

Tesis de Posgrado

Estudio de la serina hidroximetiltransferasa de tripanosomátidos (Crithidia Fasciculata y Trypanosoma cruzi) : Purificación y propiedades cinéticas y físico-químicas

Capelluto, Daniel G.S.

1997

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

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

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

Cita tipo APA:

Capelluto, Daniel G.S.. (1997). Estudio de la serina hidroximetiltransferasa de tripanosomátidos (Crithidia Fasciculata y Trypanosoma cruzi) : Purificación y propiedades cinéticas y físico-químicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2901_Capelluto.pdf

Cita tipo Chicago:

Capelluto, Daniel G.S.. "Estudio de la serina hidroximetiltransferasa de tripanosomátidos (Crithidia Fasciculata y Trypanosoma cruzi) : Purificación y propiedades cinéticas y físico-químicas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2901_Capelluto.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 la serina hidroximetiltransferasa de tripanosomátidos
(*Crithidia fasciculata* y *Trypanosoma cruzi*).
Purificación y propiedades cinéticas y físico-químicas.

Lic. Daniel G. S. Capelluto

Director: Prof. Dr. Joaquín J. B. Cannata

Co-Director: Prof. Dr. Juan J. Cazzulo

Departamento de Bioquímica Humana y Centro de Investigaciones
Bioenergéticas
Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires

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

- Marzo, 1997 -

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Studies on serine hydroxymethyltransferase from trypanosomatids
(*Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi*).
Purification and kinetic and physicochemical properties**

Lic. Daniel G. S. Capelluto

Director: Prof. Dr. Joaquín J. B. Cannata

Co-Director: Prof. Dr. Juan J. Cazzulo

**Departamento de Bioquímica Humana y Centro de Investigaciones
Bioenergéticas
Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires**

Thesis submitted for the Ph degree of the Buenos Aires University

- March, 1997 -

A Carla
Con todo mi amor

Lo conocido es finito, lo desconocido infinito; desde el punto de vista intelectual estamos en una pequeña isla en medio de un océano ilimitable de inexplicabilidad. Nuestra tarea en cada generación es recuperar algo más de tierra.

T.H. Huxley, 1887.

Al Dr. Joaquín J.B. Cannata, por la formación científica que he adquirido y por haberme inculcado la rigurosidad experimental para conseguir los resultados que he logrado.

Al Dr. Juan J. Cazzulo por contribuir con su experiencia al análisis de los resultados y por su plena disposición ante cualquier requerimiento.

Al Dr. Andrés O.M. Stoppani, por haberme brindado la posibilidad de realizar gran parte de este trabajo en el centro que él dirige.

A la Universidad de Buenos Aires y al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas, quienes me otorgaron las becas necesarias para la realización de este trabajo.

A las Dras. Berta Franke de Cazzulo y Esther Pahn por su colaboración en el cultivo de los parásitos.

Al Dr. José Santomé, a la Bioq. Evangelina Dacci y a la Lic. Susana Linskens por su colaboración en los experimentos de secuenciación de las proteínas

Al Dr. Ernesto Podestá, por el uso de los equipos de su laboratorio y por sus consejos.

A mis compañeros del CIBIERG: Dante Maugeri, Ana M. Biscardi, Patricia Carrizo, Sara del Valle, Silvia Fernandez Villamil, Graciela Gutierrez, Cristina Lincon, Marta Dubin, Pilar Molina Portela, Alejandra Verón y Natacha Witte por los gratos momentos compartidos y por la ayuda que me han brindado cuando la he requerido.

A mis compañeros del departamento de Bioquímica Humana:

A Cristina Paz y Carlos Mendez por su colaboración en la edición de esta Tesis.

A Fabiana Cornejo, Cora Cymering, Laura Dada, Paula Maloberti, Pablo Mele e Isabel Neuman por su colaboración en todo momento que lo he requerido.

A Adrián y Osvaldo por las charlas diurnas y nocturnas

Al ascensor para docentes de la Facultad de Medicina, por haber funcionado en los momentos críticos de mis experimentos.

A mis padres, suegros, hermanos y cuñados, quienes estuvieron siempre a mi lado y depositaron toda la confianza necesaria para que pueda salir adelante, especialmente en los momentos más difíciles de mi trabajo.

Y finalmente a Carla, que con su amor, su compañerismo, su constante iniciativa y sus conocimientos, hicieron posible que esta Tesis sea una realidad.

La serina hidroximetiltransferasa (SHMT) cataliza la interconversión de serina y glicina transfiriendo una unidad carbonada al tetrahidrofolato requerida para la síntesis de purinas, timidilato, metionina y colina. La mayor parte de las SHMTs estudiadas son dependientes de piridoxal-5'-fosfato (PLP). La SHMT en eucariontes existe como isoformas mitocondrial y citosólica, codificadas por genes diferentes. También ha sido demostrada una tercera SHMT, presente en cloroplastos. El presente trabajo es el primero que informa la purificación y caracterización de una SHMT a partir de tripanosomátidos y en particular, se demuestra la presencia de tres formas moleculares de la enzima (las cuales se designaron SHMT I, II y III) en *Crithidia fasciculata*. Las isoformas fueron purificadas a homogeneidad de acuerdo al análisis por SDS-PAGE. Los pesos moleculares nativos de las SHMTs I, II y III, calculados por el método de Andrews, dieron valores de 226, 173 y 211 kDa, respectivamente. Los pesos moleculares de sus subunidades fueron: 53,8, 50,7 y 51,7 kDa respectivamente, sugiriendo una estructura homotetramérica de las proteínas, coincidente con las SHMTs de hongos, plantas y mamíferos. Las tres isoformas fueron dependientes de PLP, aunque presentaron diferentes comportamientos cinéticos. También fue parcialmente purificada y caracterizada la SHMT de *Trypanosoma cruzi*. Se ha detectado una sola forma de la enzima en este parásito, utilizando la misma metodología. La SHMT, de 69 kDa, fue altamente inestable, aunque presentó, en algunos casos, similares propiedades a las estudiadas en *C.fasciculata*. Por otra parte, fue parcialmente purificado y caracterizado un inhibidor endógeno de la SHMT a partir de *T.cruzi*, similar al aislado de semillas de *Vigna radiata*.

Palabras claves: serina hidroximetiltransferasa; *Crithidia fasciculata*; *Trypanosoma cruzi*; purificación; inhibidor.

Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) catalyzes the interconversion of serine and glycine, with tetrahydrofolate serving as the C₁ acceptor, the latter is required for the biosynthesis of purines, thymidylate, methionine and choline. Most SHMTs studied require pyridoxal-5'-phosphate (PLP) as a cofactor. SHMT exists as both cytosolic and mitochondrial isoforms encoded by separate genes. A third isoform has been shown in chloroplasts from plants. The present work reports on the first isolation and characterization of SHMT from Trypanosomatids, and particularly the evidence for the presence of three isoforms of the enzyme (SHMTs I, II and III) in *Crithidia fasciculata*, which were purified to homogeneity according to SDS-PAGE analysis. The native molecular weight of SHMTs I, II and III, calculated by Andrews' method, gave values of 226, 173 and 211 kDa respectively. The subunit molecular weights of them were 53.8, 50.7 y 51.7 respectively, suggesting a homotetrameric structure, similar to those of yeast, fungi, plants and mammalian SHMTs. All molecular forms were dependent on PLP, but they exhibited different kinetic behaviour. We have also partially purified and characterized the SHMT from *Trypanosoma cruzi*; we have been able to detect only one molecular form from this source using the same method. The 69 kDa SHMT was very unstable, but it had similar properties to those of *C.fasciculata*. A naturally occurring inhibitor of SHMT in *T.cruzi* was also partially purified and characterized, and it was similar to that reported in *Vigna radiata* seedlings.

Key words: serine hydroxymethyltransferase; *Crithidia fasciculata*; *Trypanosoma cruzi*; purification; inhibitor.

A: adenina

a: radio de Stokes

ADP: adenosina difosfato

Alcohol DH: alcohol deshidrogenasa

AMP: adenosina monofosfato

Ar: adenosina

ATP: adenosina trifosfato

B12: coenzima B12 (cobalamina)

BSA: albúmina sérica bovina

C: citosina

C₁-THF sintetasa: complejo tetrahidrofolato sintetasa

CDP: citidina difosfato

CHO: línea celular de ovario de hámster chino

Cit. c: citocromo c

CMP: citidina monofosfato

Cr: citosina

CTP: citidina trifosfato

D_{20,w}: coeficiente de difusión libre

dCDP: desoxicitidina difosfato

dCMP: desoxicitidina monofosfato

dCTP: desoxicitidina trifosfato

DHF: dihidrofolato

DHFR: dihidrofolato reductasa

dTDP: desoxitimidina difosfato

dTMP: desoxitimidina monofosfato

dTTP: desoxitimidina trifosfato

DTT: ditioneitol

dUDP: desoxiuridina difosfato

dUMP: desoxiuridina monofosfato

dUTP: desoxiuridina trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

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

***f/fo*:** coeficiente friccional

FAD: flavina adenina dinucleótido (forma oxidada)

FADH₂: flavina adenina dinucleótido (forma reducida)

FPGS: folilpoliglutamato sintetasa

G: guanina

GMP: guanosina monofosfato

Gr: guanosina

H: hipoxantina

IMP: inosina monofosfato

Ir: inosina

K_M: constante de Michaelis-Menten

LDH: lactato deshidrogenasa

MDH: malato deshidrogenasa

MOPS: ácido sulfónico morfolinopropano

MTF: 5,10-metilentetrahidrofolato

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)

NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)

