al.*, 1993) también requiere de la presencia de los pro-péptidos.

Un fenómeno parecido ocurre con las aspartil proteinasas eucarióticas, que también se sintetizan como zimógenos y se activan a través de la remoción proteolítica de la región pro amino-terminal, que consta de 44 a 50 aminoácidos.

Evidencias recientes sugieren que la región pro de estas enzimas está involucrada en el plegamiento y en la localización subcelular. Estos resultados provienen de experimentos de expresión de la procatepsina D humana en células de mamífero: cuando dicha enzima se expresó sin su



región pro, fue rápidamente degradada intracelularmente, probablemente debido a un plegamiento fallido.

En tanto, los intentos de expresión de la renina sin la región pro fueron exitosos (Koelsch *et al.*, 1994).

Se efectuaron observaciones similares en la familia de las serín proteinasas, detectándose que la función de tipo chaperona de la región pro depende del carácter hidrofóbico o polar de los residuos aminoácídicos.

Los experimentos *in vitro* llevados a cabo con la pro-carboxipeptidasa Y de *Saccharomyces cerevisiae* demostraron que es capaz de plegarse rápidamente después de su desnaturalización, mientras que no ocurre lo mismo con la enzima madura (Baker *et al.*, 1993).

En todos los casos estudiados en este sentido, las regiones pro que están involucradas en el plegado correcto de la enzima también cumplen funciones inhibitorias en sus respectivas enzimas. En base a esta correlación, es válido suponer que el número de pro-péptidos involucrados en el plegamiento del dominio catalítico es considerablemente mayor al supuesto hasta el momento.

La conformación excepcionalmente estable de una enzima madura no implica que sea capaz de adquirir esa estructura en tiempos medibles experimentalmente.

Según Baker *et al.* (1993), la estabilidad termodinámica no garantiza la accesibilidad cinética.

La naturaleza habría empleado como recurso extra un polipéptido, la región "pro", para resolver el problema cinético y facilitar el acceso al estado maduro.



El diseño de drogas específicas:

Muchas de las proteinasas de los protozoos parásitos resultan particularmente atractivas para el diseño de drogas específicas. Sin embargo, los compuestos existentes en la actualidad no han sido diseñados en base a las peculiaridades de las proteinasas de los protozoos, sino que se utilizan por haber demostrado potentes efectos inhibitorios en las enzimas de mamíferos.

En los años 80 eran aproximadamente 10 los proyectos de diseño de drogas específicas mediante la cristalografía de proteínas y el modelado por computadora (Verlinde and Hol, 1994). En el año 1993, en cambio, el número de determinaciones de estructura sobre la proteinasa del virus HIV, complejada con una gran variedad de inhibidores, llegaba a los 200.

Este fenomenal incremento en el estudio estructural detallado de proteínas de importancia médica se debe a varios factores: en primer lugar, las técnicas de biología molecular han permitido obtener grandes cantidades de la proteína en cuestión, como se describió previamente. En segundo término, los métodos de purificación de proteínas, especialmente los cromatográficos, han evolucionado en gran medida. Lo mismo ha ocurrido con los instrumentos utilizados en cristalografía, lo cual hace altamente probable el éxito aún con cristales de baja difracción. Por último cabe mencionar el desarrollo explosivo de la computación y los programas de graficación.

Como consecuencia de estos adelantos, vemos que en los dos últimos años la tasa de determinación de estructuras se ha duplicado, y sigue en continuo aumento.

Sin embargo, no debemos olvidar que es muy largo el camino entre el descubrimiento o el diseño de un acertado inhibidor de una proteína y el momento en que esa droga comienza a comercializarse. De hecho, un excelente inhibidor puede ser muy tóxico, rápidamente eliminado del metabolismo, incapaz de alcanzar a la proteína blanco, inestable en



solución, o muy costoso en lo que a producción se refiere. Los criterios de aceptación de una nueva droga son muy rigurosos, y esa es la causa por la cual muchos, en teoría buenos inhibidores, nunca alcanzan a ser administrados a la población. Es imposible prever cómo la nueva droga afectará al metabolismo, aún con un detallado conocimiento de tipo farmacológico y toxicológico.

Verlinde and Holl (1994) sugieren que una estrategia válida para combatir la resistencia que manifiestan los patógenos sería el uso combinado de drogas que actúen en distinta forma. De ese modo, las chances de generar resistencia se verían reducidas. Los resultados conseguidos en el tratamiento de la lepra con varias drogas en simultaneo han sido exitosos.

Tal vez sea el camino a seguir en el futuro.



Las enzimas lisosomales y su destino intracelular:

Las células eucariotes poseen un conjunto de proteasas inespecíficas y muy activas que son recluidas en los lisosomas para evitar que la actividad proteolítica desatada libremente en el citoplasma produzca la autodestrucción celular (Knop *et al.*, 1993).

Las enzimas lisosomales, al igual que las proteínas de secreción, son secuestradas dentro del lumen del retículo endoplásmico donde sufren una serie de modificaciones post-traduccionales antes de ser dirigidas por el transporte vesicular hasta su destino final en la célula.

Al menos en algunos tipos celulares, inmediatamente después del ensamblado de la cadena polipeptídica, los oligosacáridos de alta manosa unidos a asparagina de las enzimas lisosomales (y no los presentes en las proteínas de secreción) son covalentemente modificados por la adición de N-acetilglucosamina-1-fosfato. Dichos residuos son removidos en el aparato de Golgi, para generar fosfatos monoésteres, capaces de unirse a los receptores de manosa 6-fosfato (MPRs).

Los complejos receptor-ligando son transportados en vesículas derivadas del aparato de Golgi hacia endosomas tardíos acidificados o prelisosomas, donde las vesículas endocíticas descargan su contenido. Allí las enzimas lisosomales son liberadas de los MPRs, los cuales son reciclados al Golgi o a los endosomas tempranos (McIntyre and Erickson, 1991).

Si bien se han clonado y caracterizado dos receptores de manosa 6-fosfato (Kornfeld, 1992), aún se desconoce cuál es la señal que permite a la fosfotransferasa localizada en el *cis* Golgi distinguir a las enzimas lisosomales solubles de las otras glicoproteínas que pasan por ese compartimiento celular.



La falta de homologías evidentes en la secuencia primaria o en el número y localización de carbohidratos o en los residuos de manosa fosforilados que se encuentran en las proteínas lisosomales sugiere que la señal para el destino lisosomal es una cierta estructura tridimensional, compartida por las proteínas lisosomales solubles.

En la catepsina D el dominio reconocido como señal para la adición de manosa 6-fosfato ha sido asignado a dos secuencias discontinuas (Metcalf and Fusek, 1993). La introducción de estas secuencias en posiciones análogas en el glicopepsinógeno que se secreta resulta en la fosforilación de los oligosacáridos y su transporte al lisosoma (Baranski *et al.*, 1990).

Existen mecanismos de transporte alternativos para las enzimas lisosomales:

Algunas proteínas lisosomales son dirigidas hacia el lisosoma por un mecanismo independiente de los MPRs. Un ejemplo de ello es la glucocerebrosidasa y las enzimas lisosomales de *Dictyostelium discoideum* (Cardelli *et al.*, 1986) que se localizan en los lisosomas pese a no tener manosa 6-fosfato.

Se ha demostrado que las formas biosintéticas tempranas de las catepsinas L y D interactúan específicamente con membranas microsomales mediante un mecanismo independiente de MPR. Ambas catepsinas de fibroblastos de ratón se asocian específicamente con membranas microsomales a un pH ácido. Por lo contrario las enzimas maduras, formadas por el clivaje proteolítico del pro-peptido N-terminal, no se asocian (o lo hacen en pequeña proporción) con las membranas microsomales aún a amplios rangos de pH.

Estos resultados sugieren que las regiones pro-peptídicas de las procatepsinas L y D no solo anulan la actividad proteolítica de la enzima, sino que también median su unión a membrana por un mecanismo MPR-independiente (McIntyre and Erickson, 1991).



Proteinasas de protozoos parásitos.

Las proteinasas y su creciente interés:

Las proteinasas de los parásitos han sido objeto de considerable atención en los últimos tiempos. Se podrían argumentar tres razones que explican el gran interés generado. En primer lugar, y como fue señalado anteriormente, se ha visto que las proteinasas cumplen roles importantes en las células. En segundo lugar, por el desarrollo de métodos que permitieron la detección, separación y caracterización de las múltiples formas de proteinasas que aparecen en los protozoos parásitos. En tercer lugar, y en relación con el uso de drogas, se destaca el acceso a una gran variedad de derivados peptídicos que han sido diseñados para inhibir específicamente a las distintas proteinasas (North, 1991a).

El predominio de las cisteín proteinasas:

De los cuatro tipos de proteinasas descritos, las cisteín proteinasas son las más abundantes en el diverso grupo de los protozoos parásitos (North *et al.*, 1990a), y fueron halladas en al menos un estadio de su ciclo de vida. Algunas de las cisteín proteinasas de protozoos son comparables en tamaño a las enzimas de plantas y animales, aunque existen especies que cuentan con enzimas considerablemente más grandes.

Se han identificado otras clases de proteinasas en los protozoos, pero pocas han sido caracterizadas en detalle. Una excepción es la metaloproteinasa dependiente de zinc presente en la membrana plasmática de todas las especies estudiadas de *Leishmania* (Etges and Bouvier, 1991).

En un principio fue conocida como el antígeno gp63, pero posteriormente se caracterizó su actividad proteolítica.

Otras metaloproteinasas fueron encontradas en *Trichomonas sp.* (North, 1991b) y en *Trypanosoma cruzi* (Greig and Ashall, 1990).

Las serín proteinasas están presentes probablemente en los trypanosomas africanos (Lonsdale-Eccles, 1991) y en *Plasmodium sp.* (Rosenthal, 1991 ; Schrével *et al.*, 1991). Un gen codificante de una serín



proteínasa fue amplificado por PCR en *Trypanosoma cruzi* aunque no pudo detectarse la actividad enzimática (Sakanari *et al.*, 1989).

Las aspártico proteínasas sólo fueron reportadas en algunas especies de *Plasmodium* (Rosenthal, 1991; Schrével, 1991).

La amplificación por PCR ha permitido obtener fragmentos de genes de proteínasas de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Entamoeba histolytica* (Eakin *et al.*, 1990), *Plasmodium falciparum* (Rosenthal, 1991), *Trypanosoma rangeli* (Tanaka *et al.*, 1994) y otros protozoos parásitos (North *et al.*, 1990a).

El clonado y la secuenciación de diversos genes codificantes de cisteín proteínasas ha completado el conocimiento bioquímico previo.

La cisteín proteínasa de *Trypanosoma brucei* fue la primera en ser secuenciada por completo como cADN (Mottram *et al.*, 1989). A partir de allí se secuenciaron otras cisteín proteínasas, entre ellas la de *Trypanosoma cruzi* (Eakin *et al.*, 1992; Campetella *et al.*, 1992) y recientemente las de *T. congolense* (Authié, 1994) y *T. rangeli* (Martínez *et al.*, enviado a publicación).

Las secuencias de ADN sugieren que las cisteín proteínasas de los protozoos están muy relacionadas con la catepsina L de mamíferos y poco con la catepsina B. Los trypanosomátidos presentan la mayor homología con la catepsina L, pero algunos de ellos poseen, además, una extensión carboxilo terminal. Tal es el caso de la cruzipaína (cisteín proteínasa principal de *Trypanosoma cruzi*) (Åslund *et al.*, 1991), y las enzimas de *Trypanosoma brucei* (Mottram *et al.*, 1989) y *Leishmania mexicana* (Souza *et al.*, 1992).



Proteinasas de *Trypanosoma cruzi*.

Cisteín proteinasas:

Las proteinasas de *Trypanosoma cruzi* participan en la nutrición del parásito a expensas del hospedador y en otros aspectos de dicha relación (Cazzulo, 1991); hay algunas evidencias que sugieren un rol en la penetración del trypomastigote en la célula hospedadora. Dicho evento es manifiestamente sensible a algunos inhibidores de proteinasas, tal como demostraron Piras *et al.* (1985).

Las proteinasas también podrían participar en la evasión de la respuesta inmune mediante la fabulación (Krettli *et al.*, 1980) y por la digestión intracelular de inmunoglobulinas G humanas endocitadas una vez reconocido el antígeno (Teixeira and Santana, 1989).

En los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* se han descripto distintas actividades proteolíticas. Itow y Camargo (1977) detectaron cuatro proteinasas diferentes entre si, activas sobre azocaseína y BAPA en extractos crudos de epimastigotes de la cepa Y.

Torruella *et al.*, (1981) detectaron la actividad azocaseinolítica en cinco cepas diferentes del parásito.

Avila *et al.*, (1979) detectaron tres actividades que fueron clasificadas como peptidasas y dos como catepsinas en extractos crudos de epimastigotes de la cepa Y.

Todos estos estudios fueron realizados con extractos crudos, y por lo tanto es difícil saber si las actividades descriptas corresponden a distintas enzimas.

Bongertz y Hungerer (1978) purificaron una enzima de peso molecular aparente de 200 kDa a partir de epimastigotes de la cepa D1 de *Trypanosoma cruzi*. La proteinasa demostró ser activa sobre BAPA y algunas proteínas, y los estudios efectuados con inhibidores indicaron que se trataba de una cisteín proteinasa.



Rangel *et al.*, (1981a, b) purificaron una proteinasa a partir de epimastigotes de la cepa Y. La enzima, de 60 kDa de peso molecular, resultó insensible al tratamiento con TLCK (un inhibidor de cisteín y serín proteinasas) y fue capaz de degradar caseína y hemoglobina a pHs óptimos 6 y 3 respectivamente.

Cazzulo y Franke de Cazzulo (1982) estudiaron las actividades proteolíticas sobre sustratos endógenos en extractos libres de células de epimastigotes de la cepa Tul2 de *Trypanosoma cruzi*. Los resultados de actividad en función del pH, la temperatura y el efecto de inhibidores sugirieron que el principal factor responsable de la degradación de las proteínas presentes en los extractos celulares sería la enzima capaz de actuar sobre azocaseína detectada por Itow y Camargo (1977) y por Torruella *et al.*, (1981).

Bontempi *et al.*, (1984) informaron la purificación a homogeneidad y el estudio de algunas características de esta enzima, que resultó ser monomérica y de 60 kDa. de peso molecular aparente.

La proteasa aislada por Rangel *et al.* (1981) de 60 kDa podría ser la misma enzima, sin embargo existen importantes diferencias con la hallada por Bontempi *et al.*, (1984) en cuanto al patrón de inhibidores, la temperatura óptima de catálisis y los sustratos utilizados.

Otras proteinasas de *T. cruzi*:

Además de las cisteín proteinasas se ha informado la existencia de una serín proteinasa (Sakanari *et al.*, 1989) y una metaloproteinasa (Greig and Ashall, 1990). El gen de la serín proteinasa se identificó a través de un ensayo de PCR, utilizando para ello oligonucleótidos conservados de serín proteinasas eucarióticas, pero aún no se identificó la actividad proteolítica correspondiente, si bien se han detectado en *T. cruzi* peptidasas que, por su patrón de inhibición, serían serín proteinasas (Healy *et al.*, 1992).

La metaloproteinasa tiene un pH óptimo alcalino y su peso molecular aparente es de 60 kDa. Está asociada a la membrana plasmática y podría estar relacionada con la glicoproteína gp63 de *Leishmania*.



Aún no existen evidencias de actividad de aspartil proteinasas en *T. cruzi* (Cazzulo, 1994). Recientemente se han detectado algunas peptidasas en extractos libres de células de epimastigotes (Healy *et al.*, 1992). Una cisteín peptidasa, tal vez una de las descritas por Healy *et al.*, ha sido purificada a homogeneidad. Su peso molecular es de 120 kDa y es relativamente poco sensible al inhibidor específico E-64 (Santana *et al.*, 1992).



La cruzipaína, cisteín proteinasa principal de *Trypanosoma cruzi*.

Los primeros estudios.

La cruzipaína fue purificada hasta homogeneidad electroforética por Bontempi *et al.*, (1984) a partir de epimastigotes de la cepa Tul2 de *T. cruzi*. El proceso de purificación consistió en la obtención de un extracto crudo, un fraccionamiento con sulfato de amonio en el rango 0-50%, una filtración por gel (Sephadex G-200), una cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sephacel) y finalmente una columna de hidroxilapatita.

La enzima resultó ser monomérica y de 60 kDa de peso molecular aparente. Entre sus características principales se destacó la utilización de azocaseína, caseína, seroalbúmina bovina y hemoglobina como sustratos. La actividad máxima se obtuvo sobre seroalbúmina bovina a pH 4 y también se observó actividad sobre las proteínas solubles del parásito, con un pH óptimo 3.

Es importante señalar que cuando se utilizaron los citados sustratos la actividad en función del pH para un sobrenadante de 105.000 g y para la enzima purificada fue muy similar, lo cual sugiere que la proteinasa es la principal enzima responsable de la actividad hidrolítica en epimastigotes de *T. cruzi*.

La "temperatura óptima" de actividad de la enzima purificada sobre azocaseína fue de 60°C, lo cual indica una termoestabilidad considerable para una enzima de organismo mesófilo.

La cruzipaína fue fuertemente inhibida por reactivos de tioles como el pCMB y el pCMPS. Los compuestos que contienen grupos tioles, como el β -mercaptoetanol y el glutatión reducido, activaron a la enzima.

En conjunto, los estudios con inhibidores y activadores sugirieron que la proteinasa en cuestión era una cisteín proteinasa.



Nuevos métodos para la purificación de la cruzipaína:

En el año 1989, Cazzulo *et al.* desarrollaron una modificación del método de purificación de la cisteín proteinasa principal de *T. cruzi*.

En síntesis, los parásitos se lisaron mediante ciclos de congelado y descongelado a -20°C y se efectuó un fraccionamiento con sulfato de amonio. Posteriormente se efectuó una cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sephacel). Las fracciones activas se agruparon, se concentraron con sulfato de amonio al 75% y se sembraron en una columna de Sephadex G-200. Si bien las preparaciones obtenidas fueron homogéneas a la electroforesis, para ciertos usos especiales, como la obtención de anticuerpos, se prosiguió con FPLC en una columna de Mono Q y finalmente una filtración en una columna de Superosa-12.

Labriola *et al.* (1993), desarrollaron una cromatografía de afinidad en cistatín Sefarosa que permite obtener a la cruzipaína en estado puro en un solo paso a partir de un extracto crudo de epimastigotes de *T. cruzi*. El método es específico para cisteín proteinasas y tiene un gran potencial para la purificación de dichas enzimas a partir de fuentes escasas, como por ejemplo amastigotes y tripomastigotes de cultivo, o de otros parásitos con bajos niveles de expresión de cisteína proteinasa.

La cruzipaína es una glicoproteína de la superfamilia de la papaína:

Cazzulo *et al.*, (1989) determinaron la secuencia de 32 aminoácidos del extremo N-terminal de la cruzipaína. Además, por digestión con tripsina y separación en HPLC en fase reversa, se obtuvo un pico prominente, cuya secuencia rindió 14 aminoácidos.

Tal como se muestra en la figura 3, las dos secuencias mostraron una considerable homología con la papaína y particularmente con la



catepsina L, indicando que la proteinasa es una cisteín proteinasa perteneciente a la superfamilia de la papaína.

a) Secuencia N-terminal:

	* *** * * * * * *****
cruzipaína	APA [*] AVDWXAX GAVTAVKDQ [*] G QCGSCWAFSA IG
catepsina L	APRSVDWREK GYVTPVKDQ [*] G QCGSCWAFST TG
papaína	IPEYVDWRQ [*] K GAVTPVKNQ [*] G SCGSCWAFSA VV
	1 10 20 30

b) Secuencia de un péptido tríptico:

	*** ** ***
cruzipaína	NSWTAQWGED GYIR
catepsina L	NSWGEKWGDK GYIY
papaína	NSWGTGWGEN GYIR
	1 10

Figura 3: Secuencia aminoacídica del extremo N-terminal y de un péptido interno de la cruzipaína.

Se detallan los primeros 32 aminoácidos del extremo N-terminal de la cruzipaína y de 14 aminoácidos correspondientes a un péptido tríptico.

Con un asterisco (*) se señalan los residuos de la cruzipaína que se encuentran conservados en la catepsina L y en la papaína.

(Cazzulo *et al.*, 1989)



La unión a una columna de ConA-Sefarosa y la subsecuente elución con azúcares específicos (α -metil-D-manopiranosido y α -metil-D-glucopiranosido) indicó que la cisteín proteinasa es una glicoproteína con hidratos de carbono del tipo alta manosa (Cazzulo *et al.*, 1989).

El tratamiento de la enzima purificada con la endoglucosidasa H generó una disminución de su peso molecular aparente de 60 a 54 kDa, confirmando su carácter glicoproteico informado previamente (Cazzulo *et al.*, 1990a).

Además de la banda principal apareció un segundo componente de 30-35kDa (Cazzulo *et al.* 1989) que careció de actividad proteolítica en geles con sustrato incorporado (Martínez *et al.*, 1989). Estos componentes, que aparecían en cantidades variables dependiendo de la purificación, también sufrieron una disminución en su peso molecular aparente después de ser deglicosilados (Cazzulo *et al.*, 1990a).

Otros experimentos indicaron que el procesamiento post-traducciona l de la cisteín proteinasa incluía la adición de oligosacáridos de alta manosa del tipo Man9-6GlcNac2.

No se obtuvieron evidencias en favor de la existencia de residuos fosfato, lo cual sugiere que el destino lisosomal de la cruzipaína no está determinado por marcadores de manosa-6-fosfato.

Tampoco se detectó en microsomas de epimastigotes de *T. cruzi* a la enzima UDP-GlcNAc:glicoproteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, encargada de la generación de los mencionados marcadores (Cazzulo *et al.*, 1990a).

Localización subcelular de la cruzipaína.

La enzima está localizada en los lisosomas (Bontempi *et al.*, 1989). Esta evidencia partió de estudios en los cuales la proteinasa fue extraída de células enteras con concentraciones de digitonina mayores a las requeridas para la extracción de marcadores citosólicos, menores a las que se emplean para marcadores mitocondriales y de glicosomas, y similares a las requeridas para la solubilización de la α -manosidasa ácida. Tanto la



proteínasa como la α -manosidasa ácida presentaron la misma latencia y distribución en fracciones subcelulares.

No obstante, un suero policlonal monoespecífico hecho en conejo contra la enzima purificada detectó a la cruzipaina no sólo en los lisosomas sino también en la superficie celular de epimastigotes, amastigotes, formas de transición entre amastigotes y trypomastigotes y en el bolsillo flagelar de trypomastigotes. Estos hallazgos sugieren una segunda localización, tal vez solo transiente, en la membrana plasmática (Souto Padrón *et al.*, 1990). En el mismo trabajo se observó que los fragmentos F(ab)₂ de las inmunoglobulinas presentes en el antisuero previenen parcialmente la infección de macrófagos de mamíferos por los trypomastigotes (Souto Padrón *et al.*, 1990).

Actividad proteolítica en geles con sustrato incorporado.

Utilizando geles con un sustrato proteico co-polimerizado (fibrinógeno o hemoglobina) se estudió la actividad proteolítica de extractos libres de células de epimastigotes de *T. cruzi* (Martínez *et al.*, 1989). La banda ancha de actividad principal, presente en distintas cepas del parásito, presentó una movilidad similar a la de la enzima purificada. Cuando se sembraron cantidades superiores de dichos extractos aparecieron bandas secundarias, que fueron inhibidas por pCMB, TLCK y leupeptina, e insensibles a PMSF, este último un inhibidor típico de serín proteinasas, aunque capaz de inhibir también a algunas cisteín proteinasas.

En comparación, el patrón de bandas obtenido en *T. brucei* por Lonsdale-Eccles and Mpimbaza (1986) fue mucho más complejo que el de *T. cruzi*.



Avances en la determinación de la secuencia aminoacídica de la cruzipaína.

Continuando con la caracterización de la cisteín proteinasa principal de *T. cruzi*, Cazzulo *et al.* (1990a) determinaron que la secuencia del extremo N-terminal de la banda principal de 60 kDa y de las bandas de 30-35 kDa era la misma: APAVDWA, tal como puede observarse en la figura 3.

En geles pre-armados de 10-15% de acrilamida pudieron detectarse otras bandas secundarias de aproximadamente 15, 22 y 26 kDa. La secuencia del extremo N-terminal de la banda de 15 kDa fue similar a la de la enzima intacta. Las bandas de 22 y 26 kDa, en tanto, generaron la secuencia XPGPXPEP, que pertenecería, probablemente, a una región interna de la cisteín proteinasa.

Estos resultados sugirieron que las bandas menores aparecerían por una proteólisis limitada en distintas uniones peptídicas de la molécula de 60 kDa, y que se mantendrían asociadas por uniones hidrofóbicas a través del proceso de purificación.

La cruzipaína puede autoproteolizarse.

Estudios posteriores indicaron que la cruzipaína puede autoproteolizarse (Hellman *et al.*, 1991).

La cruzipaína purificada a homogeneidad fue incubada a pH 6 y 56°C tal como se describe en "Materiales y Métodos". En la figura 4 se detalla un minigel de poliacrilamida al 10% con SDS en el que se puede apreciar la extensa degradación (calles 1 y 2) que llevó a la obtención de una banda ancha de peso molecular aparente cercano a los 25 kDa y a la desaparición de las bandas de 50 kDa (correspondientes a la enzima intacta) y las mencionadas bandas de 30-35 kDa.

El efecto de algunos inhibidores de cisteín proteinasas se observa en las calles 3 a 9 de la misma figura: E-64, TLCK, leupeptina, antipaína y quimostatina fueron efectivos en la prevención de la degradación, mientras



que el PMSF, que no inhibe a la actividad proteolítica ensayada sobre otros sustratos, fue ineficiente. El patrón de inhibición fue entonces idéntico al mostrado por la cruzipaína en geles con sustrato incorporado (pág. 54) y sobre azocaseína (pág. 69) y por lo cual la proteólisis puede ser considerada una reacción catalizada por la misma cruzipaína.

La extensión C-terminal y sus modificaciones post-traduccionales.

El fragmento de 25 kDa obtenido por autoproteólisis fue secuenciado en su extremo N-terminal y arrojó la secuencia GPGPXPEPXXXXXXXXSAPXP, (Hellman *et al.*, 1991) cuyos ocho primeros residuos fueron iguales a los generados por dos de las bandas que suele acompañar a la cruzipaína durante su purificación (Cazzulo *et al.*, 1990a).

El hecho de que la secuencia prosiguiese después de 6 residuos no identificados (X) sugirió la presencia de modificaciones post-traduccionales que impedirían la identificación del aminoácido sustituido.

Los intentos de reducción, piridiletilación y posterior tripsinización del fragmento de 25 kDa resistente a la autoproteólisis fueron muy poco exitosos, puesto que un control, utilizando solamente tripsina, demostró que la mayoría de los péptidos más hidrofílicos correspondían a fragmentos de proteólisis de la propia tripsina. En tanto, el fragmento de 25 kDa fue sólo parcialmente degradado.

Un ensayo similar sobre la cruzipaína madura (Cazzulo *et al.*, 1989) rindió un tetradecapéptido muy prominente que contenía dos residuos triptofano (figura 3). Otro péptido, obtenido por tripsinización de la enzima madura, generó la secuencia EEASSAVVGGPGPTPE (Hellman *et al.*, 1991), cuyos 7 aminoácidos finales son idénticos al extremo N-terminal del fragmento de autoproteólisis.



El tratamiento con endoglicosidasa H provocó una disminución de 25 a 20 kDa en el peso molecular aparente de dicho fragmento, indicando la presencia de oligosacáridos de alta manosa al igual que en la enzima madura.

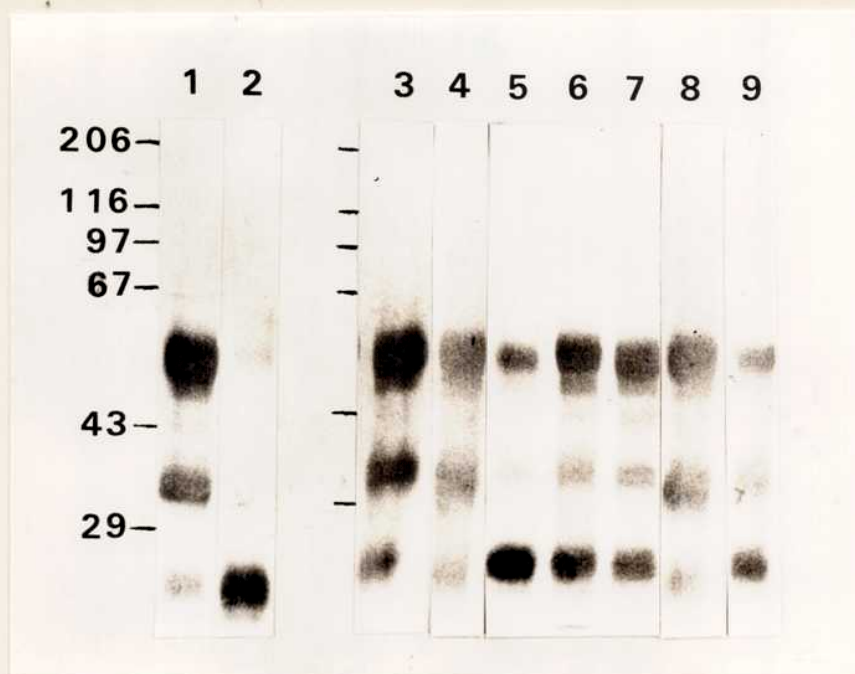


Figura 4: Autoproteólisis catalizada por la cruzipaína purificada y efecto de inhibidores de proteinasas.

La cruzipaína fue incubada durante 24 horas, con o sin inhibidores, tal como se describe en "Materiales y Métodos". Se tomaron alícuotas de 50 μ l de la mezcla, se secaron por centrifugación al vacío, se disolvieron en 10 μ l de solución de siembra y se aplicaron 4 μ l en un gel de poliacrilamida con SDS al 10%.

Calle 1: enzima no autodigerida.

Calle 2: enzima autoproteolizada

Calles 3 a 9: como la calle 2, pero la incubación se efectuó con 0,1 mM E-64 (3), 0,1 mM leupeptina (4), 10 mM PMSF (5), 0,1 mM TLCK (6), 0,1 mM antipaína (7), 0,1 mM quimostatina (8) y 5 mM TPCK (9).

(Hellman *et al.*, 1991).



En el año 1989, Mottram *et al.* clonaron un cADN codificante de una cisteín proteinasa de *Trypanosoma brucei* y determinaron su secuencia. La enzima predicha consistía de un pre y un pro-dominio, un dominio central y una extensión C-terminal de 108 aminoácidos, ausente en otras cisteín proteinasas.

La secuencia interna EEASSAVVGPGPTPE, obtenida por digestión de la cruzipaína con tripsina, fue idéntica a la hallada por Mottram *et al.* (SSAVVGGP) precediendo al inicio de la extensión C-terminal. Esto sugirió que el fragmento de autoproteólisis de la cruzipaína pertenecería a un dominio C-terminal de la enzima, y que la secuencia rica en prolina sería el punto de unión de los dos dominios, tal como lo sugiere la secuencia predicha para la proteinasa de *T. brucei*, que contiene 9 prolinas seguidas que formarían parte de una estructura tridimensional al azar (figura 5).

	***** *
cruzipaína	EEASSAVVGG PGPTPE
cisteín proteinasa	QAVSSAVVGG P..TPPPPPPPPP
de <i>T. brucei</i>	1 10

Figura 5: Secuencia aminoacídica del inicio de la extensión C-terminal.

Se detalla la secuencia de aminoácidos de un péptido triptico de la cruzipaína que comprende el fin del dominio catalítico y el comienzo de la extensión C-terminal.

Con asteriscos (*) se indican los residuos de la cruzipaína que se hallan conservados en la cisteín proteinasa de *T. brucei*.

(Hellman *et al.*, 1991).



El peso molecular de la extensión C-terminal de la proteinasa de *T. brucei*, sugerido de su secuencia, rondaría los 11 kDa. Sin embargo, el peso molecular aparente de la enzima madura sugiere que la mayor parte de esta extensión se pierde en el procesado post-traducciona.

El peso molecular aparente de 25 kDa que tiene la extensión C-terminal de la cruzipaína provendría, aparentemente, de una secuencia del doble de tamaño con el punto de corte autoproteolítico situado entre las dos glicinas.

La extensión C-terminal: secuencia de ADN y peso molecular en geles de poliacrilamida.

Åslund *et al.*, (1991), utilizando la técnica de PCR, lograron amplificar la extensión C-terminal de la cruzipaína a partir de una biblioteca de cADN de epimastigotes de la cepa Tul2 de *T. cruzi*.

El fragmento de ADN fue clonado y secuenciado.

La comparación con la secuencia completa del gen clonado en *T. brucei* (Mottram *et al.*, 1989) mostró una homología de sólo un 36%.

Es probable que la diferencia en el peso molecular deducido de la secuencia de ADN (14-15 kDa para 130 aminoácidos) con el obtenido en geles de poliacrilamida con SDS (20-25 kDa) se deba a modificaciones post-traduccionales, como las aún no identificadas presentes en los 7 aminoácidos detectados como X en la secuenciación de péptidos (Hellman *et al.*, 1991) y como treoninas a partir del ADN (Åslund *et al.*, (1991), así como a N-glicosilación.

Tal como se observa en la figura 6, la extensión C-terminal contiene 8 residuos cisteína, conservados en la enzima de *T. brucei*, y probablemente involucrados en la formación de puentes disulfuro.



Introducción

	1	10	20	30	40	50
cruzipaína	** ** *	**	* * *	* * *	* * *	* * *
cp T. brucei	GP..TPPPPP	PPPPSA...	..TFTQDFCE	GKGCTKGC	SH	ATFPTGECVQ
	59	69	79	89	99	
cruzipaína	** ** *	****	**	* * * * *	* * *	* * *
cp T. brucei	TTSGV.SAIV	TCGAETLTEE	VFFTSTHCSG	PSVRSSVPLN	QCNRLLRGSV	
	TT.GVGSVIA	TCGASNLTQI	IYPLSRSCSG	PSVPITVPLD	KCIPILIGSV	
	109	118	128			
cruzipaína	* *	* *	*			
cp T. brucei	EFFCGSSSSG	RLAD.VDRQR	RYQPYHSRHR	RL		
	EYHCSTNPPT	KAARLV...	...PHQ			

Figura 6: Secuencia aminoacídica de la extensión C-terminal completa de la cruzipaína.
 Se compara la secuencia de aminoácidos de la extensión C-terminal de la cruzipaína con aquella presente en la cisteín proteinasa de *T. brucei*.
 En negrita se señalan las 8 cisteínas presentes en la cruzipaína.
 Los asteriscos (*) indican los residuos de la cruzipaína que se hallan conservados en la cisteín proteinasa de *T. brucei*.
 (Aslund *et al.*, 1991).



La función de esta porción de la cruzipaína es sólo materia de especulaciones. No sería esencial para la actividad, vista su ausencia en las catepsinas homólogas de mamíferos. Podría interaccionar con membranas, en base a la existencia de residuos hidrofóbicos (nº 250 a nº 275, en la secuencia de la enzima madura). Otra posibilidad es que dicha extensión contenga señales de destino lisosomal, pues se había demostrado la ausencia de un sistema basado en receptores de manosa-6-fosfato (Cazzulo *et al.*, 1990a).

Clonado del gen de la cruzipaína.

Campetella *et al.*, (1992), clonaron y secuenciaron dos copias del gen de la cruzipaína a partir de ADN genómico de la cepa Tul2 de *T. cruzi*. En la figura 7 se indican los marcos de lectura abiertos, de una longitud aproximada de 1,4 kb, codificantes de una pre-pro-enzima, un dominio central homólogo al de la catepsina L y una extensión C-terminal. Las copias de cada gen están separadas por regiones intergénicas de 450 pares de bases no codificantes pero poseedoras de señales regulatorias de la expresión.

La cisteín proteinasa principal de *T. cruzi* está codificada por un gran número de genes (hasta 130) dispuestos uno detrás del otro en 2 o 4 grupos, localizados en diferentes cromosomas dependiendo de la cepa del parásito (Campetella *et al.*, 1992).

La secuenciación y el análisis con algunas enzimas de restricción demostró la existencia de algunos polimorfismos entre las distintas copias del gen, que podrían dar origen a isoformas de la proteinasa. Asimismo, el gran número de genes de la cruzipaína estaría en directa relación con el alto nivel de expresión de la enzima en epimastigotes.



1	A7ATCGCCGC	CTGCACGAC	GTGAGGCA7	ACCGTGGGTG	CCAGGATTAC	CGGTACGTT	GAATTACGG	AGGACGAGGC	CCAAATAGCC	GCATCGGTTG	CAGTCAATGG	CCCGGTTGCC	120
	-----C												
121	GTTCGGCTCC	ACGCCAGCAG	CTGGATGACC	TACACCGGGC	GCCTTATGAC	GAGCTGGCTC	TCCGAGCAGC	TGCATCACGG	CGTTCTTTCTC	GTCCGGCTACA	ATGACACGCC	CCGAGTCCCG	240
	-----T												
241	TACTGGATCA	TCAAGAACTC	GTGACCGGCG	CAGTGGGGCG	AGCATGGCTA	CATCCGCA7T	GCAGAGGGCT	CGAACCACTG	CGTTCTCAAG	CAGGAGGCCA	CGTCCCGCGT	GGTGGTGGC	360
	-----A												
361	CCCCGACCA	CTCCCGAGCC	AACCAACAGC	AGGACCAAA	GTGCCCCAGG	ACCGTCCCA	TGGTACTTTG	TGCAGATGTC	CTGCACTGAC	CGCCGCTOCA	TTGTCCGGTG	CGAGAAGCTG	480
	-----T												
481	ACGTTACCGA	CCGGTCAGTG	TCTCTGACC	ACCAGCGGGC	TCTCTGCCAT	TGTCACGTGC	GGTGGCTGAG	CTCTCACAGA	GGAAGTCTTC	TTTACGAGTA	CGCACTGCAG	CGGCCCATCC	600
	-----C												
601	GTGAGGTCT	CTGTTCTCT	CAACCAATGC	AACTGGCTTT	TAAGAGGCTC	CGTTGAGTTC	TTCTGCGGCT	CCAGCTCCAG	TGGCCGACTG	GGCGACGTGG	ACAGGCAGCC	TGCGTATCAG	720
	-----A												
721	CCATACCAAA	CGCGTCATCC	CGCGCTCGA	GGGCACTCTT	TGTTCTGAT	GCTGCCTTTT	TTCTCATTTT	ACTTTTTTAT	TATTATTGAG	CGAGCTCCGG	TGCTGCGGCA	CAGTGGGCAA	840
	-----C												
841	ATAAGTCCA	GTGGAGTGA	TTGTTTATTG	ATTGCTCCA	TGTATTATT	TTTCTTTTTT	TGAGCACAAC	TGCAAAATATG	TGTCCCGCAT	CGAGCTCTCA	GCCACCGGTG	TGTTTTTTTC	959
	-----C												
960	TATTATATGC	TTCTGTTGAG	CTCCCGAGCA	CTCCCGACTG	TGGCTGAACC	CACCGCCGTC	CCCGACTGTC	AGCGGACCA7	CGCGGCGAG	TGGCGTGCCA	ACGCTCCCTT	CGCCCGGGCT	1077
	-----G												
1078	GCACATACAC	CGCGGCATGC	TCTCTCTCTC	CACGTCAAGC	CCCGCACACC	ACCACTGCT	GAAAGTGAGC	CTGTTAAGGC	ACACAAGGAA	GGAACACAC	CCACACAAGC	AGTATGCT	1197
1198	GGCTGGCCGG	GTCCGCTGTC	GCTCCGGGCC	GTCTGGTCC	TCA7GGCGTG	CCTCTGTCCT	GGGGGAGCG	CGAGCTCTCA	TGCGGAGGAG	ACGCTGGGCT	CGCAATTCCT	AGAA7TCAAG	1317
	-----T												
1318	CAGAAGCATG	CGAGGGGTGA	CGAGAGCGCC	CGCGAGGAAC	GGTTCCGCT	GAGCGTGTTC	AGGGAGAAC	TGTTCTTTC	GAGGCTGCAC	CGCGCGGCAA	ACCCACACGC	GACCTTGGC	1437
	-----A												
1438	GTCAAGCCCT	TCTGGAGCT	CACGGCGGAG	GAATTCCGGT	CCGCTACCA	CAACGGCGCG	CGGCACCTTG	CGCGGCGACA	GGAGCGCGCG	AGAGTGGCGG	TGAACGTGCA	GGTTGTTGGT	1557
1558	GGCCCCCGGG	CAGTGGATTG	GCCTGCGAGA	GGCGCCGTGA	CAGCGGTCAA	GGACCAGGGC	CAATCCGGCT	CGTCTGGGC	CTTCTCCGCC	ATTGGCAACG	TTGAGTGGCA	GTGGTTCTC	1677
1555	-----T												
1678	CGCCGGCACG	CGCTGACGAA	CGTCTGGAG	CAGATGCTCG	TGTCGTGCGA	TAAACGGAC	TCTGGCTGGC	TGGTGGGCT	GATGAACAAC	GGCTTTGAGT	GGATTGTGCA	GGAGAATAAC	1797
1675	-----T												
1798	GGCGCCGTGT	ACACGGAGGA	CAGCTACCTT	TATGCGTCCG	GCGAGGGC	1846							1794
1795	-----T					1843							

Figura 7: Secuencia completa de dos genes de cruzipaina y de la región intergénica.

Los genes "cruzip 2" y "cruzip 4" fueron clonados a partir de ADN genómico de la cepa Tul2 de *T. cruzi*. Los fragmentos fueron obtenidos por digestión completa del ADN genómico con la endonucleasa EcoR V, que corta en un punto situado cerca del centro de la región codificante.

Los signos - indican homología entre los dos clones. Los puntos indican deleciones de los respectivos nucleótidos. Los codones de inicio y fin de la traducción están recuadrados (Campetella *et al.*, 1992).



Una secuencia similar (figura 8) fue obtenida por Eakin *et al.*, (1992), quienes además expresaron a la cisteín proteinasa en *E. coli* y obtuvieron enzima activa, evidenciando el procesamiento del péptido precursor. No obstante, resulta curioso el hecho de que la extensión C-terminal fuera removida antes que el dominio pro (Eakin *et al.*, 1992). Al respecto, hemos demostrado (Cazzulo *et al.*, 1990; Hellman *et al.*, 1991) que es el dominio pro el que se remueve primero *in vivo*, persistiendo la extensión C-terminal en la enzima madura. Estos resultados pueden deberse a la ausencia de las modificaciones post-traduccionales en la enzima recombinante expresada en *E. coli*.

En la figura 8 se comparan las secuencias aminoacídicas completas de la cruzipaina (Campetella *et al.*, 1992; Eakin *et al.*, 1992) y de otras cisteín proteinasas de tripanosomátidos tales como la de *T. brucei* (Mottram *et al.*, 1989) y *T. rangeli* (Martínez *et al.*, 1995), incluyendo aquellas correspondientes a la papaína y la catepsina L (Wada *et al.*, 1987).