NMR: resonancia nuclear magnética

OMP: orotidina monofosfato

3PGS: 3-fosfoglicerato

PLP: piridoxal-5'-fosfato

PMSF: fenil metil-sulfonil fluoruro

S_{20,w}: coeficiente de sedimentación

sAMP: succinil adenosina monofosfato

SDS: lauril sulfato de sodio

SHMT: serina hidroximetiltransferasa

SHMT I: serina hidroximetiltransferasa I de *C.fasciculata*

SHMT II: serina hidroximetiltransferasa II de *C.fasciculata*

SHMT III: serina hidroximetiltransferasa III de *C.fasciculata*

SHMT_c: serina hidroximetiltransferasa citosólica

SHMT_m: serina hidroximetiltransferasa mitocondrial

T: timina

THF: tetrahidrofolato monoglutamato

TLCK: Na-p-tosil-L-lisina clorometil cetona

TMP: timidina monofosfato

Tr: timidina

TS: timidilato sintetasa

U: uracilo

UDP: uridina difosfato

UMP: uridina monofosfato

Ur: uridina

UTP: uridina trifosfato

$V_{\max}$: velocidad máxima de reacción

X: xantina

XMP: xantosina monofosfato

Xr: xantosina

	Página
I. INTRODUCCION.....	1-51
1. Biología de los tripanosomátidos	
1.1. Ubicación sistemática de los tripanosomátidos.....	1
1.2. Biología del <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.3. Biología de la <i>Crithidia fasciculata</i>	5
2. La enzima serina hidroximetiltransferasa	
2.1. Consideraciones generales.....	5
2.2. Identificación y purificación de la SHMT en diferentes organismos.....	9
2.3. Rol del PLP.....	14
2.4. Importancia de la SHMT en el metabolismo intermedio de eucariontes	
2.4.1. Distribución intracelular de la SHMT.....	15
2.4.2. Rol de la SHMT en el citosol de eucariontes	
2.4.2.1. Síntesis de metionina.....	19
2.4.2.2. Ciclo de las purinas.....	20
2.4.2.3. Ciclo del timidilato.....	21
2.4.3. Rol de la SHMT en las mitocondrias de eucariontes	
2.4.3.1. Metabolismo de la colina.....	22
2.4.3.2. Metabolismo de la serina y glicina.....	23
2.4.4. Funciones adicionales de la SHMT propias de plantas superiores.....	24
2.5. Compartimentalización en organelas celulares	

2.5.1. Distribución subcelular de los folatos y las enzimas dependientes de folato en eucariontes.....	25
2.5.2. Comunicación entre los compartimientos citosólicos y mitocondriales.....	27
2.6. Rol de la SHMT en procariontes.....	29
2.7. Rol de la SHMT en tripanosomátidos	
2.7.1. Metabolismo de las purinas.....	31
2.7.2. Metabolismo de las pirimidinas	
2.7.2.1. Síntesis de <i>novο</i>	35
2.7.2.2. Recuperación e interconversión de pirimidinas preformadas.....	38
2.7.3. Síntesis de fosforilcolina.....	41
2.7.4. Síntesis de metionina.....	45
2.8. Análisis estructural y evolutivo de las SHMTs.....	46
2.9. Inhibidores de la SHMT.....	48
2.10. Patologías relacionadas con la SHMT en el hombre.....	50
II.OBJETIVOS.....	52-53
III. MATERIALES Y METODOS.....	54-73
1. Organismos.....	54
2. Reactivos	
2.1. Drogas.....	54
2.2. Enzimas.....	55
3. Centrifugaciones.....	55

4. Cultivos de los parásitos y obtención de los extractos crudos, libres de células	
4.1. <i>C.fasciculata</i>	55
4.2. <i>T.cruzi</i>	57
5. Purificación parcial de la SHMT de hígado de rata.....	58
6. Detección de un inhibidor endógeno de la SHMT a partir de epimastigotes de <i>T.cruzi</i> . Preparación de los extractos crudos del parásito.....	60
7. Ensayo de la actividad SHMT.....	61
8. Ensayo del inhibidor endógeno de la SHMT de <i>T.cruzi</i>	61
9. Determinación de la concentración de proteínas.....	62
10. Determinación de la concentración de ortofosfato.....	63
11. Preparación de la Hidroxilapatita.....	63
12. Concentración y desalado de las preparaciones enzimáticas.....	63
13. Determinación de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de las SHMTs	
13.1. Coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$).....	64
13.2. Radio de Stokes (a) y coeficiente de difusión libre ($D_{20,w}$).....	66
14. Estimación del peso molecular de las enzimas nativas (M)	
14.1. Método de Andrews.....	68
14.2. Aplicando la ecuación de Svedberg.....	68
15. Coeficiente friccional (f/f_0).....	69
16. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	69
17. pH óptimo.....	70
18. Remoción del PLP unido a la enzima	
18.1. Precipitación de la enzima con sulfato de amonio.....	71

18.2. Preincubación de la enzima con L-cisteína o clorhidrato de hidroxilamina.....	71
19. Análisis espectrales.....	72
20. Secuenciación del extremo amino terminal de las proteínas.....	72
21. Análisis estadístico.....	73
IV. RESULTADOS.....	74-168
1. Propiedades de las SHMTs de tripanosomátidos en extractos crudos.....	74
2. SHMT de <i>C.fasciculata</i>	
2.1. Separación de las tres isoformas de la enzima.....	79
2.2. Purificación de la SHMT I	
2.2.1. Cromatografía en Phenyl Sepharose.....	85
2.2.2. Cromatografía en Hidroxilapatita.....	86
2.2.3. Cromatografía en Reactive Red Agarose.....	88
2.2.4. Filtración molecular en Sephadex G200.....	89
2.3. Purificación de la SHMT II	
2.3.1. Cromatografía en Phenyl Sepharose.....	91
2.3.2. Cromatografía en Hidroxilapatita.....	91
2.3.3. Cromatografía en Blue Sepharose.....	93
2.3.4. Cromatografía en Reactive Red Agarose.....	94
2.3.5. Filtración molecular en Sephadex G200.....	95
2.4. Purificación de la SHMT III	
2.4.1. Cromatografía en Phenyl Sepharose.....	97
2.4.2. Cromatografía en Hidroxilapatita.....	98
2.4.3. Cromatografía en Blue Sepharose.....	99

2.4.4. Filtración molecular en Sephadex G200.....	100
2.5. Parámetros moleculares e hidrodinámicos de las isoformas	
2.5.1. Coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$).....	105
2.5.2. Radio de Stokes (a) y coeficiente de difusión libre ($D_{20,w}$).....	109
2.5.3. Peso molecular de las enzimas nativas	
2.5.3.1. Aplicando la técnica de filtración molecular....	110
2.5.3.2. Aplicando la ecuación de Svedberg.....	112
2.6. Determinación del peso molecular de la subunidades.....	112
2.7. Características cinéticas	
2.7.1. Variación de la actividad enzimática con el pH.....	115
2.7.2. Determinación de los parámetros cinéticos.....	116
2.7.2.1. Parámetros cinéticos para el THF.....	117
2.7.2.2. Parámetros cinéticos para la L-serina.....	122
2.8. Dependencia de las SHMTs de PLP	
2.8.1. Efecto del sulfato de amonio.....	126
2.8.2. Efecto de la L-cisteína.....	127
2.8.3. Efecto del clorhidrato de hidroxilamina.....	131
2.8.4. Parámetros cinéticos para el PLP.....	133
2.9. Espectros de absorción de las SHMTs.....	137
2.10. Secuenciación del extremo amino terminal de las SHMTs.....	141
3. SHMT de <i>T.cruzi</i>	
3.1. Estudio sobre la posible existencia de isoformas.....	142
3.2. Purificación parcial de la enzima	
3.2.1. Filtración molecular en Sephadex G200.....	144
3.2.2. Cromatografía en Phenyl Sepharose.....	145

3.3. Parámetros moleculares e hidrodinámicos de la enzima	
3.3.1. Peso molecular de la enzima nativa.....	147
3.3.2. Radio de Stokes (a) y coeficiente de difusión libre ($D_{20,w}$).....	148
3.4. Características cinéticas	
3.4.1. Variación de la actividad enzimática con el pH.....	150
3.4.2. Parámetros cinéticos para el THF y L-serina.....	151
3.5. Dependencia de la SHMT de PLP	
3.5.1. Efecto del sulfato de amonio, de la L-cisteína y del clorhidrato de hidroxilamina.....	154
3.5.2. Parámetros cinéticos para el PLP.....	158
4. Presencia de un inhibidor endógeno de la SHMT en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	160
4.1. Propiedades del inhibidor.....	162
4.2. Purificación parcial del inhibidor.....	166
4.3. Estudios cinéticos del inhibidor.....	167
V. DISCUSION.....	169-189
VI. BIBLIOGRAFIA.....	190-207

INTRODUCCION

1. Biología de los tripanosomátidos

1.1. Ubicación sistemática de los tripanosomátidos

Los protozoarios son microorganismos eucariontes unicelulares que constituyen un *phylum* dentro del reino animal. Sin embargo, en la clasificación moderna que divide a los seres vivos en cinco reinos (*Monera*, *Protista*, *Plantas*, *Fungi* y *Animalia*), los protozoos son considerados dentro del subreino *Protista*. De acuerdo a ello, los tripanosomátidos se ubican taxonómicamente de la siguiente manera (Levine y col., 1980):

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

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

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

Orden *Kinetoplastida*: tiene de uno a cuatro flagelos que emergen de una depresión, una única mitocondria que se extiende por toda la célula semejando un tubo o una red de tubos y generalmente posee una organela autorreplicante que es en realidad una prolongación capsular de la mitocondria, denominada kinetoplasto. El aparato de Golgi está ubicado en la zona de la depresión flagelar. Hay especies parásitas y otras de vida libre.

Suborden *Trypanosomatina*: poseen un sólo flagelo, libre o con membrana ondulante, el quinetoplasto es pequeño y compacto. Son todos parásitos.

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

Genero *Trypanosoma*: se dividen en dos grandes grupos según el sitio de producción de tripomastigotes metacíclicos en el insecto vector y el consecuente método de infección en el huésped vertebrado (Hoare, 1964).

Sección *Salivaria*: incluye tripanosomas cuyo ciclo de desarrollo en el vector invertebrado se completa en las glándulas salivales del insecto. Ejemplos: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense*.

Sección *Estercoraria*: comprende tripanosomas que completan su desarrollo en la región posterior del tubo digestivo del vector. Se transmiten por contaminación a través de las heces del insecto. Ejemplos: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma lewisi*. La única especie de este grupo patógena para el hombre es el *T.cruzi*.

1.2. Biología del *Trypanosoma cruzi*

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una enfermedad causada por el protozooario parásito *T.cruzi* (Kirchhoff, 1990). Este organismo tiene un ciclo de vida complejo que involucra cuatro formas morfológicas distintivas y exclusivas para un huésped determinado, ya sea en insectos hematófagos, los cuales se denominan vectores o bien en huéspedes mamíferos. Los parásitos se multiplican en el tracto intestinal del insecto vector (formas epimastigotes) y las formas infectivas que se encuentran presentes en las heces (formas tripomastigotes metacíclicos), son frecuentemente excretadas durante o inmediatamente después de haber ingerido la sangre del mamífero. La transmisión a mamíferos sucede cuando los parásitos presentes en las heces contaminan a las membranas mucosas, conjuntivas, o bien por rupturas en la piel e invaden a los macrófagos y a otras células del huésped (Brener, 1973). El parásito se multiplica intracelularmente (forma amastigote) hasta que se rompe la membrana de la célula huésped, en cuyo caso se liberan los parásitos ya sea para multiplicarse en las células adyacentes o bien viajar a través de la sangre y vías linfáticas para multiplicarse en otros tejidos. La forma sanguínea, el tripomastigote, es la forma ingerida por el insecto vector, y de esta manera se completa el ciclo de vida del parásito. La transmisión por insectos vectores es la más frecuente, sin embargo la transmisión por transfusión de sangre donada por individuos infectados es común en muchos países endémicos (Burns, y col.; 1992; Schmunis, 1991).

También se ha informado la transmisión congénita (Bettencourt, 1976; Azogue y col., 1985) y por accidentes en los laboratorios (Brener, 1984; Hofflin y col., 1987; Herwaldt y Juranek, 1993).

La enfermedad en el hombre se inicia con una fase aguda, que se caracteriza por la presencia de fiebre, edema facial y de extremidades inferiores y linfadenopatía (Rassi, 1979). Los parásitos invaden diferentes tejidos, particularmente corazón y sistema nervioso central (Hoff y col., 1978). La mayor parte de los afectados son asintomáticos (aunque en algunos casos puede ocasionar la muerte) y puede durar de 2 a 4 meses (Kirchhoff, 1993). Años y aún décadas después de la infección, un 10% a un 30% de las personas que portan al parásito desarrollan síntomas cardíacos y/o gastrointestinales. Esta fase denominada crónica, se caracteriza por manifestaciones de daño cardíaco (Kirchhoff y Neva, 1985; Maguirre y col., 1987) y del tracto digestivo (megacolon y megaesófago) (Rezende, 1979; Tanowitz y col., 1992).

Si bien se han ensayado numerosas drogas para el tratamiento de la enfermedad, tales como el Beznidazol (Radanil, Roche 7-1051) y Nifurtimox (Lampit, Bayer 2502), el éxito ha sido relativo ya que tienen efecto sólo sobre la fase aguda y congénita y sólo un 50% de los infectados han logrado una cura parasitológica. Además, el tratamiento puede conllevar a efectos secundarios adversos (Rassi y Ferreira, 1971; Marr y Docampo, 1986; Ferreira, 1988). Recientemente ha sido probado un agente antifúngico, el D0870 (inhibidor de la síntesis de esteroides), que elimina al parásito en ratones de laboratorio infectados con el microorganismo (Urbina y col., 1996).

A pesar de no ser tóxico en ratones ni en cultivos de células VERO, el D0870 aún no ha sido ensayado en humanos.

Por lo tanto lo mas conveniente hasta el momento es la profilaxis, por control del vector a través de tratamiento con insecticidas, mejoramiento de la vivienda y educación, sin dejar de mencionar a la identificación de los donantes infectados en los bancos de sangre.

1.3. Biología de la *Crithidia fasciculata*

Los tripanosomátidos pertenecientes al género *Crithidia*, Leger, 1902, son parásitos de 4 a 10 μ que se encuentran en conglomerados adheridos al intestino de muchos insectos (*Diptera*, *Hemiptera*, *Trichoptera* e *Hymenoptera*), los cuales constituyen su único hùésped (monogenéticos). Presentan dos estadíos morfológicos: choanomastigotes (forma infectante) y amastigotes (Lee y col., 1985).

Si bien es de suma importancia el estudio del metabolismo del *T. cruzi*, es también muy útil realizar estudios similares con *Crithidia fasciculata*, ya que este organismo es frecuentemente utilizado como modelo para el estudio del metabolismo y mecanismo de acción de drogas en tripanosomátidos, por su ausencia de patogenicidad para el hombre y su facilidad para ser cultivado en el laboratorio.

2. La enzima serina hidroximetiltransferasa

2.1 Consideraciones generales

La serina hidroximetiltransferasa (SHMT) (L-serina:tetrahidrofolato 5,10-hidroximetiltransferasa, EC 2.1.2.1) es una enzima que cataliza la serie de reacciones, indicadas en la TABLA I.

Reacción	Refer.
L-serina + THF $\longleftrightarrow$ Glicina + MTF	(1)
L- α -metil serina + THF $\longleftrightarrow$ D-alanina + MTF	(2)
Alotreonina $\longleftrightarrow$ Glicina + Acetaldehído	(3)
L-treonina $\longleftrightarrow$ Glicina + Acetaldehído	(4)
Eritro- β -fenilserina $\longleftrightarrow$ Glicina + Benzaldehído	(5)
Treo- β -fenilserina $\longleftrightarrow$ Glicina + Benzaldehído	(6)
ϵ -trimetil -3-hidroxisina $\longleftrightarrow$ Glicina + γ -butirotalnaldehído	(7)
Aminomalonato $\longleftrightarrow$ Glicina + CO ₂	(8)
D-alanina + PLP $\longleftrightarrow$ Piruvato + Piridoxamina-P	(9)
(2S) -[³ H] Glicina + [¹ H] ₂ O $\longleftrightarrow$ (2S) -[¹ H] Glicina + [³ H] ₂ O	(10)

TABLA I: Reacciones catalizadas por la serina hidroximetiltransferasa. Las referencias son las siguientes: (1) Blakley, 1969; (2) Wilson y col., 1962; (3) y (4) L. Schirch y Gross, 1968; (5) y (6) Ulevitch y Kallen, 1977; (7) Hulse y col., 1978; (8) Palekar y col., 1973; (9) L. Schirch y Mason, 1963; (10) L. Schirch y Jenkins, 1964.

El rol fisiológico de la enzima es la interconversión de L-serina y glicina con el tetrahidrofolato (THF) como aceptor de C₁ (Blakley, 1955) y la generación de unidades monocarbonadas en la forma de 5,10-metilentetrahidrofolato (MTF) (FIGURA 1).

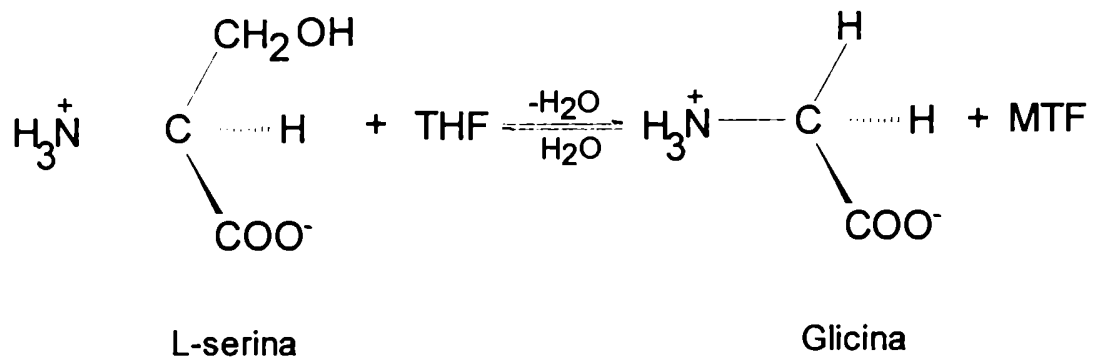


FIGURA 1: Reacción fisiológica asignada a la serina hidroximetiltransferasa.

Evidencias indirectas sugieren que la generación de unidades monocarbonadas es el rol primario de la enzima. Estas unidades monocarbonadas son requeridas en la biosíntesis de purinas, timidilato, metionina y lípidos entre otros compuestos (Blakley, 1969). El MTF producido por la SHMT es el punto de iniciación para numerosas reacciones requiriendo compuestos de C₁ (Appling, 1991). El MTF es reducido a metiltetrahidrofolato para la síntesis de metionina o bien oxidado a metenil y formiltetrahidrofolato para la síntesis de purinas (Appling, 1991).