Introducción

64

```
1          20          40          60          80
*          *          *          *          *          *          *
Cruzip 2 M..SGWARALSLAAVLVMA .CLVPAATASLHAEETLSQ FVEFKQKHGRVYESAAEERF RLSVFRENLFARLHAAANP
Cruzip 4 M..SGWARALLAAVLVMA .CLVPAATASLHAEETLSQ FAEFKQKHGRVYENAAEEAF RLSVFRENLFARLHAAAGP
cruzain M..SGWARALLAAVLVMA .CLVPAATASLHAEETLSQ FAEFLQLHGRVYESAAEERF RLSVFRENLFARLHAAANP
T.rang 1 M..TGPARTLSLVAVLVVVL .CLLPAAMASLRVEETLSQ FAAFQQRHGVYGSAAEEAF RLGVFKENLLFARLHAAANP
T.rang 2 M..TGPARTLSLVAVLVVVL .CLLPAAMASLRVEETLSQ FAAFQQRHGVYGSAAEEAF RLGVFKENLLFARLHAAANP
T.rang 3 M..TGPARTLSLVAVLVVVL .CLLPAAMASLRVEETLSQ FAAFQQRHGVYGSAAEETF RLGVFKENLLFARLHAAANP
T. brucei MPRTMVRFVRLPVLLAMA ACLASVALGSLHVEESLEMR FAAFKKKYGVYKDAKEEAF RRAFEENMEQAKIQAAANP

81          100          120          140          160
*          *          *          *          *          *          *
Cruzip 2 HATFGVTPFSDLTREEFRSR YHNGAAHFAAAQERARVP.. VNVEV..VGAPAAVDWRARG AVTAVKDQGGCGSCWAFSAI
Cruzip 4 HATFGVTPFSDLTREEFRSR YHNGAAHFAAAQERARVP.. VKVEV..VGAPAAVDWRARG AVTAVKDQGGCGSCWAFSAI
cruzain HATFGVTPFSDLTREEFRSR THNGAAHFAAAQERARVP.. VKVEV..VGAPAAVDWRARG AVTAVKDQGGCGSCWAFSAI
T.rang 1 HASFAVTPFSDLTREEFRSR YHNAAHFAAAQKRVVPVE VEVEV..GPPAAVDWRARG AVTAIKDQNCSSCWAFSTI
T.rang 2 HASFGVTPFSDLTREEFRSR YHNAAHFAAAQKRVVPVE VEVEV..GGAPAAVDWRARG AVTAIKDQGGCGSCWAFSTI
T.rang 3 HASFGVTPFSDLTREEFRSR YHNAAHFAAAQKRVVPVE VEVEVEVGAPAAVDWRARG AVTAIKDQNCSSCWAFSTI
T. brucei YATFGVTPFSDMTREEFRAR YRNGASYFAAAQKRLRKT.. VNVT..GRAPAAVDWREKG AVTPVKVQGGCGSCWAFSTI
catep L APRSDWREKG YVTPVKDQGGCGSCWAFSTI
papaína IPEYVDWRQKG AVTPVKNQSGCGSCWAFSAV
```



Introducción

65

161		180	200	220	240
	*	***	*	*	*
Cruzrip 2	GNVEQWFLAGHPLTNLSEQ	MLVSCD..KTDGCGGGLMN	NAFEWIVQENNGAVYTEDSY	PYASGEGISPPCTTSGHTVG	
Cruzrip 4	GNVEQWFLAGHPLTNLSEQ	MLVSCD..KTDGCGGGLMN	NAFEWIVQENNGAVYTEDSY	PYASGEGISPPCTTSGHTVG	
cruzain	GNVEQWFLAGHPLTNLSEQ	MLVSCD..KTDGCGGGLMN	NAFEWIVQENNGAVTTEDSY	PYASGEGISPPCTTSGHTVG	
T.rang 1	GNIEGQWHLAAGNPLTGLSEQ	MLVSCD..NADNGCDGGLMD	SAFDWIVEQNNNGSVYTEASY	SYVSGGGDSQTCMDSDHVVG	
T.rang 2	GNIEGQWHLAAGNPLTGLSEQ	MLVSCD..NADNGCDGGLMD	SAFDWIVQNNNGSVYTEASY	SYVSGGGDSQTCNMSSHVVG	
T.rang 3	GNIEGQWHLAAGNPLTGLSEQ	MLVSCD..NADNGCDGGLMD	SAFDWIVEQNNNGSVYTEASY	SYVSGGGDSQTCMDSDHVVG	
T.brucei	GNIEGQWQVAGNPLVSLSEQ	MLVSCD..TIDGCGNGGLMD	NAFNWIVQENNGNVTTEASY	PYVSGNGEQPQCQMMNGHEIG	
Catep L	GALEGQHFRKTGKLVSLSSEQ	NLVDCSRPEGNQGCNGGLMD	QAFQY.VQDNGGIDSEE.SY	PYT..AKDDEDCRYKAEYN.	
papaína	VTIEGIIKIRTGNLNQYSEQ	ELLDCD..RRSYGCNGGYPW	SALQ..LVAQYGIHYRN.T.	PYE.GVQ.RYCRSR.EKGP	
241		260	280	300	320
	*	*	*	*	*
Cruzrip 2	ATITGHV...ELPQDEAQ..	..IAACVAVNGP..VAVAVD	A..SSWMTYTGGVMTS..CV	SEQLDHGVLLVGYNDSAAVP	
Cruzrip 4	ATITGHV...ELPQDEAQ..	..IAACVAVNGP..VAVAVD	A..SSWMTYTGGVMTS..CV	SEQLDHGVLLVGYNDSAAVP	
cruzain	ATITGHV...ELPQDEAQ..	..IAAWLAVNGP..VAVAVD	A..SSWMTYTGGVMTS..CV	SEQLDHGVLLVGYNDSAAVP	
T.rang 1	AVISGHV...DLPQDEDK..	..MAAWLAVNGP..LAIADV	A..TSFMSYTGGVLTN..CV	SDQLDHGVLLVGYNDSNNPP	
T.rang 2	AVISGHV...DLPQDEDK..	..MAAWLAVNGP..LAIADV	A..TSFMSYTGGVLTN..CV	SDQLDHGVLLVGYNDSNNPP	
T.rang 3	AVISGHV...DLPQDEDK..	..MAAWLAVNGP..LAIADV	A..TSFMSYTGGVLTN..CV	SDQLDHGVLLVGYNDSNNPP	
T. brucei	AAITDHV...DLPQDEAQ..	..IAAVLAENGP..LAIADV	A..ESFMDYNGGILTS..CT	SKQLDHGVLLVGYNDSNNPP	
Catep L	.AAN.DTGFVDIPQGERAL	MKAVASV...GPVSVAI..D	AGHSSFFQYQSGIYVEPDCS	SEDLDHGVLLVGYGFEGGKK	
papaína	YAAKYDGVQRQVPYNQ.AL	LYSIAN....QPVSUWL..Q	AAGKDFQLYRGGIFVGP.C.	GNKVDHAAVAVGY....NPG	



Introducción

66

```

321          340          360          380          400
*      ****      **      ***
Cruzip 2  YWIIKNSWTAQWGEDGYIRI  AKGSNQCLVKEEA..SSAVV  G...GPGPTPEP.TTTTTTTS  APGPSYFVQMSCTDAACI
Cruzip 4  YWIIKNSWTTQWGEDGYIRI  AKGSNQCLVKEEA..SSAVV  G...GPGPTPEP.TTTTTTTS  APGPSYFVQMSCTDAACI
cruzain   YWIIKNSWTTQWGEDGYIRI  AKGSNQCLVKEEA..SSAVV  G...GPGPTPEP.TTTTTTTS  APGPSYFVQMSCTDAACI
T.rang 1  YWIIKNSWGADWGEDGYIRI  QKGTNQCLVKNYA..CSAVV  G...GPAPTPNPSTTTTTTTS  APG..PSLLVQQLCSGPGCT
T.rang 2  YWIIKNSWGADWGEDGYIRI  QKGTNQCLVKNYA..CSAVV  G...GPAPTPNPSTTTTTTTS  APG..PSLLVQQLCSGPGCT
T.rang 3  YWIIKNSWGADWGEDGYIRI  QKGTNQCLVKNYA..CSAVV  G...GPAPTPNPSTTTTTTTS  APG..PSLLVQQLCSGPGCT
T. brucei YWIIKNSWSNMWGEDGYIRI  EKGTNQCLMNQAV..SSAVV  G...GP..TPPP.PPPPPPS  A.....TFTQDFCEGKGCT
Catep L   YWIVKNSWGEKMGDKGYIYM  AKDRKN...HCGIATAASYP  LV*
papain    YILIKNSWGTGWGENGYIRI  KRGTGNSYGVCGLYTSSFYP  VKN*

401          420          440          460          480
**      ****      *      *      *      *      *      *      *      *
Cruzip 2  VGCENVTLPTGQCLLTSGV  .SAIVTCGAETLTTEEVEFFTS  THCSGSPSVRSSVPLNQCNWL  LRGSVEFFCGSSSSSGLAD.
Cruzip 4  VGCENVTLPTGQCLLTSGV  .SAIVTCGAETLTTEEVEFLTS  THCSGSPSVRSSVPLNKCENRL  LRGSVEFFCGSSSSSGLAD.
cruzain   VGCENVTLPTGQCLLTSGV  .SAIVTCGAETLTTEEVEFLTS  THCSGSPSVRSSVPLNKCENRL  LRGSVEFFCGSSSSSGLAD.
T.rang 1  TGCVNSSFPTGQCVHFGR.V  .SAILTCDATSAVEKLFPLS  TDCTGPSLPVSVPLNKCLSF  FIGSVEFFCVSSATARPIE.
T.rang 2  TGCVNSSFPTGQCVHFGR.V  .SAILTCDATSAVEKLFPLS  TDCTGPSLPVSVPLNKCLSF  FIGSVEFFCVSSATARPIE.
T.rang 3  TGCVNSSFPTGQCVHFGR.V  .SAILTCDATSAVEKLFPLS  TDCTGPSLPVSVPLNKCLSF  FIGSVEFFCVSSATARPIE.
T. brucei KGCSHATFPTGECVQTT.GV  GSVIATCGASNLQTIIYPLS  RSCSGSPSVPI TVPLDKCIP I  LIGSVEYHCSTNPPTKAARL

```



	481		497
	*	* * *	***
Cruzip 2	VDRQRRYPYQGSRRRL*		
Cruzip 4	VDRQRRHQPYSRRRL*		
cruzain	VDRQRRHQPYSRRRL*		
T.rang 1	VDKLSRYQPYQGSRRRL*		
T.rang 2	VDKLSRYQPYQGSRRRL*		
T.rang 3	VDKLSRYQPYQGSRRRL*		
T. brucei	V.....PHQ*		

Figura 8: Comparación de la secuencia aminoacídica de distintas cisteín proteinasas.

Se detallan las secuencias de aminoácidos provenientes de la secuencia de ADN de dos clones de cruzipaina, "cruzip 2 y cruzip 4" (Campetella *et al.*, 1992), un clon de cruzaina (Eakin *et al.*, 1992), tres clones de rangelipaina, "T. rang 1, 2 y 3" (Martínez *et al.* enviado a publicación); y la secuencia de aminoácidos de la catepsina L de hígado de pollo y de la papaína (Wada *et al.*, 1987). El alineamiento se efectuó de manera de obtener la máxima homología. Las secuencias correspondientes a las regiones "pro" de la catepsina L de hígado de pollo y de la papaína no han sido incluídas en esta comparación. Tal omisión se debe a que la falta de homología con las regiones "pro" presentes en las cisteín proteinasas de trypanosomátidos desvirtuaría el análisis de consenso efectuado en estas últimas (posiciones nº 1 a 129). En **negrita** figuran la cisteína y la histidina que forman el sitio activo. Los asteriscos (*) indican el consenso entre las cisteín proteinasas comparadas.



Propiedades enzimáticas de la cruzipaína:

a) Especificidad de sustrato

Estudios posteriores demostraron que la cruzipaína era capaz de degradar IgGs humanas (Bontempi and Cazzulo, 1990). El fragmento Fab de tales inmunoglobulinas fue degradado levemente, no así el fragmento Fc, que fue extensamente hidrolizado a péptidos menores. Si bien no se obtuvo información acerca de cuáles son los enlaces peptídicos que se hidrolizan, los ensayos electroforéticos y cromatográficos sugirieron la existencia de dos sitios principales de corte, ubicados a ambos lados de los puentes disulfuro intercatenarios, en la región bisagra de la cadena pesada. De tal manera, la cruzipaína sería responsable de la proteólisis intracelular de las IgGs endocitadas, un proceso informado por Texeira y Santana (1989), quienes detectaron anticuerpos marcados en vesículas intracitoplasmáticas, probablemente lisosomas, que contenían cruzipaína (Bontempi *et al.*, 1989) capaz de degradarlos al pH ácido lisosomal.

Más tarde se definió con mayor exactitud la especificidad de la cruzipaína en la hidrólisis de uniones peptídicas (Cazzulo *et al.*, 1990b).

La enzima hidrolizó péptidos cromogénicos (paranitroanilidas y β -naftilamidas) en el carboxilo de residuos arginina o lisina, y requirió al menos un aminoácido más, preferentemente arginina, fenilalanina, valina o leucina, entre la arginina o lisina terminal y el grupo bloqueante en el extremo amino.

La cisteín proteínasa principal de *T. cruzi* es también capaz de degradar las cadenas A y B de la insulina bovina oxidada (Raimondi *et al.*, 1991). Ambas resultan extensamente hidrolizadas, con 4 sitios de corte en la cadena A y 6 en la cadena B, varios de los cuales pertenecen a residuos de tipo hidrofóbico.



b) Efecto de inhibidores y agentes caotrópicos

La cruzipaína fue inhibida fuertemente por E-64 (Cazzulo *et al.*, 1990b), TLCK, pCMB (Bontempi *et al.*, 1984), leupeptina, antipaína, quimostatina, y levemente con elastatinal. La pepstatina A, un inhibidor característico de las aspartil proteinasas, no tuvo efectos inhibitorios (Cazzulo *et al.*, 1989) al igual que el PMSF, un inhibidor de serín proteinasas.

La actividad enzimática sobre los mencionados péptidos cromogénicos se vio completamente inhibida por el reactivo E-64, un potente inhibidor de las cisteín proteinasas.

La actividad sobre azocaseína a pH 5,0 fue incrementada por urea, obteniéndose un máximo a la concentración 2M. La cruzipaína fue tan activa en urea 5M como sin ella.

El sulfocianuro de potasio y el clorhidrato de guanidina, dos fuertes agentes desnaturalizantes, también activaron a la enzima a bajas concentraciones y la inhibieron a concentraciones mayores a 1M y 2M respectivamente. Estas activaciones no fueron reproducibles cuando se utilizaron los sustratos cromogénicos, ni cuando se ensayó la actividad sobre azocaseína a pH 7.

La activación por urea es una propiedad compartida con la catepsina L de mamíferos.

Efecto *in vivo* e *in vitro* de inhibidores de la cruzipaína.

Franke de Cazzulo *et al.* (1994) estudiaron el efecto de inhibidores, cuya estructura está de acuerdo con la especificidad demostrada para la cruzipaína, en a) el crecimiento de epimastigotes en medio axénico, b) la diferenciación *in vitro* de epimastigotes a trypomastigotes metacíclicos y c) el crecimiento intracelular de amastigotes.



Los tres inhibidores ensayados, una peptidilaciloximetilcetona (Z-FK-AMK) y dos peptidildiazometilcetonas (Z-FF-DMK y Z-FA-DMK), fueron capaces de penetrar en las cuatro formas de desarrollo del parásito e inhibir irreversiblemente a las proteinasas. En todos los casos la movilidad electroforética de la enzima inhibida correspondió a la observada para la cruzipaina. Ensayos de Western blot, utilizando extractos de las distintas formas de desarrollo del parásito y un suero policlonal monoespecífico contra la cruzipaina, demostraron la presencia de la enzima en niveles similares a los observados en los controles no tratados, lo cual indica que los inhibidores penetran *in vivo* e inhiben la actividad de cisteín proteinasa.

El crecimiento de los epimastigotes en medio axénico fue levemente afectado por los tres inhibidores en concentración 5 μM , no obstante causar una marcada reducción en la actividad de cisteín proteinasa. Mayores concentraciones (20 μM) de Z-FK-AMK previenen el crecimiento de los epimastigotes y causan la lisis de los parásitos.

Z-FK-AMK fue también el inhibidor más efectivo de la diferenciación de epimastigotes a trypomastigotes metacíclicos en cultivos con alta densidad de parásitos (10^8 ml^{-1}).

La presencia de los inhibidores durante la infección de células Vero por trypomastigotes, la subsiguiente diferenciación de los parásitos a amastigotes y la multiplicación intracelular de estos últimos resultó en una reducción considerable tanto en el número de células infectadas como en el número de parásitos intracelulares. Además, el tratamiento previno casi por completo la liberación de trypomastigotes.

Harth *et al.* (1993), en experimentos similares utilizando peptidilfluorometilcetonas, demostraron la inhibición *in vitro* de la proteinasa de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos *in vivo* con estos inhibidores en células infectadas sugieren que la transición entre las formas amastigote y trypomastigote y, posteriormente, de amastigote hacia



trypomastigote, son especialmente susceptibles a la inhibición de la cisteín proteínasa.

Meirelles *et al.* (1992), usando como inhibidores algunas peptidildiazometilcetonas, también demostraron un profundo efecto en los estadios iniciales de la infección por trypomastigotes de *T. cruzi*.

El efecto diferencial de estos inhibidores sobre los distintos estadios del desarrollo de *T. cruzi* puede reflejar diferencias en la accesibilidad de las cisteín proteinasas, o bien diferencias en su función.

Los inhibidores ensayados por Meirelles *et al.* (1992), Harth *et al.* (1993) y Franke de Cazzulo *et al.* (1994) han demostrado su efectividad sobre estadios del parásito considerados claves en el progreso de la infección.

Los resultados obtenidos proveen de nuevas herramientas para comprender el rol de la cruzipaína en la biología del *Trypanosoma cruzi* y sugieren, además, que la cisteín proteínasa podría convertirse en un adecuado blanco para el diseño de drogas específicas.

Características inmunológicas de la cruzipaína: Identidad con antígenos de *T. cruzi*.

Una investigación paralela a la descrita, y en parte a los resultados que forman parte de esta Tesis, fue llevada a cabo por el Dr. Julio Scharfstein y sus colaboradores en la Universidad de Río de Janeiro.

Sus trabajos se centraron en la identificación y caracterización de dos antígenos de *T. cruzi*, denominados GP57/51 (Scharfstein *et al.*, 1988; Gazzinelli *et al.*, 1991) y GP25 (Scharfstein *et al.*, 1983; Mendonça-Previato *et al.*, 1983; Scharfstein *et al.*, 1984) identificado con posterioridad como un fragmento proteolítico de aquel (Scharfstein *et al.*, 1988).

Los análisis de tipo inmunoquímico indicaron que GP57/51 se expresa en todas las formas del desarrollo del parásito (Scharfstein *et al.*,



1986; Scharfstein *et al.*, 1983) y que está presente en todas las cepas de *T. cruzi* estudiadas.

Estudios más recientes (Murta *et al.*, 1990) demostraron que GP57/51 es también una cisteín proteinasa.

La secuencia del extremo N-terminal resultó idéntica a la obtenida por Cazzulo *et al.*, (1989). La enzima se mostró activa en un rango de pH de 5 a 7,5 y fue inhibida por reactivos específicos para cisteín proteinasas, como por ejemplo leupeptina, E-64, cistatina y antipaína.

Bonaldo *et al.* (1991) estudiaron la metaciclogénesis de *T. cruzi* bajo condiciones químicas definidas, identificando un grupo de polipéptidos de peso molecular 45-50 kDa que aumenta su expresión al adherirse los epimastigotes a la superficie de las botellas de cultivo.

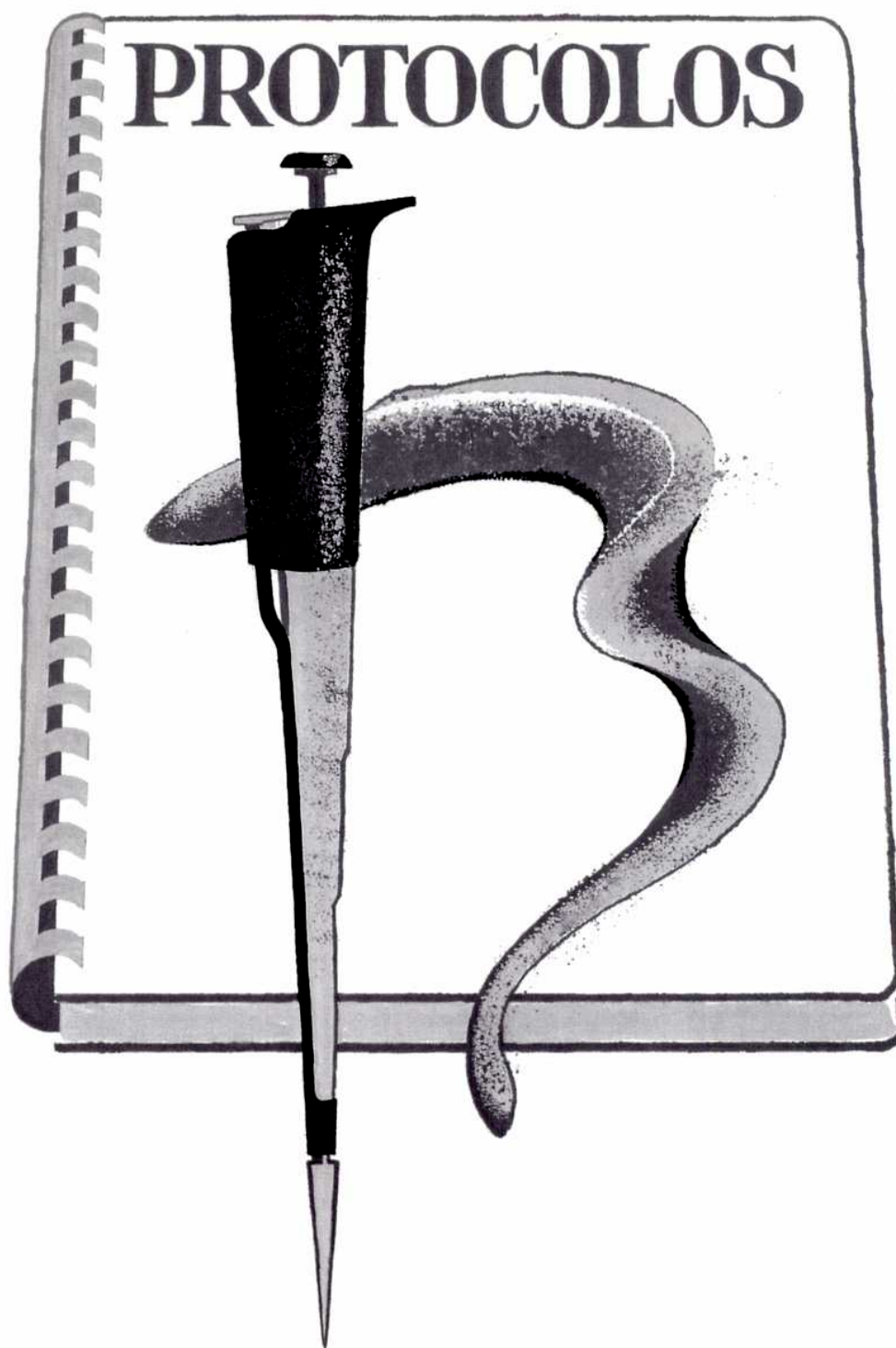
Los análisis inmunoquímicos revelaron que estas proteínas están relacionadas estructuralmente o son homólogas a la GP57/51.

En el año 1993, Malchiodi *et al.* aislaron el antígeno Ag163B6 con un anticuerpo monoclonal producido contra un extracto crudo de epimastigotes de *T. cruzi*.

Un estudio comparativo de tal antígeno con la cruzipaína, que incluyó geles de poliacrilamida con SDS, Western blots revelados con sueros específicos, isoelectroenfoque, electroforesis bidimensional, doble difusión con la técnica de Outcherlony y geles de actividad, evidenció que ambas glicoproteínas son idénticas.

A continuación se detallan los ensayos y experimentos efectuados en esta Tesis Doctoral, cuyo objetivo es el estudio de algunas propiedades estructurales e inmunológicas de la cruzipaína, cisteín proteinasa principal del *Trypanosoma cruzi*.

MATERIALES Y METODOS





Parásitos: cepas, clones y formas del desarrollo:

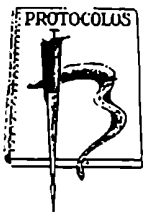
Los epimastigotes se cultivan a 28°C sin agitación en un medio BHT (por litro: infusión cerebro corazón: 33 g; Triptosa: 3 g; Na₂HPO₄: 32 g; KCl: 0,4 g; Glucosa: 0,3 g; hemina: 20 mg; pH: 7,2-7,4); adicionado con 10% v/v de suero fetal bovino inactivado previamente a 56°C durante 45 minutos, penicilina 100 u/ml y estreptomina 100 µg/ml (Cazzulo *et al.*, 1985).

La cepa Tulahuén 2 (Tul2), fue cedida por la Dra. Elsa L. Segura, Instituto Fatale Chabén, Buenos Aires, Argentina. La cepa RA fue cedida por la Dra. Stella Maris González Cappa, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina. El clon Sylvio X-10/7 fue cedido por el Dr. J. A. Dvorak, NIAID, NIH, Bethesda, MD., USA.

Los trypomastigotes metacíclicos se generan por diferenciación espontánea a partir de epimastigotes de la cepa RA y del clon Sylvio X-10/7 en cultivos axénicos en medio BHT. Para obtenerlos, los cultivos se centrifugan a 7000 g durante 10 minutos, se los resuspende en un amortiguador fosfato de pH 8 y se siembran en una columna de "Anion exchange cellulose Cellex-D" equilibrada en el mismo amortiguador. Los trypomastigotes metacíclicos eluyen en primer lugar cuando se aplica un amortiguador TAU (por litro: NaCl 11,1 g; KCl 0,93 g; CaCl₂ 0,22 g; MgCl₂ 0,19 g; NaH₂PO₄ 27,8 g; Na₂HPO₄.7H₂O 53,65 g; rojo de fenol 5 mg; pH 6,6). La pureza de los parásitos se corrobora al microscopio óptico con 400 aumentos (De Sousa, 1983; Franke de Cazzulo, comunicación personal).

Los trypomastigotes y amastigotes de la cepa RA provienen de monocapas de células Vero infectadas en medio MEM (MEM: GIBCO BRL, cat 410-1100).

Los trypomastigotes puros se obtienen por cosecha después de la primera liberación de parásitos, impidiendo que las células Vero se rompan y se liberen los amastigotes (Carvalho and De Souza, 1983). No obstante, una vez cosechados se los obtiene puros de restos celulares si se



los deja salir del sedimento y alcanzar la superficie del medio en el que se los resuspende. Este proceso demanda una hora a 37°C.

Para obtener amastigotes puros se suele sobreinfectar a las monocapas de células Vero. De esta manera los amastigotes no se diferencian a trypomastigotes y pueden cosecharse cuando las células se rompen.

Recuento de los parásitos:

Se efectúa en cámaras de Neubauer en una solución de formaldehído 1%, que ocasiona la muerte de los trypanosomas.

Purificación de la cruzipaina:

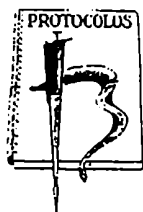
La enzima se purifica a partir de epimastigotes de la cepa Tul2 de *Trypanosoma cruzi*, tal como se describe en Cazzulo *et al.*, (1989).

Los parásitos se cosechan y se lavan tres veces con una solución de sacarosa 0,25M y KCl 5mM.

La ruptura de las células se efectúa en 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento a -20°C. Finalmente se resuspenden en tres volúmenes de la misma solución, y el homogenato se centrifuga a 5000 g durante 15 minutos a 4°C, descartándose el sedimento.

El sobrenadante se centrifuga a 43000 g durante 30 minutos a 4°C, descartándose nuevamente el sedimento.

La purificación continúa con una precipitación con una solución de sulfato de amonio, ajustada a pH 7, que se agrega en un baño frío con agitación hasta un 50% de saturación. La suspensión se centrifuga a 14000 g durante 20 minutos a 4°C. El sedimento se disuelve en Tris HCl 50mM pH 7,6; EDTA 1mM y glicerol 20%, y se centrifuga a 105000 g durante una hora a 4°C. El sobrenadante se dializa y se aplica en una columna de DEAE-Sephacel, eluyéndose con un gradiente de KCl de 0 a 500mM en el mismo amortiguador. Las fracciones con mayor actividad (120-150mM KCl) se mezclan, se concentran y se aplican en una columna de Sephadex



G-200. De nuevo, las fracciones más activas se mezclan y se utilizan en los diversos experimentos.

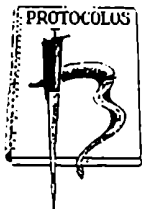
En las ocasiones en que aparecen impurezas en las fracciones eluídas de la columna Sephadex G-200, o para usos especiales, como la obtención de anticuerpos, la purificación continúa con una cromatografía en un sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) de Pharmacia, utilizando una columna MonoQ HR 5/5 de intercambio aniónico y eluyendo con un gradiente de NaCl de 0 a 0,5M en un amortiguador Tris HCl 50mM pH 7,6; glicerol 10%. Nuevamente se colectan las fracciones activas, se dializan y se concentran con polietilenglicol (Carbowax 6000). Las muestras concentradas se inyectan en una columna Superosa 12 HR 10/30 y se eluyen con un amortiguador Tris HCl 50mM pH 7,6 conteniendo NaCl 0,2M.

Finalizado cada uno de los pasos de purificación, las fracciones activas se controlan por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

Determinación de la actividad de la cruzipaína *in vitro*:

La actividad de la enzima se determina utilizando a la azocaseína como sustrato a través de los sucesivos pasos de su purificación (Bontempi *et al.*, 1984). La mezcla de reacción contiene 1 mg de azocaseína, 10 μ moles de amortiguador acetato/acético pH 5 y 2 μ moles de β -mercaptoetanol, en un volumen final de 0,2 ml. La enzima se adiciona a la mezcla ya preparada. Después de una incubación de 30 minutos a 35°C, la reacción se detiene con 0,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v). Las mezclas se centrifugan durante 10 minutos a 3000 rpm en una centrífuga de mesa. Los sobrenadantes se adicionan a 0,8 ml de NaOH 1N y se lee la absorbancia a 440 nm.

En los ensayos de inmunoprecipitación y posterior detección de la actividad, se utiliza el sustrato cromogénico Bz-Pro-Phe-Arg-pNa (Cazzulo *et al.*, 1990), (ver sección siguiente).



Inmunoprecipitación y detección de actividad de la cruzipaína:

La cruzipaína purificada (0,6 μ g) se incuba durante 45 minutos a 37°C en un volumen final de 0,1 ml con 10 μ g de seroalbúmina bovina acetilada (ABSA) y 50 μ g de IgG purificada a partir de distintos antisueros (por adsorción a esferas de proteína A-Sefarosa). Luego se agregan 25 μ l de una suspensión 50% de proteína A-Sefarosa en TBS y la mezcla se incuba durante 1 hora a 37°C con agitación suave. Las suspensiones se centrifugan durante algunos segundos y se separa el sobrenadante. Las esferas se lavan con 0,2 ml de TBS con ABSA (100 mg/ml), se centrifugan y el sobrenadante se descarta. Luego se lavan 2 veces con 0,5 ml de la misma solución, se descartan esos lavados y finalmente se resuspenden en 0,3 ml de solución TBS-ABSA.

Las muestras se agregan a 0,7 ml de mezcla de reacción (Tris acetato 50mM pH 8; Bz-Pro-Phe-Arg-pNa 0,3mM; β -mercaptoetanol 10mM; concentraciones finales) y se mide la absorbancia a 410 nm después de una incubación de una hora a 37°C.

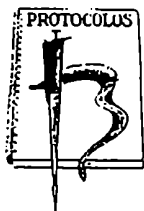
La seroalbumina bovina acetilada, que no es hidrolizada por la cruzipaína a valores de pH mayores que 7, se utiliza como protector, pues la enzima es inestable a las bajas concentraciones utilizadas.

Se utiliza un suero anti-glutamato deshidrogenasa de *T. cruzi* hecho en conejo como anticuerpo no relacionado (control negativo).

El efecto directo de los anticuerpos en la actividad de la cruzipaína se mide en la cubeta del espectrofotómetro, agregando la enzima preincubada con el anticuerpo 15 minutos a 37 °C a la mezcla de reacción, o agregando la enzima a la mezcla de reacción conteniendo al anticuerpo.

Ensayo de fosforilación de la cruzipaína *in vivo* :

Se prepara un medio BHT sin fosfatos, se lo ajusta a pH 7,5 y se le adiciona 1 mCi de ácido fosfórico ^{32} P (New England Nuclear). Los cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* se cosechan a una densidad de $30 \cdot 10^6$



células/ml, se lavan y se obtiene un extracto crudo como se describió previamente (Cazzulo *et al.*, 1989). La cruzipaina se inmunoprecipita utilizando un antisuero policlonal monoespecífico unido a proteína A-Sefarosa. El extracto crudo y el inmunoprecipitado se siembran en un minigel de poliacrilamida con SDS, que luego de ser teñido con Coomassie Blue, se seca y se expone a -70°C con una placa radiográfica Kodak X-OMAT-AR.

Secuenciación de péptidos:

Luego de una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, las bandas de proteína se electrotransfieren a una membrana de PVDF. Dicha membrana se tiñe con Coomassie R-250, se corta la banda de interés y se aplica directamente a un secuenciador Applied Biosystems Protein Sequencer, Modelo 470A, equipado con un analizador de derivados de PTH Modelo 120 A.

Reacción de β -eliminación:

Se efectúa incubando a la enzima con una solución de NaOH 50 mM durante 36 horas a 37°C . La muestra se neutraliza, se siembra en un gel de poliacrilamida con SDS (donde se puede observar la eventual variación de su movilidad electroforética) y se electrotransfiere a una membrana de PVDF para obtener su secuencia peptídica (Chaplin and Kennedy, 1986a).

Clivaje en residuos metionina con bromuro de cianógeno:

Se realiza mediante la disolución de la muestra en 100 μl de ácido fórmico 70% v/v y el agregado del reactivo en un exceso molar de 50 veces. La reacción se incuba durante 20 horas a temperatura ambiente. Las muestras se secan por centrifugación en un disecador Speed VacTM y se aplican en un gel de poliacrilamida con SDS para separar los péptidos resultantes del clivaje. El gel se



electrotransfiere a una membrana de PVDF y la banda se introduce en un secuenciador de proteínas (Harris and Angal, 1990).

Tratamiento con Endo- β -N-acetylglucosaminidasa H:

Se disuelven 0,1 mg de la enzima purificada en 0,2 ml de un amortiguador acetato de trietanolamina 0,1M, pH 5,5. Se adicionan leupeptina y SDS a concentraciones finales de 20 μ M y 0,1% respectivamente. Se agregan 10 mU de la enzima endo- β -N-acetylglucosaminidase H (endo H) y la mezcla se incuba durante 24 horas a 37°C.

Finalmente las muestras se siembran en un gel de poliacrilamida con SDS (Chaplin and Kennedy, 1986b).

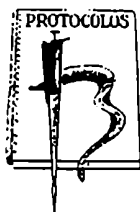
Autoproteólisis de la cruzipaína:

Se incuba la enzima (2 mg/ml) a 56°C durante 24 horas en presencia de un amortiguador acetato/acético 20mM y β -mercaptoetanol 10mM. El pH final de la mezcla es 6 (Hellman *et al.*, 1991).

Purificación de la extensión C-terminal:

La extensión C-terminal proveniente del proceso de autoproteólisis se purifica mediante una filtración en gel en una columna Superosa 12TM en un sistema de FPLC.

Para ello, la preparación de autoproteólisis se concentra en una membrana de diálisis de bajo corte (3,5 kDa) rodeada de polietilenglicol (Carbowax 6000) y se aplican a la columna 0,5 ml de muestra, eluyéndose con un amortiguador Tris HCl 50mM pH 7,6; NaCl 0,1M, a una velocidad de 0,5ml/min.



Sueros:

Los sueros de pacientes chagásicos crónicos y de personas no infectadas provienen de Argentina, Brasil y Chile, tal como se lo indica en los experimentos correspondientes. Los antisueros contra la cruzipaina nativa (Rab1 y Rab3), o la enzima parcialmente desnaturalizada (Rab2) se obtienen en conejo mediante la inyección intramuscular de 50 µg de la enzima purificada en 1 ml de PBS, emulsionado 1:1 v/v con adyuvante completo de Freund (GIBCO). Posteriormente se aplican 3 dosis en forma subcutánea, emulsionadas con adyuvante incompleto de Freund (GIBCO), con intervalos de 20 días. La especificidad de los anticuerpos se demuestra por el método de Outcherlony, obteniéndose una única banda cuando se enfrenta al suero con la enzima purificada y un extracto libre de células de *T. cruzi* (Campetella *et al.*, 1990).

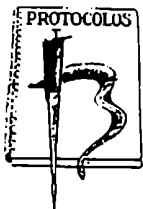
De manera similar se obtiene el suero contra las proteínas de fusión Cat1, Cat2 y C-T, aunque en este caso la zona del gel de poliacrilamida conteniendo a las proteínas de fusión se congela y pulveriza con la ayuda de un mortero. El polvo resultante se emulsiona con adyuvante completo de Freund y se inyecta intramuscularmente.

Determinación de la concentración de proteínas:

La concentración de proteínas se determina por el método de Lowry *et al.* (1951).

Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS:

Se utiliza la técnica desarrollada por Laemmli (1970) en minigeles de 8 x 7 cm x 0.5 mm. El amortiguador de corrida (5X) está compuesto de Tris base 0,125M, glicina 0,96M y SDS 5%. El amortiguador de siembra (5X) contiene glicerol 50%, SDS 10%, DTT 0,1M, Tris ClH pH 6,8 0,4M y azul de bromo fenol.



Electroforesis en geles con sustrato incorporado:

Son minigeles de poliacrilamida con SDS, de 8 x 7 cm x 0.5 mm a los cuales se incorpora gelatina 0,1% (concentración final) durante la gelificación. Las muestras no deben hervirse, pues la enzima resultaría inactivada irreversiblemente (Lonsdale-Eccles and Mpimbaza, 1986).

La corrida electroforética se efectúa normalmente a 100 voltios en el amortiguador citado anteriormente (1X). Una vez finalizada se realizan dos lavados de 15 minutos cada uno con agua bidestilada para remover el SDS y permitir la renaturalización de la enzima. Luego se incuban a 37°C, preferentemente con agitación, en un amortiguador MES 0,1M pH 6 con el agregado de DTT 0,5mM. El tiempo requerido para el desarrollo de la actividad es de 2 horas cuando se trata de lisados de epimastigotes y de hasta 24 horas en el caso de amastigotes o trypomastigotes.

Tinción de geles de poliacrilamida con Coomassie Blue:

Una vez finalizada la electroforesis los minigeles se sumergen en una solución de Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2%, metanol 50%, ácido acético 7%) durante 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación. La destinción se efectúa en una solución de metanol 20% y ácido acético 10%, a la misma temperatura.

Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata:

Una vez finalizada la electroforesis se sumergen los minigeles durante 15 minutos en una solución de metanol 50%, ácido acético 10 % y posteriormente en una solución de metanol 7%, ácido acético 5%, por un período similar. Se lavan durante 5 minutos en agua destilada y se fijan en glutaraldehído 10% por 20 minutos. Luego se efectúan repetidos lavados con agua destilada durante aproximadamente 40 minutos. Los geles se sumergen en una solución de nitrato de plata amoniacal (1,9 ml



NaOH 1N, 1,4 ml NH_3 , 17,7 ml agua destilada, 4 ml NO_3Ag 20% y agua destilada hasta 100 ml, agregando los reactivos en ese orden) durante 10 minutos; se lavan con agua destilada y se los revela con una solución que contiene 100 μl de ácido cítrico 50mg/ml y 50 μl de formaldehído 38%, en un volumen final de 100 ml. Las bandas proteicas aparecen en pocos minutos. Para detener el revelado los minigeles se lavan varias veces en agua destilada hasta eliminar completamente al revelador. Todos los procesos se deben efectuar con agitación (Oakley *et al.*, 1980).

Preparación de bacterias *Escherichia coli*

Y 1090 para la infección con fagos:

Se prepara medio de cultivo LB (por litro: triptona: 10 g; extracto de levadura: 5 g; NaCl: 10 g; y se lleva a pH 7 con NaOH) y una vez autoclavado se le agrega maltosa 0,2% y ampicilina 1:1000 v/v de una solución 100 mg/ml.

Se inocula con una colonia de bacterias a partir de una placa de Petri de LB-agar 1,5% con ampicilina en la concentración citada. El cultivo se crece durante la noche a 37°C con agitación. Se centrifuga a 5000 rpm por 15 minutos, se retira el sobrenadante y las bacterias se resuspenden en 0,4 volúmenes de SO_4Mg 10mM (Sambrook *et al.*, 1989).

Expresión de proteínas recombinantes en el fago lambda gt 11:

Se mezclan 50 μl de bacterias Y 1090 con 1 ml de top agarosa (LB agarosa 0,7%; SO_4Mg 10mM) a 50°C y se vierten en placas de Petri (5,5 cm de diámetro) conteniendo LB-agar 1,5% y ampicilina en la concentración citada. Se coloca 1 μl (10^9 - 10^{10} ufp/ml) de cada uno de los fagos recombinantes conservados a 4°C en SM (NaCl 100mM, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,1mM; Tris HCl 50mM pH 7,5 y gelatina 0,01%).

Se incuba a 42°C hasta la aparición de placas de lisis, proceso que demanda aproximadamente 90 minutos. Se embebe un filtro de



nitrocelulosa en IPTG 10mM (inductor del operón lactosa), se lo coloca sobre las placas de lisis y se incuba a 37°C durante 3 horas. Finalizada la incubación los filtros de nitrocelulosa se guardan hasta su posterior procesamiento con los sueros correspondientes (Sambrook *et al.*, 1989).

Preparación de lisados de bacterias *Escherichia coli* Y 1090 para la adsorción de sueros:

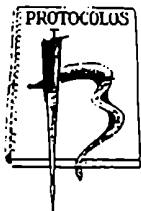
Se crece un cultivo de bacterias Y 1090 durante la noche. Se centrifuga a 5000 rpm por 15 minutos y se lo resuspende en 0,5 ml de agua destilada. Se desnaturaliza a 100°C durante 10 minutos y se pasa a hielo.

El suero en cuestión se diluye en TBS (NaCl 150mM, Tris HCl 50mM pH 7,6) con el agregado de 3% leche descremada en polvo, constituyendo la solución "A", y se adiciona un volumen similar al del suero del lisado de bacterias. Se agita en un recipiente de base ancha inmerso en hielo durante 2 horas. Se centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos y se guarda el sobrenadante.

Este proceso es necesario para el procesamiento de filtros de nitrocelulosa que contienen proteínas de fusión producidas en bacterias (Sambrook *et al.*, 1989).

Western Blot (electrotransferencia de proteínas):

Una vez finalizada la corrida electroforética los minigeles de poliacrilamida con SDS se equilibran durante 10 minutos en un amortiguador Tris base 25mM, glicina 192mM, metanol 20%, que se utiliza para la electrotransferencia de las proteínas a filtros de nitrocelulosa. Este proceso demanda 1 hora a 0,35 mA. Por último, los filtros se retiran y se dejan secar al aire (Burnette, 1981).



Revelado de filtros de nitrocelulosa conteniendo proteínas purificadas con sueros y proteína A-¹²⁵I:

Los filtros de nitrocelulosa conteniendo a las proteínas electrotransferidas se lavan 5 minutos con TBS. Se sumergen en la solución A durante 30 minutos (bloqueo) y posteriormente se incuban 90 minutos con el suero en cuestión. Se hacen 2 lavados de 15 minutos cada uno, un lavado de 10 minutos con TBS + Nonidet P-40 0,05% y dos lavados más de 10 minutos con TBS. Se incuba una hora con proteína A¹²⁵I (0,5x10⁶ cpm/ml) disuelta en solución A. Por último se hacen tres lavados de 10 minutos con TBS, un lavado de 10 minutos con TBS + NP-40 0,1% y dos o tres lavados con TBS. Se dejan secar los filtros y se exponen con una placa radiográfica a -70°C (Burnette, 1981).

Revelado de filtros de nitrocelulosa conteniendo proteínas recombinantes con sueros y proteína A-¹²⁵I:

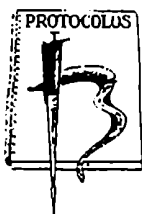
El proceso es similar al detallado anteriormente con las siguientes diferencias:

- 1) Se omite la utilización de Nonidet P-40 0,05% en los lavados previos a la incubación con proteína A¹²⁵I;
- 2) Se utilizan 10⁶ cpm/ml de proteína A¹²⁵I;
- 3) Los sueros se adsorben previamente con un lisado de *E. coli* para eliminar los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de la bacteria.

Revelado de filtros de nitrocelulosa con sueros y fosfatasa alcalina:

El procedimiento es similar al detallado hasta la finalización de los lavados posteriores a la incubación con el suero. Luego se incuba una hora con un segundo anticuerpo anti IgG de conejo producido en cabra (diluído 1:2000 en la solución A), que tiene acoplada a la enzima fosfatasa alcalina.

Se hacen tres lavados de 10 minutos con TBS, un lavado de 10



minutos con TBS + Nonidet P-40 0,1% y un último lavado con TBS. Finalmente se equilibran los filtros durante 5 minutos en un amortiguador Tris ClH 0,1M pH 9,5; NaCl 0,1M y MgCl₂ 0,05M.

Los filtros se revelan en 10 ml del mismo amortiguador con el agregado de 100 µl de BCIP (15 mg en 1 ml de dimetilformamida) y 100 µl de NBT (30 mg en 1 ml de 70 % formamida). La reacción se detiene a voluntad sumergiendo los filtros de nitrocelulosa en agua destilada y secándolos en papel de filtro (Mc Gadey, 1970)

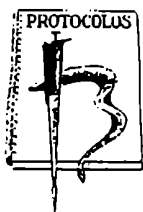
Adsorción de sueros con antígenos recombinantes de *T. cruzi*:

Se infectan bacterias Y1090 durante 20 minutos a temperatura ambiente con un fago lambda gt 11 que expresa un determinado antígeno del parásito. La infección debe permitir la obtención de una lisis casi confluyente. Se agrega agarosa top (LB agarosa 0,7%, SO₄Mg 10mM) y se vuelca la mezcla de bacterias y fagos en placas de LB agar 1,5%. Se incuba a 42°C hasta la aparición de placas de lisis (3 horas aproximadamente).

Se coloca un filtro de nitrocelulosa previamente embebido en IPTG 10 mM y se incuba a 37°C durante 3 horas. Luego se lo invierte y la incubación se prolonga por 12 horas más. Se retira el filtro conteniendo la proteína de fusión, se lo lava con TBS hasta remover las colonias de bacterias adheridas al filtro, se lo bloquea con la solución A durante 30 minutos y se lo incuba durante una hora con el suero en cuestión. Los anticuerpos dirigidos contra dicha proteína de fusión quedarán en el filtro de nitrocelulosa y el suero resultará depletado de esos anticuerpos (Sambrook *et al.*, 1989).

Selección de anticuerpos:

Para la elución de los anticuerpos dirigidos contra un determinado antígeno se trata a los filtros de nitrocelulosa con 8 ml de una solución de glicina 0,1M y NaCl 0,15M pH 2,6 durante 6 minutos. Después de la elución la solución se ajusta a pH 8 con 0,8 ml de Tris ClH 1M pH 8,8 y se



agrega leche descremada en polvo hasta un 3% final. Los anticuerpos así obtenidos pueden utilizarse en experimentos de Western Blot (Ibañez *et al.*, 1987).

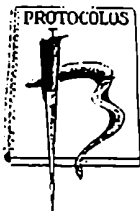
Inducción de bacterias *Escherichia coli* HB 101 conteniendo vectores de expresión:

Efectuada la transformación, se toma una colonia y se la crece durante la noche en 50 ml de un medio LB con ampicilina (1:1000 v/v de una solución 100 mg/ml) a 37°C y con agitación. A la mañana siguiente el cultivo se diluye 1/10 hasta un volumen final de 500 ml. Se mide la densidad óptica a 600 nm y se continúa la incubación a 37°C efectuando mediciones cada 10 minutos para detectar el momento en el cual el cultivo comienza a salir de la fase lag, lo cual ocurre a los 30 o 40 minutos de realizada la dilución. En ese momento se separan 50 ml (control no inducido) y a los 450 ml restantes se los induce con IPTG 0,1mM.