La primera evidencia de la existencia de la enzima en una célula fue publicada en 1946 (Shemin, 1946). En la década siguiente fue parcialmente purificada a partir de varias fuentes y se demostró el requerimiento de piridoxal-5'-fosfato (PLP) como cofactor (Lascelles y Woods, 1950), lo cual fue subsecuentemente confirmado por otros trabajos, utilizando preparaciones provenientes de mamíferos (Blakley, 1955; Alexander y Greenberg, 1956; Huennekens y col., 1957), aves (Deodhar y Sakami, 1953; Sakami, 1955), bacterias (Wright, 1955) y plantas (Wilkinson y Davies,

1958). Sin embargo existen numerosas publicaciones en las que se demostró que la SHMT es independiente del PLP, como en trigo (Cossins y col., 1964), *Lemna minor* (Wong y col., 1976), espinaca (Woo, 1979) y poroto de soja (Sukanya y col., 1991). En las SHMT-PLP dependientes, la enzima contiene unido al cofactor, pero está libre de THF (L.Schirch y Peterson, 1980; Masuda y col., 1987; Miyasaki y col., 1987; Sakamoto y col., 1991). El rol primario del THF en la reacción que se indica en la FIGURA 1 es el de añadir y remover el formaldehído del sitio activo de la enzima (L.Schirch, 1982). El THF siempre ha sido considerado de absoluto requerimiento para la enzima si cataliza la reacción de la FIGURA 1. Sin embargo la SHMT lentamente puede catalizar la interconversión de glicina y serina, en ausencia de THF (Chen y L.Schirch, 1973). La SHMT de *Methanobacterium thermoautotrophicum* cataliza la interconversión de serina a glicina, pero en presencia de tetrahidrometanopterina, ya que el THF no es utilizado por la enzima para catalizar la reacción en estos organismos (Hoyt y col., 1986).

La enzima fue por primera vez aislada en forma homogénea en 1963 a partir de hígado de conejo (L. Schirch y Mason, 1963). En los siguientes años se reveló que la enzima exhibía un amplio número de sustratos y especificidad en cada reacción. La enzima no sólo cliva 3-hidroxiamino ácidos a aldehído y glicina, sino también decarboxila aminomalonato a CO_2 y glicina y transamina D-alanina y PLP (TABLA I). La capacidad de la SHMT para aceptar una variedad de aminoácidos como sustratos y para catalizar reacciones de ruptura aldólica, decarboxilación y transaminación toma interés en términos de la acción y el rol fisiológico de la enzima.

2.2 Identificación y purificación de la SHMT en diferentes organismos

La presencia de la SHMT ha sido demostrada en una amplia variedad de organismos. La enzima ha sido purificada a homogeneidad en bacterias tales como *Clostridium cylindrosporum* (Uyeda y Rabinowitz, 1968), *Methylobacterium organophilum* XX (O' Connor y Hanson, 1975), *Escherichia coli* (V. Schirch y col., 1985), *M. thermoautotrophicum* (Hoyt y col., 1986); *Hyphomicrobium methylovorum* GM2 (Miyasaki, 1987) y en *Bacillus stearothermophilus* (Ide y col., 1992). En protozoos fue purificada a partir de *Plasmodium lophurae* (Platzer y Campuzano, 1976), *Plasmodium chabaudi* (Ruenwongsa y col., 1989) y *Euglena gracilis* Z (Sakamoto y col., 1991). En levaduras fue purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (Nakamura y col., 1973) y en hongos, la enzima fue purificada a partir de *Neurospora crassa* (Kruschwitz y col., 1993 y 1994). En plantas, la SHMT ha sido aislada a partir de células de *Nicotiana rustica* L. (Prather y Sisler, 1966), *Brassica oleracea var botrytis* L. (Mazelis y Liu, 1967), *Phaseolus aureus* (D. Rao y N. Rao, 1980), *Phaseolus vulgaris* (D. Rao y N. Rao, 1982), *Zea mays* L. (Masuda y col., 1986), *Glycine max* [L.] Merr. cv Williams (Mitchell y col., 1986), *Pisum sativum* (Bourguignon y col., 1988) y *Spinacia oleracea* (Henricson y Ericson, 1988; Besson y col., 1995). En células de mamíferos, la enzima ha sido purificada a homogeneidad a partir de hígado de conejo (Fujioka, 1969; L. Schirch y Peterson, 1980), cerebro bovino (Broderick y col., 1972), hígado de carnero (Ulevitch y Kallen, 1977), hígado de mono (Ramesh y N. Rao, 1980), hígado de oveja (Manohar y col., 1982; Baskaran y col., 1989), hígado de rata (Ogawa y Fujioka, 1981; Masuda y col., 1987), hígado porcino (Zieske y Davis, 1983), hígado bovino (Jones III y Priest,

1976; Zieske y Davis, 1983), riñón de cerdo (Harish Kumar y col., 1976), hígado de pollo (Fujiwara y col., 1986) y del hígado del hombre, clonada y expresada en *E.coli* (Kruschwitz y col., 1995). También fue purificada a partir de la línea tumoral L1210 (Strong y col., 1990).

En tripanosomátidos, la SHMT sólo ha sido identificada en epimastigotes de *T. cruzi*, en *Trypanosoma rangeli* (Nosei y J.L.Avila, 1985) y en *Leishmania tropica* (Meek y col., 1985, Nosei y J.L.Avila, 1985). Sin embargo en ningún caso ha sido informada su purificación a partir de tripanosomátidos.

Las características de las diferentes SHMT purificadas, en relación al peso molecular de la enzima nativa y de sus subunidades, estructura cuaternaria y localización intracelular se encuentran resumidas en la TABLA II. En procariontes, la SHMT es un dímero con subunidades idénticas de aproximadamente 45 kDa de peso molecular (V. Schirch y col., 1985; Miyasaki y col., 1987; Ide y col., 1992). En cambio en hongos, plantas y mamíferos, la enzima es un homotetrámero de subunidades de aproximadamente 50 kDa cada una (Martínez Carrion y col., 1972; Bourguignon y col., 1988; Kruschwitz y col., 1994).

Origen	Peso Molecular	Método de Determinación	Estructura Cuaternaria	Ubicación Subcelular
<i>E.coli</i> (1)	95000	Andrews	Dímero	-
	46000	SDS-PAGE	Monómero	
<i>B.stearothermophilus</i> (2)	45000	SDS-PAGE	Monómero	-
<i>M.extorquens</i> AM1 (3)	46300	Por secuencia nucleotídica	Monómero	-
<i>M.organophilum</i> (4)	200000	Gradiente de sacarosa	Tetramero [#]	
	50000	SDS-PAGE	Monómero	
	100000	Gradiente de sacarosa	Monómero [*]	
	100000	SDS-PAGE	Monómero	
<i>H.methylovorum</i> (5)	98000	Andrews	Dímero	-
	48000	SDS-PAGE	Monómero	
<i>Pseudomonas</i> spp (6)	120000	Andrews		-
<i>C.jejuni</i> (7)	45300	Por secuencia nucleotídica	Monómero	-
<i>M.thermoautotrophicum</i> (8)	102000	Hedrick y Smith, 1968	Dímero	-
	53000	SDS-PAGE	Monómero	
<i>E.gracilis</i> Z (9)	90000	Andrews	Dímero	Citosol
	45000	SDS-PAGE	Monómero	
<i>P.lophurae</i> (10 y 11)	68300	Andrews		Citosol
<i>P.chabaudi</i> (12)	250000	Andrews		nd
<i>D.immitis</i> (13)	260000	Andrews		nd
<i>B.pahangi</i> (13)	260000	Andrews		nd

Origen	Peso Molecular	Método de Determinación	Estructura Cuaternaria	Ubicación subcelular
<i>S.cerevisiae</i> (14 y 15)	200000	Andrews	Tetramero	Citosol
	52300	Por secuencia nucleotídica	Monómero	
	53000	Por secuencia nucleotídica	Monómero	Mitocondria
<i>N.crassa</i> (16)	230000	Andrews	Tetramero	Citosol
	54000	SDS-PAGE	Monómero	
<i>S.oleracea</i> (17)	200000	Andrews	Tetramero	Mitocondria
	52000	SDS-PAGE	Monómero	
	53000	SDS-PAGE	Monómero	Cloroplastos
<i>G.max</i> [L].Merr cv Williams (18)	230000	Andrews	Tetramero	nd
	55000	SDS-PAGE	Monómero	
<i>Moricandia arvensis</i> (19)	53000	SDS-PAGE y Western blotting	Monómero	Mitocondria
<i>P.sativum</i> (20)	220000	Andrews	Tetramero	Mitocondria
	53000	LDS-PAGE	Monómero	
<i>Solanum tuberosum</i> (21)	53700	Por secuencia nucleotídica	Monómero	Mitocondria
<i>V.radiata</i> (22)	205000	Andrews	Tetramero	nd
	50000	SDS-PAGE	Monómero	
<i>Aedes aegypti</i> (23)	260000	Andrews	nd	nd
Hígado de vaca (24)	50000	SDS-PAGE	Monómero	nd
Hígado de camero (25)	227000	Gradiente de sacarosa	Tetramero	nd
	56700	SDS-PAGE	Monómero	

Origen	Peso Molecular	Método de Determinación	Estructura Cuaternaria	Ubicación Subcelular
Hígado de conejo (26)	215000	Andrews	Tetrámero	Citosol
	53000	SDS-PAGE	Monómero	
	215000	Andrews	Tetrámero	Mitocondria
	53000	SDS-PAGE	Monómero	
Hígado de cerdo (27)	57000	SDS-PAGE	Monómero	nd
Hígado de oveja (28)	213000	Andrews	Tetrámero	Citosol
	53000	SDS-PAGE	Monómero	
Hígado de rata (29)	230000	Andrews	Tetrámero	Citosol
	56300	SDS-PAGE	Monómero	
	200000	Andrews	Tetrámero	Mitocondria
	53700	SDS-PAGE	Monómero	
Hígado de mono (30)	208000	Andrews	Tetrámero	nd
	52000	SDS-PAGE	Monómero	
Hígado humano (31)	53000	Por secuencia nucleotídica	Monómero	Citosol
	52400	Por secuencia nucleotídica	Monómero	Mitocondria
Línea celular L1210 (32)	215000	Andrews	Tetrámero	nd
	56000	SDS-PAGE	Monómero	