El registro de la densidad óptica continúa hasta que el cultivo llega a la fase estacionaria. Además, con intervalos de aproximadamente una hora, se realizan observaciones al microscopio óptico para detectar la eventual formación de cuerpos de inclusión (Marston, 1986; Sambrook *et al.*, 1989; Schein, 1989; Bowden *et al.*, 1991).

Purificación de cuerpos de inclusión:

Se parte de cultivos de *Escherichia coli* HB101 de 500 ml inducidos con IPTG 0,1mM para la expresión de las proteínas recombinantes. Después de 4 horas de inducción los cultivos se centrifugan durante 5 minutos a 7000 g y se resuspenden en 20 ml de una solución NaCl 100mM, EDTA 1mM, Tris HCl 50mM pH 8 (amortiguador I). Se observa una alícuota al microscopio para detectar la aparición de cuerpos de inclusión, que por su volumen causan una deformación en el cuerpo celular fácilmente detectable con 1000 aumentos. Posteriormente se sonica a intervalos de 30 segundos durante 5



minutos hasta la destrucción total de las células y la liberación de los cuerpos de inclusión.

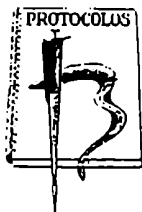
Se realiza un tratamiento con lisozima (1 mg/ml) durante 20 minutos a temperatura ambiente, se centrifuga y se resuspende en el amortiguador I. Se agrega deoxicolato de sodio al 0,1 %, se incuba 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifuga y se resuspende en el mismo amortiguador. Posteriormente se trata con $MgCl_2$ 8mM y DNasa 10 mg/ml durante 30 minutos a 37°C hasta la desaparición de la viscosidad propia de la existencia de ADN.

Se centrifuga 10 minutos a 10000 g. El sedimento obtenido se lava 2 veces con un agua destilada y se resuspende en la solución de siembra de geles a 100 °C, para evitar la posible degradación por proteasas bacterianas. Se centrifuga a temperatura ambiente durante 10 minutos a 10000 g y se conserva el sobrenadante, que se utiliza para electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (Marston, 1986; Harlow and Lane, 1988; Sambrook *et al.*, 1989; Schein, 1989; Bowden *et al.*, 1991).

La concentración de proteínas en los cuerpos de inclusión, medida por el método de Lowry *et al* (1951), es de aproximadamente 4-5 mg/ml.

Aislamiento y purificación de DNA de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*:

Se resuspende 1 g de parásitos en 10 ml de Tris ClH 10mM pH7,6; EDTA 100mM, NaCl 100mM. Se agrega SDS (1% final) y se mezcla suavemente. Se adiciona proteinasa K hasta 0,05 mg/ml y se incuba a 45°C durante toda la noche. Se agrega un volumen de fenol y se agita invirtiendo el tubo. Se centrifuga por 5 minutos a 10000 g. Se toma el sobrenadante con pipeta Pasteur evitando aspirar la interfase. Luego se extrae con un volumen de fenol:cloroformo 1:1 y finalmente con un volumen de cloroformo. Se agrega acetato de sodio hasta una concentración final 0,3M y 0,7 volúmenes de isopropanol. Se agita en círculos y con una pipeta Pasteur de extremo curvo se toma el precipitado blancuzco (ADN), que posteriormente se sumerge en etanol 70%. Puede



conservarse así, y para su utilización (corte con enzimas de restricción, PCR, etc.) se lo resuspende en TE (Tris HCl 10mM pH8; EDTA 1mM) (Sambrook *et al.*, 1989).

Minipreparación de plásmido:

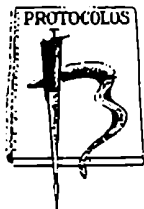
Se toma una colonia bacteriana con una punta esteril y se inocula un tubo conteniendo 3 ml de medio LB con 3 µl de ampicilina (100 mg/ml). Se crece durante 9 a 15 horas a 37°C con agitación.

Se transfiere el cultivo a tubos eppendorf de 1,5 ml. Se centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos y se resuspende en 0,3 ml de la solución P1 (Tris HCl 50mM pH 7,9, EDTA 10mM pH 8; RNasa A 100 mg/ml).

Se agregan 0,3 ml de solución P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%), se mezcla suavemente y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente se adicionan 0,3 ml de solución P3 (acetato de potasio 2,55M pH 4,8), se mezcla de inmediato y suavemente, y se centrifuga a 15000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se toma el sobrenadante y se le agregan 0,7 volúmenes de isopropanol previamente equilibrado a temperatura ambiente. Se centrifuga a 15000 rpm durante 15 minutos. El precipitado se lava con etanol 70% y se lo resuspende en 50 µl de TE (Sambrook *et al.*, 1989; Qiagen plasmid protocols, Plasmid Mini Preparation, Diagen GmbH, 1990).

Obtención de RNA:

Se centrifugan 10^9 células en un tubo eppendorf, se las resuspende en 1 ml de solución desnaturizante (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM pH 7, β-mercaptoetanol 0,1M y N-laurilsarcosina 0,5%) y se agrega 1/3 del volumen de etanol 95%. Se deja 10 minutos en hielo y se centrifuga a 10000 g durante 15 minutos. Se resuspende el pellet en 0,5 ml de solución desnaturizante y se agrega 0,1 ml de acetato de sodio 2M pH 4, 1 ml de fenol equilibrado en agua y 0,2 ml de cloroformo:alcohol isoamílico 49:1. Se agita con vortex entre 10 y 20 segundos y se deja 15 minutos en hielo. Se centrifuga a 10000 g durante 20 minutos a 4°C y se



toma 1 ml del sobrenadante. Se agrega 1 ml de isopropanol y se deja a -20°C durante una hora. Se centrifuga a 10000 g por 20 minutos y se resuspende el pellet en 0,3 ml de solución desnaturalizante. Se agregan 0,3 ml de isopropanol y se deja a -20°C durante 1 hora. Se centrifuga a 10.000 g por 10 minutos a 4°C y se resuspende el sedimento en agua bidestilada. (Chomczynski and Sacchi, 1987; Siebert and Chenchik, 1993).

Purificación de oligonucleótidos:

Los oligonucleótidos sintetizados se desprotegen por tratamiento a 56°C durante 8 a 16 horas. Para su purificación se siguen las instrucciones suministradas por Pharmacia en sus columnas NAPTM10 de Sephadex G-25. Deben efectuarse 3 lavados de 5 ml de agua destilada cada uno. Luego se agrega el oligonucleótido en un volumen no mayor de 1 ml y se descarta el eluido. Para recuperar al oligonucleótido se adicionan 2 volúmenes de 0,75 ml de agua bidestilada, se colecta el eluido y el contenido se seca totalmente en una centrífuga con vacío. Finalmente el sedimento se resuspende en 0,5 ml de agua destilada.

Cuantificación del oligonucleótido purificado:

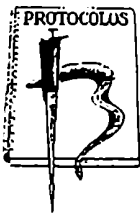
Se toman 5 μl del oligonucleótido y se lo lleva a 1 ml con agua destilada. Se mide la absorbancia a 260nm y se calcula su concentración teniendo en cuenta que 1 DO= 33 $\mu\text{g/ml}$. Para llegar al valor final, se multiplica la cifra obtenida por el factor de dilución utilizado (Sambrook *et al.*, 1989).

Cuantificación de ADN:

Se utiliza el mismo método que para la cuantificación de los oligonucleótidos.

Cuantificación de ARN:

Se utiliza el mismo método que para la cuantificación de oligonucleótidos, pero el valor obtenido debe multiplicarse por 40.



Digestión de ADN genómico y plasmídico:

Los componentes de la reacción comprenden el ADN en cuestión, la enzima de restricción elegida, un amortiguador apto para ella y un volumen adecuado de agua destilada (Sambrook *et al.*, 1989). Las digestiones pueden realizarse usando como sustrato ADN genómico, ADN plasmídico o un producto de PCR. Los tiempos de digestión y el número de unidades de enzima requeridos dependen de cada ensayo en particular.

Geles de agarosa:

Los geles de agarosa se preparan en TBE 0,5X (5X: Tris Base 5,4%; ácido bórico 2,75%; EDTA 10mM) (Sambrook *et al.*, 1989). Antes de verter la solución en el molde de electroforesis se le agrega bromuro de etidio (10 mg/ml) en una relación 1:2000 v/v. La electroforesis se lleva a cabo a 10 V por cm de separación entre los electrodos.

El porcentaje de agarosa del gel dependerá del tamaño de los fragmentos a separar. Para la resolución de fragmentos pequeños y de tamaños muy parecidos se utilizan geles al 4% de agarosa preparados con agarosa de bajo punto de fusión y agarosa común en proporción 3:1, que permiten separar fragmentos de hasta 5 pares de bases de diferencia.

Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa:

Una vez detectada la banda a escindir se toma un bisturí, se corta el rectángulo de agarosa debajo de la banda deseada y se lo cubre con agarosa de bajo punto de fusión. Se continúa la electroforesis permitiendo que el fragmento de ADN penetre en dicha agarosa. Se corta la banda y se la sumerge en un tubo eppendorf que contiene 0,45 ml de TE y 50 µl de NaCl 5M. Se incuba a 65°C durante 15 minutos. Se realizan dos extracciones con fenol equilibrado y una extracción con una mezcla fenol: cloroformo isoamílico 1:1. Se agrega acetato de sodio 0,3M final y dos volúmenes de etanol 100%. Se deja a -70°C por 20 minutos y se centrifuga a 15000 rpm durante 20 minutos. Se lava el sedimento con



etanol 70% y se resuspende en un volumen adecuado de TE (Sambrook *et al.*, 1989).

Transcripción reversa:

Esta reacción la efectúa la enzima transcriptasa reversa y consiste en la síntesis de una cadena de cADN utilizando como templado una molécula de ARN.

Para la transcripción reversa a partir de RNA total de distintos estadios y cepas de *Trypanosoma cruzi* se utilizó el First-Strand cDNA Synthesis Kit, Pharmacia, Cat No 27-9261-01, que ha sido diseñado para la amplificación por PCR o la síntesis de la segunda hebra del cDNA.

Se toman entre 1 y 5 mg de RNA, se los resuspende en 20 µl de agua bidestilada, se incuba a 65°C durante 10 minutos y se pasa a hielo.

Se toman 11 µl de la "Bulk First-Strand cDNA Reaction Mix", que contiene la transcriptasa reversa murina clonada y purificada por FPLC, inhibidor de RNasa, BSA libre de ADNsa y ARNsa, y dNTPs en solución acuosa. Se añaden 1 µl de DTT 200mM y 1 µl de oligo dT (200 ng). Se mezcla bien y se incuba a 37°C durante 1 hora. Finalizada la reacción, se la incuba a 90°C por 5 minutos para desnaturalizar el híbrido ARN-cADN e inactivar la transcriptasa reversa, y se transfiere a hielo.

Para la reacción de PCR se utilizan 2 o 3 µl de esta reacción.

Secuenciación de ADN:

Se realiza con el equipo SEQUENASE versión 2.0. de United States Biochemical adaptado por el personal técnico del Departamento de Genética Médica del Biomedical Center, Universidad de Uppsala. Este método, llamado de "terminación de cadena", se basa en la síntesis *in vitro* de una cadena de ADN por la ADN polimerasa sobre un templado de simple cadena (Sanger and Coulson, 1975). En particular, se utiliza a la enzima T7 polimerasa sobre un plásmido pUC19 o un "vector T" (ver más adelante) como templado. La reacción de síntesis culmina con la



incorporación de un nucleótido análogo que impide la polimerización de nuevos nucleótidos.

La secuenciación de ADN comprende las siguientes etapas:

1) Desnaturalización del ADN:

A partir de una minipreparación de plásmido, se toman aproximadamente 3-5 μg de ADN y se los desnaturaliza en una solución que contiene NaOH 200mM y EDTA 0,2mM durante 20 minutos a 37°C. Se agrega acetato de sodio hasta una concentración final 0,3M y 2,5 volúmenes de etanol 100%. Se deja a -70°C durante 15 minutos, se centrifuga y se lava el sedimento con etanol 70%.

2) Reacción de hibridación con el oligonucleótido "primer":

Se resuspende el ADN plasmídico en 7 μl de agua destilada y se agregan 30 ng de oligonucleótido "primer" y 2 μl de amortiguador de Sequenase 5X (Tris HCl 200mM pH 7,5, MgCl_2 100mM; NaCl 250mM). La mezcla se incuba a 37°C durante 20 minutos y luego se la deja llegar a temperatura ambiente.

3) Reacción de marcado y pre-elongación:

A cada mezcla del ítem 2) se le agregan 1 μl de DTT 0,1M; 0,5 μl de [^{35}S] dATP (5 μCi) y 2 μl de la mezcla de marcación (7,5mM dGTP, dCTP, dTTP) diluída 1:5 en agua destilada. Por último, se adiciona 1 μl de la enzima T7 ADN polimerasa diluída en Tris HCl 10mM pH 7,5; DTT 5mM y BSA 0,5 mg/ml.

La reacción se extiende por espacio de 5 minutos a temperatura ambiente.



4) Reacción de terminación de la elongación:

Se transfieren 3,5 μ l de cada reacción de marcado (de un volumen total de 15,5 μ l) a cada tubo de terminación (ddX) precalentado a 37°C. La mezcla "ddG" contiene NaCl 50 mM, 80 μ M de cada nucleótido y 8 μ M de ddGTP.

La incubación se continúa a 37°C durante 5 minutos y la reacción se detiene con 4 μ l de una solución que contiene formamida al 95%, EDTA 20mM, azul de bromo fenol y Xylene Cyanol FF 0,05%.

Las muestras se desnaturalizan a 80°C durante 2 minutos y se siembran 3 μ l de cada reacción en un gel de secuencia.

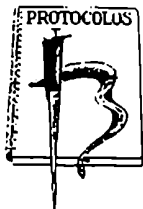
La electroforesis se efectúa a 75 W, aproximadamente 2.000 V. Una vez finalizada, el gel se seca en un Gel Dryer model 583 de Bio Rad, y se expone a temperatura ambiente con una placa de radiografía Kodak X-OMat-AR.

Geles de acrilamida para la secuenciación de ADN:

Se preparan con una mezcla de acrilamida/bisacrilamida (concentración final 6%), TBE 1X, urea 7,5 M, TEMED y persulfato de amonio 0,035% (Sambrook *et al.*, 1989). Se deja polimerizar a temperatura ambiente. Antes de aplicar las muestras se realiza una pre-corrida a 60-80 W durante una hora en TBE 0,5X. La electroforesis se efectúa a 60-80 W constantes (1600 a 2000 voltios).

Ligación de moléculas de ADN:

La reacción de ligación consiste en la unión de dos moléculas de ADN catalizada por la enzima T4 Ligasa a 14-16 °C (Sambrook *et al.*, 1989). El tiempo recomendado para la reacción es de no menos de 3 horas, si bien se suele efectuar por espacio de 20 horas.



Los componentes de la reacción son: el fragmento de ADN a clonar, el vector de clonado, la enzima T4 Ligasa, ATP, el amortiguador de la enzima y agua bidestilada.

Para la ligación de productos de PCR, que contienen un residuo de adenina adicional en los extremos 3' (Clark, 1988), se utiliza un vector T, que tiene un residuo de timina que permite ligar en forma cohesiva a tales fragmentos de PCR (Marchuk *et al.*, 1991).

En los experimentos efectuados se utilizó el vector T de Novagen (T-vector Kit Protocols. Novagen pT7Blue T-vector Kit. Cat. No. 69820-1) y el de Promega (pGEM-T Vector Systems Cat. No A 3600).

Transformación de bacterias competentes:

Se retiran bacterias competentes HB101 de -70°C. Se dejan en hielo durante 10 minutos hasta que se descongelen. Se toman 50 µl y se agregan a 5 µl de la ligación o lo que corresponda en cada experimento.

La mezcla se deja en hielo durante 30 minutos. Se calienta a 42 °C durante 50 segundos y se pasa nuevamente a hielo por 2 minutos. Se agregan 200 µl de medio LB y se incuba a 37°C durante una hora.

Se toman 125 µl de la mezcla y se vuelca sobre placas de LB-agar 1,5% con ampicilina (50 mg/ml). Se deja secar y se incuba durante la noche a 37°C.

Si se pretende seleccionar a las bacterias que tienen el fragmento de ADN clonado, se deben preparar placas de LB-agar 1,5% con ampicilina (50 mg/ml) y agregarles X-Gal e IPTG en la superficie a concentraciones que dependerán del vector de clonado utilizado. En el caso del vector T se usaron 45 µl de X-Gal 4% y 20 µl de IPTG 100mM.

Las bacterias positivas serán blancas y aquellas que no contengan inserto alguno serán azules (Sambrook *et al.*, 1989; T-vector Kit Protocols. Novagen pT7Blue T-vector Kit. Cat. No. 69820-1; pGEM-T Vector Systems Cat. No A 3600).



PCR sobre colonias:

Se toma una colonia bacteriana con una punta esteril y se la resuspende en 10 μ l de amortiguador de lisis (Tris ClH 25mM pH 9; KCl 50 mM; Tween 20 0,01%). Se hierve durante 5 minutos, se pasa inmediatamente a hielo, se centrifuga durante 2 minutos y se toma 1 μ l del sobrenadante para la reacción de PCR (Laboratory Manual, Perkin-Elmer AB, 1994).

Reacción de PCR:

Para una reacción de PCR se utiliza un amortiguador 10X (Tris HCl 100mM pH 7,9; KCl 500mM; MgCl₂ 15mM); dNTPs (10X) 2mM; 300 ng de cada oligonucleótido; 2,5 unidades de Taq polimerasa; ADN en la cantidad que corresponda, y agua bidestilada hasta 50 μ l.

Las temperaturas y tiempos de unión de los oligonucleótidos al templado, la elongación y la desnaturalización son propios de cada experimento, así como el número de ciclos de la reacción (Saiki, 1985).

Secuenciación automática de ADN:

La secuenciación por este método comprende 3 etapas:

1) Generación del templado a secuenciar por PCR, a partir de un plásmido o de un lisado de bacterias, usando un oligonucleótido biotinilado.

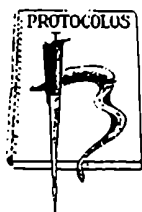
2) Purificación y desnaturalización del templado a través de su unión a esferas magnéticas de estreptavidina.

3) Reacción de secuencia propiamente dicha.

(Laboratory Manual, Perkin-Elmer AB, 1994):

1) Generación del templado:

La reacción de PCR para generar el templado fue descripta anteriormente. Los oligonucleótidos a utilizar (5 pmoles por reacción) corresponden a secuencias del plásmido en el cual fue clonado el



fragmento a secuenciar. Uno de ellos debe estar biotinilado y debe ser utilizado en la menor concentración posible para evitar la competencia en la reacción de pegado del producto de PCR a las esferas de estreptavidina. La reacción de PCR se hace en un volumen de 50 μ l, 40 de los cuales serán utilizados en la reacción de secuencia.

El programa de amplificación es el siguiente: 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos. Finaliza con un ciclo de extensión de 7 minutos a 72°C. El número total de ciclos es 25.

Una vez concluída la reacción, se toman 5 μ l del producto de PCR y se somete a electroforesis en un gel de agarosa al 1-1,5%.

2) Purificación del templado:

Se utilizan 40 μ l de esferas magnéticas para los 40 μ l de producto de PCR. Previo a la unión, las esferas se lavan con 50 μ l de la solución II (Tris HCl 10mM, NaCl 1M, Tritón X-100 0,1%). Se descarta el sobrenadante, se agregan otros 40 μ l de la solución II y luego los 40 μ l del producto de PCR. Se mezcla y se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Para la reacción de secuencia el templado debe ser una molécula de ADN simple cadena. Para ello, se separa el sobrenadante de la mezcla (utilizando un soporte magnético) y las esferas con el producto de PCR unido se lavan con 50 μ l de la solución II.

La desnaturalización se efectúa agregando 50 μ l de solución alcalina (NaOH 0,1M, NaCl 1M, Tritón X-100 0,1%). Se resuspende y se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se efectúan 3 lavados de 50 μ l con solución alcalina, solución II y Tris HCl 10mM, en ese orden, y se resuspenden las esferas en 24 μ l de agua destilada.

3) Reacción de secuencia:

En primer término se deben mezclar los amortiguadores 1, 2 y 3 en volúmenes iguales (mezcla A).



amortiguador 1:	Tris-HCl (pH 7,5)	311mM
amortiguador 2:	DTT	177 mM
amortiguador 3:	MnCl ₂	62mM
	Isocitrato	460mM

En segundo lugar se deben mezclar 6 μ l de la mezcla A con 18 μ l de agua destilada y los 24 μ l de la suspensión de esferas magnéticas para cada templado. Se divide esta mezcla (B) en cuatro pocillos de una microplaca, de la siguiente manera:

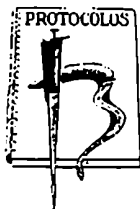
Microplaca	A	C	G	T
Mezcla B (μ l)	5	5	10	10
"Primer" (μ l)	1	1	2	2

La reacción de unión del primer al templado se realiza sobre un bloque a 65°C durante un período de 7 minutos, finalizado el cual se deja llegar a temperatura ambiente lentamente. Este procedimiento se debe efectuar en oscuridad, debido al carácter fluorescente de los primers, que permitirá luego ser distinguidos unos de los otros.

Durante la unión se diluye a la T7 polimerasa en su amortiguador de dilución a 3U/ μ l.

Además, se prepara esta mezcla de deoxinucleótidos (C).

dATP	1mM
dCTP	1mM
c7dGTP	1mM
dTTP	1mM
ddNTP	5 μ M
NaCl	50mM
Tris-HCl (pH 7,4)	40mM
agua destilada	



Se mezcla la T7 polimerasa diluída y los deoxinucleótidos en las siguientes proporciones:

Tubo	A	C	G	T
Mezcla C (µl)	3	3	6	6
pol T7 diluída (µl)	0,5	0,5	1	1

Estas mezclas se mantienen en hielo y luego se las agrega a los templados unidos al primer, mezclando apropiadamente.

Se incuba la placa a 37°C durante 10 a 30 minutos para la reacción de extensión.

Finalizada dicha reacción, se colectan en un tubo los contenidos de los cuatro tubos (A, C, G y T) de cada templado. Se los ubica en un soporte magnético y se descarta la solución.

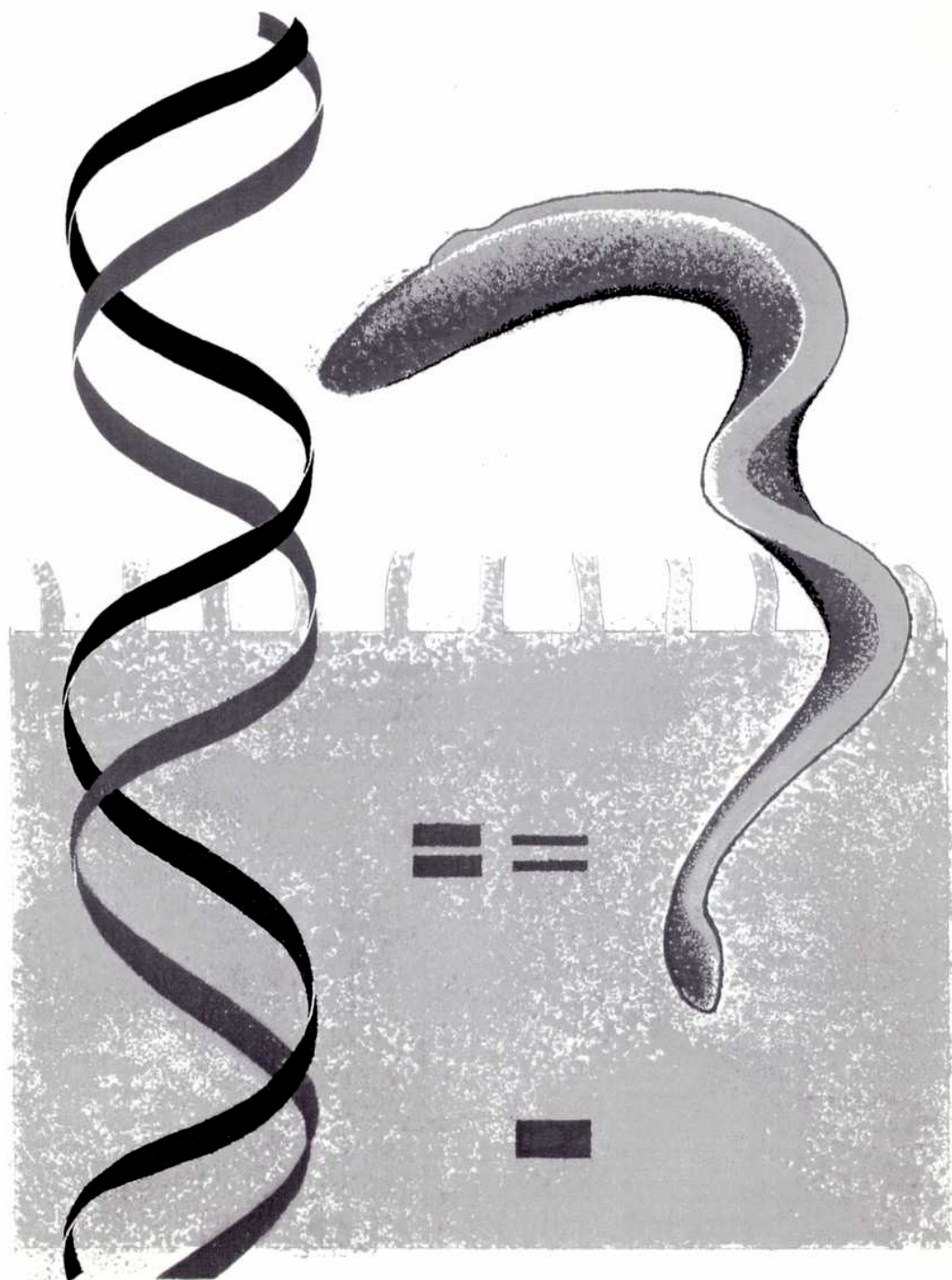
Finalmente se agregan 6 µl de solución para detener la reacción (formamida 95%, EDTA 20 mM, dextran blue).

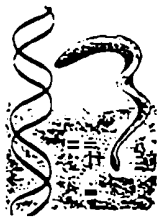
Las muestras deben ser conservadas a -20°C en oscuridad.

Las reacciones de secuencia deben ser desnaturalizadas durante 2 minutos a aproximadamente 80 °C antes de sembrar 4 µl de cada una de ellas en el gel de secuencia.

El secuenciador ABI373, fabricado por BioLabs, permite detectar la fluorescencia de cada primer. La corrida electroforética está acoplada a una computadora Macintosh IICX que almacena la información y permite luego generar gráficos de picos de las distintas secuencias efectuadas.

RESULTADOS





1- Antigenicidad y modelo estructural de la cruzipaína.

La posible localización secundaria de la cruzipaína en la membrana plasmática en algunos estadios del ciclo de vida y la inhibición parcial de la penetración de trypomastigotes en macrófagos humanos causada por los fragmentos F(ab)₂ de un antisuero específico (Souto Padrón *et al.*, 1990) sugieren que la cruzipaína estaría involucrada en la interacción huésped-parásito, además de su rol en la digestión intracelular de proteínas.

Por otro lado, los estudios efectuados por Scharfstein *et al.*, (1988), y Gazzinelli *et al.*, (1991) demuestran que la glicoproteína GP57/51 es un antígeno de *T. cruzi* con actividad de cisteín proteinasa, y que su secuencia N-terminal es idéntica a la de la cruzipaína (Murta *et al.*, 1990).

La aparente homología entre dichas proteínas llevó a pensar que la cisteín proteinasa principal de *T. cruzi* bien podría ser un antígeno y, en tal caso, un eventual reactivo de diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Para probar esta hipótesis se investigó la existencia de anticuerpos dirigidos contra la cruzipaína en el suero de pacientes chagásicos agudos y crónicos.

La cruzipaína es antigénica en la infección natural:

La figura 9a corresponde a un ensayo de Western blot en el cual se hizo reaccionar a la cruzipaína purificada con 2 sueros de pacientes chagásicos crónicos, H1 y H2. La banda de aproximadamente 55 kDa corresponde a la cruzipaína, así como también los productos de autodegradación de 30 a 35 kDa que suelen acompañar a la enzima en su proceso de purificación.

En la figura 9b se evidencia la especificidad del antisuero Anti-Pr, que reconoció sólo a la cruzipaína en extractos de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tul2 (calle B). En tanto, el suero crónico H2 reconoció un patrón complejo de proteínas en el extracto mencionado y tenuemente a la cruzipaína purificada en la calle A.

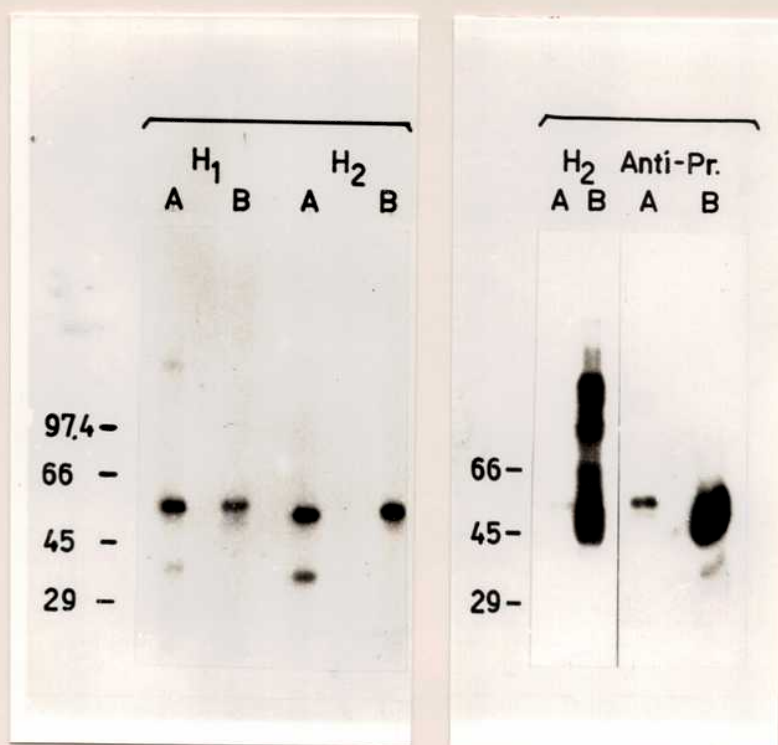
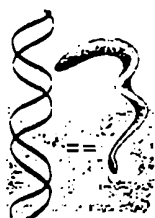


Figura 9: Inmunoreactividad de la cruzipaina y sus fragmentos.

a) Reactividad de dos sueros de pacientes chagásicos crónicos (H1 y H2) contra la proteinasa purificada en ensayos de Western blot. Se utilizaron dos preparaciones de cruzipaina, una rica en fragmentos intermedios de la enzima (A) y la otra conteniendo casi exclusivamente a la cruzipaina intacta (B). Se sembró 1 μ g de enzima por calle y la dilución de los sueros fue de 1:1000.

b) Reactividad de un suero de paciente crónico, H2, diluido 1:1000, y del antisuero (anti-Pr) diluido 1:3000, contra 1 μ g de cruzipaina purificada (A) y un extracto total de proteínas de epimastigotes de la cepa Tul2 de *T. cruzi* (4×10^6 células) (B).

Los pesos moleculares se indican en kiloDaltones.



De los 13 sueros crónicos analizados en ensayos de Western Blot, 11 reaccionaron contra la cruzipaína.

Cuando se ensayaron 12 sueros provenientes de pacientes agudos, sólo uno generó una banda tenue contra la cisteín proteinasa.

Los sueros provenientes de personas sanas y de pacientes de leishmaniasis visceral (kala-azar) no reaccionaron con la cruzipaína.

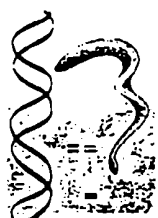
Todos estos sueros también se enfrentaron con distintos antígenos de *T. cruzi* clonados en el laboratorio del Dr. Frasch (Ibañez *et al.*, 1987).

En la tabla 1 se esquematizan los resultados obtenidos.

Los primeros intentos de clonado del gen codificante de la cruzipaína fueron realizados en nuestro laboratorio por el Dr. Oscar Campetella a partir de una biblioteca de expresión genómica de *T. cruzi*, utilizando para ello un suero policlonal monoespecífico contra la enzima purificada (Campetella *et al.*, 1990). Los ensayos llevaron al aislamiento de numerosos clones cuya secuencia fue idéntica a la del antígeno 13, miembro de una familia de antígenos de 85 kDa (Ibañez *et al.*, 1988), y que luego demostró ser miembro de la superfamilia que incluye a la *trans*-sialidasa (Campetella *et al.*, 1992).

Estos resultados sugirieron una fuerte reacción cruzada entre dichas moléculas y la cruzipaína.

El suero anti-cruzipaína se enfrentó, además, contra otros antígenos recombinantes de *T. cruzi* (Ibañez *et al.*, 1987), reconociendo también, aunque debilmente, al antígeno 36. Mientras tanto, en ensayos de Western blot el antisuero reconoció solamente a la cruzipaína en extractos de epimastigotes (figura 9b) y trypomastigotes de la cepa Tul2.



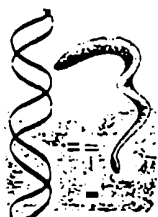
Resultados

101

sueros	descripción y fuente	cruzipaína	Reactividad contra los siguientes antígenos					
			1	2	7	13	30	36
H1	crónico A	+	+	+	+	+	+	+
H2	crónico A	+	+	+	+	+	+	+
R3	crónico A	+	+	+	-	+	+	-
399	crónico B	-	+	-		-	-	
16	crónico B		+					
27	crónico B		+					
166	crónico B		+					
167	crónico B		+					
185	crónico B		+					
86/195	crónico C		+					
87/1844	crónico C		+					
87/1711	crónico C		-					
88/1997	crónico C							
6-68	agudo B							
6-111	agudo B	-						
390	agudo B	+/-						
397	agudo B	-						
A4	agudo B							
A10	agudo B							
A13	agudo B							
A14	agudo B							
A26	agudo B							
A7	agudo B							
A20	agudo B							
A25	agudo B							
L1	leish B							
L5	leish B							
L7	leish B							
L9	leish B							
N2	normal A							
N3	normal A							

Tabla 1: Reactividad de los sueros humanos y del antisuero policlonal monoespecífico contra la cruzipaína y otros antígenos clonados de *T. cruzi*.

A, Argentina; B, Brasil; C, Chile.



Es genuina la inmunoreactividad de los sueros chagásicos crónicos contra la cruzipaína?

En base a la reacción cruzada detectada fue necesario confirmar que los anticuerpos de los pacientes chagásicos crónicos que reconocían a la cruzipaína no fueran generados contra los antígenos 13 y 36. Para ello se adsorbieron 5 sueros de pacientes chagásicos crónicos y el suero anti-cruzipaína con dichas proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* (Ibáñez *et al.*, 1987) y se los enfrentó nuevamente con la cruzipaína purificada. Todos los sueros conservaron su reactividad contra la enzima después de adsorbidos con cada uno de los antígenos, tal como puede observarse en la figura 10 para el suero crónico H2 y el suero anti-cruzipaína (Anti-Pr) adsorbidos con el antígeno 13 recombinante.

Como control negativo se utilizó al antígeno 30 de *T. cruzi* clonado y expresado en el vector pGEX.

Cuál es la causa de la reacción cruzada entre la cruzipaína y los antígenos 13 y 36?

Para la obtención del suero policlonal monoespecífico se utilizó cruzipaína purificada de epimastigotes de la cepa Tul2. La posibilidad de que en ella existieran trazas de los antígenos 13 y 36 puede ser descartada ya que el antígeno 13 y su ARN mensajero no han sido detectados en epimastigotes (Ibáñez *et al.*, 1987). Por otro lado el antisuero no ha detectado ninguna proteína de 85 kDa, el peso molecular del antígeno 13, en Western blots de extractos totales de epimastigotes de *T. cruzi* (figura 9b).

Los resultados obtenidos avalan esta argumentación, puesto que dos sueros crónicos reconocieron a la cruzipaína pero no al antígeno 13. Además, cuatro sueros de pacientes agudos, positivos para el antígeno 13, fueron negativos para la cruzipaína y, por último, seis sueros crónicos reaccionaron con la proteinasa pero no con el antígeno 36 (tabla 1).



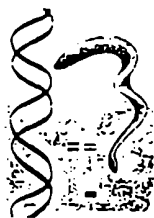
Figura 10: Reactividad del suero anti-proteinasa (Anti-Pr.), anti-antígeno 13 (Anti 13), y del suero H2 crónico, antes (-) y después (+) de ser adsorbido con el antígeno 13, expresado como una proteína de fusión con la glutatión-S-transferasa en el vector pGEX.

Se utilizó cruzipaina purificada (A), una preparación enriquecida en la extensión C-terminal de 25 kDa obtenida por el proceso de autoproteólisis (B) y la proteína de fusión 13 en el vector pGEX (C).

Se sembró aproximadamente 1 µg de proteína por calle.

Se analizaron las secuencias de la cruzipaina y de los antígenos 13 y 36 en busca de homologías que explicaran la reacción cruzada.

La secuencia SGE fue detectada en una de las repeticiones del antígeno 13 y en la posición nº 93 a 95 de la cruzipaina madura. Las secuencias LPQXEXQ y LPT se hallan en las repeticiones del antígeno 36 y



en las posiciones nº 118 a 124 y nº 258 a 260 de la cruzipaína, respectivamente (Ibañez *et al.*, 1988).

La extensión C-terminal es antigénica.

Scharfstein *et al.*, (1988) habían informado el aislamiento de un antígeno de *T. cruzi*, reconocido por sueros crónicos, al que llamaron GP 57/51 en relación a la presencia de carbohidratos y al peso molecular que evidenciaba en geles de poliacrilamida con SDS. La secuenciación del extremo N-terminal mostró una secuencia típica de una cisteín proteinasa, que resultó ser la cruzipaína (Murta *et al.*, 1990).

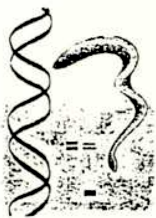
Los mismos autores habían identificado otro antígeno, al que llamaron GP25 (Scharfstein *et al.*, 1983) y que fue luego considerado como un producto de degradación de la GP 57/51 (Scharfstein *et al.*, 1988). Este hecho hizo pensar que GP25 podría corresponder al dominio C-terminal de la cruzipaína.

En la figura 10 se observa una banda de 25 kDa de peso molecular que corresponde a la extensión C-terminal obtenida mediante el proceso de autoproteólisis. El suero anti-cruzipaína y el suero crónico H2 la reconocieron intensamente.

En base a la antigenidad que evidenciaba la extensión C-terminal decidimos investigar si acaso no sería el blanco principal de los anticuerpos en la infección natural.

Existe un dominio inmunogénico en la cruzipaína?

Para analizar la especificidad de la respuesta inmune contra la cruzipaína se clonaron 2 fragmentos de ADN codificantes del dominio central y uno codificante de la extensión C-terminal en el vector de expresión pGEX, que permite expresar a la enzima glutation-S-transferasa de 26 kDa fusionada a la proteína de interés.



La figura 11 describe las construcciones realizadas.

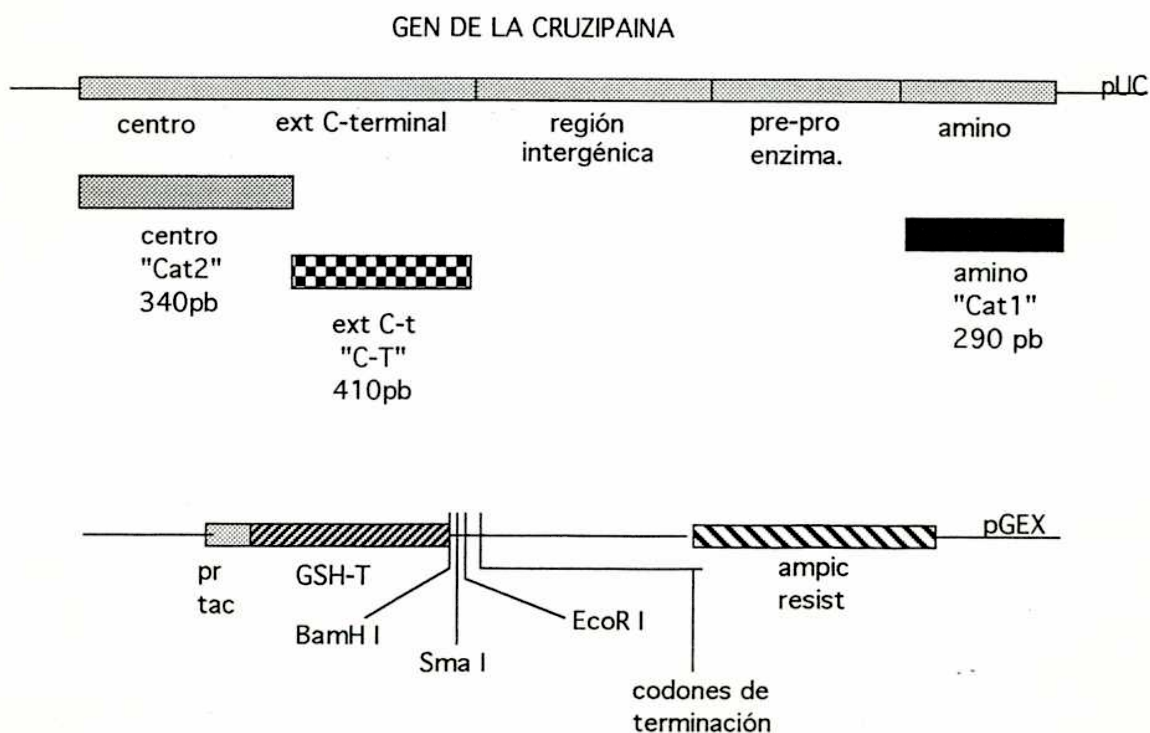
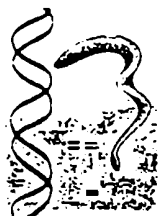


Figura 11: Fragmentos de la cruzipaina (Cat₁, Cat₂ y C-T) clonados en el vector pGEX para ser expresados como proteínas de fusión con la glutation-S-transferasa.

El gráfico superior muestra un gen de la cruzipaina tal como fue clonado por Campetella *et al.*, (1992). En el gráfico inferior se detalla al vector pGEX, con su promotor "tac" que responde a la inducción con IPTG, y con los sitios para las enzimas de restricción BamH I, Sma I y EcoR I que permiten clonar el fragmento de interés.



La proteína Cat1 está codificada por 290 pb. de la región N-terminal del dominio central de la cruzipaína y la proteína Cat2 por 340 pb. de la porción restante del dominio central. La proteína recombinante C-T corresponde a la extensión C-terminal de la cruzipaína y está codificada por un fragmento de ADN de 410 pb.

Las tres proteínas de fusión se expresaron en *E. coli* formando cuerpos de inclusión, estructuras que contienen formas biológicamente inactivas de la proteína recombinante y que pueden estar compuestas exclusivamente por la proteína recombinante o bien estar acompañadas de proteínas bacterianas.

En la figura 12a se observan lisados de bacterias que expresan a las proteínas Cat1, Cat2 y C-T. Nótese la banda intensa correspondiente a la proteína de fusión y las numerosas bandas proteicas que la acompañan. La figura 12b muestra los cuerpos de inclusión purificados correspondientes a las proteínas de fusión Cat1 y Cat2. Si bien la proteína recombinante es mayoritaria, existen otras bandas de menor peso molecular, que suelen ser productos de degradación de aquella.

La figura 13 ilustra los resultados obtenidos en experimentos de Western blots de la enzima purificada y de las proteínas Cat1, Cat2 y C-T cuando se las enfrentó con un suero anti-cruzipaína y con sueros provenientes de pacientes chagásicos crónicos.

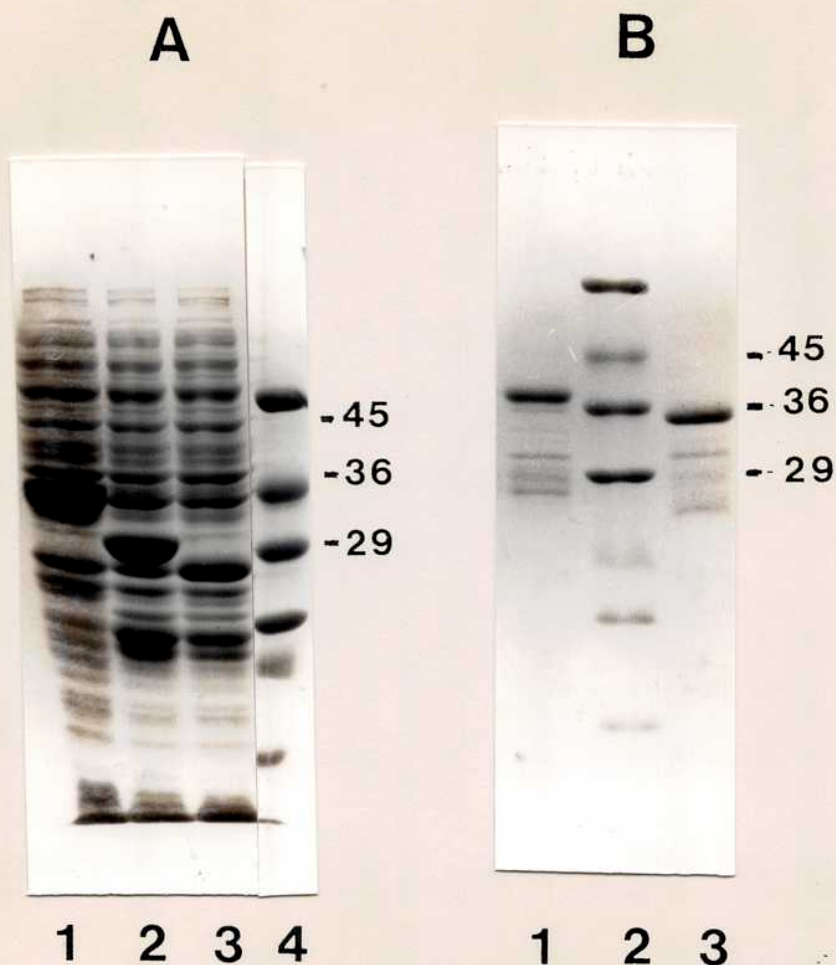
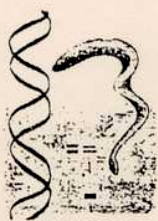


Figura 12a: Expresión de las proteínas de fusión en *Escherichia coli*.

Gel de poliacrilamida al 10% teñido con Coomassie Blue.

Calle 1: lisado de bacterias que expresan a la proteína de fusión C-T.

Calle 2: lisado de bacterias que expresan a la proteína de fusión Cat2.

Calle 3: lisado de bacterias que expresan a la proteína de fusión Cat1.

Calle 4: marcadores de peso molecular en kiloDaltones .

Figura 12b: Cuerpos de inclusión de las proteínas Cat1 y Cat2.

Gel de poliacrilamida al 10% teñido con Coomassie Blue.

Calle 1: cuerpos de inclusión de la proteína de fusión Cat2.

Calle 2: marcadores de peso molecular.

Calle 3: cuerpos de inclusión de la proteína de fusión Cat1.

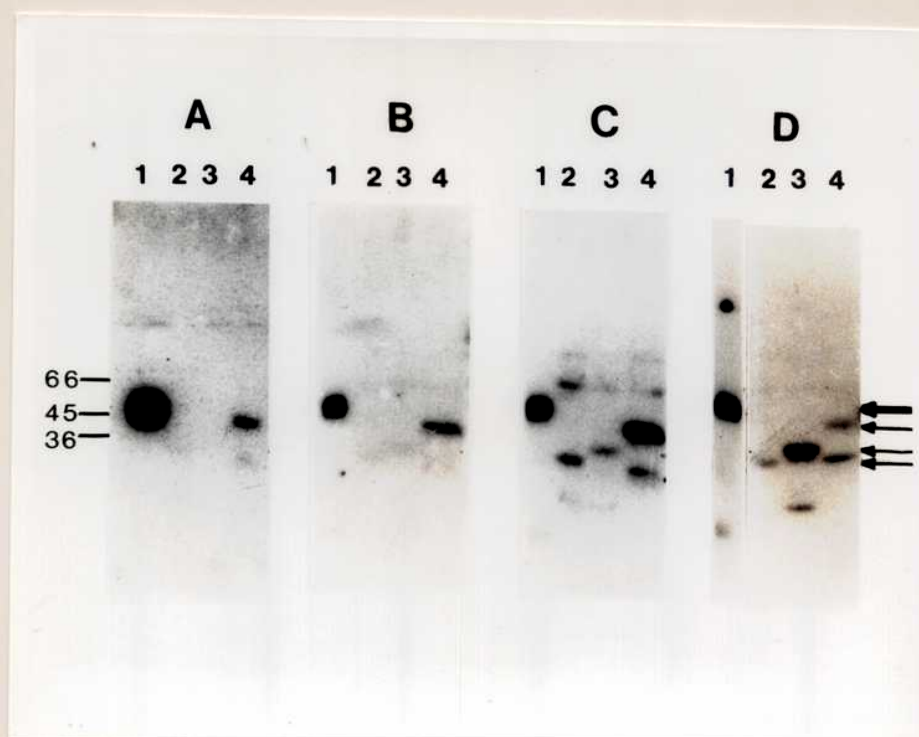
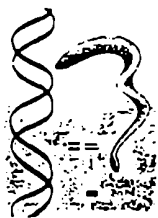


Figura 13: Reacción de sueros provenientes de pacientes chagásicos crónicos y antisueros específicos con la cruzipaina purificada (peso molecular aparente 50 kDa, calle 1) y las proteínas de fusión Cat₁, Cat₂ y C-T, (35, 37 y 44 kDa; calles 2, 3 y 4 respectivamente, de los cuales 26 kDa provienen de la glutathion-S-transferasa).

Los paneles A, B, C y D corresponden al antisuero Rab1 (Anti-Pr en las figuras 9 y 10), y a los sueros humanos R3, 167 y 185, respectivamente. La posición de la cruzipaina está indicada con una flecha gruesa y la de las proteínas de fusión con una fina. Los valores de peso molecular están dados en kiloDaltones. Algunas bandas adicionales de menor peso molecular en los paneles C y D corresponden a productos de degradación de los cuerpos de inclusión. La banda de 66 kDa que aparece en el panel C es un contaminante de *E. coli*, reconocido por el suero crónico 167.



Los antisueros Rab1 y Rab3 y la mayoría de los sueros crónicos reaccionaron intensamente con la cruzipaína, la extensión C-terminal obtenida por autoproteólisis (ausente en la figura) y la proteína de fusión C-T, pero no con las proteínas Cat1 y Cat2. Unos pocos sueros, como el nº 167, reaccionaron debilmente con una u otra de las fracciones del dominio central, mientras que uno solo, el nº 185, reaccionó fuertemente con la proteína Cat2. El suero anti-cruzipaína Rab2, obtenido contra la cruzipaína parcialmente desnaturalizada e inactiva, reconoció intensamente a las proteínas Cat1 y C-T.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2.

En busca de un modelo estructural para la cruzipaína.

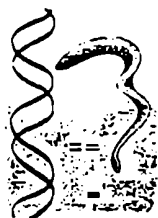
Hemos visto que la cruzipaína tiene un dominio central catalítico altamente homólogo a la catepsina L de mamíferos (Campetella *et al.*, 1992). Pero a diferencia de las catepsinas posee una extensión C-terminal que demostró ser fuertemente inmunogénica.

La secuencia GPGPTPEP presente en el extremo N-terminal de la extensión C-terminal sugiere una estructura tridimensional flexible y poco propensa a la formación de α -hélices, que formaría una bisagra con la función de separar al dominio catalítico de la extensión C-terminal inmunogénica.

Se diseñó un experimento para probar esta hipótesis desde un punto de vista funcional.

Si la cruzipaína estuviera formada por dos dominios claramente diferenciados, un anticuerpo dirigido contra la extensión C-terminal podría inmunoprecipitar a la enzima sin alterar su actividad catalítica.

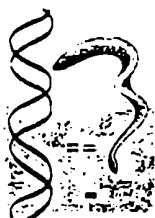
La cruzipaína fue entonces inmunoprecipitada con diferentes anticuerpos y se midió su actividad en los inmunocomplejos (tabla 3).



sueros	descripción y fuente	Reactividad contra los siguientes antígenos			
		Cat1	Cat2	C-T	cruzipaína
716/90	humano C			+	++
882/89	humano C			+	+
302/89	humano C		-	+/-	+
1167/89	humano C		+/-	+	+
295/89	humano C	-	-	+	++
773/89	humano C	+/-	+/-	+	++
1251/89	humano C	-	-	+	++
525/90	humano C			+	+
837/90	humano C			+	++
H1	humano A		+/-		++
H2	humano A		-		++
R3	humano A				++
16	humano B		-	-	+
27	humano B		+/-	+/-	+
166	humano B	-	-	+	++
167	humano B	+/-	+/-	+	++
185	humano B	+/-	+	+/-	++
Rab1	conejo	-	-		+++
Rab2	conejo	++	+/-		+++
Rab3	conejo	+/-	-		+++

Tabla 2: Reactividad de distintos sueros contra la cruzipaína purificada y las tres proteínas de fusión con la glutation-S-transferasa.

A, Argentina; B, Brasil; C, Chile.



Resultados

111

Sueros	Actividad enzimática ($\mu\text{moles. h}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$)			
	Inmunoprecipitación		Determinación directa de la actividad	
	Sobrenadante	Precipitado	Preincubado	No preincubado
Rab1	1,33	104,2	76,5	124,17
Rab2	0,94	40,16	53,4	105,00
Rab3	1,33	107,0	-	-
Anti-Cat1	34,10	2,27	38,9	123,20
Anti-Cat2	34,10	3,60	-	-
Anti-C-T	35,05	2,46	-	-
Anti-GDH	26,33	0,38	43,18	120,20
- anticuerpo específico	23,68	0	38,63	82,75

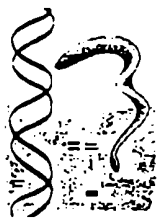
Tabla 3: Efecto de los anticuerpos específicos purificados de antisueros de conejo sobre la actividad de la cruzipaina.

La cruzipaina fue inmunoprecipitada con distintos antisueros y se midió su actividad en los inmunocomplejos.

Este ensayo se efectuó con anticuerpos purificados, pues el antisuero tiene α -2-macroglobulina, un inhibidor potente de las proteinasas, y peptidasas capaces de hidrolizar al compuesto Bz-Pro-Phe-Arg-pNA, que se utilizó como sustrato de la cruzipaina.

Una vez medida la actividad se separó la mezcla de reacción por centrifugación, se adicionó nueva mezcla de reacción y se obtuvieron los mismos valores de actividad, certificando que la enzima estaba activa y formando parte de inmunocomplejos.

Los sueros Rab1 y Rab3, cuyos anticuerpos habían demostrado estar dirigidos principalmente contra la extensión C-terminal, inmunoprecipitaron a la enzima sin afectar su actividad.



El suero Rab2, que en Western Blots reconoció fuertemente al dominio catalítico Cat₁ y en menor medida al Cat₂, inmunoprecipitó a la enzima inhibiendo su actividad en un 60%.

Los sueros obtenidos en conejo contra las tres proteínas de fusión desnaturalizadas (Cat₁, Cat₂ y C-T) reconocieron a dichas proteínas y a la cruzipaína purificada en Westerns blots, pero fueron incapaces de inmunoprecipitar a la enzima nativa e inhibir su actividad, al igual que un suero monoespecífico anti-glutamato deshidrogenasa de *T. cruzi* utilizado como control negativo (tabla 3). Esto sugiere que los anticuerpos generados contra las proteínas de fusión están dirigidos contra epítopes secuenciales, no accesibles en la enzima nativa.

Los experimentos resumidos en la tabla 3 requirieron el uso de concentraciones muy bajas de enzima, lo cual favorecía su desnaturalización, llevando a valores de actividad prácticamente nulos. Para evitar este problema se agregó seroalbúmina bovina acetilada (ABSA) a la mezcla de reacción como protector. Los anticuerpos también protegieron a la cruzipaína, en especial aquellos que se le unen específicamente, como es el caso de los purificados a partir de los sueros Rab1, Rab2 y Rab3.

Por último, se utilizó al suero Rab2 en un experimento de Western Blot con el fin de comprobar la presencia de la cruzipaína en los inmunocomplejos. En la figura 14 se observa una doble banda de aproximadamente 40-50 kDa en las calles que contienen a los inmunocomplejos de la cruzipaína con los sueros Rab1, Rab2 y Rab3.

Los sueros obtenidos con las tres proteínas de fusión desnaturalizadas no habían inmunoprecipitado a la enzima, y como era de esperar, no generaron banda alguna en el Western Blot.

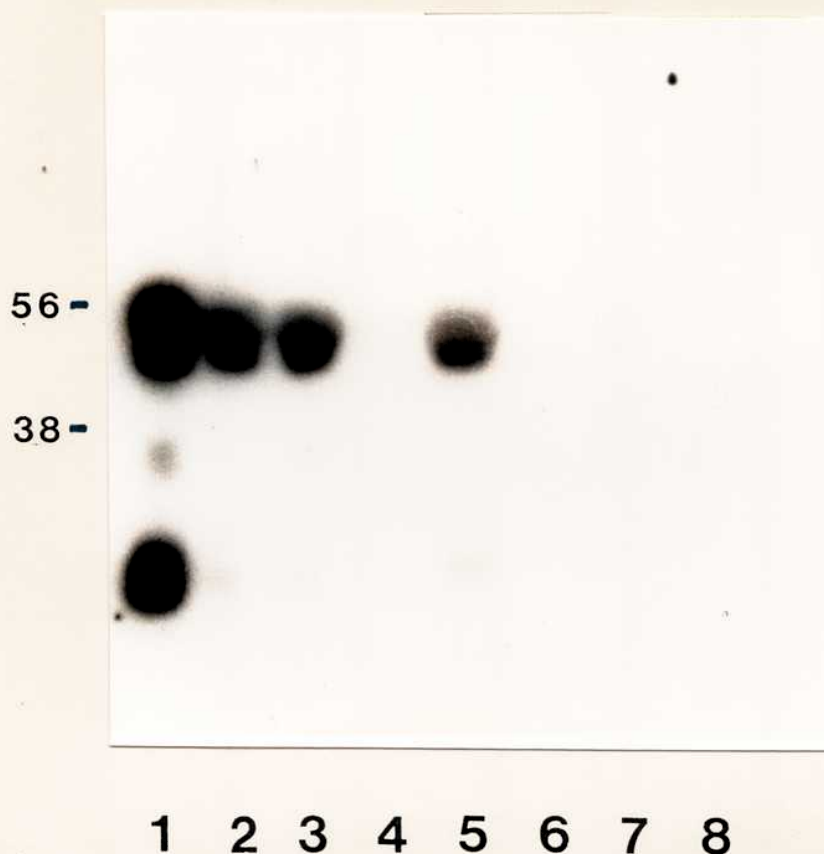


Figura 14: Western blot de los inmunocomplejos formados por la cruzipaína y diferentes antisueros usados para su inmunoprecipitación.

Se utilizó el suero Rab2. Los pesos moleculares están indicados en kiloDaltones.

Calle 1: cruzipaína purificada.

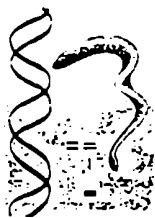
Calles 2 y 3: cruzipaína inmunoprecipitada con los sueros Rab1 y Rab3, respectivamente.

Calle 4: cruzipaína inmunoprecipitada con un suero anti GDH de *T. cruzi*.

Calle 5: cruzipaína inmunoprecipitada con el antisero Rab2.

Calles 6, 7 y 8: cruzipaína inmunoprecipitada con los sueros producidos contra las proteínas de fusión Cat1, Cat2 y C-T, respectivamente.

La posición de la cruzipaína está indicada por una flecha gruesa. La extensión C-terminal por una flecha fina.



Los resultados obtenidos sugieren que la cruzipaína estaría formada por dos dominios claramente diferenciados, uno catalítico de baja antigenicidad en infecciones naturales y otro no enzimático, la extensión C-terminal, inmunodominante y que podría tener como función principal desviar a la respuesta inmune del huésped, permitiendo la conservación de la actividad enzimática (Cazzulo and Frasch, 1992).

2- Comportamiento anómalo en geles de poliacrilamida.

Los valores de peso molecular aparente asignados a la cisteín proteinasa principal de *Trypanosoma cruzi* han sido objeto de controversia. Si bien fue inicialmente informado un valor aproximado de 60 kDa (Cazzulo, 1991), otros estudios, utilizando distintas condiciones electroforéticas, arrojaron valores de 50 kDa (Greig and Ashall, 1990) y 40 kDa (Bonaldo *et al.*, 1991).

El peso molecular de la enzima, deducido de la secuencia completa de dos genes de la cepa Tul2 es de 36,3 kDa (Campetella *et al.*, 1992) y podría alcanzar un valor de 41 kDa si los 3 sitios potenciales de N-glicosilación estuviesen efectivamente ocupados *in vivo* (Cazzulo *et al.*, 1990).

Cuál es el peso molecular aparente de la cruzipaína?

Las glicoproteínas cuyo contenido en carbohidratos representa al menos un 10% de su peso molecular se comportan anómalamente en geles de poliacrilamida con SDS. Sin embargo, el peso molecular aparente tiende a su valor correcto a medida que se aumenta la concentración de acrilamida (Segrest and Jackson, 1971).

Teniendo en cuenta que la cruzipaína es una glicoproteína cuyos oligosacáridos de alta manosa representan aproximadamente un 10% del



peso molecular total (Cazzulo *et al.*, 1990), decidimos utilizar geles de porcentaje creciente de acrilamida para acercarnos lo más posible al peso molecular real de la enzima.

En la figura 15 se observa la movilidad electroforética de la cruzipaína purificada en geles de poliacrilamida con SDS al 7,5; 10,0; 12,5 y 15%, teñidos con nitrato de plata. En todos los casos la enzima fue reducida con DTT 0,1M y hervida durante dos minutos antes de ser sometida a la electroforesis.

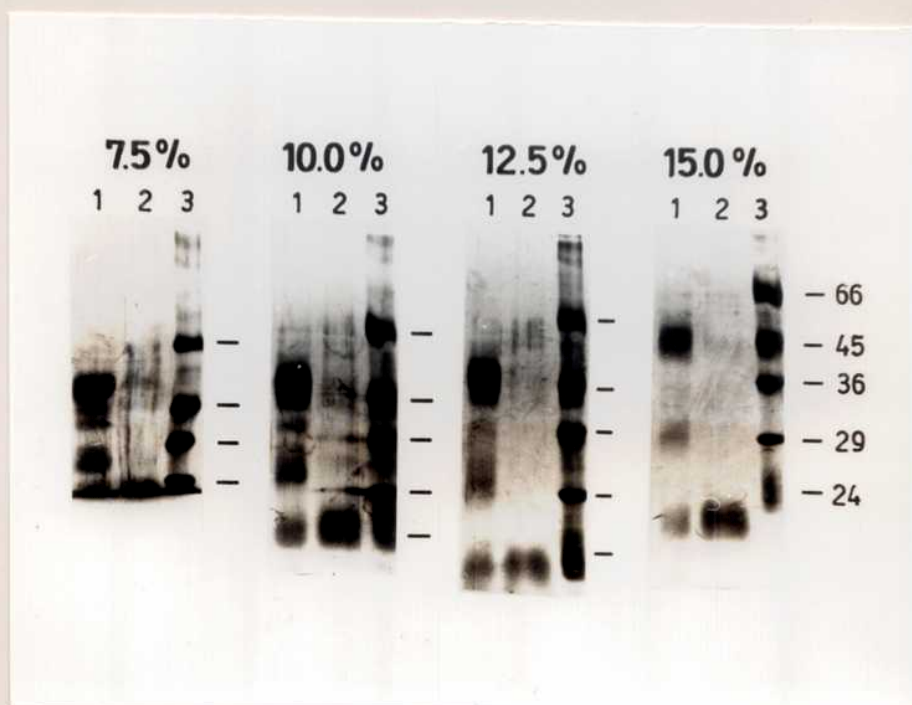


Figura 15: Movilidad electroforética de la cruzipaína en geles de poliacrilamida de diferente porosidad.

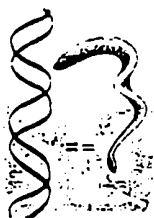
Calle 1: cruzipaína intacta (0,6 μ g).

Calle 2: extensión C-terminal obtenida por autoproteólisis (2 μ g).

Calle 3: marcadores de peso molecular en kiloDaltons.

Los geles se corrieron a 120 V y a temperatura ambiente, durante 1,5 a 2,5 horas dependiendo de la concentración de acrilamida, y fueron teñidos con nitrato de plata.

Todas las muestras se sometieron a ebullición en presencia de DTT 0,1M.



Los valores de peso molecular obtenidos para la banda principal fueron de 51, 48, 47 y 45 kDa, decrecientes a medida que se aumentó el porcentaje de acrilamida.

Parte de la información conflictiva surge de estudios en los que se estimó el peso molecular en geles con gelatina incorporada (Greig and Ashall, 1990; Bonaldo *et al.*, 1991).

En la figura 16 se repitieron las condiciones del experimento de la figura 15, pero en geles conteniendo gelatina.

Las bandas decoloradas de actividad, tomando como referencia el centro de cada una, tuvieron pesos moleculares de 48, 41, 35,5 y 33 kDa, para porcentajes crecientes de acrilamida (7,5 a 15%).

Todos los valores resultaron inferiores a los obtenidos en geles sin sustrato incorporado (figura 15). En particular, en los geles de poliacrilamida con SDS al 12,5 y 15% se obtuvieron valores inferiores a los deducidos de la secuencia del gen.

Por qué los pesos moleculares aparentes en geles con sustrato incorporado son menores a los obtenidos en geles normales?

Para visualizar la actividad enzimática en geles con gelatina es condición básica que la enzima no sea desnaturalizada por ebullición. ¿Puede este factor modificar la movilidad electroforética de la enzima?

Para hallar la respuesta a esta pregunta se efectuó el experimento de la figura 17, en el cual se puso a prueba el efecto de la ebullición sobre la movilidad electroforética de la enzima reducida con DTT 0,1M en geles al 10% de acrilamida sin gelatina incorporada.

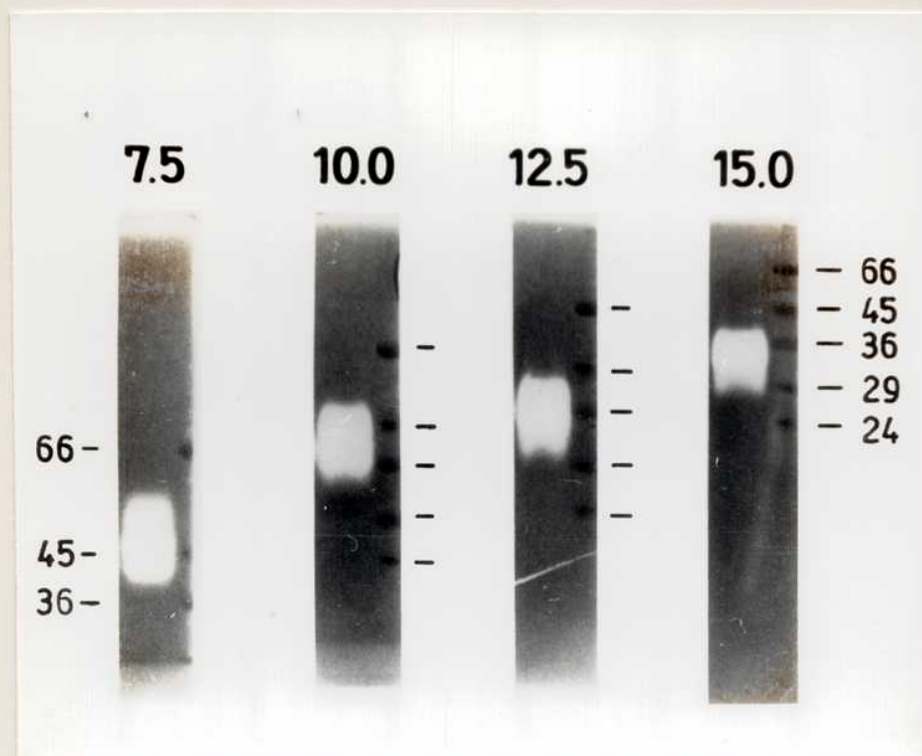


Figura 16: Actividad de la cruzipaína en geles de diferente porosidad conteniendo gelatina 0,1% como sustrato incorporado.

Las condiciones experimentales son iguales a las de la figura 15, excepto la presencia del sustrato en el gel. Las muestras (0,3 μ g de proteína) no fueron sometidas a ebullición.

La enzima no hervida, en las calles 3 a 5, presentó una movilidad electroforética mayor y consecuentemente un peso molecular aparente menor que la cruzipaína hervida (calles 1, 2, 6 y 7). El valor de 40 kDa se



acercó al de 41 kDa obtenido en geles de poliacrilamida con SDS al 10% con gelatina incorporada.

Así, la diferencia en el peso molecular aparente de la enzima en geles con y sin sustrato es consecuencia de la ebullición y no de la presencia de un sustrato proteico en el gel.

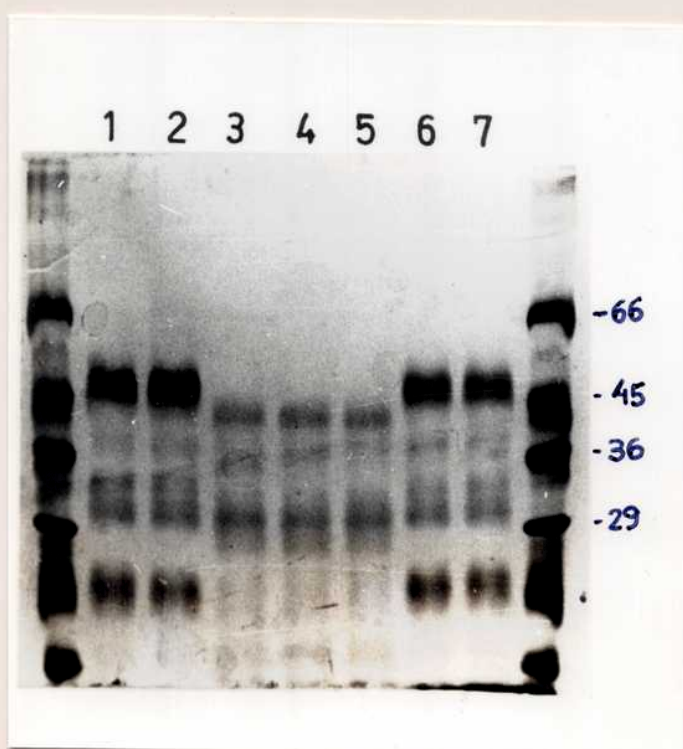


Figura 17: Efecto de la ebullición sobre la movilidad electroforética de la cruzipaína.

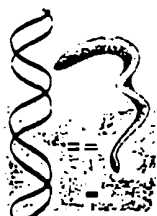
Se corrió un gel de poliacrilamida al 10% con 0,32 mg de cruzipaína purificada.

Calles 1, 2, 6 y 7: muestras sometidas a ebullición.

Calles 3, 4 y 5: muestras no sometidas a ebullición.

Todas las muestras contienen DTT 0,1M. La tinción se realizó con nitrato de plata.

Los pesos moleculares están en kiloDaltons.



El comportamiento de la cruzipaína frente a la ebullición se asemeja al de las proteínas que tienen puentes disulfuro cuando se las somete a electroforesis en presencia y ausencia de un agente reductor.

En este caso el peso molecular aparente dependerá del estado de reducción de la proteína. Si los puentes disulfuro son intracatenarios, la reducción producirá el desplegado de la molécula, resultando una proteína de mayor peso molecular aparente por el aumento de su volumen hidrodinámico.

La figura 18a muestra un peso molecular aparente de 39 kDa para la cruzipaína no reducida y de 47 kDa para la enzima reducida, en un gel al 10% de acrilamida.

El arco que se observa entre las calles 2 y 3 y las calles 5 y 6 se debe a la difusión del agente reductor y confirma la identidad de ambas proteínas y la existencia, al igual que otras cisteín proteinasas, de puentes disulfuro intracatenarios (Allore and Barber, 1984).

En la figura 18b se observa un gel similar al de la figura 18a, pero teñido con nitrato de plata.

Curiosamente la proteína no reducida resultó prácticamente invisible, si bien en los bordes externos de las calles 3 y 5 se la alcanza a ver. No obstante la escasa tinción, se observa que el peso molecular aparente es menor que el de la enzima reducida.

Esta diferencia de tinción se observó aún sometiendo a electroforesis cantidades de cruzipaína no reducida 5 a 10 veces mayores a las de la enzima reducida.

Estos resultados indican que la reducción total de los puentes disulfuro de la cruzipaína requiere del calentamiento a 100°C en presencia de DTT 0,1M.



Figura 18a: Efecto de la reducción con DTT 0,1M sobre la movilidad electroforética de la cruzipaina.

Se corrió un gel de poliacrilamida al 10% con 5,4 μg de cruzipaina purificada.

Calles 1, 2, 6 y 7: cruzipaina reducida con DTT 0,1M.

Calles 3, 4 y 5: cruzipaina no reducida.

Todas las muestras fueron sometidas a ebullición. La tinción se efectuó con Coomassie Blue.

Los pesos moleculares están en kiloDaltones.

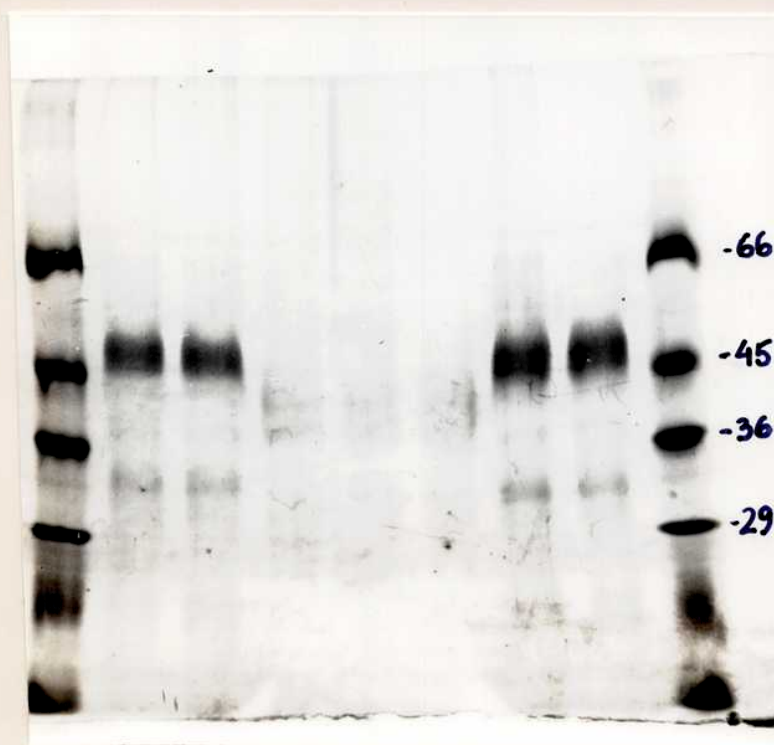
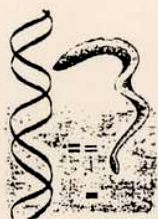


Figura 18b: Efecto de la reducción con DTT 0,1M sobre la movilidad electroforética de la cruzipaina.

Experimento similar al de la figura 18a. En este caso se utilizaron 0,3 μg de cruzipaina purificada, y el gel se tiñó con nitrato de plata.



Cuál es el comportamiento electroforético de la extensión C-terminal?

Hemos visto que el peso molecular aparente de la cruzipaína es función del porcentaje de acrilamida en geles con SDS.

En la figura 15 se efectuó el mismo experimento con la extensión C-terminal purificada y se obtuvieron pesos moleculares aparentes de 29, 24, 22 y 21 kDa en geles de poliacrilamida con SDS al 7,5; 10; 12,5 y 15% respectivamente.

El peso molecular de la extensión C-terminal, deducido de la secuencia de ADN, es de aproximadamente 14 kDa (Campetella *et al.*, 1992).

Si comparamos estos últimos valores con los obtenidos para la cruzipaína, vemos que aún en geles al 15% de acrilamida el peso molecular aparente es un 50% superior al deducido de la secuencia.

Como veremos en breve, se han detectado algunas modificaciones de tipo post-traduccionales cuyos efectos en el peso molecular aparente de la extensión C-terminal son desconocidos.

Para investigar el efecto de la ebullición en presencia de DTT 0,1M se repitió el experimento de la figura 15.

En la figura 19 se observa que la extensión C-terminal no presentó ninguna variación en su peso molecular aparente en relación a la ebullición. Si, en cambio, la cruzipaína remanente del proceso de autoproteólisis, en concordancia con lo observado en la figura 15.



Figura 19: Efecto de la ebullición sobre la movilidad electroforética de la extensión C-terminal de la cruzipaína.

Se corrió un gel de poliacrilamida al 12,5% con 1 μ g de una preparación de extensión C-terminal purificada.

Calles 1, 2, 6 y 7: las muestras fueron sometidas a ebullición.

Calles 3, 4 y 5: muestras no sometidas a ebullición.

Todas las muestras contienen DTT 0,1M. La tinción se realizó con nitrato de plata.

Los pesos moleculares están en kiloDaltones.

Para completar la caracterización electroforética de la extensión C-terminal se probó el efecto del DTT 0,1 M, en un experimento similar al de la figura 18b.

En la figura 20 la ausencia de DTT 0,1M en las calles 3-5 provocó la eventual desaparición de la extensión C-terminal.



Figura 20: Efecto de la reducción con DTT 0,1M sobre la movilidad electroforética de la extensión C-terminal de la cruzipaína.

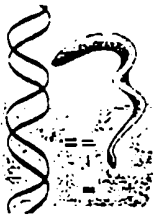
Se corrió un gel de poliacrilamida al 10% con 1 μ g de proteína obtenida como producto de la autoproteólisis de la cruzipaína.

Calles 1, 2, 6 y 7: cruzipaína reducida con DTT 0,1M.

Calles 3, 4 y 5: cruzipaína no reducida.

Todas las muestras fueron sometidas a ebullición. La tinción se efectuó con nitrato de plata. Los pesos moleculares están en kiloDaltones.

Aunque tenuemente, puede verse el arco generado por la difusión del DTT. El peso molecular aparente de la extensión C-terminal no reducida resultó idéntico al de la proteína reducida.



Este resultado sugiere que en la extensión C-terminal los residuos de cisteína no formarían puentes disulfuro. Sin embargo, otros experimentos (ver figura 24) indicaron lo contrario para la mayoría de los residuos cisteína.

Una posible explicación es que los puentes disulfuro pongan en contacto a residuos de cisteína muy próximos entre sí, de manera tal que la reducción no altere significativamente su estructura tridimensional.

La cruzipaína y su extensión C-terminal se comportaron de diferente manera ante la tinción con Coomassie Blue y con nitrato de plata, dependiendo del estado de reducción y desnaturalización por ebullición.

A continuación se resumen los ensayos realizados:

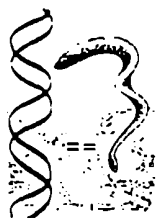
- * La cruzipaína hervida y reducida con DTT 0,1M se tiñe más con nitrato de plata que la enzima no hervida y reducida (figura 17).

- * La cruzipaína hervida y reducida con DTT 0,1M se tiñe más con Coomassie Blue que la hervida y no reducida (figura 18a).

- * La cruzipaína hervida y no reducida prácticamente no se tiñe con nitrato de plata (figura 18b).

- * La extensión C-terminal hervida y reducida con DTT 0,1M se tiñe más que la no hervida con nitrato de plata (figura 19).

- * La extensión C-terminal hervida no reducida no se tiñe con nitrato de plata (figura 20).



De lo expuesto se deduce que las mayores dificultades se presentaron para la tinción del dominio C-terminal.

El Coomassie Blue no dio resultados (no mostrado) y el nitrato de plata sólo surtió efecto en presencia de DTT 0,1M y preferentemente con ebullición.

La cruzipaína hervida (0,3 μ g) necesitó DTT 0,1M para ser visualizada con nitrato de plata (figura 18b). Con Coomassie Blue se tiñó relativamente bien (figura 18a), a pesar de requerir una cantidad de proteína muy superior (5,4 μ g).

Westerns blots como un método alternativo de detección de la cruzipaína y su extensión C-terminal:

Como un método alternativo para detectar a la cruzipaína y a la extensión C-terminal hervidas y no reducidas, se transfirieron geles de poliacrilamida con SDS similares a los de las figuras 18b (cruzipaína) y 20 (extensión C-terminal) a filtros de nitrocelulosa y se los enfrentó al antisuero Rab2. Los resultados pueden verse en la figuras 21a y 21b.

La cruzipaína no reducida, invisible con nitrato de plata, originó una señal uno o dos órdenes de magnitud más intensa que la cruzipaína reducida, y su peso molecular aparente fue inferior, en concordancia con las figuras 18a y 18b.

La extensión C-terminal no reducida pudo ser detectada claramente. Su peso molecular no varió respecto de la proteína reducida y la intensidad de la señal fue levemente superior. Las trazas de cruzipaína no reducida también se detectaron, pero no aquellas reducidas con DTT 0,1M, en concordancia con lo observado en la figura 21a.

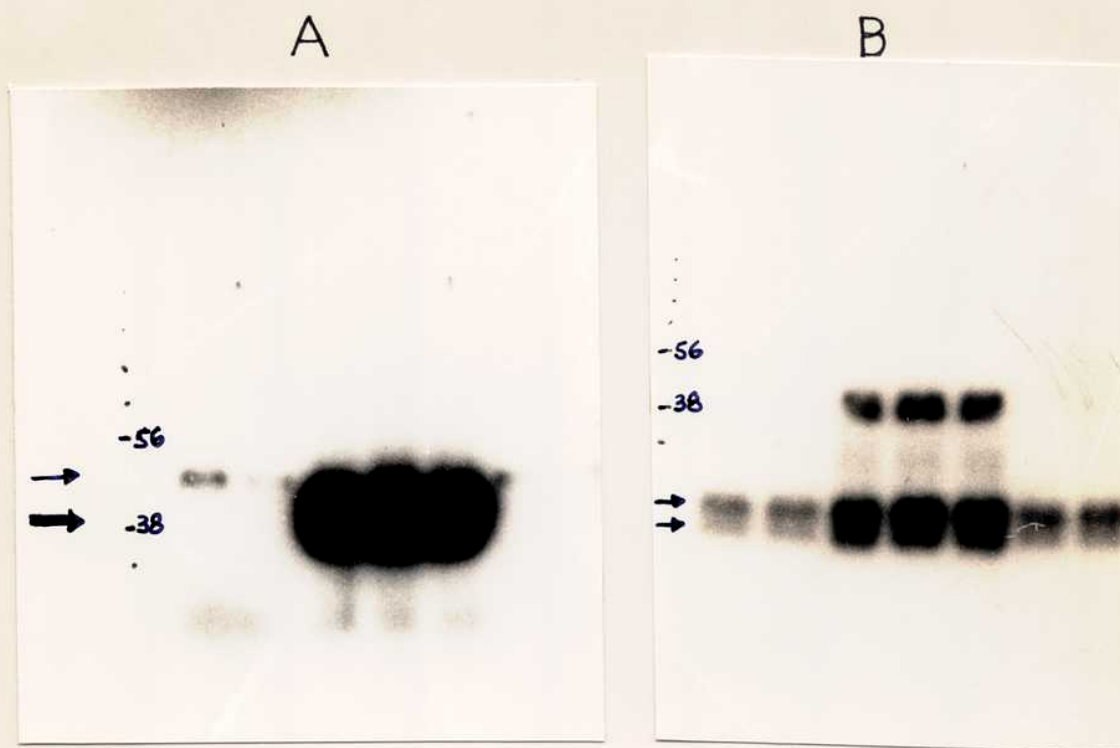
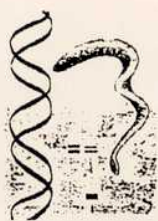


Figura 21a: Efecto de la reducción con DTT 0,1M sobre la reactividad en Western Blots de la cruzipaína.

Se corrió un gel de poliacrilamida al 10% con 0,3 μ g de cruzipaína purificada.

Calles 1, 2, 6 y 7: cruzipaína reducida con DTT 0,1M.

Calles 3, 4 y 5: cruzipaína no reducida.

Todas las muestras fueron sometidas a ebullición. El gel fue electrotransferido a un filtro de nitrocelulosa y las proteínas se hicieron reaccionar con el antisuero Rab2. La flecha fina señala a la cruzipaína reducida con DTT 0,1M y la flecha gruesa a la enzima no reducida.

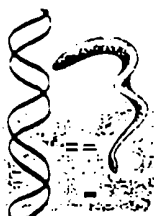
Figura 21b: Efecto de la reducción con DTT 0,1M sobre la reactividad en Western Blots de la extensión C-terminal de la cruzipaína.

Se corrió un gel de poliacrilamida al 12,5% con 1 μ g de extensión C-terminal purificada.

Calles 1, 2, 6 y 7: extensión C-terminal reducida con DTT 0,1M.

Calles 3, 4 y 5: extensión C-terminal no reducida.

Las condiciones son similares a las de la figura 21a. Las flechas indican la doble banda de reactividad de la extensión C-terminal.



Los resultados expuestos aportan evidencias concluyentes del comportamiento anómalo de la cruzipaína madura y su extensión C-terminal purificada en distintos sistemas electroforéticos y bajo diferentes condiciones experimentales.

3- Algunas características estructurales de la extensión C- terminal de la cruzipaína.

Purificación de la extensión C-terminal:

La extensión C-terminal se obtiene mediante la autoproteólisis de la cruzipaína en condiciones controladas, tal como fue descrito por Hellman *et al.*, (1991). Como resultado de este proceso se generan péptidos pequeños provenientes de la degradación completa del dominio catalítico, quedando además algunas moléculas de cruzipaína intactas que se detectan en geles de poliacrilamida con SDS.

Los estudios que se detallan a continuación se efectuaron con la extensión C-terminal purificada a homogeneidad mediante una filtración en geles utilizando una columna de Superosa-12 en un sistema de FPLC.

En la figura 22 se aprecian los resultados de tal purificación.

El pico A corresponde a la cruzipaína y el pico B a la extensión C-terminal. Los picos C y D corresponden a los péptidos resultantes de la degradación del dominio catalítico.

La discrepancia existente entre el área de los picos A y B y las bandas de proteína teñidas por plata se debe a que las mediciones de proteína se hicieron a la absorbancia habitual de 280 nm.

La secuencia de uno de los dos clones genómicos de la cruzipaína (Campetella *et al.* 1992) muestra la existencia de un solo residuo triptofano (W) en la extensión C-terminal. El otro clon secuenciado, en tanto, carece por completo de residuos triptofano, al ser sustituido en éste por un residuo arginina (R).



Por el contrario, el dominio catalítico cuenta con 8 residuos triptofano.

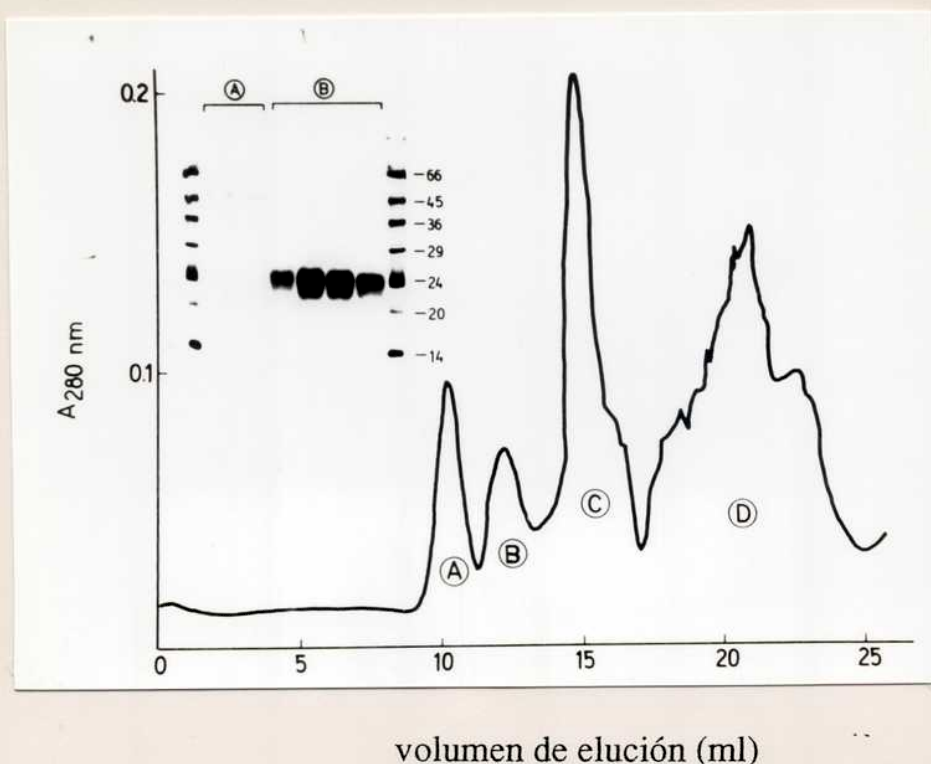
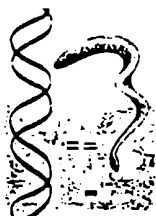


Figura 22: Purificación del fragmento C-terminal de la cruzipaina obtenido por autoproteólisis mediante filtración en geles en una columna Supersa 12.

Se aplicaron 0,5 mg de la mezcla de autoproteólisis y la cromatografía se efectuó según las condiciones especificadas en Materiales y Métodos.

Los picos A, B, C y D corresponden a la cruzipaina remanente del proceso de autoproteólisis, la extensión C-terminal purificada y péptidos provenientes del dominio catalítico, respectivamente.

El gel al 12,5% de acrilamida muestra a la cruzipaina remanente (A) y a la extensión C-terminal en estado sumamente puro (B). La tinción se efectuó con nitrato de plata.



Todas las muestras fueron desnaturalizadas a 100°C en presencia de DTT 0.1M pues, como hemos visto en la sección anterior, ambas condiciones son esenciales para visualizar a la extensión C-terminal en geles de poliacrilamida con SDS teñidos con nitrato de plata.

El fragmento C-terminal purificado se resolvió como una banda ancha, de mayor espesor en aquellas muestras correspondientes al centro del pico de proteína.

La extensión C-terminal tiene modificaciones post-traduccionales:

La microsecuenciación del extremo N-terminal de la extensión C-terminal purificada arrojó una única secuencia, idéntica a la informada en los experimentos iniciales de autoproteólisis (Hellman *et al.*, 1991).

Los 7 residuos de treonina presentes en esta parte de la secuencia evidenciaron estar modificados *in vivo*.

En la figura 23b se observa el cromatograma correspondiente al ciclo nº 14 de la secuencia. El PTH-derivado de treonina modificada, no identificado, apareció junto con niveles variables de PTH-treonina en las posiciones 5, 10, 11, 12, 13 y 14 del extremo N-terminal de la extensión C-terminal. En la posición nº 9, en cambio, no apareció pico alguno de PTH-aminoácido. Esto sugiere que habría dos tipos diferentes de modificación post-traducciona de las treoninas en esta zona de la proteína.

En la figura 23a se muestran los patrones de corrida de los PTH-aminoácidos standard.