TABLA II: Peso molecular, estructura cuaternaria y localización subcelular de SHMTs de diversos orígenes. Los números indican las siguientes referencias: (1) V.Schirch y col., 1985; (2) Ide y col., 1992; (3) Chistoserdova y Lidstrom, 1994; (4) O'Connor y Hanson, 1975; (5) Miyasaki y col., 1987; (6) Bell y Turner, 1977; (7) Chan y Bingham, 1990; (8) Hoyt y col., 1986; (9) Sakamoto y col., 1991; (10) Platzer y Campuzano, 1976; (11) Platzer, 1977; (12) Ruenwongsa y col., 1989; (13) Jaffe y Chrin, 1980; (14) Nakamura y col., 1973; (15) McNeil y col., 1994; (16) Kruschwitz y col., 1993; (17) Besson y col., 1995; (18) Mitchell y col., 1986; (19) Morgan y col., 1993; (20) Bourguignon y col., 1988; (21) Kopriva y Bauwe, 1995; (22) D.A. Rao y N.A.Rao, 1982; (23) Jaffe y Chrin, 1980; (24) Jones III y Priest, 1976; (25) Ulevitch y Kallen, 1977; (26) L.Schirch y Peterson, 1980; (27) Braman y col., 1981; (28) Brahatheeswaran y col., 1996; (29) Ogawa y Fujioka, 1981; (30) Ramesh y N.A.Rao, 1980; (31) Garret y col., 1993; (32) Strong y col., 1990. nd: no determinado. # Forma metanol dependiente.* Forma succinato dependiente.

2.3. Rol del PLP

En las enzimas dependientes de PLP, en todos los organismos estudiados, cada subunidad de la SHMT tiene unido una molécula de PLP formando una base de Schiff entre el grupo ϵ -amino de un residuo de la lisina de la enzima y el cofactor (L. Schirch, 1982). La lisina es esencial para la actividad de la enzima, ya que es requerida para liberar al aminoácido producido, sea L-serina o glicina (D.Schirch y col., 1993). La histidina, que se encuentra adyacente a la lisina que une al PLP, podría cumplir un rol importante en la catálisis de la reacción, ya que ocupa una posición equivalente en numerosas SHMTs. Sin embargo, su reemplazo tiene poco efecto sobre la interconversión serina-glicina (Hopkins y V.Schirch, 1986) aunque fueron aceleradas las reacciones sobre otros aminoácidos utilizados como sustratos (Stover y col., 1992).

El rol del PLP en la reacción es su capacidad de formar un intermediario quinoide que absorbe cerca de los 500 nm. Sin esta estructura, la conversión de serina a glicina involucraría a un intermediario, el cual tendría una carga negativa neta acumulada sobre el α -carbono de la glicina. Esta situación de alta energía es evitada en el intermediario quinoide por la resonancia y por la carga negativa inductiva sobre el anillo del piridoxal (L. Schirch, 1982). Otros autores han atribuido roles adicionales al PLP, como el de mantener la integridad estructural de la SHMT al prevenir la disociación de la enzima en sus subunidades, además de su función en la catálisis (Brahatheeswaran y col., 1996).

Existen tres métodos diferentes que permiten demostrar la dependencia de la SHMT por el PLP. El primero involucra la incubación de la holoenzima con la L-cisteína, la cual forma un complejo tiazolidina con el PLP. El complejo tiene una baja afinidad por el sitio activo de la enzima y puede ser eliminado por diálisis o por precipitación de la apoenzima con sulfato de amonio (L.Schirch, 1982). El segundo método es similar al anterior pero la enzima se preincuba con hidroxilamina. El tercer y último método consiste en la transaminación de la D-alanina en ausencia de exceso de PLP (reacción 9, TABLA I), que convierte al complejo enzima-PLP en enzima-piridoxamina-P. Esta forma de la coenzima tiene baja afinidad por el sitio activo y puede ser eliminada por diálisis (L.Schirch, 1982). En los tres casos la apoenzima es inactiva y sólo puede recuperar su actividad por el agregado de PLP exógeno. En cambio en las SHMTs independientes de PLP, la enzima no modifica su actividad por el tratamiento con L-cisteína como fue demostrado sobre la SHMT de *V.radiata* (Sukanya y col., 1991).

2.4. Importancia de la SHMT en el metabolismo intermedio en eucariontes

2.4.1. Distribución intracelular de la SHMT

En mamíferos, la SHMT existe como isoformas citosólicas y mitocondriales (SHMTc y SHMTm respectivamente) (Fujioka, 1969; L.Schirch y Peterson, 1980; Masuda y col., 1987). También se han detectado isoformas de SHMT de diferente localización celular en protozoos fotosintéticos (Sakamoto y col., 1991), en levaduras (Zelikson y Luzzati, 1976) y en plantas (Turner y col., 1992; Besson y col., 1995).

En mamíferos, la isoforma citosólica es la especie predominante en hígado (L. Schirch y Peterson, 1980; Matthews y col., 1982), aunque se ha informado de una abundante SHMTm en células en cultivo (Chasin y col., 1974). El esquema sugerido en relación al rol de cada isoforma de SHMT se encuentra descrito en la FIGURA 2.

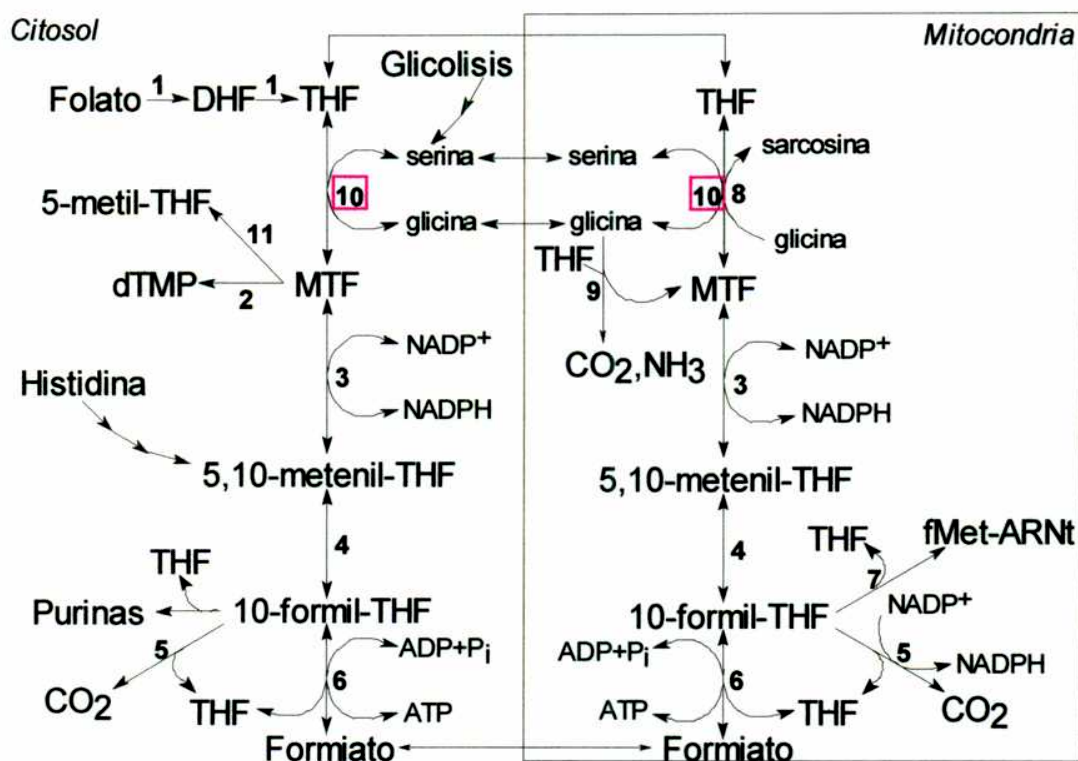


FIGURA 2: Compartimentalización de las isoformas de diversas enzimas relacionadas al metabolismo del folato y de unidades monocarbonadas en eucariontes. Las enzimas involucradas son las siguientes:

(1) dihidrofolato reductasa; (2) timidilato sintetasa; (3) 5,10-metilentetrahydrofolato deshidrogenasa; (4) 5,10-metilentetrahydrofolato ciclohidrolasa; (5) 10-formiltetrahydrofolato deshidrogenasa; (6) 10-formiltetrahydrofolato sintetasa; (7) metionil-ARNt formiltransferasa; (8) sarcosina deshidrogenasa; (9) sistema enzimático de ruptura de glicina; (10) SERINA HIDROXIMETILTRANSFERASA; (11) 5,10-metilentetrahydrofolato reductasa. Las enzimas que llevan a cabo las reacciones 3, 5, 6 y 10 se encuentran en los compartimientos citosólico y mitocondrial.

La función fisiológica de cada una de las isoformas de la SHMT no es al presente muy clara y más aún, en algunos casos las informaciones experimentales con que se cuenta son contradictorias. La contribución de cada isoforma es desconocida en relación al aumento observado en la actividad SHMT en tejidos tumorigénicos (Whitehouse y col., 1995). Una línea celular de ovario de hámster chino (CHO), la cual es deficiente en la SHMTm (CHOm-) pero que presenta la actividad enzimática citosólica, requiere glicina para el crecimiento (Kao y col., 1968) sugiriendo que la isoforma mitocondrial puede estar relacionada con el metabolismo del crecimiento.

Se ha sugerido que el rol de la SHMTc es el de proveer MTF para la síntesis de nucleótidos (L.Schirch, 1982). Algunos investigadores han propuesto que la SHMTm y el sistema de ruptura de glicina están involucrados en la síntesis acoplada de serina a partir de glicina dentro de la mitocondria (Lowry y col., 1986; Brosnan, 1987). Sin embargo, otros autores inversamente propusieron que la SHMTm es responsable de la síntesis de glicina a partir de serina (Pfendner y Pizer, 1980) o para la provisión de formiato para la síntesis de purinas (Pasternack y col., 1994a).