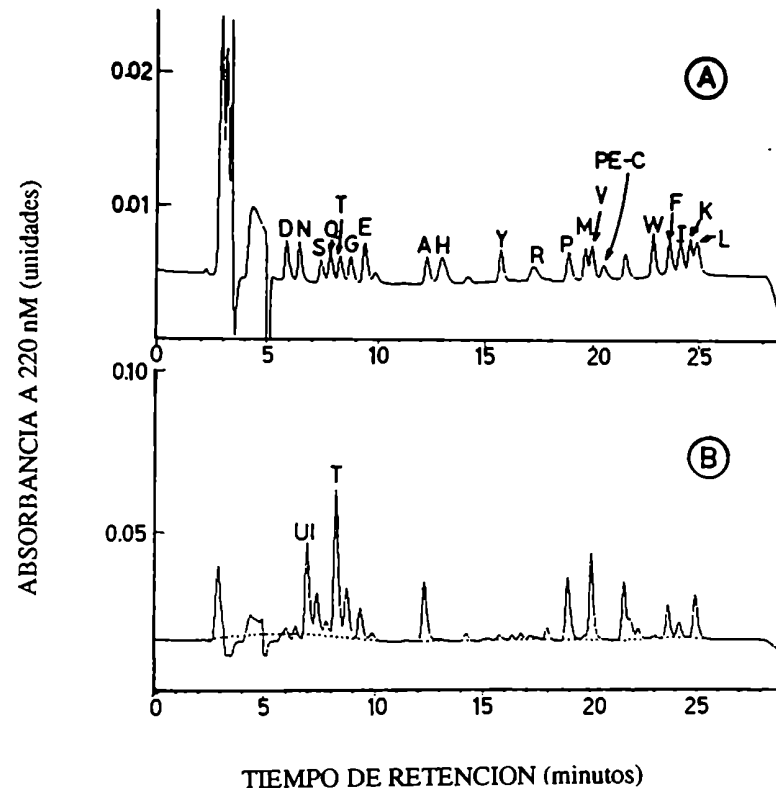
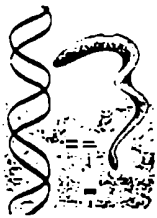
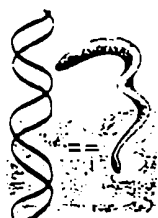


Figura 23: Presencia de una modificación post-traducciona no identificada en la extensión C-terminal.

a: patrones de derivados PTH de aminoácidos. PE-C corresponde a cisteína piridiletada.
b: ciclo nº 14 de la secuenciación del extremo N-terminal de la extensión C-terminal. El derivado no identificado se indica como UI.

¿Las treoninas están O-glicosiladas?

La posición relativa de los mencionados picos en el secuenciador resultó ser similar a la informada por Harris *et al.* (1992) para O-fucosil-Thr. Los ensayos de β -eliminación efectuados no lograron desenmascarar a las treoninas modificadas, y por ende hubo que descartar la existencia de tal modificación. De hecho, la β -eliminación resultó en un aumento diferente de la movilidad electroforética, así como en la aparición de una banda peptídica de bajo peso molecular aparente. Cuando dichas bandas fueron secuenciadas, se encontró que: a) el derivado de PTH no identificado estaba



aún presente y en la misma relación con respecto al derivado PTH-treonina que antes del tratamiento; b) el tratamiento de β -eliminación había fragmentado a la cadena polipeptídica. La banda de mayor peso molecular aparente generó una secuencia en la cual estaba ausente el dipéptido inicial GP, mientras que la banda de menor peso molecular aparente arrojó, principalmente, una secuencia interna de la extensión C-terminal.

¿Las treoninas están fosforiladas?

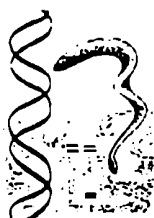
Sería posible que los residuos de treonina estuviesen fosforilados. Se crecieron entonces epimastigotes de la cepa Tul2 de *T. cruzi* en presencia de $^{32}\text{P}_i$, se inmunoprecipitó a la cruzipaína con el antisuero Rab2 y los inmunocomplejos se corrieron en un gel de poliacrilamida con SDS.

La ausencia de señal en la cruzipaína madura indicó que, de ser fosforilada *in vivo*, el proceso sería sólo de carácter transiente.

La extensión C-terminal está N-glicosilada:

Existe un sitio potencial de N-glicosilación en el residuo de asparragina nº 254 (numeración correspondiente a la enzima madura intacta) de la extensión C-terminal de la cruzipaína. Hemos demostrado que tal sitio está efectivamente N-glicosilado ya que la digestión por la endoglicosidasa H de la extensión C-terminal purificada produce una disminución en su movilidad electroforética.

El tratamiento con bromuro de cianógeno permite escindir a la cadena polipeptídica en la única metionina, situada en la posición nº 27 (numeración correspondiente al inicio del dominio C-terminal). El péptido remanente, de 108 aminoácidos, puede ser purificado en una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, transferido a una membrana de PVDF y secuenciado. La secuencia obtenida fue SCTDAACIVGCEXVT, lo cual indica que la asparragina nº 254 está modificada *in vivo*.



La extensión C-terminal tiene puentes disulfuro:

El fragmento C-terminal tiene 8 residuos de cisteína, todos ellos conservados si se compara la secuencia de la cruzipaína (Åslund *et al.*, 1990; Campetella *et al.*, 1992; Eakin *et al.*, 1992) con las enzimas correspondientes en *T. brucei* (Mottram *et al.*, 1989) y *T. rangeli* (Martínez *et al.*, enviado a publicación).

La figura 24 muestra que la mayor parte, si no todos los residuos de cisteína del fragmento C-terminal, forman puentes disulfuro.

El espectro control A muestra al fragmento C-terminal tratado con iodoacetamida 2,5mM, con el objeto de bloquear los residuos de cisteína libres.

En el espectro B, el fragmento C-terminal fue piridiletilado luego de un tratamiento muy suave con β -mercaptoetanol 1mM, similar al que se utiliza para activar a la cruzipaína en estudios cinéticos.

El espectro C se obtuvo después de un tratamiento con iodoacetamida 2,5mM, seguido de una completa reducción de los puentes disulfuro con DTT y por último un proceso de piridiletilación.

El tratamiento B solo mostró un leve incremento en la absorbancia a 254 nm sobre el control A, característico de la introducción del residuo piridilo. El tratamiento C, en cambio, resultó en la aparición de un pico prominente a dicha absorbancia, como consecuencia de la piridiletilación de los residuos de Cys-SH que formaban los puentes disulfuro reducidos por la adición del DTT.

No se pudieron identificar los residuos cisteína involucrados en estos puentes disulfuro debido a la resistencia que evidenció el fragmento C-terminal a la digestión con algunas enzimas proteolíticas que se utilizan comunmente para estos análisis: tripsina, *Achromobacter* protease I (LysC) y la proteasa V8 purificada de *Staphylococcus aureus* (GluC).

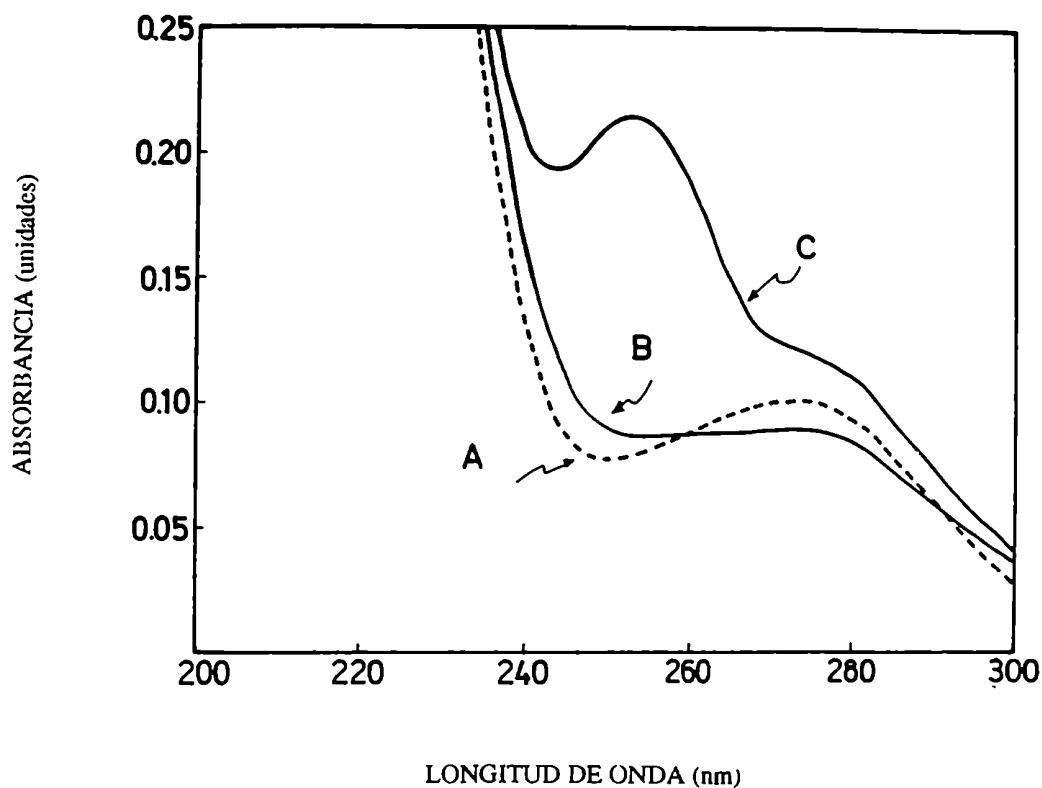
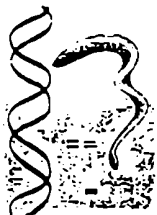
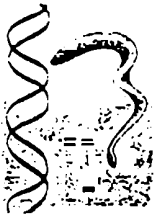


Figura 24: Espectros de la extensión C-terminal piridiletalada.

El fragmento fue sometido a dicho tratamiento antes (B) o después (C) de ser reducido con DTT $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$. A: control tratado con con $2,5 \text{ mM}$ iodoacetamida. La muestra C también fue tratada con iodoacetamida antes de la reducción.



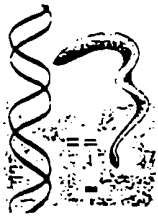
4- La extensión C-terminal y su influencia en las isoformas de la cruzipaína.

Las siguientes evidencias, acumuladas en los experimentos descriptos, apuntan a la existencia de isoformas de la cruzipaína en la cepa Tul2 de *T. cruzi*:

- 1) La banda ancha o doble banda que genera la enzima en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata, dependiendo de las condiciones electroforéticas utilizadas.
- 2) La banda ancha o doble banda que también genera el dominio C-terminal, obtenido por autoproteólisis, en geles de poliacrilamida con SDS o en ensayos de Western Blot con un anti-suero específico.
- 3) La considerable microheterogeneidad que presenta la cruzipaína cuando se la somete a una cromatografía de intercambio iónico en una columna MonoQ (Cazzulo *et al.*, 1989).
- 4) La banda ancha o doble banda de actividad que generan los extractos de epimastigotes de la cepa Tul2 en geles al 10% de acrilamida conteniendo fibrinógeno como sustrato (Campetella *et al.*, 1990).
- 5) Los experimentos de isoelectroenfoque con la cruzipaína madura, que muestran numerosas bandas en el rango 4,7 a 5,4 de punto isoelectrico (Malchiodi *et al.*, 1993).

Los experimentos que se detallan a continuación tienen como objetivo la detección de polimorfismos en la extensión C-terminal de la cruzipaína, posiblemente responsables de las isoformas que se detectan en los ensayos electroforéticos y cromatográficos.

Campetella *et al.* (1992) habían secuenciado por completo dos clones provenientes de ADN genómico de la cepa Tul2 detectando algunas sustituciones de nucleótidos resultantes en cambios en la secuencia aminoacídica. La mayoría de dichas sustituciones se agruparon en la



extensión C-terminal de la enzima, como puede observarse en la figura 8 (clones cruzip-2 y cruzip-4).

En base a estos resultados se emprendió un análisis detallado de la porción del gen de la cruzipaína codificante de la extensión C-terminal, teniendo en cuenta que algunas de las evidencias bioquímicas provienen específicamente de ese dominio de la cisteín proteinasa.

Transcripción reversa y PCR:

Se preparó ARN total de epimastigotes de la cepa Tul2 y se sintetizó una cadena de cADN, tal como se describe en la sección "Materiales y Métodos".

El paso siguiente consistió en amplificar mediante PCR la extensión C-terminal de la cruzipaína.

A partir de ahora llamaremos a esta amplificación PCR_A.

Los oligonucleótidos utilizados en este experimento fueron diseñados en base a las secuencias de ADN genómico obtenidas por Campetella *et al.*, (1992):

CTa: 5' TGCCTTGTCAAGGAGGAGGCGAGC 3'

CTb: 5' CCATAAGCTTCAGCATCAGAAACAAAGAGTGCCC 3'

En la figura 25 se observa que CTa se une río arriba del inicio de la extensión C-terminal, es decir, en el final del dominio catalítico; mientras que CTb lo hace en la región 3' no codificante, río abajo del codón de terminación de la cruzipaína.

Para esta amplificación se utilizaron 30 ciclos de 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 55°C y 2 minutos a 72°C, seguidos de una extensión final de 7 minutos a 72°C.

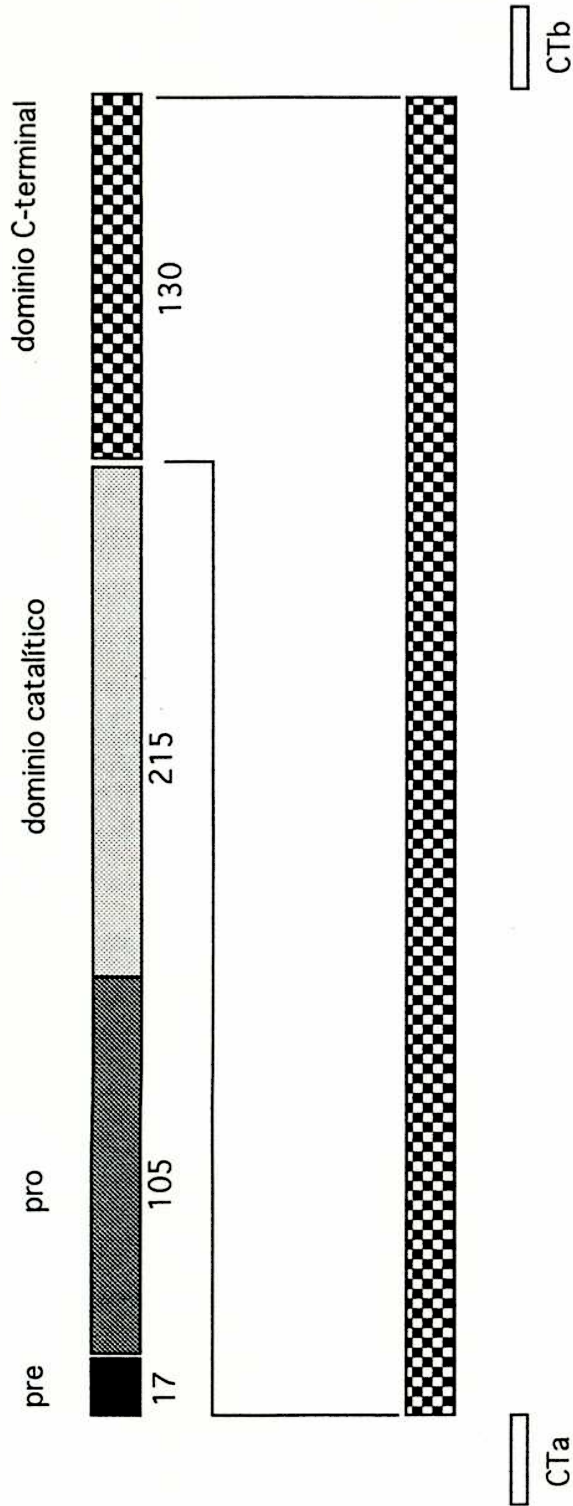
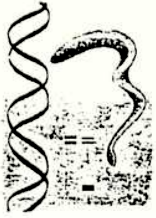
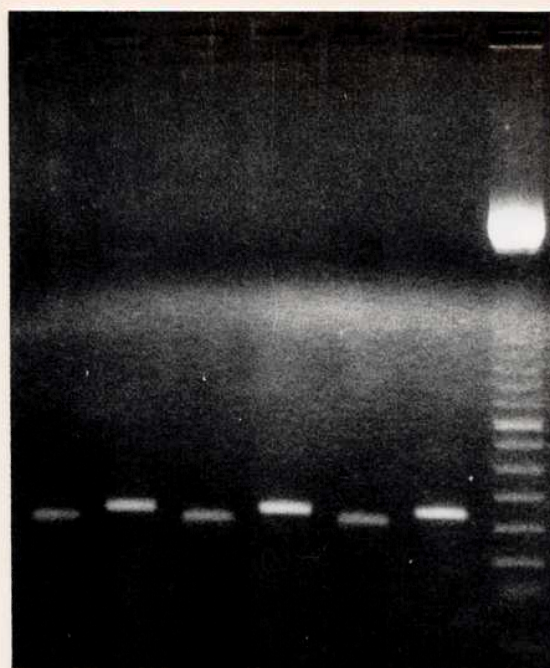


Figura 25: Esquema del gen de la cruzipaina. Se detallan los dominios Pre, Pro, Catalítico y C-terminal. Los oligonucleótidos CTa y CTb, graficados fuera de escala, se utilizaron para amplificar el dominio C-terminal de la cruzipaina. Como sustrato se utilizó cADN preparado a partir de ARN total de epimastigotes de la cepa Tul2 de T. cruzi. La secuencia de los oligonucleótidos se detalla en el texto.



En la calle 4 de la figura 26 se observa la amplificación específica de un fragmento de aproximadamente 450 pb.



1 2 3 4 5 6 7

Figura 26: Electroforesis en un gel de agarosa 1,5%.

Se observan los productos de PCR de 450 pb. obtenidos por la amplificación de la extensión C-terminal de la cruzipaina con los oligos CTa y CTb.

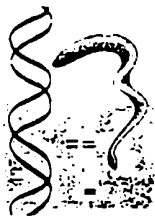
Calle 2: amplificación a partir de ADN genómico de la cepa Tul2 de *T. cruzi*.

Calles 4 y 6: PCR_A y PCR_B a partir de ADN copia de epimastigotes de la cepa Tul2 de *T. cruzi*.

Calle 7: escalera de bandas de 100 pb. Aparece más intensa la banda de 800 pb (-).

Las calles 1, 3 y 5 corresponden a controles de la amplificación efectuados con otros oligonucleótidos sobre los mismos sustratos.

El fragmento obtenido fue ligado con un vector T y luego transformado en bacterias *E. coli* competentes.



Una vez obtenidos los transformantes se seleccionaron las bacterias portadoras del plásmido conteniendo el fragmento amplificado mediante una reacción de PCR sobre cada colonia ("colony PCR"), con los mismos oligonucleótidos utilizados en la amplificación original. En este caso la temperatura elegida para la unión de los oligonucleótidos al templado fue de 60°C, para evitar la aparición de bandas inespecíficas que pudiesen interferir con los experimentos futuros.

Se seleccionaron de esta manera 36 clones positivos de la PCR_A, suponiendo que en tal muestra deberíamos encontrar una porción sustancial de los polimorfismos presentes en los 130 genes codificantes de la cruzipaína que posee la cepa Tul2.

Detección de polimorfismos con enzimas de restricción:

Como un primer método de análisis se eligieron 4 enzimas de restricción en base a los sitios de corte presentes en la secuencia publicada y a las secuencias blanco de cada enzima (figura 27).

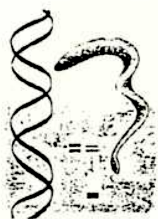
La enzima de restricción Msp I (C*CGG) distinguió 4 clases de genes, a los cuales hemos denominado A, B, C y D.

La endonucleasa BstU I (CG*CG) distinguió 3 tipos de genes, X, Y y Z.

La utilización de la endonucleasa Sau96 I (G*GNCC) resultó en la detección de un solo clon distinto a los demás, mientras que Dde I (C*TNAG) no permitió detectar diferencia alguna.

En la figura 28a se pueden apreciar los patrones de restricción generados por Msp I y BstU I sobre clones de la PCR_A.

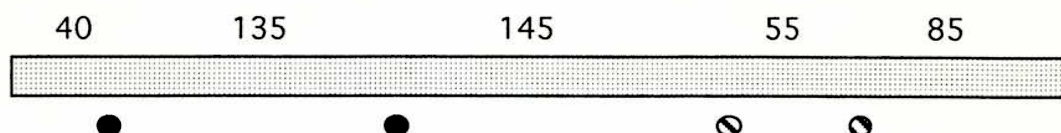
La figura 28b es una representación gráfica de los resultados mostrados en la figura 28a. En este caso se toman en cuenta sólo los patrones de bandas producidos por Msp I y BstU I.



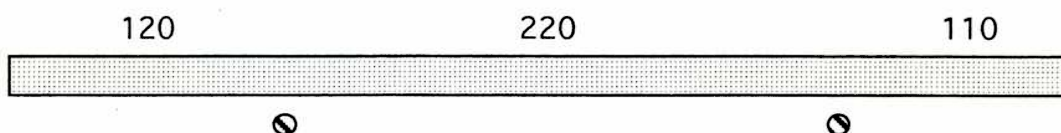
Resultados

140

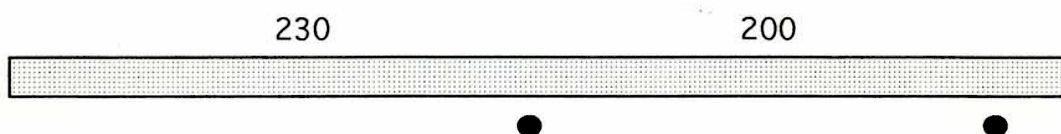
Msp I



BstU I



Dde I



Sau 96 I



Figura 27: Mapa de restricción de la extensión C-terminal a partir de la secuencia publicada por Campetella *et al.*, (1992).

Se detallan los sitios de corte para las enzimas de restricción Msp I, BstU I, Dde I y Sau96 I, junto con la longitud, en pares de bases, de cada fragmento.

Los círculos rayados corresponden a los sitios polimórficos.

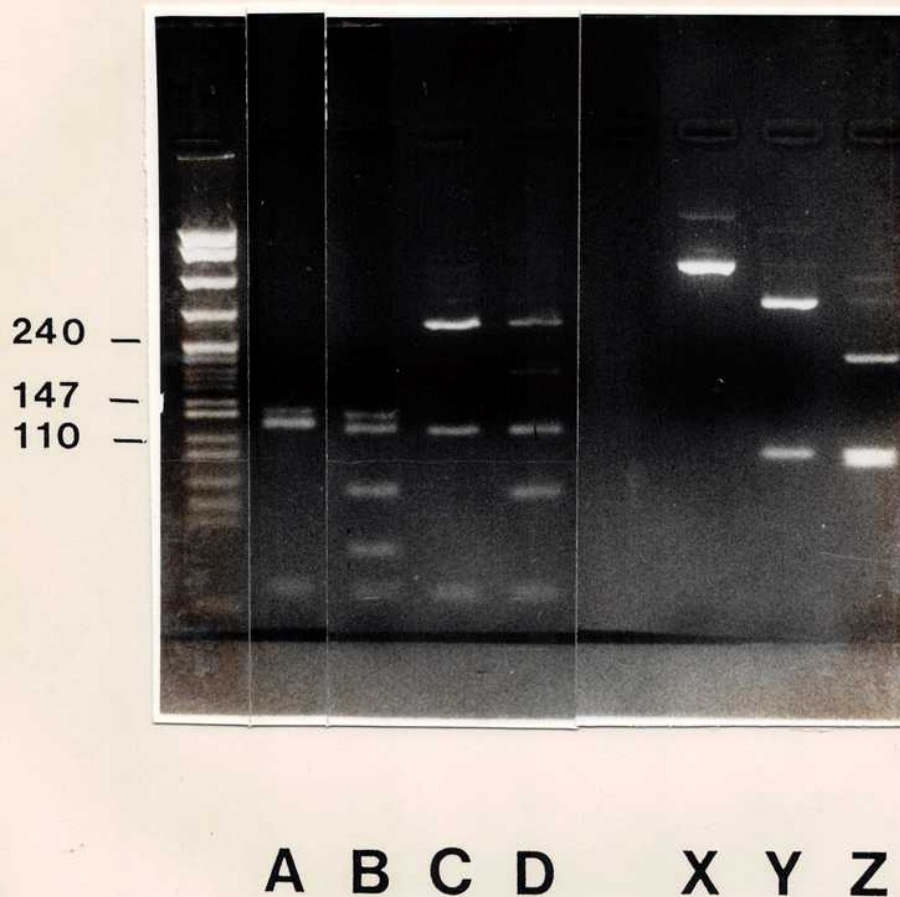
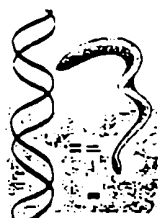


Figura 28a: Se observa el patrón de restricción generado por las enzimas de restricción Msp I y BstU I sobre clones obtenidos a partir de la PCR_A. Se utilizó un gel de agarosa al 4%.



Resultados

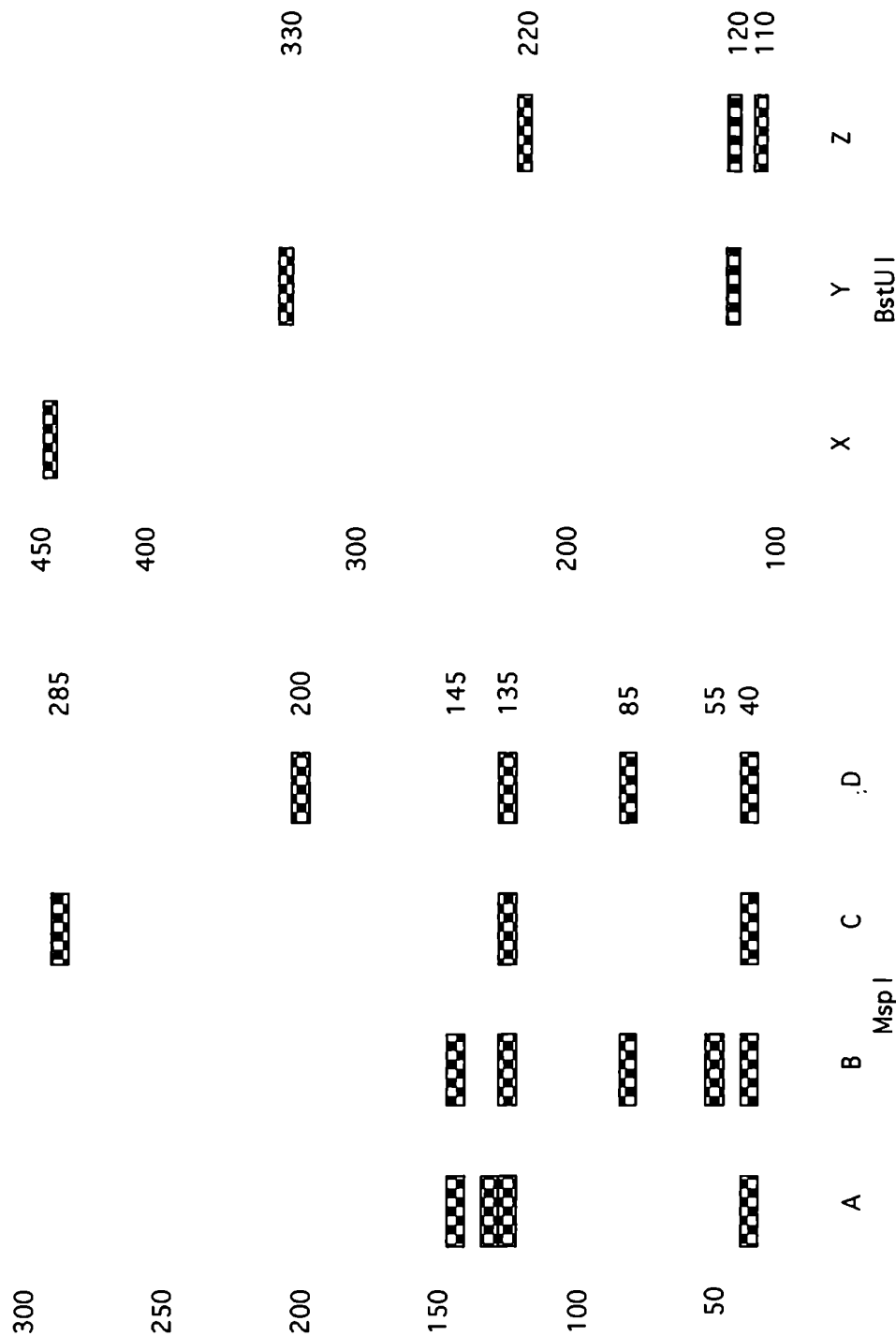
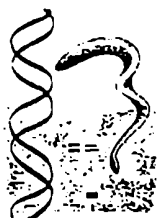


Figura 28b: El esquema intenta resumir los distintos patrones de bandas producidos por las mencionadas endonucleasas. La enzima de restricción Msp I identificó 4 grupos (A, B, C y D), mientras que la endonucleasa BstU I permitió distinguir 3 grupos (X, Y y Z).



La Taq polimerasa introduce nucleótidos equivocados:

Es sabido que la Taq polimerasa suele introducir nucleótidos erróneos en la reacción de PCR, pues carece de una actividad correctora 3'-5'. Se estima que la tasa de incorporación fallida es del orden de 1 cada 500 o 1000 nucleótidos.

Para salvar este inconveniente se repitió el experimento anterior. Se clonó el fragmento de ADN (figura 26, calle 6) codificante de la extensión C-terminal, obtenido en una nueva amplificación (PCR_B) a partir de un cADN.

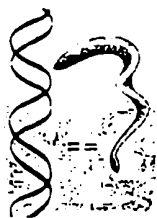
Debido a que los errores son azarosos, no deberían ser los mismos en amplificaciones independientes. En otras palabras, sería poco probable que una sustitución que aparece en ambas PCRs se deba a un error cometido por la enzima.

En el análisis de la PCR_B se utilizaron solamente las endonucleasas Msp I y BstU I, pues Dde I y Sau96 I no habían detectado polimorfismos.

A diferencia de lo ocurrido en la PCR_A, al utilizar la endonucleasa Msp I aumentó el número de miembros del grupo C en detrimento del grupo D. Mientras tanto, las cifras obtenidas con la endonucleasa BstU I fueron similares a las del primer experimento.

Se realizó por último un tercer experimento de amplificación, clonado y análisis de restricción con Msp I y BstU I sobre clones amplificados a partir de ADN genómico de la cepa Tul2 de *T. cruzi*.

El objetivo de este ensayo fue comparar el patrón de restricción de clones genómicos con el obtenido a partir de cADN, en busca de una eventual expresión diferencial de algunos genes de la cruzipaina. Por otro lado serviría como confirmación de los patrones de restricción obtenidos sobre clones de cADN.



Resultados

144

En la tabla 4 se resumen los resultados del análisis de restricción sobre los clones de las PCR_A y PCR_B, y de aquellos provenientes de la amplificación sobre ADN genómico.

	A	B	C	D	X	Y	Z
PCR _A	13	7	8	8	1	32	3
PCR _B	10	9	15	1	6	25	4
ADN genómico	10	8	16	2	8	25	3

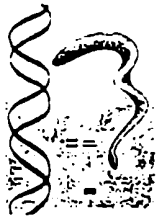
Tabla 4: Grupos y número de miembros de cada grupo generados por las endonucleasas de restricción Msp I y BstU I sobre 36 clones provenientes de la amplificación de la extensión C-terminal utilizando como sustrato cADN (PCR_A y PCR_B) y ADN genómico.

La secuenciación detectó más polimorfismos:

Finalizado el análisis con enzimas de restricción se secuenciaron 17 clones de la PCR_A y la misma cantidad de la PCR_B con el secuenciador automático ABI373.

Los clones se eligieron al azar y en forma proporcional a los grupos detectados en los ensayos con enzimas de restricción.

El análisis de las 17 secuencias provenientes de la PCR_A reveló 20 posiciones en las que se registraron cambios de nucleótidos, de los cuales 10 generaron cambios en la secuencia de la extensión C-terminal.



Por su parte, en las 17 secuencias provenientes de la PCR_B aparecieron 18 cambios, de los cuales 9 produjeron alteraciones en la secuencia proteica.

En la tabla 5 se resume la información aportada por las 34 secuencias de ADN, señalando todas las sustituciones, tanto las silenciosas como las que se traducen en cambios de la secuencia aminoacídica (números en negrita).

Secuenciados 34 clones, 24 de las 38 sustituciones nucleotídicas fueron comunes a ambas amplificaciones.

Si sólo consideramos los cambios de aminoácidos, vemos que 6 de ellos fueron detectados en uno o más clones de ambas PCR.

La misma situación se generó con las sustituciones silenciosas, ya que también 6 de ellas fueron detectadas en las PCRs A y B.

De acuerdo a lo señalado anteriormente, estas 12 sustituciones compartidas serían auténticas, y no un producto de errores cometidos por la Taq polimerasa en las amplificaciones originales.

Las endonucleasas Msp I y BstU I detectaron 2 de los 6 cambios que llevan a sustituciones de aminoácidos. El polimorfismo revelado por Msp I en la posición nº 292, causante de la sustitución de arginina (grupos A y B) por triptofano (grupos C y D), apareció en el 45 % de los clones estudiados. El detectado por BstU I en la posición nº 322, que sustituye una cisteína (grupos X e Y) por una arginina (grupo Z), se detectó en sólo el 10 % de los clones.



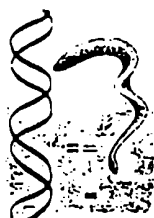


Tabla 5: Análisis de las 17 secuencias de los clones seleccionados de la PCR_A y de las 17 secuencias de los clones seleccionados de la PCR_B.

En la fila superior se indican las posiciones en las cuales se producen las sustituciones en la extensión C-terminal.

La posición n°16 corresponde al primer nucleótido de la extensión C-terminal, ya que el oligonucleótido utilizado en la amplificación fue diseñado río arriba de su inicio.

En negrita figuran las posiciones en las cuales se producen sustituciones que generan cambios en la secuencia proteica.

En la primera columna se indica el nombre de los clones analizados. Ax son los clones provenientes de la PCR_A y Bx son los clones provenientes de la PCR_B.

Los asteriscos (*) indican las posiciones en las que se observaron sustituciones nucleotídicas.

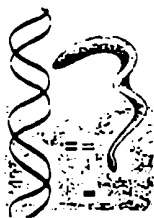
Los signos + y - indican la presencia o ausencia, respectivamente, de los sitios de corte para las enzimas de restricción Msp I (posiciones n° 292 y 345) y BstU I (posiciones n° 111 y 322).

¿Cuántas isoformas tiene la extensión C-terminal?

Finalmente, y basándose en los datos de la tabla 5, se agruparon los clones de ambas PCRs que compartían las mismas sustituciones de aminoácidos, ya sean una, dos o más. De este proceso surgieron 13 grupos con distinto número de miembros cada uno.

En la figura 29 se detallan las secuencias aminoacídicas de los 13 grupos de clones y el número de miembros de cada uno.

Para este análisis se tomaron en cuenta sólo 30 clones, si bien se secuenciaron 34. La selección previa fue azarosa y proporcional; sin embargo se eligieron todos los clones de tipo Z, identificados por la enzima de restricción BstU I, pues la sustitución de arginina (R) por una cisteína (C) dejaría a la extensión C-terminal con sólo 7 residuos cisteína. Pero como el estudio es de tipo cuantitativo y proporcional, se decidió eliminar del análisis a 4 de aquellos clones.



De los 13 grupos, 5 (Ct 1-2-3-6-10) están constituidos por clones pertenecientes a ambas PCRs, sumando 22 de los 30 clones secuenciados, es decir, un 75%.

Se utilizó el programa PepSort para calcular el punto isoeléctrico teórico de las isoformas que codifican esos 13 grupos de genes.

En la figura 29 se presentan los valores, destacando los correspondientes a los 5 grupos mencionados.

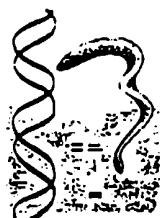
Figura 29: Agrupación de los clones de ambas amplificaciones cuyas sustituciones, generadoras de cambios en la secuencia aminoacídica, hayan sido las mismas.

Se obtuvieron 13 grupos de clones, Ct-1 a Ct-13.

En negrita se señalan los aminoácidos sustituidos.

Los grupos Ct-1, Ct-2, Ct-3, Ct-6 y Ct-10 están compuestos por clones provenientes de las dos amplificaciones.

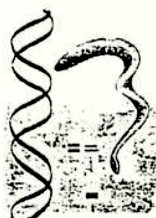
Se detallan, además, los puntos isoeléctricos deducidos de la secuencia aminoacídica de los 13 grupos de clones de la extensión C-terminal y, en negrita, los correspondientes a los grupos Ct-1, Ct-2, Ct-3, Ct-6 y Ct-10.



Resultados

149

	1				45
Ct1	SAVVGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct2	SAVVGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct3	SAVVGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct10	SAVVGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct6	SAVVGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct4	SAVVGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct5	SAVVGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct7	SAVVGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct8	SAVVGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct9	SAVVGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct11	SAVVGPGAT	PEPTTTTTTS	APGPSYFV	QMSCTDAACS	VGCENVTLPT
Ct12	SAVVGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct13	SAVVGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
	46				95
Ct1	GQCLLTSGV	SAIVTCGAET	LTEEVFFTST	HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct2	GQCLLTSGV	SAIVTCGAET	LTEEVFFTST	HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct3	GQCLLTSGV	SAIVTCGAET	LTEEVFFTST	HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct10	GQCLLTSGV	SAIVTCGAET	LTEEVFLTST	HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct6	GQCLLTSGV	SAIVTCGAET	LTEEVFFTST	HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct4	GQCLLTSGV	SAIVTCGAET	LTEEVFFTST	HCSGPSVRSS	VPLNQCNRPL
Ct5	GQCLLTSGV	SAIVTCGAET	LTEEVFFTST	HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct7	GQCLLTSGV	SAIVTCGAET	LTEEVFFTST	HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct8	GQCLLTSGV	SAIVTCGAET	LTEEVFLTST	HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct9	GQCLLTSGV	SAIVTCGAET	LTEEVFFTST	HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct11	GQCLLTSGV	SAIVTCGAET	LTEEVFLTST	HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct12	GQCLLTSGV	SAIVTCGAET	LTEEVFFTST	HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct13	GQCLLTSGV	SAIVTCGAET	LTEEVFFTST	HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
	96		130		pI
Ct1	RGSVEFFCGS	SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS	RHRRL*	8 clones 7,50
Ct2	RGSVEFFCGS	SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS	RHRRL*	7 clones 7,05
Ct3	RGSVEFFRGS	SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS	RHRRL*	3 clones 7,87
Ct10	RGSVEFFCGS	SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS	RHRRL*	2 clones 7,83
Ct6	RGSVEFFRGS	SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS	RHRRL*	2 clones 7,56
Ct4	RGSVEFFCGS	SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS	RHRRL*	1 clon 7,50
Ct5	RGSVEFFCGS	SSSGRLADVD	RQCRYQPYQS	RHRRL*	1 clon 6,43
Ct7	RGSVEFFCGS	SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS	RHRRL*	1 clon 7,05
Ct8	RGSVEFFCGS	SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS	RHRRL*	1 clon 7,81
Ct9	RGSVEFFCGS	SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS	RHRRL*	1 clon 7,22
Ct11	RGSVEFFRGS	SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS	RHRRL*	1 clon 8,12
Ct12	RGSVEFFCGS	SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS	RHRRL*	1 clon 7,81
Ct13	RGSVEFFCGS	SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS	RHRRL*	1 clon 7,05



5- Polimorfismos en el dominio catalítico de la cruzipaína.

Las sustituciones de aminoácidos detectadas en la extensión C-terminal podrían ser una fuente de isoformas de la cruzipaína.

Un estudio similar al presentado en la sección anterior, pero sobre el dominio catalítico de la cruzipaína, indicaría si tal dominio también presenta polimorfismos que originan variaciones en la secuencia aminoacídica de la enzima.

Con tal fin fue preciso amplificar genes completos de la cruzipaína.

Como se indica en la figura 30, el oligonucleótido diseñado sobre el extremo 3' del gen fue el mismo que se utilizó para amplificar a la extensión C-terminal (CTb). Para el extremo 5' se diseñó un nuevo oligonucleótido, denominado "PreCru", por hallarse en el inicio mismo de la región pre de la cruzipaína.

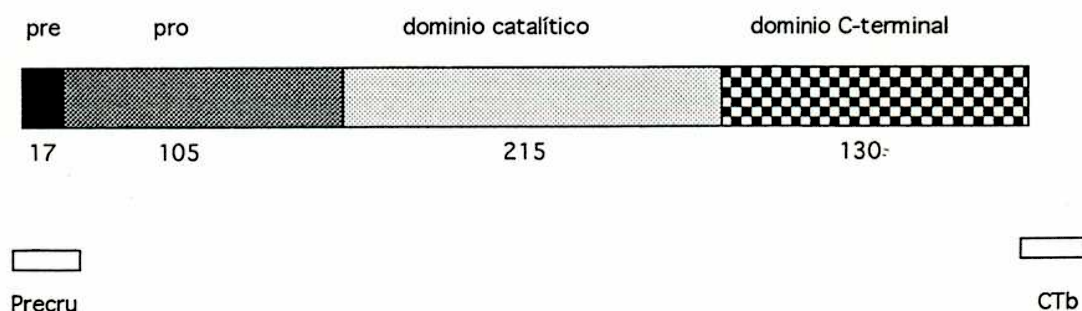
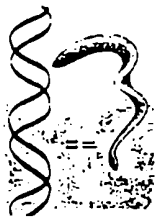


Figura 30: Esquema del gen de la cruzipaína.

Se detallan los dominios Pre, Pro, Catalítico y C-terminal. Los oligonucleótidos PreCru y CTb, graficados fuera de escala, se utilizaron para amplificar el gen completo de la cruzipaína. Como sustrato se utilizó cADN preparado a partir de ARN total de epimastigotes de la cepa Tul2 de *T. cruzi*.

La secuencia de los oligonucleótidos se detalla en el texto.



PreCru: 5' TGAGGATCCATGTCTGGCTGGGCGCGTGCGCTG 3'
CTb: 5' CCATAAGCTTCAGCATCAGAAACAAAGAGTGCCC 3'

Para esta amplificación se utilizaron 30 ciclos de 1,5 minutos a 94°C, 1,5 minutos a 60°C y 2,5 minutos a 72°C, seguidos de una extensión final de 7 minutos a 72°C, obteniéndose un fragmento de 1400 pb. que luego de ser purificado se clonó en el vector T.

El elevado número de copias del gen de la cruzipaína en la cepa Tul2 -130- hizo necesario contar con una cantidad representativa de clones para realizar un mapeo con enzimas de restricción similar al efectuado sobre la extensión C-terminal.

Así, se obtuvieron más de 50 clones del gen completo de la cruzipaína.

Un mapeo con enzimas de restricción:

Los fragmentos de 1400 pb. fueron digeridos con varias endonucleasas. En primer término se escogieron aquellas utilizadas para la detección de polimorfismos en la extensión C-terminal. Los 4 grupos identificados por Msp I (A, B, C y D) y los 3 grupos detectados por BstU I (X, Y y Z) deberían detectarse también en el gen completo.

En la figura 31a se observa el patrón de restricción generado por Msp I sobre clones de cruzipaína de la cepa Tul2.

En la figura 31b se grafica el patrón de restricción generado por Msp I sobre los 53 clones de cruzipaína de la cepa Tul2.

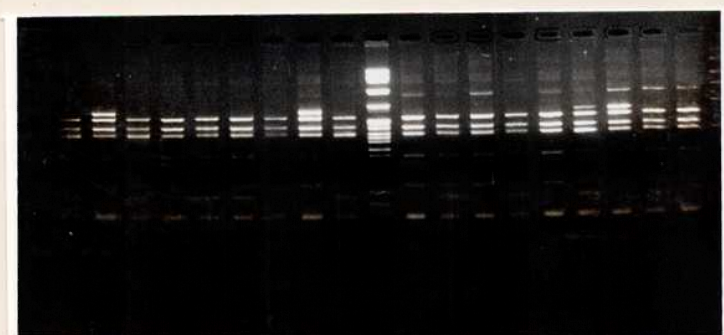
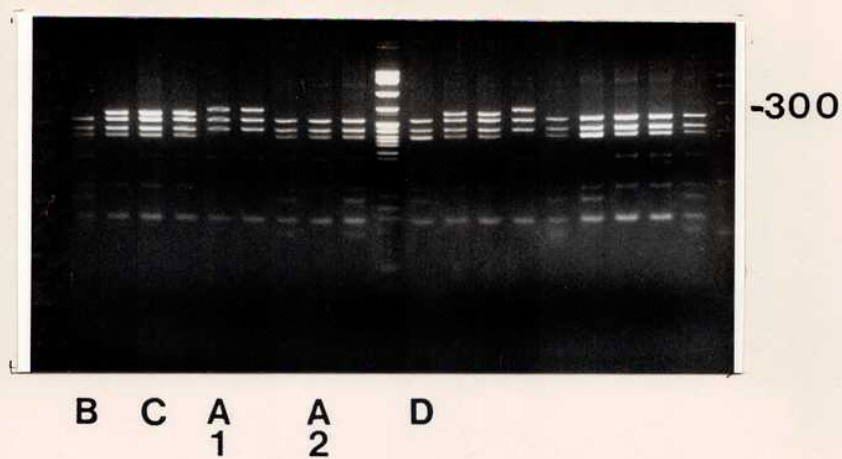


Figura 31a: Patrón de restricción generado por Msp I sobre clones del gen completo de la cruzipaina de la cepa Tul2.
Se utilizó un gel de agarosa al 4%.

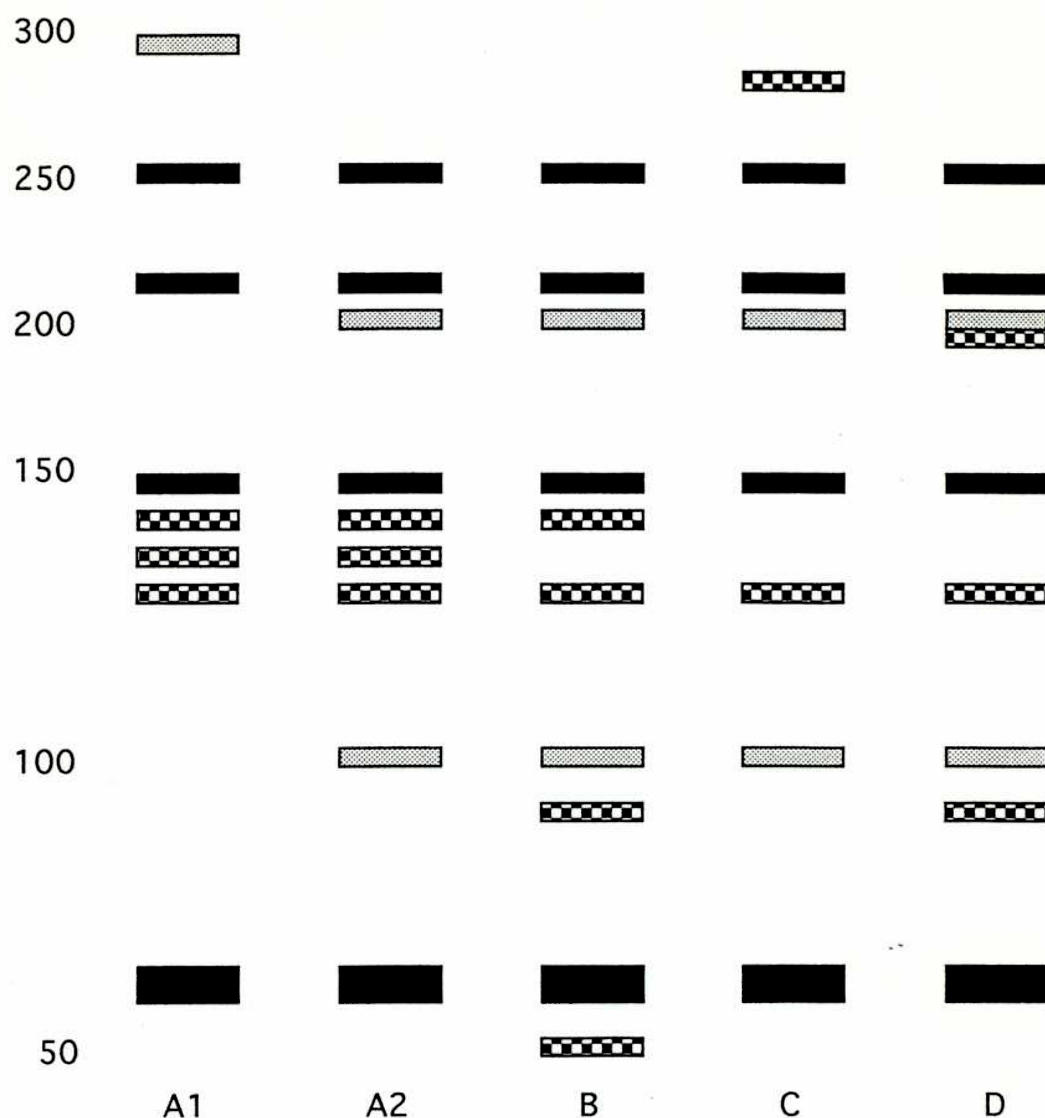
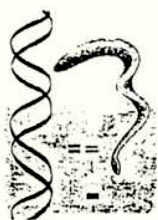


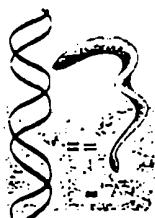
Figura 31b: El esquema intenta resumir los distintos patrones producidos por la enzima de restricción Msp I.

La enzima de restricción Msp I confirmó los 4 grupos (A, B, C y D) identificados en la extensión C-terminal, y permitió distinguir a los subgrupos A1 y A2.

Las bandas cuadriculadas corresponden a fragmentos de la extensión C-terminal.

Las bandas negras no varían entre los grupos.

Las bandas punteadas permiten diferenciar al grupo A1 de los restantes grupos.



Resultados

154

A continuación se detallan las frecuencias obtenidas sobre los 53 clones analizados.

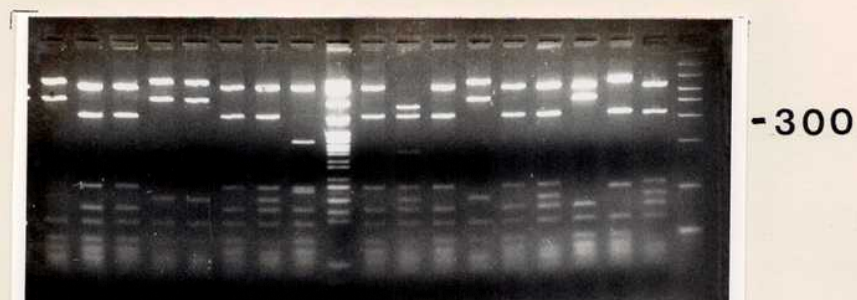
Grupo	Número de clones
A1	7
A2	16
B	10
C	11
D	9

Se detectaron dos clases de genes pertenecientes al grupo A: A1 y A2. El subgrupo A1 carece del sitio de restricción para Msp I que está presente en los grupos A2, B, C y D.

Tal sustitución nucleotídica no afecta a la secuencia de aminoácidos de la cruzipaína.

En la figura 32a se observa el patrón de restricción generado por BstU I sobre clones de cruzipaína de la cepa Tul 2.

En la figura 32b se grafica el patrón de restricción generado por BstU I sobre los 53 clones de cruzipaína de la cepa Tul2.



X
3

X Y Y Z
2 1 2 1

X
1



Z
2

Z
1

Figura 32a: Patrón de restricción generado por BstU I sobre clones correspondientes al gen completo de la cruzipaina de la cepa Tul2. Se utilizó un gel de agarosa al 4%.

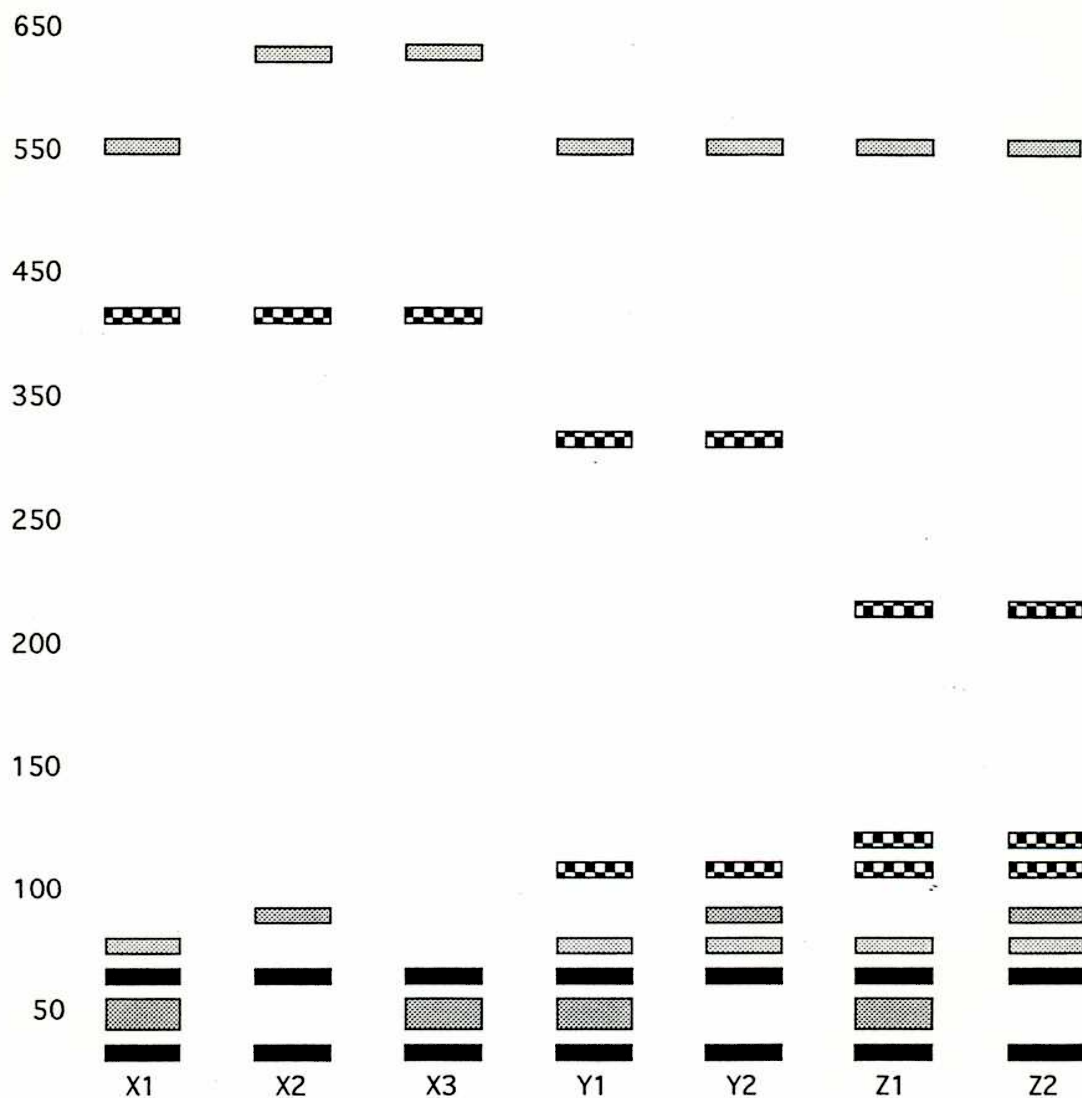
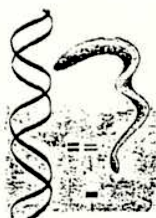


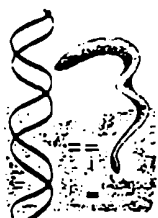
Figura 32b: El esquema intenta resumir los distintos patrones producidos por la enzima de restricción BstU I.

La enzima de restricción BstU I confirmó los 3 grupos (X, Y y Z) identificados en la extensión C-terminal, y permitió distinguir a los subgrupos X1, X2, X3, Y1, Y2, Z1, Z2.

Las bandas cuadrículadas corresponden a fragmentos de la extensión C-terminal.

Las bandas negras no varían entre los grupos.

Las bandas punteadas permiten diferenciar a los distintos grupos.



En la tabla que sigue se detallan las frecuencias obtenidas.

Grupos	Número de clones
X1	2
X2	6
X3	4
Y1	24
Y2	14
Z1	2
Z2	2

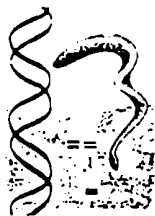
BstU I también identificó nuevos subgrupos, X1, X2 y X3, que son el producto de cambios nucleotídicos en dos posiciones, uno en la región Pro de la cruzipaína y otro en su dominio catalítico.

Los subgrupos Y1, Y2, Z1 y Z2 sólo se diferenciaron por la presencia o la ausencia del sitio de restricción en la pro-enzima, que no provoca ningún cambio en la secuencia aminoacídica.

El cambio de aminoácido en el dominio catalítico, ubicado a 30 aminoácidos de distancia del inicio de la extensión C-terminal (posición nº 308 de la pre-pro-enzima), se detectó en los siguientes subgrupos:

X1 Y1 Y2 Z1 Z2:	W T A Q W	(44 clones)
X2 X3:	W T T Q W	(10 clones)

Recordemos que los grupos A, B, C, D, X, Y y Z fueron establecidos mediante el análisis de la extensión C-terminal, y que los subgrupos surgieron del análisis del dominio catalítico de la cruzipaína.



Comparando los polimorfismos hallados en los dos dominios de la cruzipaína:

Efectuando un análisis similar al de la extensión C-terminal, los grupos A y B, que sumaron 33 clones, tienen un residuo arginina en la posición nº 93 de la extensión C-terminal y constituyen el 62% de los clones analizados.

Los grupos C y D (20 clones) tienen triptofano en dicha posición y conforman el 38% restante.

Cuando se efectuó el análisis de la extensión C-terminal los grupos A y B mostraron una frecuencia del 55%, y los grupos C y D del 45%.

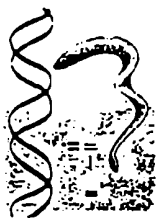
Los grupos X e Y sumaron 50 clones, codifican cisteína en la posición nº 103 de la extensión C-terminal y constituyen el 92,5% de los clones analizados. El grupo Z estuvo conformado por solo 4 clones, que codifican una arginina en esa posición y forman el 7,5% restante.

El análisis de la extensión C-terminal mostró que un 90% de los clones contenían cisteína y un 10% arginina.

Los valores obtenidos independientemente para la extensión C-terminal y el gen completo de la cruzipaína son comparables y demuestran que los polimorfismos detectados son auténticos.

Se extiende el análisis con enzimas de restricción:

Se eligieron otras enzimas de restricción para ampliar el análisis comenzado con Msp I y BstU I. Para ello se tuvo en cuenta el número de sitios de corte en el dominio catalítico de la enzima, tomando como referencia a los genes cruzip-2 y cruzip-4 (figura 7) secuenciados por Campetella *et al.*, (1992).



Debido a que la detección de polimorfismos con esta estrategia se limita a determinadas porciones del gen, es recomendable abarcar el mayor número de nucleótidos con cada enzima de restricción. La obvia desventaja de este procedimiento es que el alto número de bandas complica el análisis de los geles, en particular si los fragmentos son pequeños. Por ello se recurrió a geles de alto porcentaje de agarosa que permitieron resolver fragmentos de hasta 10 pb. de diferencia.

En la figura 33 se grafican las enzimas a utilizar y los sitios de restricción esperados.

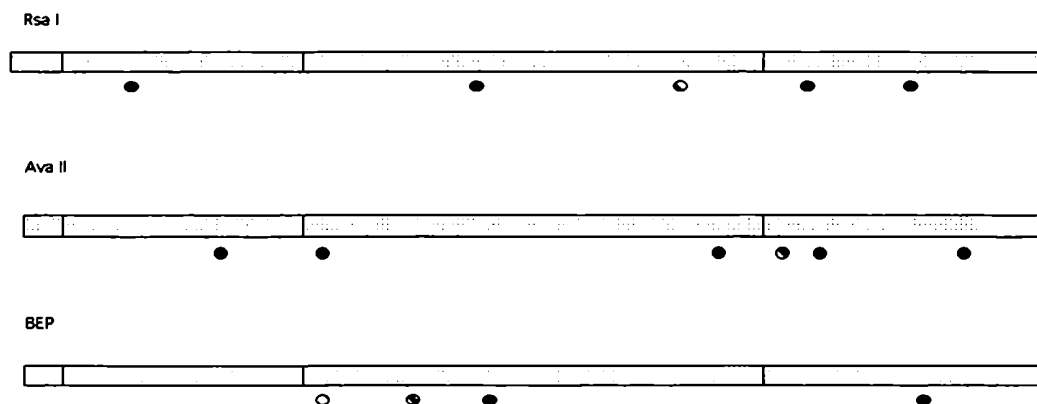
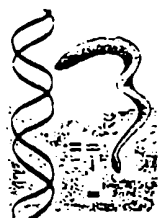


Figura 33: Mapa de restricción del gen de la cruzipaína a partir de la secuencia publicada por Campetella *et al.*, (1992).

Se detallan los sitios de corte para las enzimas de restricción Ava II, Rsa I y la combinación de Bgl I, EcoR V y Pst I (BEP).

Los círculos rayados corresponden a sitios polimórficos.



La endonucleasa Ava II (G*GA/TCC) detectó la existencia de dos clases de genes, una de ellas netamente mayoritaria, correspondiéndole 32 de los 34 clones analizados. La clase minoritaria, 2 clones, carece de un sitio de restricción que genera la sustitución de alanina por prolina en la posición nº 4 de la extensión C-terminal (nº 341 de la pre-pro-enzima).

32 clones:	G P G P T P E
2 clones:	G P G A T P E

Si bien minoritario, este cambio de aminoácido es importante, ya que reside en una región muy conservada de la cruzipaína: la "bisagra" que separa al dominio catalítico de la extensión C-terminal, compuesta de glicinas y prolinas y seis treoninas modificadas post-traduccionalmente.

La enzima de restricción Rsa I (GT*AC) generó una situación semejante a la de Ava II, pues detectó también dos tipos de genes, diferenciándose en la posición nº 299 de la pre-pro-enzima.

35 clones:	A V P Y W I I
3 clones:	A V P H W I I

Por último se utilizó la siguiente combinación de enzimas de restricción: Bgl I (GCCNNNN*NGGC) + EcoR V (GAT*ATC) + Pst I (CTGCA*G), a la que llamaremos "BEP". En este caso se detectó la existencia de 3 clases de genes, producto de un sitio polimórfico para las enzimas Bgl I y Pst I. La sustitución que destruye el sitio Bgl I no genera cambios en la secuencia de la proteína; si lo hace, en cambio, el polimorfismo para Pst I, que genera la sustitución de serina por glicina en la posición nº 186.

31 clones:	S G C G G G L
7 clones:	S G C S G G L



Los resultados volcados en esta sección demuestran que la cruzipaína de la cepa Tul2 de *T. cruzi* es polimórfica no solo en su extensión C-terminal, sino también en su dominio catalítico.

Es importante destacar, además, que se ha recurrido a la secuenciación sólo para investigar la naturaleza de los polimorfismos detectados con las enzimas de restricción. Por lo tanto los resultados son más limitados que los obtenidos con la extensión C-terminal, en cuyo caso la secuenciación completa de los clones seleccionados permitió detectar nuevos polimorfismos no observados a través del mapeo de restricción.

6- Expresión de la cruzipaína en los distintos estadios y cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Los experimentos descriptos hasta ahora fueron realizados con cruzipaína purificada y con genes codificantes de la cruzipaína provenientes de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tul2.

Los resultados obtenidos indican que la cruzipaína es en realidad un complejo conjunto de isoformas. Cabe preguntarnos, entonces, si este fenómeno es exclusivo de la cepa Tul2 u ocurre también en otras cepas y clones de *T. cruzi*. Y tanto o más importante, si existe algún tipo de cambio cualitativo en la expresión de los genes que codifican a la cisteín proteinasa a través del ciclo de vida del parásito.

Actividad en geles con sustrato incorporado:

En la figura 34a se observa un gel de poliacrilamida al 10% con SDS y gelatina 0,1% que contiene extractos de epimastigotes de las cepas Tul2 y RA, y del clon Sylvio X-10/7 de *T. cruzi*.

La cepa Tul2 generó una banda ancha de 36-45 kDa de peso molecular aparente después de una incubación de 4 horas a 37°C.



RA y Sylvio X-10/7 generaron una sola banda de actividad de distinta movilidad pero en la misma zona de las bandas generadas por la cepa Tul2.

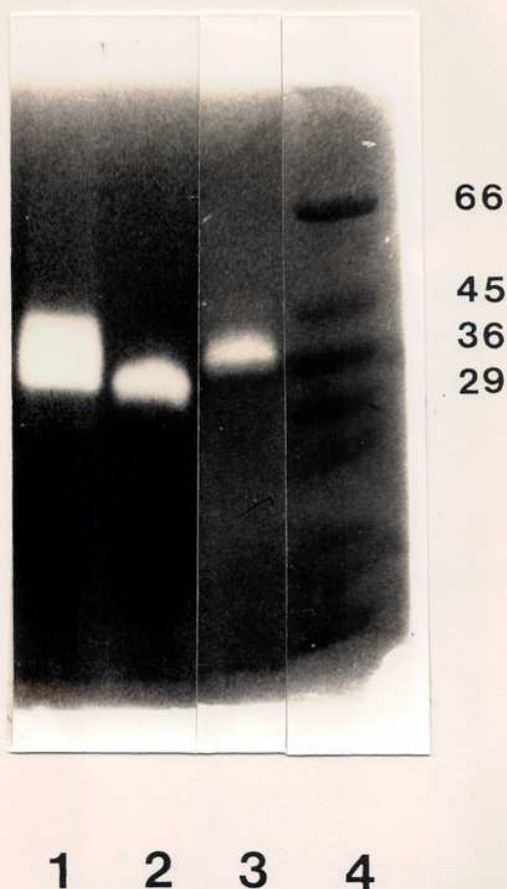


Figura 34a: **Actividad proteolítica en distintas cepas de *Trypanosoma cruzi*.** Gel de poliacrilamida al 10% con gelatina incorporada. Se sembraron extractos provenientes de $2 \cdot 10^6$ células de epimastigotes de las cepas Tul2, RA y del clon Sylvio X-10/7.

Calle 1: actividad proteolítica de la cepa Tul2.

Calle 2: actividad proteolítica de la cepa RA.

Calle 3: actividad proteolítica del clon Sylvio X-10/7.

Calle 4: marcadores de peso molecular en kiloDaltones.

El tiempo de incubación fue de 4 horas.

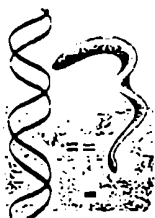


Para obtener una mejor resolución de la banda ancha de Tul2 se efectuó un gel de poliacrilamida al 7,5% y se lo incubó durante 90 minutos para evitar que un exceso de actividad impidiera discriminar las bandas (figura 34b).

En estas condiciones los extractos de epimastigotes de la cepa Tul2 generaron 4 bandas con un peso molecular aparente de 40-50 kDa. En la cepa RA y el clon Sylvio X-10/7 se detectó una sola banda. Como control se utilizó cruzipaína purificada de la cepa Tul2.



Figura 34b: Actividad proteolítica en distintas cepas de *Trypanosoma cruzi*. Experimento similar al de la figura 34a, excepto en que el gel de poliacrilamida, con gelatina como sustrato incorporado, se hizo al 7,5%, y que la incubación fue de 1,5 horas.



En la figuras 35a y 35b se compara la actividad de cruzipaína presente en epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes de la cepa RA luego de 2 y 18 horas de incubación respectivamente. La actividad proteolítica en los epimastigotes fue aproximadamente un orden de magnitud superior a la detectada en amastigotes y trypomastigotes, tal como lo indican las mediciones de actividad utilizando azocaseína como sustrato (Campetella *et al.*, 1990).

Las mismas evidencias se obtuvieron estudiando el efecto de inhibidores irreversibles de la cruzipaína. El nivel de actividad proteolítica en geles con gelatina fue 40 veces superior en epimastigotes que en amastigotes y trypomastigotes (Franke de Cazzulo *et al.*, 1994).

En amastigotes y trypomastigotes se detectó una doble banda, que luego de 18 horas de incubación se transformó en una banda ancha.

La movilidad aparente de la actividad proteolítica en el extracto de amastigotes fue inferior a la detectada en epimastigotes y trypomastigotes, lo cual constituye una nueva evidencia a favor de la existencia de isoformas de la cruzipaína, esta vez en distintos estadios del ciclo de vida.

Detección de isoformas en ensayos de Western blot:

Los ensayos de Western Blot ratificaron los resultados obtenidos con los geles de actividad y las determinaciones de actividad *in vitro*.

La figura 36 muestra que el suero Rab2 reconoce a la cruzipaína, a la extensión C-terminal purificada y a los extractos celulares de los distintos estadios del ciclo de vida del parásito. Sin embargo la intensidad y la posición de las bandas varió considerablemente. Los epimastigotes de la cepa RA reaccionaron fuertemente, mientras que los amastigotes lo hicieron de forma leve y los trypomastigotes generaron una señal apenas perceptible. En tanto, los epimastigotes y los trypomastigotes metacíclicos



del clon Sylvio X-10/7 también se diferenciaron netamente por la movilidad y la intensidad.

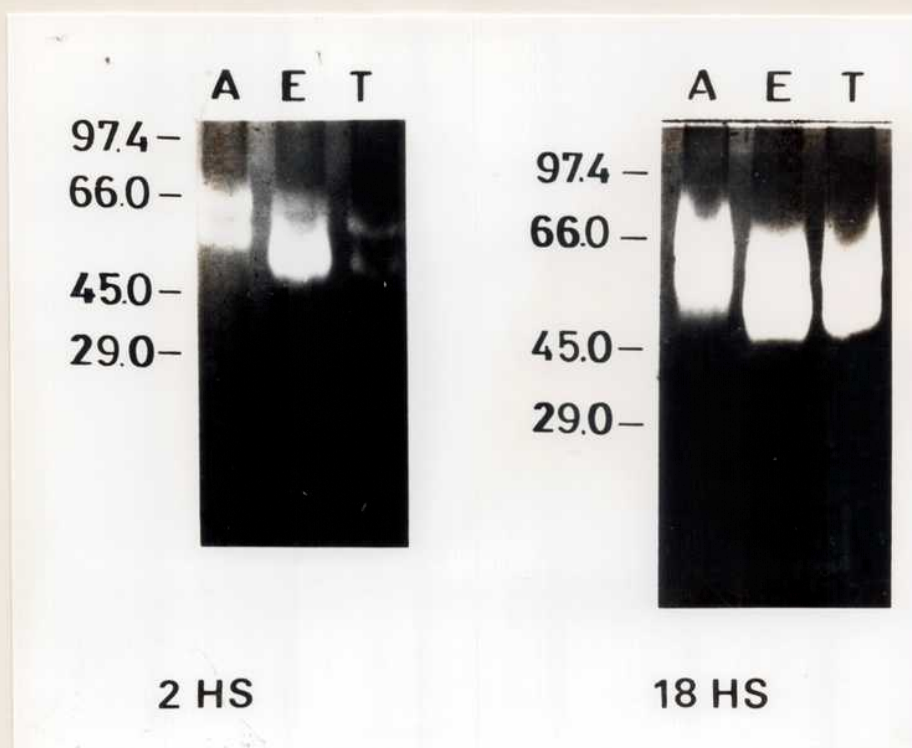


Figura 35a: Actividad proteolítica en las distintas formas del ciclo de vida de la cepa RA de *Trypanosoma cruzi*.

A, amastigotes; E, epimastigotes; T, trypomastigotes de la cepa RA.

Se sembraron $5 \cdot 10^6$ células por calle.

La incubación se efectuó durante 2 horas a 37°C .

Figura 35b: Actividad proteolítica en las distintas formas del ciclo de vida de la cepa RA de *Trypanosoma cruzi*.

Experimento similar al de la figura 35a. En este caso la incubación se efectuó durante 18 horas a 37°C .



Figura 36: Western blot de extractos proteicos de epimastigotes de la cepa Tul2, de las 4 formas del ciclo de vida de la cepa RA y de epimastigotes y trypomastigotes metacíclicos del clon Sylvio X-10/7 de *T. cruzi*.

Se sembraron extractos provenientes de 10^6 de epimastigotes y de $10 \cdot 10^6$ de amastigotes, trypomastigotes metacíclicos y trypomastigotes de células, en un gel al 10% de acrilamida. El filtro de nitrocelulosa fue enfrentado con el antisuero Rab2, en una dilución 1:1000, y revelado con un segundo anticuerpo IgG acoplado a fosfatasa alcalina.

Los marcadores de peso molecular se expresan en kiloDaltones.

Sy m: trypomastigotes metacíclicos del clon Sylvio X-10/7.

Sy e: epimastigotes del clon Sylvio X-10/7.

RA a: amastigotes de la cepa RA.

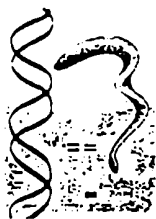
RA t: trypomastigotes de la cepa RA.

RA e: epimastigotes de la cepa RA.

T2 e: epimastigotes de la cepa Tul2.

C-T: extensión C-terminal purificada.

C: cruzipaina purificada.



Vale recordar que los extractos de epimastigotes provienen de un número de células 10 veces menor al del resto de los extractos.

En todos los casos la cruzipaína presentó un peso molecular aparente entre 40 y 50 kDa.

Resulta evidente, pues, que *Trypanosoma cruzi* regula cualitativa y cuantitativamente la expresión de distintas isoformas de la cruzipaína a lo largo de su ciclo de vida y que, además, existen variaciones de la misma índole entre distintas cepas del parásito.

¿Existen polimorfismos en los genes de cruzipaína de RA y Sylvio X-10/7?

Finalmente se analizaron los genes codificantes de la cruzipaína en los distintos estadios del ciclo de vida de la cepa RA y del clon Sylvio X-10/7 utilizados previamente en ensayos bioquímicos.

La estrategia fue similar a la utilizada para el análisis de los polimorfismos presentes en el dominio catalítico de la cruzipaína en la cepa Tul2: se preparó ARN de amastigotes, epimastigotes, trypomastigotes metacíclicos y trypomastigotes de células de la cepa RA y de epimastigotes y trypomastigotes metacíclicos del clon Sylvio X-10/7. Se sintetizó cADN y sobre ese sustrato se efectuó PCR con los mismos oligonucleótidos utilizados en la cepa Tul2. Los fragmentos amplificados fueron purificados, clonados en el vector T, y los clones positivos se identificaron efectuando PCR sobre colonias.

Las endonucleasas Msp I y BstU I habían detectado polimorfismos causantes de alteraciones en la secuencia aminoacídica de la extensión C-terminal en la cepa Tul2, y más tarde en el dominio catalítico.

En primer término se utilizaron estas endonucleasas para analizar la presencia o ausencia de los polimorfismos hallados en la cepa Tul2.

La figura 37 es una representación gráfica de la digestión de clones de la cepa RA y del clon Sylvio X-10/7, obtenidos por PCR a partir de ADN genómico.

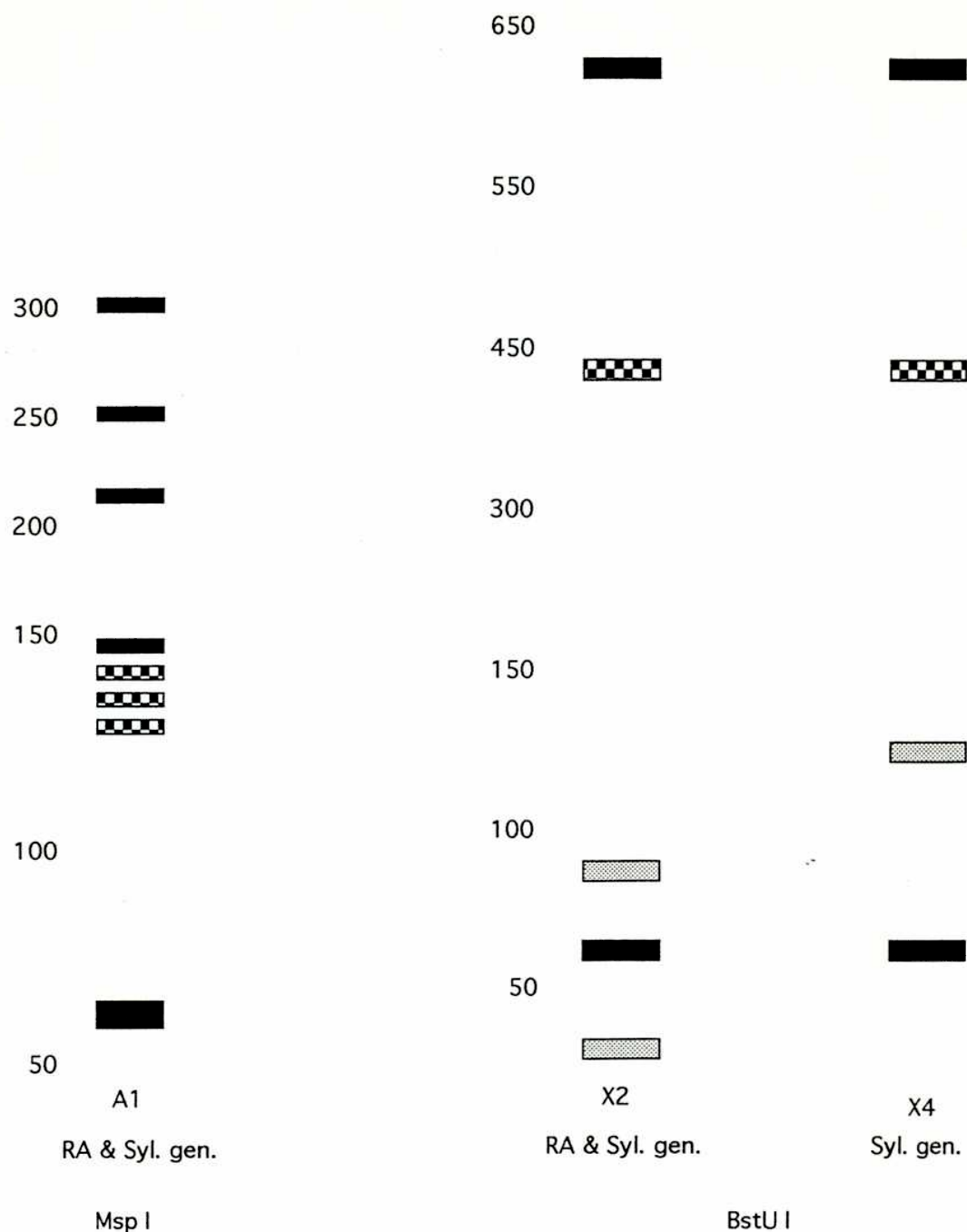
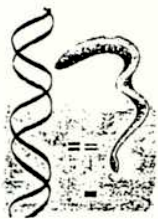
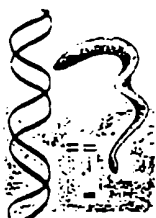


Figura 37: Esquema de los patrones de restricción generados por Msp I y BstU I sobre clones del gen de la cruzipaina amplificados a partir de ADN genómico de la cepa RA y del clon Sylvio X-10/7. Las bandas cuadrículas corresponden a la extensión C-terminal. Las bandas negras no varían entre los grupos. Las bandas punteadas distinguen a los grupos X2 y X4.



En la cepa RA tales enzimas de restricción no detectaron polimorfismo alguno. Todos los clones pertenecieron al grupo A1 (MspI) y al grupo X2 (BstUI), de acuerdo con la nomenclatura establecida en el análisis de la cepa Tul2.

Estos resultados indican que la cepa RA codifica solamente arginina en la posición nº 93 de la extensión C-terminal y no la alternancia de arginina y triptofano detectada por Msp I en la cepa Tul2.

Asimismo, todos los clones codifican cisteína en la posición nº 103 de la extensión C-terminal. En la cepa Tul2, en tanto, 10 de los 108 clones codificaron arginina.

La secuenciación de la extensión C-terminal de 14 clones provenientes de los distintos estadios del ciclo de vida de la cepa RA confirmó la ausencia de triptofano en la posición nº 93 y de arginina en la posición nº 103.

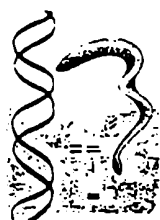
En el clon Sylvio X-10/7, sólo un clon de los 18 analizados fue identificado como perteneciente al grupo A2. Los demás pertenecieron al grupo A1. Recordemos que el grupo A2 fue mayoritario en la cepa Tul2.

La endonucleasa BstU I identificó 12 clones correspondientes al grupo X2 y 6 clones pertenecientes a un nuevo grupo, X4, generado por la desaparición de un sitio de corte en el inicio de la región Pro.

Si bien se trata de un análisis limitado a dos enzimas de restricción, estos resultados sugieren que el polimorfismo en RA y Sylvio X-10/7 es menor que el de la cepa Tul2.

El paso siguiente consistió en ampliar el mapeo de restricción con las enzimas utilizadas en la cepa Tul2, es decir: Ava II, Rsa I y la combinación de Bgl I, EcoR V y Pst I (BEP).

En este caso el análisis se efectuó sobre un total de 18 clones provenientes de la amplificación por PCR a partir de cADN de cada uno de los 4 estadios de RA y de los 2 estadios del clon Sylvio X-10/7.



En la cepa RA, las enzimas Ava II y "BEP" no detectaron ningún polimorfismo. En el clon Sylvio X-10/7 se dio el mismo resultado, incluso para la enzima Rsa I.

Sin embargo, Rsa I detectó la existencia de dos tipos de genes en la cepa RA, a los que denominamos grupo I y grupo II. Las frecuencias observadas sobre 18 clones de cada estadio fueron las siguientes:

RsaI	grupo I	grupo II
amastigotes	14	4
epimastigotes	12	6
tripomastigotes metacíclicos.	14	4
tripomastigotes de células.	17	1

Tal polimorfismo generó la sustitución de tirosina (grupo I) por histidina (grupo II) en la posición nº 299. En la cepa Tul2 se detectó esta misma sustitución en 3 de los 38 clones analizados. En el clon Sylvio X-10/7, por el contrario, todos los clones pertenecieron al grupo I.

En la figura 38 se esquematizan los resultados obtenidos en las distintas cepas y estadios del ciclo de vida analizados.

La combinación BEP no detectó polimorfismos en el clon Sylvio X-10/7. No obstante, el patrón de restricción fue distinto al de las cepas T2 y RA. La variación hallada por estas endonucleasas se circunscribe a un sitio de restricción para Bgl I y a otro para Pst I. El primero no altera la secuencia aminoacídica de la cruzipaína. El segundo si, produciendo la alternancia de glicina y serina en la posición nº 186.

En definitiva, todos los genes de cruzipaína del clon Sylvio X-10/7 (grupo IV) codifican glicina al igual que 31 genes de la cepa Tul2 (grupo II). Además, cinco genes de la cepa Tul2 y todos los de la cepa RA (grupo I) junto con dos de la cepa Tul2 (grupo III) codifican al aminoácido serina. En la figura 39 se aprecia el patrón de restricción generado por la combinación BEP sobre estos clones.

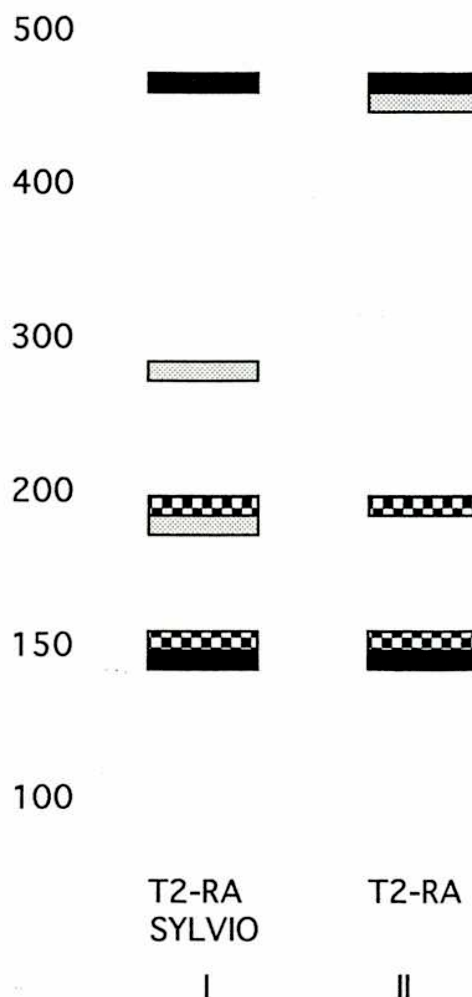
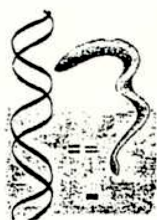


Figura 38: Esquema del patrón de bandas generado por Rsa I sobre clones del gen de la cruzipaina amplificados a partir de cADN de epimastigotes de la cepa Tul2, amastigotes, epimastigotes, trypomastigotes metacíclicos y trypomastigotes de células de la cepa RA, y epimastigotes y trypomastigotes metacíclicos del clon Sylvio X-10/7.

Las bandas cuadriculadas corresponden a fragmentos de la extensión C-terminal.

Las bandas negras corresponden a fragmentos que no varían entre las cepas de *T. cruzi*.

Las bandas punteadas permiten diferenciar a las distintas cepas de *T. cruzi*.

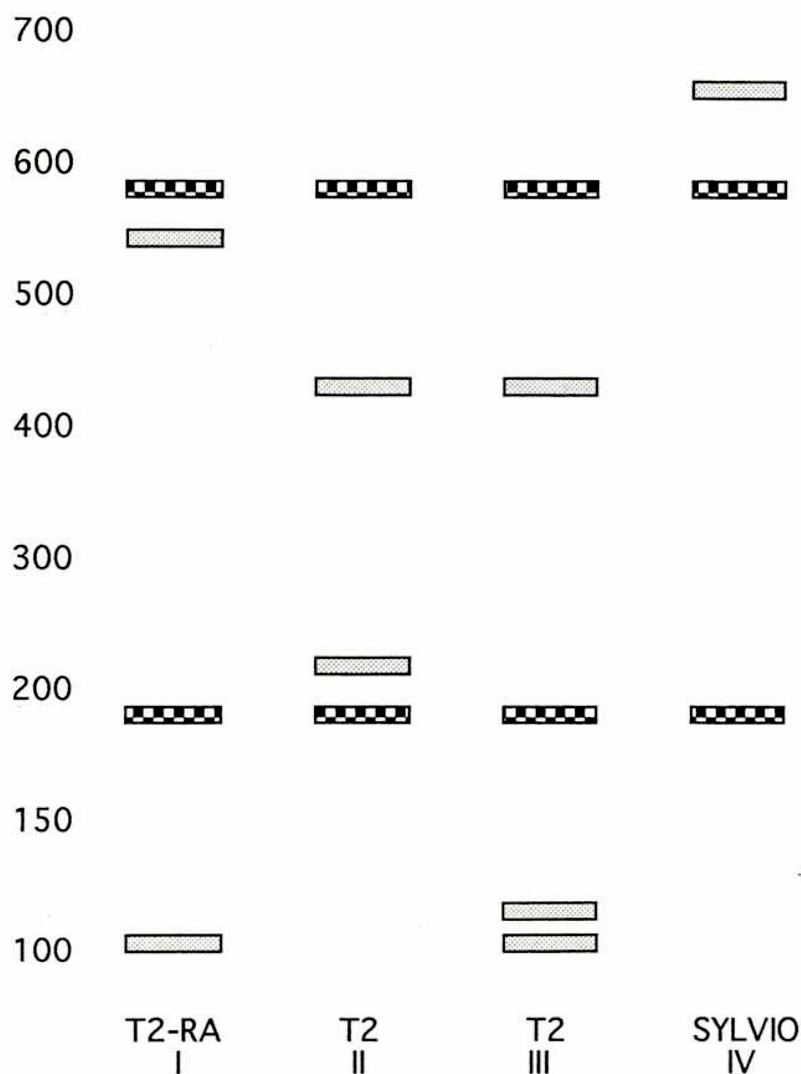
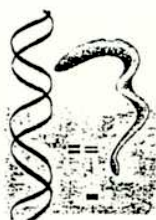
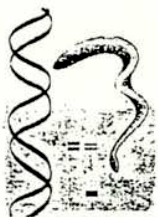


Figura 39: Esquema del patrón de bandas generado por la combinación de enzimas de restricción (BEP) sobre clones del gen de la cruzipaína amplificados a partir de cADN de epimastigotes de la cepa Tul2, amastigotes, epimastigotes, trypomastigotes metacíclicos y trypomastigotes de células de la cepa RA, y epimastigotes y trypomastigotes metacíclicos del clon Sylvio X-10/7.

Las bandas cuadriculadas corresponden a fragmentos de la extensión C-terminal.
Las bandas punteadas permiten diferenciar a las distintas cepas de *T. cruzi*.



En la figura 40 se grafica el patrón de bandas generado por la endonucleasa Ava II. La ausencia de polimorfismos se contrapone a lo ocurrido en la cepa Tul2, en la cual se identificaron, en sólo 2 clones (grupo II) de los 38 analizados, una sustitución de prolina por alanina en la posición nº 4 de la extensión C-terminal.

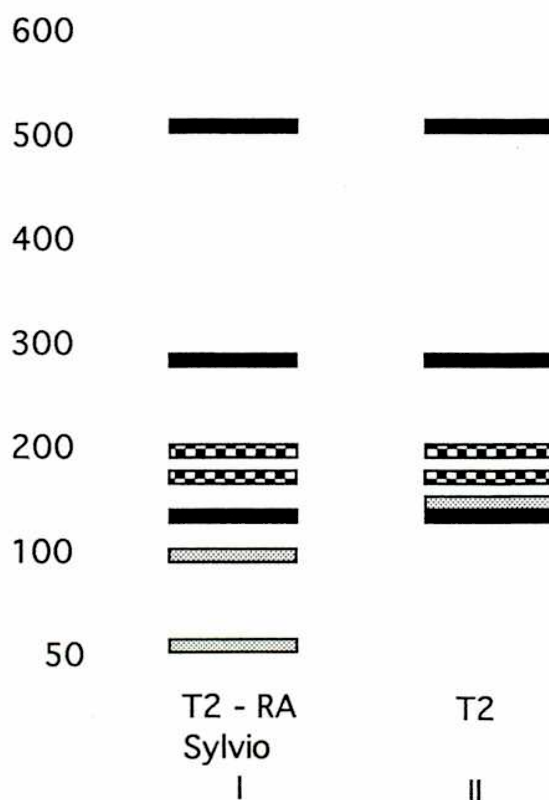
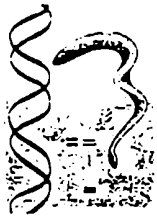


Figura 40: Esquema del patrón de bandas generado por Ava II sobre clones del gen de la cruzipaina amplificados a partir de cADN de epimastigotes de la cepa Tul2, amastigotes, epimastigotes, trypomastigotes metacíclicos y trypomastigotes de células de la cepa RA, y epimastigotes y trypomastigotes metacíclicos del clon Sylvio X-10/7.

Las bandas cuadriculadas corresponden a fragmentos de la extensión C-terminal.

Las bandas negras corresponden a fragmentos que no varían entre las distintas cepas de *T. cruzi*.

Las bandas punteadas permiten diferenciar a las distintas cepas de *T. cruzi*.



Resultados

NOTAS

DISCUSSION





Antigenicidad de la cruzipaína.

La reactividad de los sueros de pacientes chagásicos contra la cruzipaína indica, sin lugar a dudas, que la cisteín proteinasa principal de *T. cruzi* es antigénica en la infección natural. De los 22 sueros crónicos analizados, 20 reconocieron a la enzima, es decir, un 90%. En tanto, sólo uno de los 12 sueros provenientes de pacientes agudos reaccionó de forma débil con la cruzipaína.