Recientes estudios utilizando la línea celular CHOm-, la cual requiere glicina para el crecimiento y tiene una baja tasa de síntesis de glicina, demostraron que hay una división intracelular de la interconversión de serina y glicina que involucra a las dos isoformas de SHMT (Narkewicz y col., 1996). Los autores demostraron dicha hipótesis por tres caminos diferentes.

Utilizando 1-¹³C serina, la línea CHOm- presenta una disminución de la síntesis de glicina a partir de serina, comparada con la línea celular CHOm+, la cual presenta las dos isoformas. La misma conclusión fue obtenida utilizando 1-¹³C glicina como sustrato. En un tercer experimento en el que se midió el enriquecimiento intracelular de glicina libre a las 24 horas, a partir de 1-¹³C serina, se observó que la concentración de glicina era menor en la línea CHOm- que en la CHOm+. Todos estos datos confirman la hipótesis de que en la línea celular CHO la SHMTm es la responsable de la síntesis de glicina a partir de serina. Por otra parte, al aumentar la concentración de glicina en el medio de cultivo de la línea CHOm- y en la CHOm+, se observó un aumento en la producción de serina en ambas líneas, lo cual apoya la idea de que el rol de la SHMTc, en dichas líneas celulares, es el de la síntesis de serina a partir de glicina (Narkewicz y col., 1996). De todas maneras, la distribución diferencial de los cofactores necesarios para las reacciones catalizadas por la SHMT, tales como el THF, MTF y PLP, son los factores limitantes que determinan la compartimentalización intracelular de la biosíntesis de serina y glicina. Se ha sugerido que la compartimentalización intracelular de los folatos con diferente grado de poliglutamilación es un factor importante en la regulación de la síntesis de serina y glicina (Appling, 1991). En síntesis, la SHMT juega un importante rol en el metabolismo de un carbono en la interconversión de L-serina y glicina, y hasta ahora y de acuerdo a los estudios metabólicos realizados, la porción monocarbonada puede tener tres destinos diferentes en el citosol de los mamíferos: síntesis de metionina, síntesis *de novo* de purinas y síntesis de timidilato, mientras que las mitocondrias proveen formiato para la síntesis de purinas, interconvierten serina y glicina y metabolizan a la colina (FIGURA 2).

2.4.2. Rol de la SHMT en el citosol de eucariontes

2.4.2.1. Síntesis de metionina

Un ciclo importante en el metabolismo de un carbono involucra la reducción del MTF a 5-metiltetrahidrofolato, seguido por la transferencia del grupo metilo a la homocisteína para formar metionina y regenerar al THF, sustrato de la SHMT (FIGURA 3). La síntesis de 5-metiltetrahidrofolato es catalizada irreversiblemente por la metilén tetrahidrofolato reductasa-NADPH dependiente (Green y col., 1988). La metionina sintetasa cataliza la transferencia del grupo metilo a la homocisteína para la síntesis de metionina. Esta enzima se caracteriza por tener unida una cobalamina (coenzima B12) que actúa como cofactor de la enzima (Utley y col., 1985).

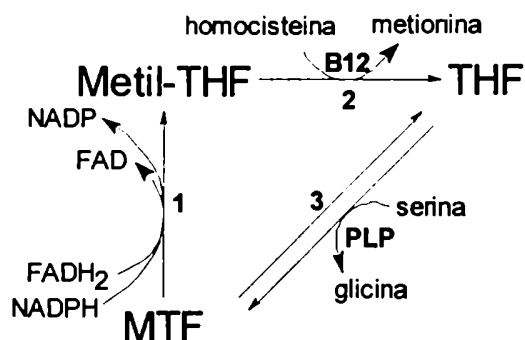


FIGURA 3: Síntesis de metionina en eucariontes. Los números indican las siguientes enzimas: (1) metiléntetrahidrofolato reductasa; (2) metionina sintetasa; (3) SERINA HIDROXIMETILTRANSFERASA.

Trabajos previos indicaron que la adición de metionina al medio de crecimiento de *E.coli* causaba en estas células una represión significativa de varias enzimas dependientes de folato (Burton y Metzenberg, 1975). En *N.crassa*, la colina conduce a la represión de los genes que codifican para la SHMT, metionina sintetasa y metilen THF deshidrogenasa. La metionina potencia el efecto de la colina, pero no tiene efecto si es agregada sola (Burton y Metzenberg, 1975). Existen trabajos que informan que el suplemento de metionina en la dieta de los mamíferos conduce a una disminución de los niveles de metionina sintetasa y al mismo tiempo un aumento de los niveles de la cistationina ϵ -sintetasa (Finkelstein, 1990).

Recientemente fue informado que los niveles de varias enzimas dependientes de folato, entre ellas la SHMT, son regulados por los genes regulatorios met H y met D (necesarios para la síntesis de metionina) en *Aspergillus nidulans* y que la metionina y la homocisteína actúan como efectores de bajo peso molecular en este sistema (Lewandowska y col., 1996).

2.4.2.2. Ciclo de las purinas

La oxidación del MTF llevada a cabo reversiblemente por las enzimas metilentetrahidrofolato reductasa y meteniltetrahidrofolato ciclohidrolasa que conducen a la síntesis de 10-formiltetrahidrofolato, sustrato de la síntesis de purinas en mamíferos es descrita en la FIGURA 2. También el 10-formiltetrahidrofolato puede ser obtenido por formilación directa del THF, catalizada por la formiltetrahidrofolato sintetasa-ATP dependiente (Shane, 1989).

La deshidrogenasa, ciclohidrolasa y la sintetasa están asociadas como un complejo trifuncional en tejidos de mamíferos (Paukert y col., 1976; Tan y col., 1977), el cual ha sido denominado complejo C₁ THF sintetasa.

2.4.2.3. Ciclo del timidilato

El folato y sus derivados no están involucrados en la síntesis *de novo* de pirimidinas, excepción hecha del timidilato (FIGURA 4). La timidilato sintetasa (TS) cataliza la transferencia del formaldehído desde el MTF a la posición 5 del desoxiuridilato, conduciendo a la síntesis de desoxitimidilato. Así el anillo pirazina del THF provee el componente reductor para la transferencia de la unidad monocarbonada y el THF es oxidado a dihidrofolato (DHF). El DHF es inactivo como coenzima y es reducido a THF en una reacción catalizada por la dihidrofolato reductasa (DHFR), enzima que también cataliza la reducción del folato a DHF, sin embargo su rol principal es catalizar la primera de las reacciones descriptas. Cabe aclarar que en mamíferos, la TS y la DHFR existen como proteínas separadas monofuncionales (Santi y Danenberg, 1984), contrariamente a lo que sucede en protozoos, en donde las enzimas existen como un complejo interdependiente (Garret y col, 1984; Ivanetich y Santi, 1990). En este ciclo, el rol de la SHMT es el de proveer el MTF, sustrato de la TS.

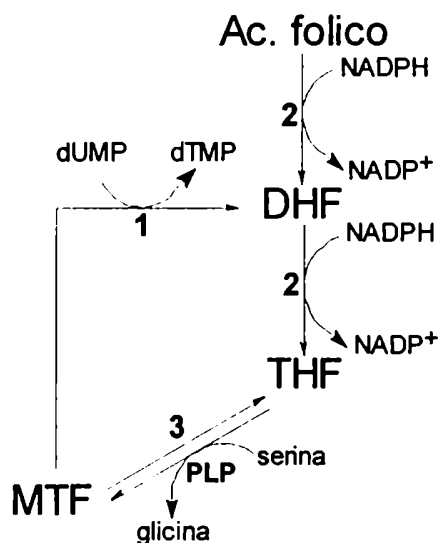


FIGURA 4: Ciclo del timidilato en eucariontes. Las enzimas son las siguientes: (1) timidilato sintetasa; (2) dihidrofolato reductasa; (3) SERINA HIDROXIMETILTRANSFERASA.

2.4.3. Rol de la SHMT en las mitocondrias de eucariontes

2.4.3.1. Metabolismo de la colina

Se ha propuesto la participación de la SHMT en el metabolismo de la colina, en la forma que se esquematiza en la FIGURA 5. La colina es inicialmente oxidada a betaína. En hígado de mamíferos existe la betaína metiltransferasa, la cual cataliza la transferencia de uno de los grupos metilo de la betaína a la homocisteína para generar metionina y dimetilglicina (Skiba y col., 1982). Esta enzima, a diferencia de la metionina sintetasa, no utiliza a la cobalamina como cofactor y no utiliza folato como sustrato.

2.4.4. Funciones adicionales de la SHMT propias de plantas superiores

En plantas, la SHMT también existe como isoformas, de diferente localización intracelular (Turner y col., 1992; Besson y col., 1995). Además de estar presente en citosol y mitocondrias, también fue detectada en cloroplastos (Besson y col., 1995). De hecho, fue demostrado que el 50% de la actividad SHMT está compartimentalizada en la mitocondria mientras que las fracciones citosólicas y cloroplásticas representan un 20-25% cada una (Besson y col., 1995). También fue detectada una actividad SHMT en núcleos de *P.sativum* (Neuburger y col., 1996).

En las células animales, el folato es suplementado del medio externo y el *pool* mitocondrial de folato es obtenido desde el citosol, como se mencionó anteriormente. En las plantas la situación es totalmente diferente ya que las células vegetales sintetizan folato dentro de la mitocondria. Sin embargo, los derivados del THF son un absoluto requerimiento para la síntesis de purinas y timidilato y por lo tanto deben estar presentes también en el citosol y en los cloroplastos. Por lo tanto los poliglutamilTHF requeridos en citosol y cloroplastos serían suplementados desde la mitocondria. La vía de síntesis de THF en la mitocondria es una característica general en las plantas, ya que existe una alta concentración de folato (alrededor de 200 μ M) y también altos niveles de las enzimas requeridas para la síntesis de THF poliglutamatos, como ocurre en las mitocondrias de tubérculo de la papa (Neuburger y col., 1996). También las mitocondrias son el sitio de síntesis de timidilato, ya que el complejo DHFR-TS fue únicamente detectado en mitocondrias (Neuburger y col., 1996).