El suero policlonal monoespecífico anti-cruzipaína reconoció muy fuertemente, como una proteína de fusión con la β -galactosidasa, al antígeno recombinante 13, y con menor intensidad al 36, ambos clonados y expresados en el laboratorio del Dr. Frasch (Ibañez *et al.*, 1987).

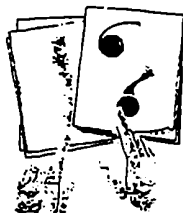
Estos resultados pusieron en duda la antigenicidad de la cruzipaína en la infección crónica. Existía la posibilidad de que los anticuerpos presentes en los sueros crónicos hubiesen sido generados contra los antígenos 13 y 36, y no contra la cruzipaína.

Sin embargo, dichos sueros conservaron su reactividad contra la enzima aún después de ser adsorbidos con los mencionados antígenos.

El suero anti cruzipaína reconoció debilmente a los antígenos 13 y 36 como proteínas de fusión con la glutatión-S-transferasa en ensayos de Western blot, mientras que los sueros producidos contra estas proteínas recombinantes no reconocieron a la cruzipaína.

Del posterior análisis de las secuencias de ADN surgieron algunas zonas de homología que podrían ser la causa de la reactividad cruzada, recordando que la porción antigénica de las proteínas 13 y 36 corresponde a repeticiones de aminoácidos, una característica común de los antígenos de trypanosomátidos.

La fuerte reacción de algunos sueros crónicos contra la extensión C-terminal purificada llevó a investigar el rol de tal dominio de la cruzipaína en la antigenicidad natural. Para ello se clonaron y expresaron



tres fragmentos de la cruzipaína como proteínas de fusión con la glutathion-S-transferasa en *E. coli*. Dos de ellos componen el dominio catalítico y el restante corresponde a la extensión C-terminal.

La expresión de estas proteínas llevó a la formación de cuerpos de inclusión, los cuales fueron purificados, sometidos a electroforesis en condiciones desnaturalizantes, transferidos a filtros de nitrocelulosa y finalmente enfrentados con sueros de pacientes chagásicos crónicos.

La tinción de dichos geles con Coomassie Blue o nitrato de plata mostró que los cuerpos de inclusión no estaban formados por una sola proteína, sino que contenían algunas bandas de menor peso molecular que la correspondiente a la proteína de fusión completa.

Los antisueros reconocieron fuertemente a esta última, pero también reaccionaron con una o dos bandas por debajo de ella, lo cual indicó que se trataba de productos de degradación que suelen acompañar a la proteína principal en estos sistemas de purificación.

Los resultados de la tabla 2 permiten concluir que la extensión C-terminal es el blanco principal de los anticuerpos en la infección natural.

No obstante, algunos sueros de pacientes crónicos reconocieron, además, a las proteínas Cat1 y/o Cat2, apuntando a la existencia de anticuerpos que reconocen algunos epitopes secuenciales en el dominio catalítico de la cruzipaína.

La conservación de la actividad proteolítica de la cruzipaína, aún después de ser inmunoprecipitada con un anticuerpo dirigido hacia la extensión C-terminal, indicaría que la enzima cuenta con dos dominios: uno catalítico no inmunogénico, y otro inmunogénico, la extensión C-terminal, carente por completo de actividad.

El antisuero Rab2, generado contra la enzima purificada y sometida a secado por centrifugación al vacío, había reconocido al dominio catalítico (proteína Cat1) en ensayos de Western blot e inmunoprecipitó a la enzima ocasionándole una disminución en su actividad.



Los antisueros generados contra las proteínas Cat1, Cat2 y C-T no inmunoprecipitaron a la cruzipaína ni inhibieron su actividad, comportándose de hecho como el suero anti-GDH, utilizado en este experimento como un control negativo. En ensayos de Western blot estos sueros habían reconocido a la enzima purificada y a las mencionadas proteínas de fusión. Deberíamos asumir entonces que solo contienen anticuerpos dirigidos hacia epitopes secuenciales, no disponibles en la molécula nativa. .

No podemos descartar, en antisueros o en sueros de pacientes chagásicos crónicos, la existencia de algunos anticuerpos dirigidos contra epitopes conformacionales del dominio catalítico de la cruzipaína, que desaparecen en las condiciones desnaturalizantes de un Western blot. Por ejemplo, la cruzipaína no reducida (que conserva parte de su estructura espacial debido a la persistencia de sus puentes disulfuro) es reconocida mucho más intensamente que la reducida con DTT 0,1M.

Sin embargo, en los ensayos de inmunoprecipitación con un antisuero generado contra la enzima nativa, que contiene anticuerpos dirigidos casi exclusivamente contra la extensión C-terminal, la cruzipaína conservó su actividad. Este resultado resta chances a la hipótesis recientemente sugerida, si bien podría ocurrir que existan anticuerpos dirigidos contra el dominio catalítico que no afecten de modo alguno a la actividad enzimática.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la cruzipaína podría ser considerada como una proteína quimérica, originada por un mecanismo de fusión génica o por inserción de secuencias extrañas. Sin embargo, debido a que se conocen algunos ejemplos de genes de proteinasas no pertenecientes a trypanosomátidos que contienen una extensión C-terminal (Schaffer and Fischer, 1988, proteína predicha a partir de una secuencia de cADN pero sin homología con la de trypanosomátidos), la presencia de este dominio podría ser considerada como un caracter ancestral, perdido en las cisteín proteinasas "modernas", pero presente en algunas enzimas



de trypanosomátidos, pues ofrecería a estos una ventaja evolutiva basada en la protección del parásito contra el sistema inmune del huésped (Cazzulo and Frasch, 1992).

Es posible que moléculas con un dominio enzimáticamente activo hayan sido seleccionadas para tener otro dominio altamente antigénico, constituido por repeticiones de aminoácidos, como el SAPA (shed acute phase antigen) (Frasch *et al.*, 1991), o por secuencias extrañas al huésped y no repetitivas, en el caso de la cruzipaína.

Este fenómeno puede ser parte de una estrategia general desarrollada por el parásito durante la evolución para desviar la respuesta inmune del huésped y proteger, de esta manera, a la región funcionalmente enzimática de la proteína.

Comportamiento electroforético anómalo de la cruzipaína.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS es una técnica rápida empleada frecuentemente para determinar el peso molecular de una proteína (Hames and Rickwood, 1990). La utilidad de estas determinaciones depende, sin embargo, de dos factores:

- 1) Las proteínas unen, en general, una cantidad constante de SDS por gramo cuando están completamente reducidos, si los hay, sus puentes disulfuro. De ello resulta una carga negativa global que enmascara la carga intrínseca de la proteína y que genera una relación constante carga/masa.
- 2) Las proteínas saturadas con SDS adoptan una forma de "bastón", siendo el largo de esta estructura proporcional a la extensión de la cadena polipeptídica y a su peso molecular.

Este procedimiento no es directamente aplicable a glicoproteínas que contienen al menos un 10% de carbohidratos, como es el caso de la cruzipaína (Cazzulo *et al.*, 1990a), pues la capacidad de unir moléculas de SDS por gramo de glicoproteína se ve reducida si se la compara con proteínas sin carbohidratos. Por lo tanto, la relación carga/masa será menor, resultando de ello una reducción en la movilidad durante la



electroforesis y un peso molecular aparente superior. Sin embargo, si se aumenta el porcentaje de acrilamida del gel el factor masa tenderá a predominar y el peso molecular se aproximará asintóticamente al real.

El valor de peso molecular de la cruzipaína obtenido en geles al 15% fue el que más se aproximó al deducido de la secuencia del gen: los pesos moleculares aparentes calculados en gráficos de logaritmo del peso molecular vs. movilidad electroforética mostraron una disminución desde 51 kDa, en geles de poliacrilamida al 7,5%, hasta 45 kDa, en geles al 15%. En términos generales puede decirse que el grado de anomalía de cada glicoproteína es una función directa de su composición en carbohidratos: cuanto mayor es su contenido en hidratos de carbono, más anómalamente se comportará en geles de poliacrilamida con SDS.

Las proteínas que contienen puentes disulfuro sufren variaciones en su peso molecular aparente en geles de poliacrilamida dependiendo de su estado de reducción (Allore and Barber, 1984).

En proteínas compuestas por subunidades unidas por puentes disulfuro intercatenarios, la reducción de dichos puentes provocará la disociación de las subunidades y por lo tanto el peso molecular será el de cada subunidad y no el del oligómero.

Por el contrario, si los puentes disulfuro son intracatenarios, la reducción producirá el desplegado de la molécula, resultando una proteína de mayor volumen hidrodinámico y peso molecular aparente superior.

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS hace posible averiguar qué tipo de puentes disulfuro tiene una proteína mediante la reducción o no de la misma. Allore y Barber (1984) desarrollaron una modificación muy simple de la técnica de Laemmli que permite observar directamente los cambios en la movilidad relativa de las bandas proteicas dependiendo de su estado de reducción.



La muestra se divide en dos partes y solamente una se reduce con DTT. Luego se siembra el gel de la siguiente manera, (el signo + indica reducción de la muestra y el signo - la no reducción).

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	+	+				+	+	

Durante la electroforesis el agente reductor difundirá lateralmente entre las calles 3-4 y 6-7, produciendo una reducción parcial en esa zona del gel. Así se crearán "arcos" de proteína que ligarán a las bandas reducidas con las no reducidas, indicando la identidad entre las proteínas sembradas adyacentemente.

Como puede observarse en la figura 18a, el peso molecular aparente de la enzima no reducida fue de 39 kDa, mientras que la cruzipaína reducida arrojó un valor de 47 kDa en geles al 10 y 12,5% de acrilamida.

Por el contrario, la presencia o ausencia de DTT no afectó a la movilidad electroforética de la extensión C-terminal, de acuerdo a los experimentos de Western blot de las figuras 21a y 21b. Si se observa detenidamente, las muestras no reducidas tienen un peso molecular aparente levemente inferior a las reducidas, pero el efecto no es de ninguna manera comparable al observado sobre la cruzipaína.

La extensión C-terminal contiene puentes disulfuro, pues como veremos en breve los residuos cisteína no pueden ser piridiletílicos sino después de que la proteína haya sido completamente reducida. ¿Por qué, entonces, no se produce una drástica variación dependiendo del estado de reducción de la molécula? Esta aparente discrepancia podría explicarse por la proximidad de los residuos cisteína en la estructura primaria. La presencia o ausencia de tales puentes causaría, pues, cambios estructurales menores, no detectables con la técnica empleada.



La papaína, una enzima no glicosilada a cuya superfamilia pertenece la cruzipaina, también contiene 3 puentes disulfuro en su dominio catalítico (el único presente en la enzima madura). En un experimento similar al desarrollado en la figura 18a genera un peso molecular correcto de 23,4 kDa cuando ha sido desnaturalizada por ebullición en presencia del agente reductor. Sin embargo, cuando no se la reduce se obtiene un peso aparente de 19,5 kDa, que puede considerarse como un artefacto (resultado no mostrado).

La tinción con Coomassie Blue fue más efectiva que la de plata sobre la cruzipaina hervida y no reducida (figura 18a), pero no surtió efecto alguno sobre la extensión C-terminal, independientemente de su estado de reducción y de la desnaturalización por calor.

La tinción de plata no dio resultado cuando la cruzipaina (figura 18b) y su extensión C-terminal (figura 20) fueron desnaturalizadas por ebullición en ausencia de DTT 0,1M. Ambas, para ser visualizadas, debieron ser reducidas antes de ser sometidas a la electroforesis.

La extensión C-terminal se tiñó fuertemente por nitrato de plata cuando se la desnaturalizó por ebullición en presencia de DTT 0,1M. La reducción efectuada a temperatura ambiente debilitó la tinción en forma considerable (figura 19).

Se sabe que la tinción por nitrato de plata es en cierto modo influenciada por grupos específicos de las proteínas, como por ejemplo los aminoácidos básicos y las cisteínas reducidas. Los resultados obtenidos indican que en el caso de la extensión C-terminal de la cruzipaina, los grupos sulfidrilos libres no estarían involucrados en este fenómeno, puesto que reducidos por completo o reducidos y piridiletílicos se tiñen con la misma intensidad (resultados no mostrados).

Por otro lado, se han proporcionado evidencias claras de que la ebullición afecta a la tinción, tal vez por su efecto en el desplegamiento



completo de la proteína y la correspondiente variación en la accesibilidad a ciertos grupos involucrados en la reacción.

La mayor movilidad de la cruzipaína no reducida o no hervida, comparada con la que se obtiene por reducción y ebullición, se debería a la diferente conformación de la enzima no reducida, que ve alterada su capacidad de unión de SDS, resultando en una disminución del volumen hidrodinámico del complejo proteína-SDS.

El notable aumento en la antigenicidad que se produce al no reducir a la cruzipaína es otra muestra de la alteración que causa el DTT en su estructura tridimensional. La reducción de los puentes disulfuro de la cruzipaína causaría el desplegado de la molécula y la consiguiente desaparición de algunos epitopes conformacionales. Resulta evidente que estos últimos constituyen una proporción importante de los epitopes de la cruzipaína. Tal aumento no se produjo en la extensión C-terminal, lo cual sugiere que la mayoría de los epitopes conformacionales están en el dominio catalítico.

Estos resultados demuestran que el peso molecular aparente de la cruzipaína es totalmente dependiente de las condiciones electroforéticas empleadas, variando entre 50 y 33 kDa.

Las razones de este comportamiento anómalo pueden buscarse en su carácter de glicoproteína, en la presencia de puentes disulfuro que ponen en contacto cisteínas próximas o distantes en la secuencia primaria y en la existencia de modificaciones post-traduccionales no identificadas aún, localizadas en la extensión C-terminal.

Además de proveer información acerca de la estructura de la cruzipaína, estos estudios muestran algunos de los artefactos que suelen aparecer cuando se utilizan técnicas básicas a proteínas desconocidas.



Algo que parece ser tan simple como una tinción, en verdad no lo es. Por ejemplo, si hubiésemos utilizado rutinariamente el Coomassie Blue, jamás hubiéramos detectado a la extensión C-terminal. De hecho, podríamos haber pensado que la cruzipaína se autodegrada totalmente, y no que su extensión C-terminal es resistente a tal tratamiento.

Algunas características estructurales del dominio C-terminal.

El proceso de purificación de la extensión C-terminal en FPLC con una columna de Superosa 12 es muy eficiente. Permite obtener a dicho fragmento libre de péptidos menores provenientes del dominio catalítico y de la cruzipaína remanente del proceso de autoproteólisis, tal como puede observarse en las calles 1 y 2 de la figura 22. En la calle 3 aparecen ambas especies y en las calles 4 a 6 la extensión C-terminal está pura. A pesar del estado de pureza que se logra, la banda tiene un ancho inusitado para tratarse de una sola proteína.

Es sabido que la presencia de oligosacáridos en las proteínas genera bandas de mayor espesor en geles de poliacrilamida con SDS. La extensión C-terminal tiene un oligosacárido de alta manosa en la asparragina de la posición nº 40. Se han detectado, además, dos tipos de modificaciones post-traduccionales en las treoninas de las posiciones nº 5 y nº 9 a 14, pero hasta el momento no hemos identificado la naturaleza de estas modificaciones.

Harris *et al.*, (1992) reportaron una sustitución de tipo O-fucosil-treonina cuya posición relativa en el secuenciador es similar a la obtenida con la extensión C-terminal. Sin embargo, los ensayos de β -eliminación no lograron desenmascarar las modificaciones presentes en las citadas treoninas, descartando a la O-glicosilación como posible evento post-traducciona. De hecho, el tratamiento resultó en un incremento de la movilidad electroforética y en la aparición de una banda de bajo peso molecular. Cuando estas bandas se transfirieron a una membrana de PVDF y se secuenciaron, se observó que el derivado no identificado previamente



aparecía en la misma posición y que el tratamiento producía la fragmentación de la proteína.

La eventual fosforilación de las treoninas puede descartarse debido a la ausencia de radiactividad en la banda correspondiente a la cruzipaína, y por el hecho de que un auténtico residuo P-treonina no se comporta como las modificaciones halladas en nuestros experimentos.

El papel de las cisteínas en la extensión C-terminal es indiscutible a partir de los resultados espectrofotométricos.

El notable aumento de absorbancia a 254 nm por piridiletilación después de bloquear los residuos de cisteína libres y reducir por completo con DTT indica la existencia de puentes disulfuro, que se suman a las evidencias electroforéticas discutidas anteriormente.

Hasta el día de hoy han fallado todos los intentos de fragmentar a la extensión C-terminal, sin reducirla previamente, para analizar cuáles son las cisteínas involucradas en puentes disulfuro. Se utilizaron sin éxito distintas proteinasas, como la tripsina (Hellman *et al.*, 1991), la proteasa de *Achromobacter* I (Lys C) y la proteinasa V8 de *Staphylococcus aureus* (resultados no publicados).

Polimorfismos en el dominio C-terminal.

Åslund *et al.* (1991) y Campetella *et al.* (1992) detectaron algunas sustituciones de aminoácidos en la extensión C-terminal al secuenciar 3 clones obtenidos por amplificación de la extensión C-terminal a partir de una librería de cADN de *T. cruzi* y dos copias genómicas del gen de la cruzipaína, cruzip-2 y cruzip-4, respectivamente (figuras 6 y 8).

No obstante el escaso número de genes analizados (teniendo en cuenta que la cepa Tul 2 tiene hasta 130 genes de la cruzipaína) estos resultados indican que la microheterogeneidad detectada en los ensayos



bioquímicos se debería a algunas diferencias menores en la composición aminoacídica de la enzima.

Para estimar la incidencia de aquellas sustituciones, o de otras nuevas en el repertorio total de genes del parásito, fue necesario analizar un número mayor de clones de la extensión C-terminal de la cruzipaina.

La estrategia elegida fue la amplificación por PCR a partir de cADN de epimastigotes de la cepa Tul2.

Los oligonucleótidos se diseñaron en regiones no polimórficas, de acuerdo a las secuencias publicadas, para descartar la posible "selección" de determinadas copias del gen de la cruzipaina en el proceso de amplificación.

La endonucleasa Msp I mostró diferencias en el número de miembros de los grupos C y D entre la PCR_A y la PCR_B. Si bien la elección de las colonias se hizo por azar, la diferencia resultó considerable. En tanto, los resultados obtenidos con ADN genómico fueron similares a los originados por la PCR_B. La posterior secuenciación indicó que la desaparición del sitio de restricción que diferencia a los grupos C y D no provoca ningún cambio de aminoácido, lo cual quita relevancia a la sustitución detectada.

En síntesis, Msp I detectó la alternancia arginina (R) -triptofano (W) con una frecuencia aproximada al 50%. BstU I, en cambio, identificó la sustitución de cisteína (C) por arginina (R) en sólo el 10% de los clones.

Los resultados obtenidos con Msp I y BstU I sobre cADN y ADN genómico se resumen en la siguiente tabla, donde las cifras indican el número de clones de cada una de las cuatro combinaciones posibles de aminoácidos. La sustitución que detecta Msp I origina un cambio de aminoácido en la posición nº 93 de la extensión C-terminal, y BstU I lo hace en la posición nº 103.



Msp I	BstU I	n° de clones
A+B= arginina	X+Y= cisteína	53
A+B= arginina	Z= arginina	4
C+D= triptofano	X+Y= cisteína	44
C+D= triptofano	Z= arginina	6

La presencia de cisteína en la posición nº 103 es claramente mayoritaria (97), en cambio las isoformas que contienen arginina (57) y triptofano (50) están presentes en una proporción similar.

La secuenciación de 17 clones de cada amplificación, elegidos al azar pero proporcionalmente a los grupos detectados, permitió detectar otras sustituciones de aminoácidos que se sumaron a las dos identificadas con las endonucleasas Msp I y BstU I.

Las que se encontraron en un sólo clon de una de las amplificaciones (PCR_A o PCR_B) podrían deberse a un error introducido por la Taq polimerasa. Eventualmente podrían estar presentes en copias muy poco representadas en el genoma o cuya expresión se vea regulada negativamente a nivel transcripcional o post-transcripcional.

Dado el alto número de copias del gen de la cruzipaína, es probable que de haber secuenciado más clones de cada amplificación se hubiesen encontrado más polimorfismos comunes a ambas PCRs.

Se hallaron 6 sustituciones de aminoácidos presentes en clones de ambas amplificaciones. De ellas, cinco habían sido detectadas por Åslund *et al.* (1991) y por Campetella *et al.* (1992). El cambio de cisteína (C) por arginina (R), en la posición nº103 de la extensión C-terminal y presente en 10 de los 108 clones analizados, sólo fue detectado por Lima *et al.* (1994) en un clon proveniente de una biblioteca de ADN genómico de epimastigotes del clon Dm28c.



A modo de resumen se detallan las 6 posiciones (fila superior) en las que se detectaron variaciones en la secuencia aminoacídica de la extensión C-terminal de la cruzipaína; los grupos de clones (columna de la izquierda) y los aminoácidos más frecuentes (consenso, en negrita) en dichas posiciones (de la figura 29):

	72	90	93	103	120	124
Ct 1	F	Q	R	C	Y	Q
Ct 2	F	Q	W	C	Y	Q
Ct 3	F	Q	R	R	Y	Q
Ct 10	L	K	R	C	H	H
Ct 6	F	Q	W	R	Y	Q
cons.	F	Q	R	C	Y	Q

Los clones que conforman el grupo Ct 10 se diferencian netamente de los restantes, que se distinguen entre sí por una o dos sustituciones.

Todas las alteraciones generan cambios en la carga total de la molécula, excepto el cambio de fenilalanina (F) por leucina (L) en la posición nº 72:

posición nº 72: leucina (no polar)	fenilalanina (F) (no polar).
posición nº 90: lisina (básico)	glutamina (Q) (polar).
posición nº 93: triptofano (no polar)	arginina (R) (básico).
posición nº 103: arginina (básico)	cisteína (C) (polar).
posición nº 120: histidina (básico)	tirosina (Y) (polar).
posición nº 124: histidina (básico)	glutamina (Q) (polar).



Los puntos isoeléctricos calculados a partir de las secuencias de aminoácidos de los 13 grupos de clones se ubican entre 6,4 y 8 (figura 29).

Vale recordar que la cruzipaína madura arrojó valores entre 4,7 y 5,4 (Malchiodi *et al.*, 1993).

Recientemente, Stoka *et al.* (1994), informaron los puntos isoeléctricos de la catepsina L de origen humano (6), la catepsina S de origen bovino (6,5) y la cruzipaína purificada de la cepa Tul2 (4 - 4,8).

Este último dato se aproxima al obtenido previamente por Malchiodi *et al.*, (1993).

La determinación de los puntos isoeléctricos de las catepsinas es importante pues carecen de la extensión C-terminal presente en la cruzipaína y en otras cisteín proteinasas de trypanosomátidos.

Según estos valores, el punto isoeléctrico de la extensión C-terminal podría ser muy inferior al deducido de la secuencia de aminoácidos (7-8).

Muy posiblemente la diferencia observada se deba a las modificaciones post-traduccionales que, a pesar de los esfuerzos realizados, no han podido identificarse hasta el momento.

Parodi *et al.*, (1995) detectaron una nueva particularidad estructural de la extensión C-terminal de la cruzipaína.

Hemos mencionado que la enzima es una glicoproteína lisosomal que contiene oligosacáridos de tipo alta manosa unidos a residuos de asparragina. Estos oligosacáridos no poseen residuos fosfato, lo cual indica que el direccionamiento de la cruzipaína hacia los lisosomas no se efectúa por el sistema de marcadores manosa-6-fosfato presente en células de mamíferos (Cazzulo *et al.*, 1990). En cambio, podrían estar involucrados algunos elementos estructurales de la parte proteica.

Entre los monosacáridos obtenidos por hidrólisis total de la cruzipaína se han detectado pequeñas cantidades de galactosa.



Con el doble objetivo de dilucidar la localización de estas galactosas y de obtener más información acerca del procesamiento de la parte glicosídica de la cruzipaína, que a su vez permite inferir el camino seguido por la molécula a través del retículo endoplásmico y del Golgi, se efectuó un estudio de la estructura de las cadenas de oligosacárido presentes en los dominios catalítico (una o dos) y C-terminal (una, presente en todas las moléculas) de la cruzipaína.

Los resultados indicaron la presencia de oligosacáridos de alta manosa en ambos dominios, pero sólo en la extensión C-terminal se detectó una porción menor de galactosa, correspondiente a oligosacáridos de tipo complejo. Así, el dominio C-terminal de algunas moléculas de cruzipaína presenta un oligosacárido de alta manosa, y el de otras uno de tipo mixto o complejo, en el único sitio de N-glicosilación.

El tamaño aparente de los oligosacáridos en el dominio catalítico (alta manosa exclusivamente) o en el C-terminal (mezcla de diferentes tipos) es similar.

Dado que los oligosacáridos de tipo complejo derivan de los de alta manosa, una posible explicación es la existencia de heterogeneidades en la estructura de la cadena peptídica del C-terminal, que llevarían a una diferente exposición del oligosacárido, resultando en un procesamiento mayor o menor.

Esta hipótesis está de acuerdo con los polimorfismos detectados mediante la secuenciación de clones de la extensión C-terminal de epimastigotes de la cepa Tul2 de *T. cruzi*.

La presencia de oligosacáridos de tipo complejo en la cruzipaína de *T. cruzi* indica que, al igual que en mamíferos, las enzimas lisosomales atraviesan el aparato de Golgi completo antes de llegar a los lisosomas.

Polimorfismos en el dominio catalítico.

Hemos visto que las variaciones de aminoácidos detectadas en la extensión C-terminal de la cruzipaína de la cepa Tul2 están agrupadas en el extremo carboxilo, y la mayoría de ellas está presente en unas pocas copias



del gen, con la excepción de la alternancia triptofano y arginina, en la posición nº 93, y presente en el 50% de los casos analizados. Debe destacarse, sin embargo, que el espectro de absorción del dominio C-terminal purificado no presenta un pico definido a 280 nm (figura 24). Por lo tanto, no podemos descartar que algún control post-transcripcional ocasione una disminución en la traducción de los ARNs mensajeros que generarían moléculas con un residuo triptofano en la posición nº 93.

En el dominio catalítico se detectaron sustituciones, algunas de las cuales habían sido halladas con anterioridad por Campetella *et al.* (1992) en sólo dos copias genómicas de la cruzipaína de la cepa Tul2 (cruzip-2 y cruzip-4) y por Mottram *et al.* (1989) en la cisteín proteinasa de *T. brucei*.

A continuación se comparan las mencionadas secuencias de la figura 8 con la variación detectada por BstU I en este trabajo.

Las posiciones se cuentan, como de costumbre, a partir de la metionina N-terminal.

<i>T. cruzi</i> grupos X1, Y1, Y2, Z1, Z2:	W T A Q W	(44 clones)
<i>T. cruzi</i> grupos X2 X3:	W T T Q W	(10 clones)
cruzip-2	W T A Q W	
cruzip-4:	W T T Q W	
<i>T. brucei</i> :	W S N M W	
A/T posición nº 308		

Es importante aclarar que la aparición o desaparición de un sitio de restricción puede deberse a distintos cambios dentro de la secuencia blanco de la endonucleasa. Por lo tanto, para saber cuál es el nuevo aminoácido codificado es imprescindible recurrir a la secuenciación. Este procedimiento sólo se empleó sobre algunos clones en cada uno de los



polimorfismos hallados. Si bien no se puede asegurar que todos los clones tengan la misma sustitución, las secuencias efectuadas siempre mostraron el mismo reemplazo nucleotídico.

Podemos hacer la misma comparación con las sustituciones detectadas por las enzimas Ava II, Rsa I y Bgl I+EcoR V+Pst I (BEP), en ese orden.

<i>T. cruzi</i> :	P G P T P	(32 clones)
<i>T. cruzi</i> :	P G A T P	(2 clones)
cruzip-2:	P G P T P	
cruzip-4:	P G P T P	
<i>T. brucei</i> :	P - - T P	
P/A posición nº 341		

<i>T. cruzi</i> :	V P Y W I	(35 clones)
<i>T. cruzi</i> :	V P H W I	(3 clones)
cruzip-2:	V P Y W I	
cruzip-4:	V P Y W I	
<i>T. brucei</i> :	P P Y W I	
Y/H posición nº 299		

<i>T. cruzi</i> :	G C G G G	(31 clones)
<i>T. cruzi</i> :	G C S G G	(7 clones)
cruzip-2:	G C G G G	
cruzip-4:	G C G G G	
<i>T. brucei</i> :	G C N G G	
G/S posición nº 186		



Las secuencias de otras extensiones C-terminales de cisteín proteinasas de trypanosomátidos muestran entre sí una mayor variabilidad que sus respectivos dominios catalíticos. Como ejemplo, la cisteín proteinasa de *T. brucei* (Mottram *et al.*, 1989) tiene una homología de tan sólo un 36% con la cruzipaína.

Recientemente hemos clonado y caracterizado a una cisteín proteinasa de *Trypanosoma rangeli*, homóloga a la cruzipaína y llamada, por esa razón, rangelipaína (Labriola and Cazzulo; Martínez *et al.*, enviado a publicación). Esta enzima tiene una extensión C-terminal de un tamaño similar al de la cruzipaína, pero la homología es baja (55%) si se la compara con la del dominio catalítico (74%) y la correspondiente a la región pro (78%) (figura 8).

Es necesario recordar que un estudio con enzimas de restricción tiene un alcance tan limitado como el número de enzimas que se utilicen. Aún así es capaz de detectar sólo una parte de los polimorfismos presentes en un gen. En el caso de la cepa Tul2 es difícilmente emprender un proyecto de secuenciación que abarque todo el repertorio de genes de que dispone el parásito. Por esta razón, y para tener una visión global pero real de los polimorfismos, se optó por un análisis de restricción, que pudo llevarse a cabo sobre un gran número de genes.

El elevado número de clones obtenidos también está en relación con los errores que suele introducir la Taq polimerasa.

La detección de un polimorfismo en un clon sobre un total de 53 haría pensar en un error durante la amplificación. Sin embargo, el hecho de encontrar esa misma variación en una amplificación independiente modificaría tal conclusión.

A modo de ejemplo, en la posición nº 4 de la extensión C-terminal se detectó una sustitución de alanina (A) por prolina (P). Al investigar la existencia de polimorfismos en el dominio catalítico se volvió a encontrar,



mediante el uso de la enzima de restricción Ava II, la misma sustitución en 2 de los 53 clones analizados. En este caso, estaríamos en presencia de un gen muy poco representado en el genoma del parásito o cuyo nivel de transcripción sea muy bajo.

Expresión de la cruzipaína en distintos estadios y cepas de *Trypanosoma cruzi*.

En *Trypanosoma cruzi* son numerosas las proteínas cuya expresión está regulada durante el ciclo de vida. Es un mecanismo que posee el parásito para adaptarse a las diferentes condiciones imperantes en el huésped vertebrado y en el insecto vector.

Tomemos como ejemplo a la *trans*-sialidasa, presente en *T. cruzi* y *T. brucei* (Frasch, 1994). Esta enzima, que ha sido involucrada en el proceso de invasión de la célula del mamífero, se expresa en el estadio trypomastigote, pero recientemente se la identificó en epimastigotes de cultivo en fase estacionaria. Sin embargo, la enzima de epimastigotes está codificada por otro gen y no tiene el dominio antigénico y repetitivo con el que cuenta la *trans*-sialidasa de trypomastigotes (Chaves *et al.*, 1993).

Los genes de los trypanosomátidos suelen estar repetidos. Las copias, a veces múltiples, se ubican una detrás de la otra y separadas por espacios intergénicos de tamaño variable. En el caso de la cruzipaína (Campetella *et al.*, 1992), las copias se encuentran, además, en distintos cromosomas. Las histonas H1 (Aslund *et al.*, 1994) y H3 (Bontempi *et al.*, 1994) representan un caso similar, aunque la última se encuentra codificada en un solo cromosoma.

Hemos demostrado que en la cepa Tul2 las numerosas copias del gen de la cruzipaína presentan polimorfismos que se traducen en cambios de la secuencia aminoacídica, especialmente en el extremo carboxilo de la extensión C-terminal. Las isoformas, producto de estas sustituciones y de modificaciones post-traduccionales, podrían expresarse diferencialmente a



través del ciclo de vida, así como lo hacen las *trans*-sialidasas de epimastigotes y trypomastigotes.

No conocemos qué proceso evolutivo dio origen a las isoformas ni tampoco su ubicación cromosómica, pero podría suceder que los genes de un determinado cromosoma se expresen en un estadio y no en otro, en respuesta a señales actuantes sobre distintas secuencias promotoras.

Lamentablemente no fue posible estudiar la expresión diferencial de los genes de cruzipaína a lo largo del ciclo de vida en la cepa Tul2 por la dificultad en la obtención de amastigotes y trypomastigotes en esta cepa.

Hubiese sido interesante completar su caracterización buscando isoformas que fueran características de un determinado estadio.

Por lo tanto, nuestros esfuerzos se centraron en el análisis de la expresión de la cruzipaína en todos los estadios del ciclo de vida de la cepa RA y en epimastigotes y trypomastigotes metacíclicos del clon Sylvio X-10/7. Esta elección permitió realizar, además, un estudio comparativo de la expresión de la enzima en diferentes cepas del parásito.

En experimentos de detección de la actividad proteolítica en geles con sustrato incorporado (figuras 34 y 35) y en ensayos de Western Blot con el suero Rab2 (figura 36), RA y Sylvio X-10/7 mostraron importantes diferencias con la cepa Tul2.

En epimastigotes, las bandas de actividad en geles 7,5% fueron únicas, de distinto peso molecular aparente, y se ubicaron en el mismo rango de peso molecular que las 4 bandas detectadas en la cepa Tul2. Los resultados obtenidos con esta técnica sugerirían que la cruzipaína presente en RA y Sylvio X-10/7 podría ser una de las isoformas existentes en Tul2.

Sin embargo, la aparición de una doble banda de distinta movilidad en amastigotes y trypomastigotes de la cepa RA complica el análisis.

Los ensayos de Western Blots también detectaron diferencias de tipo cuantitativo y cualitativo, aunque las bandas generadas por epimastigotes de la cepa Tul2 y del clon Sylvio X-10/7 fueron similares.



En síntesis, las variaciones en las bandas de actividad y en las detectadas por el antisuero Rab2 en los distintos estadíos y cepas argumentan a favor de la expresión diferencial de la cruzipaína.

Las evidencias bioquímicas dieron paso al análisis de los genes involucrados en los fenómenos descriptos.

Las endonucleasas Msp I y BstU I se utilizaron en primer término para detectar eventuales polimorfismos en los genes de cruzipaína de RA y Sylvio X-10/7. El objetivo fue comparar los resultados con aquellos obtenidos en la cepa Tul2.

RA y Sylvio X-10/7 pertenecieron ambas al grupo A1 detectado por Msp I en la cepa Tul2. En el caso de Sylvio X-10/7, un solo clon de trypomastigotes metacíclicos, sobre un total de 18, perteneció al grupo A2.

BstU I no detectó diferencias en la cepa RA: todos los clones pertenecieron al grupo X2, también descripto en Tul2. En tanto, Sylvio X-10/7 presentó un polimorfismo en la región Pro de la cruzipaína, que no había sido identificado en la cepa Tul2, en 6 de los 18 clones analizados (grupo X4).

Estos estudios, que fueron efectuados sobre genes completos de cruzipaína obtenidos por amplificación a partir de ADN genómico de RA y Sylvio X-10/7, indican que la extensión C-terminal no presenta los polimorfismos hallados en la cepa Tul2.

Como puede apreciarse en la figura 41, la secuenciación completa de la extensión C-terminal en 14 clones de cruzipaína provenientes de distintos estadíos de la cepa RA, ratificó la ausencia de triptofano (W) en la posición nº 93 y de arginina (R) en la posición nº 103. Ambas sustituciones habían sido detectadas en Tul2 por las endonucleasas Msp I y BstU I.



	1				45
Ct1	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct2	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct3	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct10	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct6	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct4	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct5	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct7	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLQT
Ct8	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct9	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct11	SAVVGGPGAT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACS	VGCENVTLPT
Ct12	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Ct13	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
cruzip 4	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
cruzip 2	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
Aslund et al	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPCPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
cruzipain2	SAVVGGPGTT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACS	VGCENVTLPT
cruzain	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
czp1	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFA	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
czpA (ep)	SAVVGGPGTT	PETTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACS	VGCENVTLPT
czpB (tr)	SAVVGGPGAT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDVACI	VGCENVTLPT
czpC (am)	SAVVGGPGAT	PEPTTTTTTS	APGPSTSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
czpD (am)	SRVVGGPGAT	PEPTTTTTTS	APGPSPSCFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
czpE (tr)	SAVVGGPGAT	PEPTTTTTTS	APGPSPMYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
RA 2 (am)	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
RA 12 (am)	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
RA 14 (am)	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
RA 49 (ep)	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
RA 54 (ep)	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
RA 55 (ep)	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
RA 15 (met)	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
RA 23 (met)	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
RA 20 (tr)	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
RA 22 (tr)	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
RA 67 (tr)	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
RA 69 (tr)	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT
RA 72 (tr)	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTGAACI	VGCENVTLPT
RA 73 (tr)	SAVVGGPGPT	PEPTTTTTTS	APGPSPSYFV	QMSCTDAACI	VGCENVTLPT



Discusión

196

	46	95
Ct1	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFFTST HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct2	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFFTST HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct3	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFFTST HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct10	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
Ct6	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFFTST HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct4	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFFTST HCSGPSVRSS	VPLNQCNRPL
Ct5	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFFTST HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct7	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFFTST HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct8	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
Ct9	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFFTST HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct11	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
Ct12	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFFTST HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Ct13	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFFTST HCSGPSVRSS	APLNQCNRLL
cruzip 4	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
cruzip 2	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFFTST HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
Aslund et al	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFFTST HCSGPSVRSS	VPLNQCNRLL
cruzipain2	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
cruzain	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
czp1	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
czpA (ep)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNR
czpB (tr)	GQCLLTSGA SAIVTCGAET LTEEVFLTCT HCSGPSVRSS	V
czpC (am)	GQCLLTSGA SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
czpD (am)	GQCLLTSGR SAIVTCGAET LTEEVFLTCT HCSGPSVRSS	V
czpE (tr)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HSSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
RA 2 (am)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
RA 12 (am)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
RA 14 (am)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
RA 49 (ep)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
RA 54 (ep)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
RA 55 (ep)	GQCLLTSGV SAIVTCGTET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
RA 15 (met)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
RA 23 (met)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
RA 20 (tr)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
RA 22 (tr)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
RA 67 (tr)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
RA 69 (tr)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
RA 72 (tr)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL
RA 73 (tr)	GQCLLTSGV SAIVTCGAET LTEEVFLTST HCSGPSVRSS	VPLNKCNRLL



Discusión

197

	96	130	
Ct1	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS RHRRL*	8 clones
Ct2	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS RHRRL*	7 clones
Ct3	RGSVEFFRGS SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS RHRRL*	3 clones
Ct10	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	2 clones
Ct6	RGSVEFFRGS SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS RHRRL*	2 clones
Ct4	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS RHRRL*	1 clon
Ct5	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQCRYQPYQS RHRRL*	1 clon
Ct7	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS RHRRL*	1 clon
Ct8	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS RHRRL*	1 clon
Ct9	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	1 clon
Ct11	RGSVEFFRGS SSSGRLADVD	RQRRYQPYHS RHRRL*	1 clon
Ct12	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS RHRRL*	1 clon
Ct13	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS RHRRL*	1 clon
cruzip 4	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	
cruzip 2	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRYQPYQS RHRRL*	
Aslund et al	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRYQPYHS RHRRL*	
cruzipain2	RGSVEFFRGS NSSGRLADVD	RQRRYQPYHS RHRRL*	
cruzain	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	
czp1	RGSVEFFCGS SSSGRLADLD	RQRRYPYHS RHRRL*	
czpC (am)	RGS		
czpE (tr)	RGS		
RA 2 (am)	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	
RA 12 (am)	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	
RA 14 (am)	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	
RA 49 (ep)	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	
RA 54 (ep)	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	
RA 55 (ep)	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	
RA 15 (met)	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	
RA 23 (met)	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	
RA 20 (tr)	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	
RA 22 (tr)	RGSVEFFCGS GSSGRLADVD	RQRRYQPYHS RHRRL*	
RA 67 (tr)	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	
RA 69 (tr)	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	
RA 72 (tr)	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	
RA 73 (tr)	RGSVEFFCGS SSSGRLADVD	RQRRHQPYS RHRRL*	

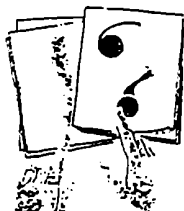


Figura 41: **Secuencias aminoacídicas de la extensión C-terminal de la cruzipaina de *Trypanosoma cruzi*.**

A continuación se detalla el origen de cada una de las secuencias y la forma en la que se obtuvo.

Ct1 a Ct13: Por PCR a partir de cDNA simple cadena de epimastigotes de la cepa Tul2.

cruzip-2 y cruzip-4: Por clonado a partir de DNA genómico de epimastigotes de la cepa Tul2 (Campetella *et al.*, 1992).

Aslund *et al.*: Por PCR a partir de una biblioteca de cDNA de epimastigotes de la cepa Tul2 (Aslund *et al.*, 1991).

cruzipain2: Por clonado a partir de una biblioteca de DNA genómico de epimastigotes del clon Dm28c (Lima *et al.*, 1994).

cruzain: Por clonado a partir de una biblioteca de DNA genómico de la cepa Tul2 (Eakin *et al.*, 1991).

czp1: Por clonado a partir de una biblioteca de cDNA de epimastigotes del clon Dm28c (Lima *et al.*, 1994).

czpA: Por PCR a partir de cDNA de epimastigotes del clon Dm28c (Lima *et al.*, 1994).

czpB y czpE: Por PCR a partir de cDNA de trypomastigotes de la cepa Y (Lima *et al.*, 1994).

czpC y czpD: Por PCR a partir de cDNA de amastigotes de la cepa Y (Lima *et al.*, 1994).

RA: Por PCR a partir de cDNA simple cadena de amastigotes, epimastigotes, trypomastigotes metacíclicos y trypomastigotes de cultivos celulares de la cepa RA.

En la cepa RA, la posición nº 4 de la extensión C-terminal está ocupada siempre por un residuo prolina (P), a diferencia de la sustitución por alanina (A) detectada en algunos clones de la cepa Tul2 y en los clones czp B, C, D y E (Lima *et al.*, 1994). Debe destacarse, sin embargo, que esta sustitución no ha sido detectada por secuenciación directa de la proteína, por lo que estos ARN mensajeros estarían presentes en una baja proporción o bien podrían ser escasamente traducidos.

Asimismo no se detectó la alternancia de leucina (L) y fenilalanina (F) en la posición nº 72 de la extensión C-terminal en la cepa Tul2 ni tampoco la alternancia de lisina (K) y glutamina (Q) en la posición nº 90.



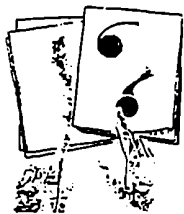
Por último, los residuos nº 120 y 124 fueron histidinas (H) en 13 de los 14 clones analizados. Sólo en el clon 22, amplificado a partir de trypomastigotes, se detectó un residuo tirosina (Y), presente en la mayoría de los clones obtenidos de la cepa Tul2.

Algunas sustituciones, como la de glicina (G) por ácido aspártico (D) en la posición nº 31 (RA 72 tr), la de treonina (T) por alanina (A) en la posición nº 63 (RA 55 ep), y la de glicina (G) por serina (S) en la posición nº 106 (RA 22 tr), podrían deberse a errores introducidos por la Taq polimerasa. Tales cambios de aminoácidos se detectaron solamente en un clon y no aparecieron en epimastigotes de la cepa Tul2, en clones de amastigotes y trypomastigotes de la cepa Y ni en epimastigotes del clon Dm28c (Lima *et al.*, 1994).

La casi ausencia de polimorfismos en la extensión C-terminal de la cruzipaína de la cepa RA hace prever una banda única o de menor grosor en geles de poliacrilamida que la banda ancha o doble banda que proporciona la cepa Tul2. No obstante, no podemos descartar que la N-glicosilación y las modificaciones post-traduccionales ubicadas sobre las treoninas nº 5 y nº 9 al 14 alteren el comportamiento de la proteína en la electroforesis.

La utilización de las enzimas de restricción Ava II, Rsa I y la combinación de Bgl I, EcoR V y Pst I (BEP), sobre genes de cruzipaína de la cepa Tul2, permitió detectar nuevos polimorfismos en el dominio catalítico además de los ya identificados en la extensión C-terminal.

Decidimos, entonces, probar estas endonucleasas sobre clones provenientes de los distintos estadios de la cepa RA y del clon Sylvio X-10/7, con el objeto de encontrar diferencias entre los estadios y entre las dos cepas analizadas.



La endonucleasa Rsa I detectó un polimorfismo en los distintos estadios de la cepa RA, pero no en el clon Sylvio X-10/7, en la posición nº 299 (dominio catalítico). Tal modificación se encontró en mayor proporción en epimastigotes -6 de los 18 clones-, en 4 clones en amastigotes y trypomastigotes metacíclicos y en sólo un clon de trypomastigotes.

Una sustitución similar, histidina (H) por tirosina (Y), ya había sido detectada en la posición nº 120 de la extensión C-terminal en 3 clones sobre un total de 38 en la cepa Tul2 (figura 38).

Los patrones proporcionados por la enzima de restricción Rsa I indican la existencia de dos poblaciones de genes y consecuentemente dos isoformas en la cepa RA.

La combinación BEP permitió diferenciar netamente a la cepa RA del clon Sylvio X-10/7, pero no a los distintos estadios del ciclo de vida. La diferencia se debe a la presencia o ausencia de un sitio de restricción para la enzima Pst I. Como resultado de este polimorfismo, los genes de cruzipaina del clon Sylvio X-10/7 tienen un residuo glicina en la posición nº 186, mientras que en la cepa RA encontramos un residuo serina. En la cepa Tul2 existen las dos isoformas, con predominancia de la primera (figura 39)

Finalmente, la enzima de restricción Ava II no identificó polimorfismo alguno, a diferencia de lo ocurrido en la cepa Tul2, en la cual 2 de los 38 clones analizados presentaron la sustitución de un residuo prolina por un residuo alanina en la posición nº 4 de la extensión C-terminal. En RA y Sylvio X-10/7 no se detectó esta variante (figura 40).



Discusión

NOTAS

CONCLUSIONES





Conclusiones

201

1- La cruzipaína, además de su rol en la digestión intracelular de proteínas, ha evidenciado ser antigénica en la infección natural con *Trypanosoma cruzi*, siendo la extensión C-terminal el blanco preferencial de los anticuerpos generados en la respuesta inmune.

2- La enzima cuenta con dos dominios; uno catalítico, con alta homología con la catepsina L, y una extensión C-terminal, ausente en mamíferos y carente de actividad proteolítica. Este modelo se basa en la comparación con otras cisteín proteinasas de trypanosomátidos y en los experimentos de inmunoprecipitación con retención o disminución de la actividad utilizando antisueros que reconocen exclusivamente a la extensión C-terminal o que, además, reconocen al dominio catalítico.

3- El carácter de glicoproteína de alta manosa hace que el peso molecular aparente de la cruzipaína en geles de poliacrilamida con SDS se aproxime asintóticamente al real (deducido de la secuencia de su gen) a medida que se aumenta el porcentaje de acrilamida.

4- El comportamiento electroforético de la cruzipaína en geles de poliacrilamida con SDS depende fuertemente de su estado de reducción y de la desnaturalización o no por calor, tratamientos que también inciden en la tinción, ya sea con Coomassie Blue o con nitrato de plata.

5- La extensión C- terminal puede obtenerse en estado de suma pureza (libre de trazas de cruzipaína intacta) mediante la filtración de la mezcla original de autoproteólisis en una columna de Superosa 12 en un equipo de FPLC.



6- Las siete treoninas ubicadas en el extremo N-terminal de la extensión C-terminal están modificadas post-traduccionamente, sin conocerse aún cuál es el tipo de modificación presente. En tanto, los experimentos realizados demostraron la ausencia de O-glicosilación y de fosforilación.

7- La extensión C-terminal cuenta con ocho residuos de cisteína, la mayoría o todos ellos involucrados en la formación de puentes disulfuro.

8- Los ensayos de actividad proteolítica en geles con sustrato incorporado muestran que en la cepa Tul2 de *Trypanosoma cruzi* la cruzipaína es un complejo conjunto de isoformas.

9- La extensión C-terminal presenta variaciones en su secuencia aminoacídica, localizadas principalmente en la porción carboxilo terminal, que serían fuente de las mencionadas isoformas. Una de ellas es la alternancia, aproximadamente en un 50% de los clones analizados, de un residuo de triptofano y de arginina. Otra consiste en el reemplazo de un residuo de cisteína por otro de arginina en un 10% de los clones analizados, con el consiguiente posible efecto sobre la estructura espacial de la extensión C-terminal.

10- El punto isoelectrico de la extensión C-terminal, deducido de la secuencia aminoacídica, varía entre 7 y 8. Estos valores podrían verse modificados por el aporte de modificaciones post-traduccionales, tales como las presentes en las treoninas del extremo N-terminal. El punto isoelectrico de la enzima madura es netamente ácido, variando entre 4,7 y 5,4; y el valor del punto isoelectrico de la catepsina L humana, carente de la extensión C-terminal y altamente homóloga al dominio catalítico de la cruzipaína, es de 6.



11- El dominio catalítico de la cruzipaína de la cepa Tul2 también muestra variaciones en su secuencia de aminoácidos, que han sido detectadas mediante la secuenciación de los sitios polimórficos hallados en un análisis previo con enzimas de restricción.

12- La detección de la cruzipaína con antisueros específicos y los ensayos de actividad en geles con sustrato incorporado demuestran que la expresión de la cisteín proteinasa varía cualitativa y cuantitativamente entre distintas cepas y estadios de desarrollo del parásito, y que en particular es la cepa Tul2 la que parece expresar mayor cantidad de isoformas de la enzima.

13- La secuenciación parcial de genes codificantes de cruzipaína pertenecientes a distintas cepas y estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* permite asegurar, en concordancia con los ensayos de carácter bioquímico, que la cruzipaína de la cepa Tul2 es la que presenta el mayor número de cambios de aminoácidos en su secuencia.

14- La secuenciación completa del ADN correspondiente a la extensión C-terminal de la cruzipaína de la cepa RA de *T. cruzi* (en los cuatro estadios del ciclo de vida) demuestra su menor grado de polimorfismo en comparación con la cepa Tul2.

BIBLIOGRAFIA

Affranchino, J.L., Ibañez, C.F., Luquetti, A.O., Rassi, A., Reyes, M.B., Macina, R.A., Åslund, L., Pettersson, U. and Frasch, A.C.C. (1989). Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas disease. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **34**, 221-228.

Affranchino, J.L., Pollevick, G.D. and Frasch, A.C.C. (1991). The expression of the major shed *Trypanosoma cruzi* antigen results from the developmentally-regulated transcription of a small gene family. **FEBS Lett.**, **280**, 316-320.

Afonso, L.C.C., Scharon, T.M., Vieira, L.Q., Wysocka, M., Trinchieri, G. and Scott, P. (1994). The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. **Science**, **263**, 235-237.

Allore, R.J. and Barber, B.H. (1984). A recommendation for visualizing disulfide bonding by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. **Anal. Biochem.**, **137**, 523-527.

Andrews, N.W., Abrams, C.K., Slatin, S.L., Griffiths, G. (1990). A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, **61**, 1277-1287.

Andrews, N.W. (1993). Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. **Biol. Res.**, **26**, 65-67.

Åslund, L., Henriksson, J., Campetella, O., Frasch, A.C.C., Pettersson, U. and Cazzulo, J.J. (1991). The C-terminal extension of the major cysteine proteinase (Cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **45**, 345-348.

Åslund, L., Carlsson, L., Henriksson, J., Rydaker, M., Toro, G.C., Galanti, N. and Pettersson, U. (1994). A gene family encoding heterogeneous histone H1 proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **65**, 317-330.

Authié, E. (1994). Trypanosomiasis and trypanotolerance in cattle: a role for congopain? **Parasitol. Today**, **10**, 360-364.

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

Avila, J.L. (1983). New rational approaches to Chagas' disease chemotherapy. **Interciencia**, **8**, 405-417.

Avila, J.L. in Subcellular Biochemistry, Volume 18, Intracellular Parasites. Cap 6, "Intracellular digestion of endocytosed proteins as a source of amino acids for protein synthesis in *Trypanosoma cruzi*" pag 189-234. Plenum Press, New York and London, 1992. Edited by J.L. Avila and J.R. Harris.

Baker, D., Shiau, A.D. and Agard, D.A. (1993). The role of pro regions in protein folding. **Curr. Op. in Cell Biol.**, **5**, 966-970.

Baranski, T.J., Faust, P.L., Kornfeld, S. (1990). Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. **Cell**, **63**, 281-291.

Barrett, A.J. and McDonald, J.K. (1980). Mammalian proteases: a glossary and bibliography, vol 1, London: Academic Press.

Barrett, A.J. (1987). The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. **TIBS**, **12**, 301-304.

Basombrío, M.A. and Arredes, H. (1987). Long-term immunological response induced by attenuated *Trypanosoma cruzi* in mice. **J. Parasitol.**, **73**, 236-238.

Bode, W. and Huber, R. (1991). Ligand binding: proteinase-protein inhibitor interactions. **Curr. Op. Struct. Biol.**, **1**, 45-52.

Bonaldo, M.C., Scharfstein, J., Murta, A.C.M. and Goldenberg, S. (1991). Further characterization of *Trypanosoma cruzi* GP57/51 as the major antigen expressed by differentiating epimastigotes. **Parasitol. Res.**, **77**, 567-571.

- Bonaldo, M.C., D'Escoffier, L.N., Salles, J.M. and Goldenberg, S. (1991). Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Exp. Parasitol.**, **73**, 44-51.
- Bond, J.S. and Butler, P.E. (1987). Intracellular proteases. **Ann. Rev. Biochem.**, **56**, 333-364.
- Bongertz, V. and Hungerer, K.D. (1978). *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of a protease. **Exp. Parasitol.**, **45**, 8-18.
- Bontempi, E., Franke de Cazzulo, B.M., Ruiz, A.M. and Cazzulo, J.J. (1984). Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **77B**, 599-604.
- Bontempi, E. and Cazzulo, J.J. (1990). Digestion of human immunoglobulin G by the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.** **70**, 337-342.
- Bontempi, E.J., Porcel, B.M., Henriksson, J., Carlsson, L., Rydaker, M., Segura, E.L., Ruiz, A.M. and Pettersson, U. (1994). Genes for histone H3 in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **66**, 147-151.
- Borst, P. (1986). Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. **Annu. Rev. Biochem.** **55**, 701-732.
- Borst, P. (1991). Why kinetoplast DNA networks? **TIG**, **7**, 139-141.
- Borst, P. and Nussenzweig, V. (1992). Molecular parasitology at Woods Hole. **Cell**, **71**, 895-899.
- Bowden, G.A., Paredes, A.M. and Georgiou, G. (1991). Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Biotechnology**, **9**, 725-730.

- Burnette, N.W. (1981). "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.**, **112**, 195-203.
- Brabin, L. (1993). *Trypanosoma cruzi* infection in women. **Parasitol. Today**, **9**, 198-199.
- Branden, C. and Tooze, J., (1991). Introduction to Protein Structure. Cap 15: An example of enzyme catalysis: serine proteinases. Garland Publishing, Inc. New York and London, 1991.
- Campetella, O., Henriksson, J., Åslund, L., Frasch, A.C.C., Pettersson, U., and Cazzulo, J.J. (1992). The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **50**, 225-234.
- Campetella, O., Sánchez, D., J.J. Cazzulo and Frasch, A.C.C. (1992). A superfamily of *Trypanosoma cruzi* surface antigens. **Parasitol. Today**, **8**, 378-381.
- Cardelli, J.A., Golumbeski, G.S. and Dimond, R.L. (1986). Lysosomal enzymes in *Dictyostelium discoideum* are transported to lysosomes at distinctly different rates. **J. Cell. Biol.**, **102**, 1264-1270.
- Carlomagno, M., Cura, E., Pérez, A.C. y Segura, E. (1989). Informe sobre Chagas. **Ciencia Hoy**, **1**, 37-44.
- Carrell, R.W. and Lesk, A.M., (1994). A tale of two proteinases. **Struct. Biol.**, **1**, 492-494.
- Carvalho, T.U. and De Souza, W. (1983). Separation of amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from cultured cells. **Zentbl. Bakt. Parasitenkunde Abt. I**, **69**, 571-575.
- Cazzulo, J.J. and Franke de Cazzulo, B.M. (1982). Proteolytic activity on endogenous substrates in cell-free extracts of *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, **38**, 1335-1337.

- Cazzulo J.J., Franke de Cazzulo, B.M., Engel, J.C. and Cannata, J.J.B. (1985). End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in Trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **16**, 329-334.
- Cazzulo, J.J., Couso, R., Raimondi, A., Wernstedt, Ch. and Hellman, U. (1989). Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **33**, 33-42.
- Cazzulo, J.J., Hellman, U., Couso, R. and Parodi, A.J.A. (1990a). Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Absence of phosphorylated mannose residues. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **38**, 41-48.
- Cazzulo, J.J. In Biochemical Protozoology. Cap.17, "Proteinases of *Trypanosoma cruzi*" pag. 191-199. Edited by G. Coombs and M.J. North. Taylor & Francis. London. Washington DC. 1991.
- Cazzulo, J.J. and Frasch, A.C.C. (1992). SAPA/*trans*-sialidasa and cruzipain: two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. **FASEB J.**, **6**, 3259-3264.
- Cazzulo, J.J. (1994). Intermediate metabolism en *Trypanosoma cruzi*. **J. Bioenerg. Biomemb.**, **26**, 157-164.
- Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. (1986a). Carbohydrate analysis. A practical approach. IRL Press Limited, 1986, cap. 5, pag 148.
- Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. (1986b). Carbohydrate analysis. A practical approach. IRL Press Limited, 1986, cap. 5, pag 200.
- Chaves, L.B., Biones, M.R.S. and Schenkman, S. (1993). *Trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **61**, 97-106.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, **162**, 156-159.

Chung H.M., Lee, M.G.S. and Van der Ploeg, L.H.T. (1992). RNA polymerase I-mediated protein-coding gene expression in *Trypanosoma brucei*. **Parasitol. Today**, **8**, 414-418.

Ciechanover, A. and Schwartz, A.L. (1994). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. **FASEB J.**, **8**, 182-191.

Clark, P. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eucaryotic DNA polymerases. **Nuc. Ac. Res.**, **16**, 9677-9686.

Colli, W. (1993). *Trans*-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. **FASEB J.**, **7**, 1257-1264.

Covello, P.S. and Gray, M.W. (1993). On the evolution of RNA editing. **TIG**, **9**, 265-268.

Cox, F.E.G. (1993). *Modern Parasitology. A Textbook of Parasitology*. Blackwell Scientific Publications. Second Edition.

Cruz, A. and Beverley, S.M. (1990). Gene replacement in parasitic protozoa. **Nature**, **348**, 171-173.

Cunha e Silva, N.L. and De Souza, W. (1993). *Trypanosoma cruzi*: Identification and localization of the LDL receptor. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **88**, 102.

Dalbey, R.E. and von Heijne, G. (1992). Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes- a new protease family. **TIBS**, **17**, 474-478.

De Sousa, M.A. (1983). A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-cellulose columns. **Mem. Inst. O. Cruz**, **83**, 123-133.

- Dietrich, P., Soares, M.B., Affonso, M.H.T. and Floeter-Winter, L.M. (1993). The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. **Gene**, **125**, 103-107.
- Dombroski, A.J., Walter, W.A., Record, M.T.Jr., Siegele, D.A. and Gross, C.A. (1992). Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma⁷⁰ exhibit specificity of binding to promoter DNA. **Cell**, **70**, 501-512.
- Dragon, E.A., Sias, S.R., Kato, E.A. and Gabe, J.D. (1987). The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. **Mol. Cell. Biol.**, **7**, 1271-1275.
- Eakin, A.E., Bouvier, J., Sakanari, J.A., Craik, C.S. and Mc Kerrow, J.H. (1990). Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteinases from protozoan parasites. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **39**, 1-8.
- Eakin A.E., Mills, A.A., Harth, G., McKerrow, J.H. and Craik, C.S. (1992). The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, **267**, 7411-7420.
- Eakin, A.E., McGrath, M.E., McKerrow, J.H., Fletterick, R.J. and Craik, C.S. (1993). Production of crystallizable cruzain, the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, **268**, 6115-6118.
- Engel, J.C., Doyle, P.S. and Dvorak, J.A. (1985). *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of clones derived from chronic chagasic patients. II. Quantitative analysis of the intracellular cycle. **J. Protozool.**, **32**, 80-83.
- Engman, D.M., Sias, S.R., Gabe, J.D., Donelson, J.E. and Dragon, E.A. (1989). Comparison of HSP70 genes from two strains of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **37**, 285-288.
- Etges, R. and Bouvier, J. In Biochemical Protozoology. Cap.20, "The promastigote surface proteinase of *Leishmania*" Edited by Graham Coombs and Michael North. Taylor & Francis. London. Washington DC. 1991.

- Fraindenraich, D., Peña, C., Isola, E.L., Lammel, E.M., Coso, O., Díaz Añel, A., Pongor, S., Baralle, F., Torres, H.N. and Flawiá, M.M. (1993). Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an α D-globin fragment from *Triatoma* hindgut: Effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, **90**, 10140-10144.
- Franke de Cazzulo, B.M., Martínez, J., North, M.J., Coombs, G.H. and Cazzulo, J.J. (1994). Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.**, **124**, 81-86.
- Frasch, A.C.C. and Reyes, B.M. (1990). Diagnosis of Chagas disease using recombinant DNA technology. **Parasitol. Today**, **6**, 137-140.
- Frasch, A.C.C., Cazzulo, J.J., Åslund, L. and Pettersson, U. (1991). Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. **Parasitol. Today**, **7**, 148-151.
- Frasch, A.C.C. (1994). Trans-sialidases in the insect-vector stages of african and american trypanosomes. **Parasitol. Today**, **10**, 170-171.
- Greig, S. and Ashall, F. (1990). Electrophoretic detection of *Trypanosoma cruzi* peptidases. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **39**, 31-38.
- Gutter, M.G. (1994). Proteinase inhibitors: another new fold. **Structure**, **2**, 575-576.
- Hadjuk S.L., Harris, M. and Pollard, V. (1993). RNA editing in kinetoplastid mitochondria. **FASEB J.**, **7**, 54-63.
- Hames, B.D., and Rickwood, R., (1990). **Gel electrophoresis of proteins. A practical approach.** IRL Press, Oxford pp. 16-22 and 53-65.
- Hariharan, S., Ajioka, J. and Swindle, J. (1993). Stable transformation of *Trypanosoma cruzi*: inactivation of the PUB 12.5 polyubiquitin gene by targetted gene disruption. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **57**, 15-30.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

Harris, E.L.V. and Angal, S. (1990). Protein purification applications. A practical approach. Oxford University Press, 1990, cap. 5, pág 88.

Harris, R.J., Ling, V.T. and Spellman, M.W. (1992). O-linked fucose is present in the first epidermal growth factor domain of factor XII but not protein C. **J. Biol. Chem.**, **267**, 5102-5107.

Harth, G., Andrews, N., Mills, A.A., Engel, J.C., Smith, R. and McKerrow J.H. (1993). Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **58**, 17-24.

Hartley, D.L. and Kane, J.F. (1988). In "Recovery and reactivation of recombinant proteins". **Bioch. Soc. Trans.**, **16**, 101-115.

Healy, N., Greig, S., Enahoro, H., Roberts, H., Drake, L., Shaw, E. and Ashall, F. (1992). Detection of peptidases in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes using chromogenic and fluorogenic substrates. **Parasitol.**, **104**, 315-322.

Hellman, U., Wernstedt, Ch. and Cazzulo J.J. (1991). Self proteolysis of the cysteine proteinase, cruzipain, from *Trypanosoma cruzi* gives a major fragment corresponding to its carboxy-terminal domain. **Mol. Biochem., Parasitol.** **44**, 15-22.

Hinnebusch, A. and Hochstrasser, M. (1993). Post-transcriptional processes. Editorial overview. **Curr. Op. in Cell Biol.**, **5**, 941-943.

Ibañez, C.F., Affranchino, J.L. and Frasch, A.C.C., (1987). Antigenic determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **25**, 175-184.

Ibañez, C.F., Affranchino, J.L., Macina, R.A., Reyes, M.B., Leguizamón, S., Camargo, M.E., Åslund, L., Pettersson, U. and Frasch, A.C.C. (1988). Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **30**, 27-34.

Itow, S. and Camargo, E.P. (1977). Proteolytic activities in cell extracts of *Trypanosoma cruzi*. **J. Protozool.**, **24**, 591-95.

Jeronimo, S.M.B. and Pearson, R.D. in Subcellular Biochemistry, volume 18, Intracellular Parasites. Cap 1, "The Leishmania. Protozoans adapted for extracellular and intracellular survival". pag 1-37. Plenum Press, New York and London, 1992. Edited by Avila J.L. and Harris, J.R.

Kapler, G.M., Zhang, K. and Beverley, S.M. (1990 a). Nuclease mapping and DNA sequence analysis of transcripts from the dihydrofolate reductase-thymidilate synthase (R) region of *Leishmania major*. **Nucl. Acids. Res.**, **18**, 6399-6408.

Kapler, G.M., Coburn, C.M. and Beverley S.M. (1990). Stable transfection of the human parasite *Leishmania* delineates a 30 kb. region sufficient for extrachromosomal replication and expression. **Mol. Cell Biol.**, **10**, 1084-1094.

Keller, G.A., Krisans, S., Gould, S.J., Sommer, J.M., Wang, C.C., Schliebs, W., Kunau, W., Brody, S. and Subramani, S. (1991). Evolutionary conservation of a microbody targeting signal that targets proteins to peroxisomes, glyoxysomes, and glycosomes. **J. Cell. Biol.**, **144**, 893-904.

Kelly, J.M., Ward, H.M., Miles, M.A. and Kendall, G. (1992). A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucl. Acids. Res.**, **20**, 3963-3969.

Kierszenbaum, F. (1986). Autoimmunity in Chagas disease. **J. Parasitol.**, **72**, 201-211.

Knop, M., Schiffer, H.H., Rupp, S. and Wolf, D.H. (1993). Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. **Curr. Op. in Cell Biol.**, **5**, 990-996.

Koelsch, G., Mares, M., Metcalf, P. and Fusek, M. (1994). Multiple functions of pro-peptides of aspartic proteinase zymogens. **FEBS Lett.**, **343**, 6-10.

Kornfeld, S. (1992). Structure and function of the mannose-6-phosphate/insuline like growth factor II receptors. **Annu. Rev. Biochem.**, **61**, 307-330.

Krettli, A., Thomas, N. and Eisen, H. (1980). Escape mechanisms of *Trypanosoma cruzi* from the host immune system. In Israel, L., Lagrange, P. and Salomon, J.C. (Eds) *Les Colloques de l'INSERM. Cancer Immunology and Parasite Immunology*, vol 97, 553-558, Paris: INSERM.

Laban, A., Tobin, J.F., de G. Lafaille, M.A.C. and Wirth, D.F. (1990). Stable expression of the bacterial neoR gene in *Leishmania enriettii*. **Nature**, **343**, 572-574.

Laboratory Manual. Advanced PCR course: Fluorescent DNA sequencing, microsatellite analysis and quantitative PCR. Department of Medical Genetics, Biomedical Center, Uppsala University. Perkin-Elmer AB, 1994.

Labriola, C., Sousa, M. and Cazzulo J.J., (1993). Purification of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* by affinity chromatography. **Biol. Res.**, **26**, 101-107.

Labriola, C. and Cazzulo J.J. Rangelipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma rangeli*: purification and characterization. Enviado a publicación.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**, 680-685.

Laird, P.W. (1989). *Trans*-splicing in trypanosomes-archaism or adaptation? **TIG**, **5**, 204-208.

LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L. and Beverley, S.M. (1993). Coupling of poly(A) site selection and *trans*-splicing in *Leishmania*. **Gen. & Dev.**, **7**, 996-1007.

Lee, M.G.S. and van der Ploeg, L.H.T. (1990). Homologous recombination and stable transfection in the parasitic protozoan *Trypanosoma brucei*. **Science**, **250**, 1583-1587.

Leguizamón, M.S., Campetella, O.E., Reyes, M.B., Ibañez, C.F., Basombrío, M.A., Rincón, J., Orn, A. and Frasch, A.C.C. (1991). Bloodstream *Trypanosoma cruzi* parasites from mice simultaneously express antigens that are markers of acute and chronic human Chagas disease. **Parasitol.**, **102**, 379-385.

Levin, M.J., Mesri, E., Benarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Chiale, P., Ruiz, A., Kahn, A., Rosembaum, M., Torres, H.N. and Segura, E.L. (1989). Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas "heart disease". **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **41**, 530-539.

Levin, M.J., Vazquez, M., Kaplan, D. and Schijman, A.G. (1993). The *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein family: classification and antigenicity. **Parasitol. Today**, **9**, 381-384.

Ley, V., Robbins, E.S., Nussenzweig, V. and Andrews, N. (1990). The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **J. Exp. Med.**, **171**, 401-403.

Lima, A.P.C.A., Tessier, D.C., Thomas, D.Y., Scharfstein, J., Storer, A.C. and Vernet, T. (1994). Identification of new cysteine protease gene isoforms in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **67**, 333-338.

Lonsdale-Eccles, J.D. and Mpimbaza, G.W.N. (1986). Thiol dependent proteases of african trypanosomes. Analysis by electrophoresis in sodium sulphate/polyacrylamide gels co-polymerized with fibrinogen. **Eur. J. Biochem.**, **155**, 469-473.

Lonsdale-Eccles, J.D. In Biochemical Protozoology. Cap.18, "Proteinases of African trypanosomes". pag. 200-207. Edited by G. Coombs and M.J. North. Taylor & Francis. London. Washington DC. 1991.

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

Macina, R.A., Affranchino, J.L., Pollevick, G.D., Jazín, E. and Frasch, A.C.C. (1989). Variable number of repeat units in genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. **FEBS Lett.**, **257**, 365-368.

Madoery, R.J. y Madoery, C. (1992). Período intermedio de la enfermedad de Chagas; en "Actualizaciones en la enfermedad de Chagas", Simposio satélite, Córdoba, Noviembre de 1992. pag. 51-56.

Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. and Collins, F.S. (1991). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. **Nucl. Acids. Res.**, **19**, 1154.

Marston, F.A.O. (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. **Biochem. J.**, **240**, 1-12.

Mason, R.W. In Biochemical Protozoology. Cap 14, "Proteinases of mammals: an overview". pag 168-179. Edited by G. Coombs and M.J. North. Taylor & Francis. London. Washington DC. 1991.

Matthews, K.R., Tschudi, C. and Ullu, E. (1994). A common pyrimidine-rich motif governs *trans*-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Gen. & Dev.**, **8**, 491-501.

Mc Gadey, 1970. A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. **Histochemie**, **23**, 180-184.

Mc Intyre, G.F. and Erickson, A.H. (1991). Procathepsins L and D are membrane-bound in acidic microsomal vesicles. **J. Biol. Chem.**, **266**, 15438-15445.

Meirelles, N.L.M., Juliano, L., Carmona, E., Silva, S.G., Costa, E.M., Murta, A.C.M. and Scharfstein, J. (1992). Inhibitors of the major cystein proteinase (GP 57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **52**, 175-178.

Mendonça-Previato, L., Gorin, P.A.J., Braga, A.F., Scharfstein, J. and Previato, J.O. (1983). Chemical structure and antigenic aspects of complexes obtained from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemistry**, **22**, 4980-4986.

Metcalf, P. and Fusek, M. (1993). Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site. **EMBO J.**, **12**, 1293-1302.

Mitraki, A. and King, J. (1989). Protein folding intermediates and inclusion body formation. **Bio/Technology**, **7**, 690-697.

Morris, S.A., Tanowitz, H.B., Bilezikian, J.P. and Wittner, M. (1991). Modulation of host cell metabolism by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, **7**, 82-87.

Mottram, J.C., North, M.J., Barry, J.D. and Coombs, G.H. (1989). A cysteine proteinase cDNA from *Trypanosoma brucei* predicts an enzyme with an unusual C-terminal extension **FEBS Lett.**, **258**, 211-215.

Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K. and Ichihara, A., (1992). Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitin. **Nature**, **360**, 597-599

Murta, A.C.M., Persechini, P.M., Souto Padron, T., de Souza, W., Guimaraes, J.A. and Scharfstein, J. (1990). Structural and functional identification of GP 57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. **Mol. Biochem. Parasitol.** **43**, 27-38.

Nogueira N. and Cohn, Z. (1976). *Trypanosoma cruzi*: Mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **J. Exp. Med.**, **143**, 1402-1420.

North, M.J., Mottram, J.C. and Coombs, G.H. (1990a). Cysteine proteinases of parasitic protozoa. **Parasitol. Today**, **6**, 270-275.

North, M.J., Robertson, C.D. and Coombs, G.H. (1990b). The specificity of trichomonad cysteine proteinases analysed using fluorogenic substrates and specific inhibitors. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **39**, 183-194.

North, M.J. In Biochemical Protozoology. Cap.15, "Proteinases of parasitic protozoa: an overview". pag 180-185. Edited by G.Coombs and M.J. North. Taylor & Francis. London. Washington DC. 1991a.

North, M.J. In Biochemical Protozoology. Cap.21, "Proteinases of trichomonads and *Giardia*". pag 234-244. Edited by G. Coombs and M.J. North. Taylor & Francis. London. Washington DC. 1991b.

Oakley, B.R., Kirsch, D.R. and Morris, R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**, **105**, 361-363.

Okania, E.O., Stumpf, J.L. and Dusanic, D.G. (1982). Crossed-immunoelectrophoretic analyses of *Trypanosoma cruzi* epimastigote, metacyclic, and bloodstream forms. **Int. J. Parasitol.**, **12**, 251-256.

Opperdoes, F.R. (1988). Glycosomes may provide clues to the import of peroxisomal proteins. **TIBS**, **13**, 255-260.

Ortega-Barria, E. and Pereira, M.E.A. (1992). Entry of *Trypanosoma cruzi* into eukaryotic cells. **Infect. Ags. Dis.**, **1**, 136-145.

Otsu, K., Donelson, J.E. and Kirchoff, L.V. (1993). Interruption of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a protein encoding 14-amino acid repeats by targetted insertion of the neomycin phosphotransferase gene. **Mol. Biochem. Parasitol**, **57**, 317-330.

Overath P., Chaudhri, M., Steverding D. and Ziegelbauer, K. (1994). Invariant surface proteins in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. **Parasitol. Today**, **10**, 53-58.

Pamer, E.G., Davis, C.E. and So, M. (1991). Expression and deletion analysis of the *Trypanosoma brucei rhodesiense* cysteine protease in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **59**, 1074-1078.

Parham, P. (1992). Defence cuts begin to bite. **Nature**, **356**, 291-292.

Parodi, A.J., Pollevick, G.D., Mautner, M., Buschiazzi, A., Sanchez, D.O. and Frasch, A.C.C. (1992). Identification of the gene(s) coding for the trans -sialidase of *Trypanosoma cruzi*. **EMBO J.**, **11**, 1705-1710.

Parodi, A.J., Labriola, C. and Cazzulo J.J. (1995). The presence of complex-type oligosaccharides at the C-terminal domain glycosylation site of some molecules of cruzipain. **Mol. Biochem. Parasitol.**, en prensa.

Patnaik, P.K., Kulkarni, S.K. and Cross, G.A.M. (1993). Autonomously replicating single-copy episomes in *Trypanosoma brucei* show unusual stability. **EMBO J.**, **12**, 2529-2538.

Peterson, D.S., Wrightsman, R.A. and Manning, J.E. (1986). Cloning of a major surface-antigen gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat. **Nature**, **322**, 566-568.

Petry, K. and Eisen, H. (1989). Chagas disease. A model for the study of autoimmune diseases. **Parasitol. Today**, **5**, 111-116.

Pinto Dias, J.C. (1992). Situación actual de la enfermedad de Chagas en las Américas; en "Actualizaciones en la enfermedad de Chagas", Simposio satélite, Córdoba, Noviembre de 1992. pág. 1-11.

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

Pollevick, G.D., Affranchino, J.L., Frasch, A.C.C. and Sanchez, D.O. (1991). The complete sequence of SAPA, a shed acute phase antigen of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol**, **47**, 247-250.

Raimondi, A., Wernstedt, Ch., Hellman, U., and Cazzulo, J.J. (1991). Degradation of oxidised insulin A and B chains by the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.** **49**, 341-344.

Rangel, H.A., Araújo, P.M.F., Camargo, I.J.B., Bonfitto, M., Repka, D., Sakurada, J. and Atta, A.M. (1981a). Detection of a proteinase common to epimastigote, trypomastigote and amastigote of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Trop. Parasitol.**, **32**, 87-92.

Rangel, H.A., Araújo, P.M.F., Repka, D. and Costa, M.G. (1981b). *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of a proteinase. **Exp. Parasitol.**, **52**, 199-209.

Rawlings, N.D. and Barrett, A.J. (1993). Evolutionary families of peptidases. **Biochem. J.**, **290**, 205-218.

- Requena, J.M., López, M.C., Jimenez-Ruiz, A., de la Torre, J.C. and Alonso, C. (1988). A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma cruzi*. **Nuc. Ac. Res.**, **16**, 1393-1406.
- Reyes, B.M., Lorca, M., Muñoz, P. and Frasch, A.C.C. (1990). Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**, 2486-2850.
- Rivett, A.J. (1993). Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. **Biochem. J.**, **291**, 1-10.
- Rosenthal, P.J. In Biochemical Protozoology. Cap.24, "Proteinases of malaria parasites". pag 257-269. Edited by G. Coombs and M.J. North. Taylor & Francis. London. Washington DC. 1991.
- Ruiz, A.M., Esteva M., Cabeza Meckert, P., Laguens, R.P. and Segura, L. (1985). Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with subcellular fractions of *T. cruzi*. **Acta Trop.**, **42**, 299-309.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, **230**, 1350-1354.
- Sakanari, J.A., Staunton, C.E., Eakin, A.E., Craik, C.S. and McKerrow, J.H. (1989). Serine proteases from nematode and protozoan parasites: isolation of sequence homologs using generic molecular probes. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **86**, 4863-4867.
- Sambrook, J., Fritsch, E.T. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Santana, J.M., Grellier, P., Rodier, M.H., Schrevel, J. and Teixeira, A. (1992). Purification and characterization of a new 120 kDa alkaline proteinase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **187**, 1466-1473.

Schaffer, M.A. and Fischer, R.L. (1988). Analysis of mRNAs that accumulate in response to low temperature identifies a thiol protease gene in tomato. **Plant Physiol.**, **87**, 431-436.

Scharfstein, J., Rodrigues, M.M., Andrade Alves, C., de Souza, W., Previato J.O. and Mendonça-Previato, L. (1983) *Trypanosoma cruzi*: description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. **J. Immunol.** **131**, 972-976.

Scharfstein, J., Luquetti, A., Murta, A.C.M., Senna, M., Rezende, J.M., Rassi, A. and Mendonça-Previato, L. (1985). Chagas' disease serodiagnosis with purified GP25 antigen. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **34**, 1153-1159.

Scharfstein, J., Schechter, M., Senna, M., Peralta, J.M., Mendonça-Previato, L. and Miles, M.M. (1986). *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of a 57/51000 m.w. surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. **J. Immunol.**, **137**, 1336-1431.

Schein, C.H. (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. **Bio/Technology**, **7**, 1141-1147.

Schenkman, S. and Eichinger, D. (1993). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. **Parasitol. Today**, **9**, 218-222.

Schrével, J., Barrault, C., Grellier, P., Mayer, R. and Monsigny, M. In Biochemical Protozoology. Cap.25, "*Plasmodium* proteinases during the erythrocytic phase of infection". pag 270-280. Edited by G. Coombs and M.J. North. Taylor & Francis. London. Washington DC. 1991.

Scott, M.T. and Snary, D. (1979). Protective immunisation of mice using cell surface glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. **Nature**, **282**, 73-74.

Segrest, J.P. and Jackson, R.L. (1971). Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulphate. In Methods in Enzymology (Ginsburg, V., ed.), Academic Press, New York and London, Vol. 28B, 54-63.

- Seiwert, S.D. and Stuart, K. (1994). RNA editing: transfer of genetic information from gRNA to precursor mRNA in vivo. **Science.**, **266**, 114-117.
- Siebert, P.D. and Chenchik, A. (1993). Modified acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction method which greatly reduces DNA contamination. **Nucl. Acids. Res.**, **21**, 2019-2020.
- Smith, S.M. and Gottesman, M.M. (1989). Activity and deletion analysis of recombinant human cathepsin L expressed in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, **264**, 20487-20495.
- Souto-Padrón, T., Campetella, O., Cazzulo, J.J. and de Souza, W. (1990). Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. **J. Cell. Sci.**, **96**, 485-490.
- Souza, A.E., Waugh, S., Coombs, G.H. and Mottram, J.C. (1992). Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana* **FEBS Lett.**, **311**, 124-127.
- Stoka, V., Ritonja, A., Lenarcic, N., Dolenc, I., Cazzulo, J.J. and Turk, V. Cruzipaina y catepsinas L y S: similitudes en propiedades y estructura. **XXX Reunión Nacional de SAIB, Puerto Iguazú, 1994, resumen nº 437.**
- Tanaka, T., Kaneda, Y., Ijda, A. and Tanaka, M. (1994). Homologous cysteine proteinase genes located on two different chromosomes from *Trypanosoma rangeli*. **Int. J. Parasitol.**, **24**, 179-188.
- Tardieux, L., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J.A., Heuser, J. and Andrews, N.W. (1992). Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, **71**, 1117-1130.
- ten Asbroek, A.L.M.A., Ouellette, M. and Borst, P. (1990). Targetted insertion of the neomycin phosphotransferase gene into the tubulin gene cluster of *Trypanosoma brucei*. **Nature**, **348**, 174-175.

- Texeira, A.R.L. and Santana, J.M. (1989). *Trypanosoma cruzi*: endocytosis and degradation of specific antibodies by parasite forms. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **40**, 165-170.
- Tobin, J.F., Laban, A. and Wirth, D.F. (1991). Homologous recombination in *Leishmania enrietti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **88**, 2118-2121.
- Torruella, M., Franke de Cazzulo, B.M., Engel, J.C., Ruiz, A.M., Segura, E.L. and Cazzulo, J.J. (1981). *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: glutamate dehydrogenases and proteolytic activities. **Comp. Biochem. Physiol.**, **70B**, 463-468.
- Turk, V. and Bode, W., (1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Lett.**, **285**, 213-219.
- Uemura, H., Schenkman, S., Nussenzweig, V. and Eichinger, D. (1992). Only some members of a gene family in *Trypanosoma cruzi* encode proteins that express both *trans*-sialidase and neuraminidase activities. **EMBO J.**, **11**, 3837-3844.
- Twining, S.S. (1994). Regulation of proteolytic activity in tissues. **Crit. Rev. in Biochem. Mol. Biol.**, **29**, 315-383.
- Vainstein, M.H., Alves, S.A., de Lima, B.D., Aragao, F.J.L. and Rech, E.L. (1994). Stable DNA transfection in a flagellate trypanosomatid by microparticle bombardment. **Nucl. Acids. Res.**, **22**, 3263-3264.
- Vassella, E., Braun, R. and Roditi, I. (1994). control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in a procyclin expression site: a dual role for polypyrimidine tracts in trypanosomes? **Nucl. Acids. Res.**, **22**, 1359-1364.
- Verlinde, C.L.M.J. and Hol, W.G.J. (1994). Structure-based drug design: progress, results and challenges. **Structure**, **2**, 577-587.

Vernet, T., Khouri, H.E., Laflamme, P., Tessier, D.C., Musil, R., Salin, B.J. Gour, Storer, A.C. and Thomas D.Y. (1991). Processing of the papain precursor. Purification of the zymogen and characterization of its mechanism of processing. **J. Biol. Chem.**, **266**, 21451-21457.

Wada, K., Takai, T. and Tanabe, T. (1987). Amino acid sequence of chicken liver cathepsin L. **Eur. J. Biochem.**, **167**, 13-18.

Webster, P. and Russell, D.G. (1993). The flagellar pocket of trypanosomatids. **Parasitol. Today**, **9**, 201-206.

Wilkinson, D.L. and Harrison, R.G. (1991). Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Biotechnology.**, **9**, 443-448.

Wolf, D.H. (1992). Proteases as biological regulators. Introductory remarks. **Experientia**, **48**, 117-118.

Tesista: Lic. Javier A. Martínez

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Martínez', with a horizontal line drawn underneath.

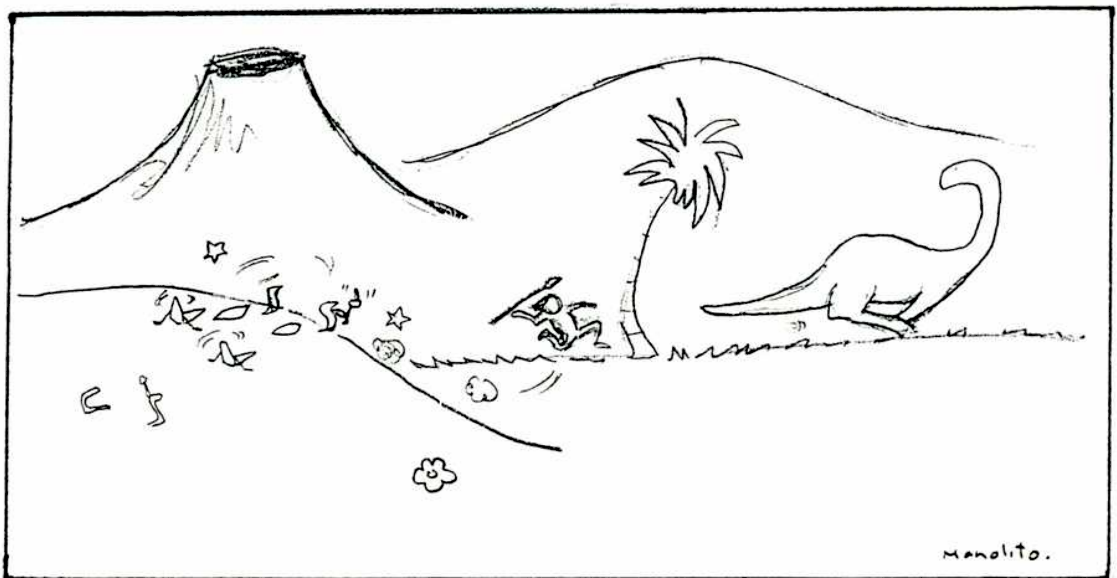
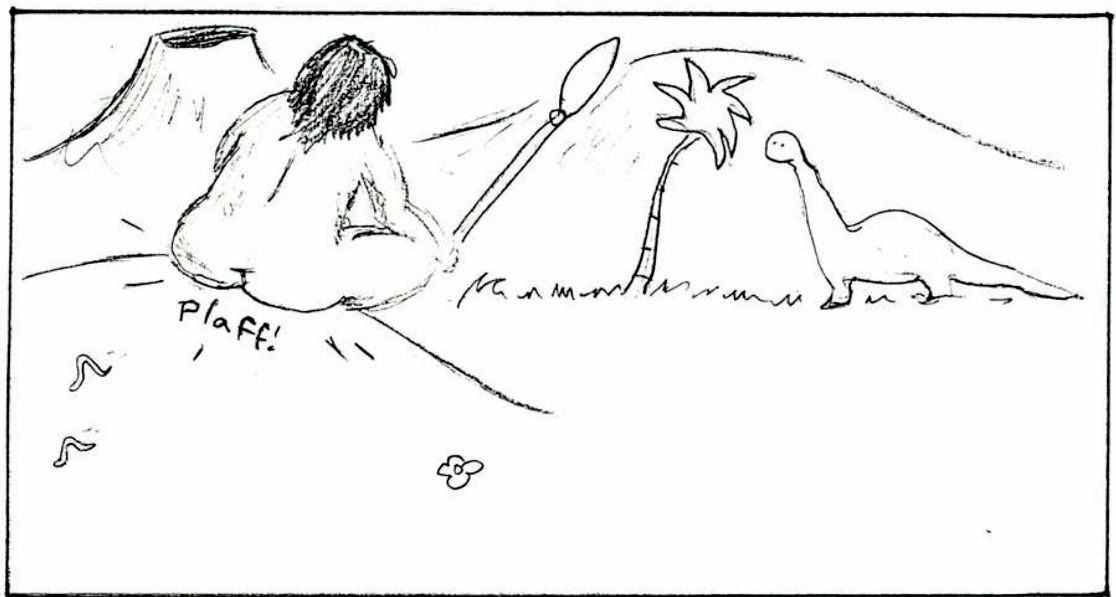
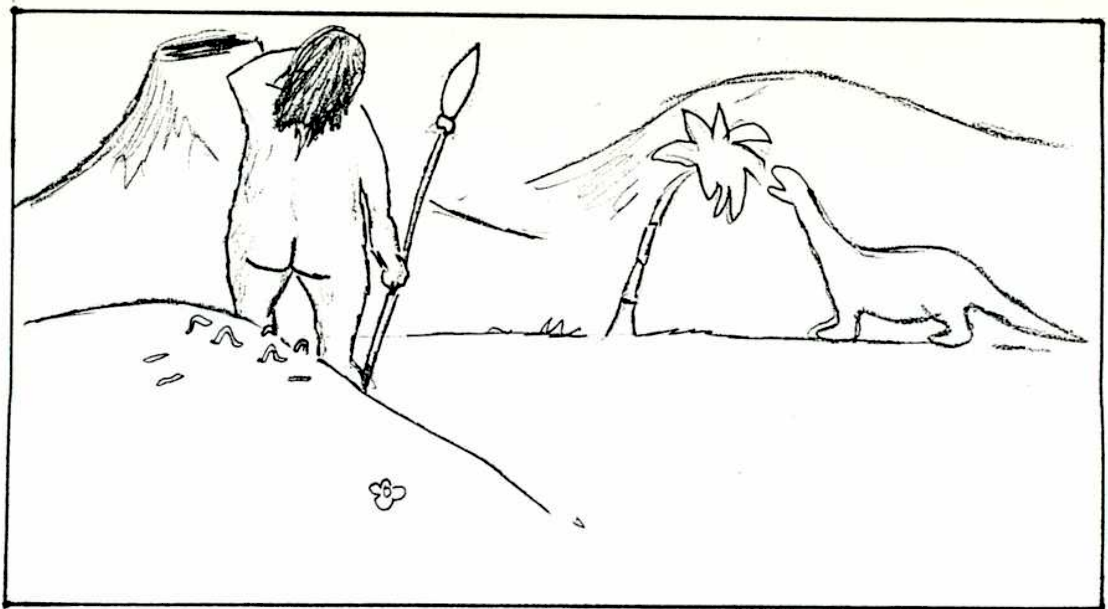
Director de Tesis: Dr. Juan José Cazzulo

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Cazzulo', with a horizontal line drawn underneath.

So, your period of postgraduate study is over, your thesis is complete, papers are written and the degree awarded. Take a moment to reflect on this phase of your life, and try to remember the person you were when you came to the laboratory. Realize just how many skills and new abilities you have acquired, largely through your own efforts. Recognize the role of your supervisor in this transformation.

You may find yourself working in a laboratory in which new graduate students are just starting out. Recall all the lessons that you learned the hard way, and try to help these new students to avoid making the same mistakes. But don't give them answers- offer advice that allows them to analyse the problem and provide their own solutions. This is the way you developed- do not deny them the same experience!

Robert J. Benyon, in "Postgraduate Study in the Biological Sciences. A Researcher's Companion."



Trypanosomas at the beginning were just kind and nice worms until they were threatened by a predator species