Además del metabolismo de un carbono, la SHMT juega un rol importante en la fotorespiración en las plantas superiores como fue demostrado en mutantes faltando la actividad SHMTm (Somerville y Ogren, 1981). La enzima junto con las cuatro enzimas del complejo de ruptura de glicina (proteínas P, H, L y T), están presentes en altas concentraciones en el espacio de la matriz mitocondrial en las hojas de las plantas superiores (Bourguignon y col., 1988). Durante la fotorespiración, el complejo de ruptura de la glicina cataliza la oxidación de la glicina en la presencia de NAD^+ y THF a CO_2 , NADH, NH_3 y MTF. La continua operatividad de la vía está asegurada por la reoxidación del NADH a través de la cadena de transporte de electrones y por la reconversión del MTF a THF por la reacción reversible de la SHMT (Oliver, 1994).

2.5. Compartimentalización en organelas celulares

2.5.1. Distribución subcelular de los folatos y las enzimas dependientes de folato en eucariontes.

Las principales reservas de folato en células hepáticas se encuentran en citosol y mitocondria (Cook y Blair, 1979). El núcleo contiene muy bajos niveles de folato. En plantas, los folatos se encuentran en cloroplastos, además de estar presentes en citosol y mitocondrias (Cossins y Shuh, 1972). Las formas de THF presentes en citosol de hígado son aproximadamente 45% 5-metiltetrahidrofolato, 30% formiltetrahidrofolato y 25% THF no sustituido. En cambio en la mitocondria, el 5-metil-THF representa el 7%, mientras que el 44% es formiltetrahidrofolato y el 48% corresponde a THF no sustituido (Appling, 1991).

Las enzimas dependientes de folato también están compartimentalizadas, como se mencionó anteriormente (ver FIGURA 2). La distribución en tales compartimientos es consistente con los roles conocidos del metabolismo de un carbono en cada uno de ellos. Así, los folatos citoplasmáticos participan en la biosíntesis de purinas y timidilato y en la generación de unidades monocarbonadas. Como se mencionó anteriormente, la interconversión de L-serina y glicina ocurre en ambos compartimientos, vía SHMT. En la mitocondria (y en los cloroplastos) los folatos son requeridos para la formilación del ARN de transferencia iniciador (ARN^t) para la síntesis de proteína organelar (Staben y Rabinowitz, 1984) y el catabolismo de la glicina (Kikuchi, 1973). La oxidación de los grupos metilo de la colina vía dimetilglicina y sarcosina sucede en la mitocondria como se explicó anteriormente (Lewis y col., 1978).

Es por ello que se ha establecido el concepto de agregados (*clusters*) organizados de enzimas para el metabolismo del folato. En un agregado de enzimas, los productos de una enzima son transferidos directamente a la siguiente enzima de la vía, actuando entonces como sustrato, sin difundir. Estas transferencias de metabolitos es llamada canalización (*channeling*). Una ventaja significativa de la canalización de coenzimas derivadas del folato en estas reacciones, es la del aumento de la estabilidad de dichas coenzimas al estar unidas a la enzima (Wagner, 1996).

2.5.2. Comunicación entre los compartimientos citosólicos y mitocondriales

El conjunto de coenzimas derivadas del folato en la mitocondria surgiría a partir de la entrada del folato desde el citosol (Appling, 1991). Aunque existen evidencias del intercambio de folatos reducidos entre el citosol y la mitocondria (Horne y col., 1992; Kim y col., 1993; Lin y Shane, 1994) es claro que este intercambio no es suficiente para sustentar los requerimientos de unidades monocarbonadas de un dado compartimiento (Horne y col., 1989; Lin y Shane, 1994). De esta manera son la serina, glicina, y formiato los que actúan como donores en ambos compartimientos y la presencia de la trifuncional C₁-THF sintetasa y de la SHMT, las cuales interconvierten las unidades monocarbonadas para satisfacer las necesidades de cada uno de los compartimientos (Appling, 1991).

La acumulación del folato citosólico y mitocondrial es dependiente de la actividad de la enzima folilpoliglutamato sintetasa (FPGS). Esta enzima cataliza la adición secuencial de hasta ocho residuos de ácido L-glutámico sobre el folato, generando péptidos de unión y carboxilo, siendo las especies predominantes los penta y los hexaglutamatos en la mayor parte de los tejidos de mamíferos (Schirch y Strong, 1989). Un aumento en la longitud de la cadena de glutamato, disminuye la afinidad de la FPGS por los folatos poliglutamatos, lo que indica un grado de regulación en la glutamilación de los folatos. La poliglutamilación sobre los folatos permite que estos sean retenidos intracelularmente en un determinado compartimiento celular (Horne y col., 1989; Schirch y Strong, 1989).

La FPGS también está presente en la mitocondria, lo cual indica que cada isoforma de la FPGS permite la acumulación de folatos en cada compartimiento (Synold y col., 1996). Las formas triglutamatos son suficientes para una normal retención celular (Wagner, 1996).

La L-serina y la glicina son rápidamente transportadas por un mecanismo *uniport* a través de la membrana mitocondrial interna (Cybulski y Fischer, 1976). La isoenzima SHMT_m está involucrada en este transporte, ya que cataliza la interconversión de estos aminoácidos de acuerdo a las necesidades metabólicas de la célula. Por tal propósito se han propuesto diversos modelos que involucran el transporte de estos aminoácidos. El más aceptado es el propuesto por Cybulski y Fischer (1976), a través del sistema de lanzadera (*shuttle*). De acuerdo con estos autores, el formiato generado durante el catabolismo mitocondrial de la colina genera MTF, como se mencionó anteriormente. La SHMT_m transfiere el grupo hidroximetilo a la glicina para formar serina. Esta es transportada al citosol y es reconvertida a glicina por la SHMT_c. El MTF generado sirve para las principales vías de síntesis (metionina, purinas y timidilato) mientras que la glicina regenerada puede regresar a la mitocondria para completar el ciclo. Alternativamente, la glicina mitocondrial puede ser catabolizada por el sistema de ruptura de glicina para formar NH₃, CO₂, NADH y MTF (Shane, 1989). El formiato es otro de los metabolitos que atraviesan la membrana mitocondrial libremente (FIGURA 2, Appling, 1991). El formiato, tanto citosólico como mitocondrial, puede ser destinado a numerosas vías metabólicas (FIGURA 2).

Se ha demostrado que el formiato puede ser un sustrato alternativo a la glicina y al 5-formil-THF (Jones y Lam, 1973; McKenzie y Jones, 1977; Ogur y col., 1977) ya que puede ser utilizado para la síntesis de 10-formil-THF (síntesis de purinas), MTF (síntesis de timidilato) o metil-THF (síntesis de metionina) según las necesidades metabólicas (Pasternack y col., 1996).

Un trabajo reciente sobre la compartimentalización de los folatos en *S.cerevisiae* destaca la importancia del formiato mitocondrial (Pasternack y col., 1994a). Los autores demostraron que el 25% de las unidades monocarbonadas utilizadas en el citoplasma para la síntesis de purinas derivan del formiato mitocondrial. Otros autores, trabajando también con el mismo organismo demostraron el rol de la SHMTm en la síntesis de TMP. Trabajaron con levaduras mutantes para la SHMTm, las cuales eran auxótrofas para TMP, de donde se deduce que el TMP puede ser sintetizado en la mitocondria, de manera de estar disponible para el compartimiento citosólico (McNeil y col., 1996).

2.6. Rol de la SHMT en procariontes

Si bien la SHMT de procariontes ha sido poco estudiada en relación a su rol fisiológico, la enzima tiene una función similar a la SHMTc de los mamíferos. En primer lugar cataliza la interconversión de serina y glicina, como sucede con todas las SHMTs estudiadas en otros organismos (Stauffer y col., 1974; Ema y col., 1979; Miyasaki y col., 1987). La enzima también está involucrada en la biosíntesis de purinas, timidilato y metionina (Stauffer y col., 1974; O'Connor y Hanson, 1975).

Una segunda ruta alternativa ha sido descrita en bacterias para la biosíntesis de glicina, la cual ha sido llamada *Tut* (utilización de la treonina). En este ciclo está involucrada la treonina deshidrogenasa (Ravnikar y Sommerville, 1987). El MTF sirve como principal donador de unidades monocarbonadas en las bacterias, siendo la SHMT la principal fuente de MTF (Stover y col., 1993) (FIGURA 6).

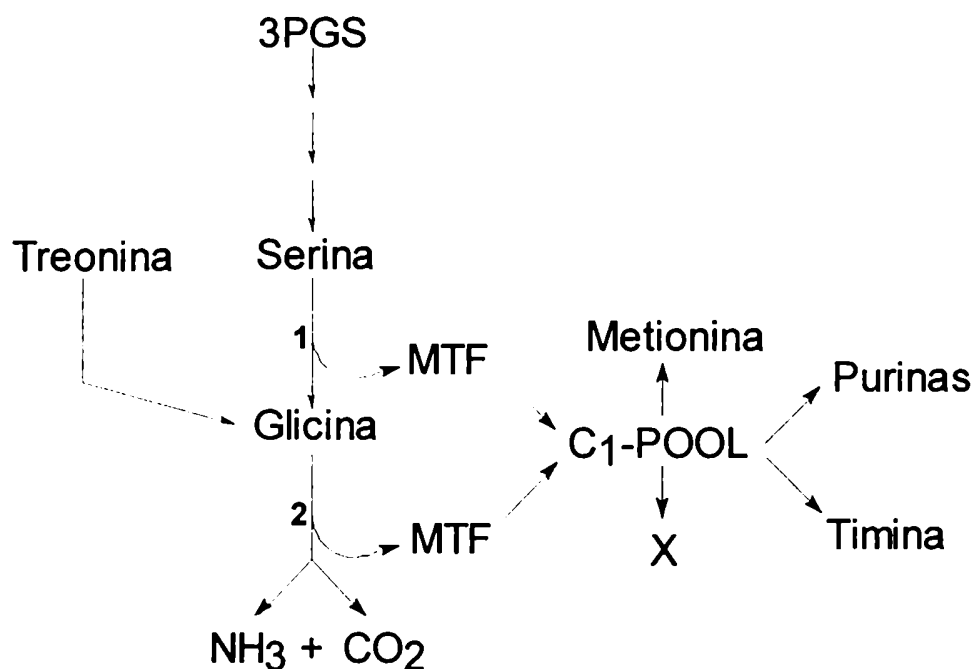


FIGURA 6 : Vías del metabolismo de la serina/glicina y de un carbono en bacterias. Los números indican las siguientes enzimas: (1) SERINA HIDROXIMETILTRANSFERASA; (2) sistema de ruptura de la glicina; X, componente(s) hipotético(s) a los cuales puede ser transferida una unidad de un carbono.

2.7. Rol de la SHMT en tripanosomátidos

2.7.1. Metabolismo de las purinas

Los tripanosomátidos son incapaces de sintetizar purinas. Hammond y Gutteridge (1984) muestran evidencias contra una vía funcional de síntesis *de novo* de purinas, a través de dos líneas de investigación. En primer lugar, una amplia variedad de tripanosomátidos no puede incorporar precursores en el anillo de las purinas (Bone y Steinert, 1956; Fernandes y Castellani, 1958; Pizzi y Taliaferro, 1960; Marr y col., 1978; Gutteridge y Gaborak, 1979; Ceron y col., 1979; Berens y col., 1981; Hansen y Webster, 1981; Fish y col., 1982). El precursor elegido para esos estudios ha sido glicina, aunque también han sido examinadas las incorporaciones de serina y de formiato. Algunas especies tales como *Crithidia deanei* con endosimbionte (Ceron y col., 1979) y *Strigomonas oncopelti* con cuerpos bipolares (Newton, 1957) pueden biosintetizar *de novo* a las purinas. Sin embargo, es más probable que los resultados observados sean debidos a las estructuras endosimbiontes ya que el aposimbionte *C.deanei* ha perdido esa capacidad de síntesis (Mundim y Roitman, 1977). Además, en *Trypanosoma equiperdum* fue informada la incorporación de glicina radioactiva en el ácido nucleico, pero la tasa de incorporación fue lenta comparada con la de purinas preformadas y no fue demostrado si la mismas purinas estaban realmente marcadas (Pizzi y Taliaferro, 1960). En segundo lugar es necesario un suplemento de purinas preformadas para el crecimiento de muchas especies de tripanosomátidos (Hammond y Gutteridge, 1984; Alleman y Gottlieb, 1996).

Contrariamente a lo expuesto anteriormente, J.L.Avila y A.Avila demostraron que epimastigotes de *T.cruzi* cultivados en un medio libre de nucleótidos, pueden desarrollar normalmente, indicando que el parásito podría sintetizar nucleótidos *de novo* y también obtener sus derivados del folatos por síntesis vía SHMT (J.L.Avila y A.Avila, 1981). Sin embargo tanto *L.braziliensis* como *L.mexicana* no pueden sintetizar nucleótidos o folatos (R.F.Steiger y E.Steiger, 1977; Marr y col., 1978). Se ha sugerido que la SHMT en los tripanosomas americanos generaría al MTF necesario para la síntesis de timidina y de 5-hidroximetildesoxicitidilato y es un precursor para la síntesis de otros folatos los cuales proveerían unidades monocarbonadas para la síntesis *de novo* de purinas y la glicina formada puede servir como fuente de carbono y nitrógeno para la síntesis de purinas (Nosei y J.L.Avila, 1985). Estos autores también propusieron que en el *T.cruzi*, la SHMT estaría acoplada a las enzimas del ciclo del timidilato: TS y DHFR (ver FIGURA 10).

J.L. Avila y A. Avila demostraron que un medio mínimo con catalasa de hígado bovina como única fuente de aminoácidos y libre de nucleósidos es suficiente para que crezcan epimastigotes de *T.cruzi* lo cual indicaría la operatividad de una vía de síntesis *de novo* de pirimidinas (J.L. Avila y A. Avila, 1981), la cual ya fue demostrada con anterioridad (Pizzi y Taliaferro, 1960; Gutteridge y Gaborak, 1979; Hammond y Gutteridge, 1980; Hill y col., 1981) pero también de purinas (J.L. Avila y A. Avila, 1981). Sin embargo O'Daly y Rodriguez demostraron que este crecimiento se debió a que la catalasa de hígado bovina estaba contaminada con proteínas y nucleótidos (O'Daly y Rodriguez, 1987).

Por lo tanto la teoría mas aceptada es la entrada de purinas desde el exterior, como bases preformadas, que se denominan vías de recuperación (FIGURA 7).

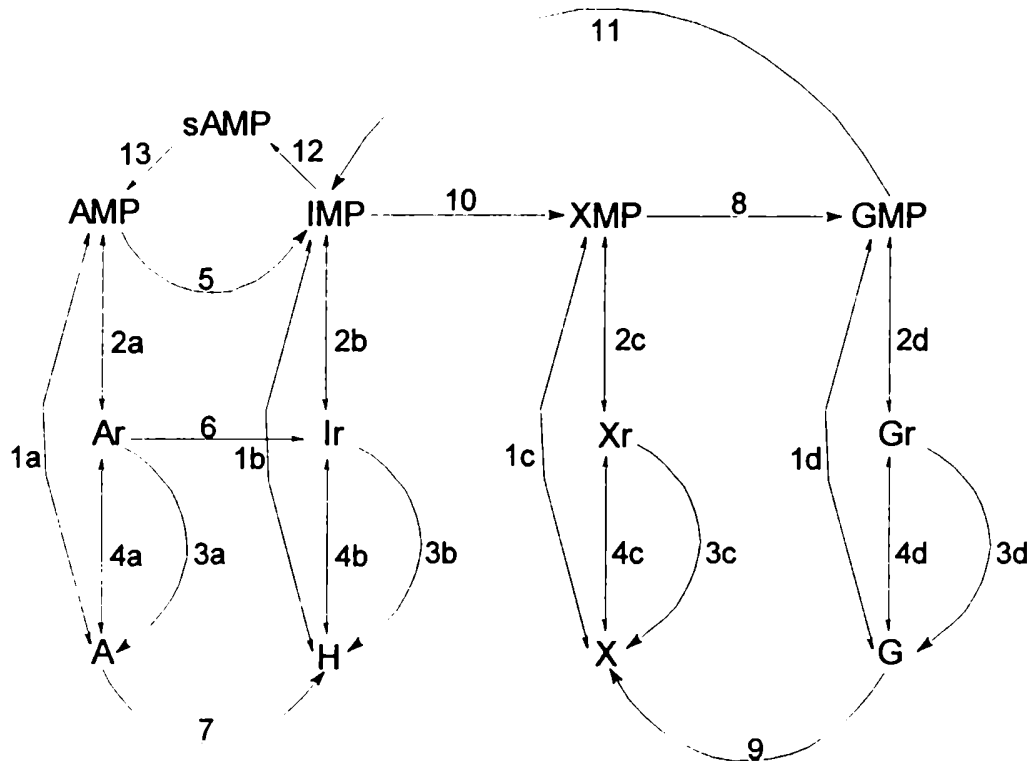


FIGURA 7: Posibles conversiones involucradas en la recuperación de purinas. Los números y letras indican:

- (1) fosforibosiltransferasas: (a) adenina; (b) y (d) hipoxantina-guanina y (c) xantina.
- (2) quinasas: (a) adenosina; (b) y (d) guanosina/inosina y (c) xantosina.
- (3) nucleosidasas: (a) adenosina; (b) inosina; (c) xantosina y(d) guanosina.
- (4) fosforilasas: (a) adenosina; (b) inosina; (c) xantosina y (d) guanosina purina nucleosidasa.
- (5) AMP deaminasa; (6) adenosina deaminasa; (7) adenina deaminasa; (8) GMP sintetasa; (9) guanina deaminasa; (10) IMP deshidrogenasa; (11) GMP reductasa; (12) adenilsuccinato sintetasa y (13) adenilsuccinato liasa.

Tripomastigotes de *T.brucei* y *T.congolense* presentarían un sistema de alta afinidad para la entrada de adenosina, inosina, guanosina, adenina e hipoxantina, pero no se sabe con precisión si existe más de un sistema de transporte (James y Born, 1980). En promastigotes de *L.braziliensis* se demostró que la entrada de adenina, hipoxantina, adenosina e inosina al parásito está regulada por un proceso mediado a bajas concentraciones, y por difusión a altas concentraciones (Hansen y col., 1982). A través de estudios genéticos en promastigotes de *L.donovani* se han demostrado dos sitios distintos de transporte de nucleósidos. Uno de ellos transporta inosina, guanosina y sus análogos, mientras que el segundo sitio transporta nucleósidos de pirimidina, adenosina y análogos de adenosina (Iovannisci y col., 1984; Aronow y col., 1987).

También se ha postulado la existencia de dos sistemas de transporte en *C.fasciculata*, uno de alta afinidad y baja velocidad y el otro de baja afinidad y alta velocidad (Kidder y col., 1978). La ausencia de inhibición del transporte por el uso de inhibidores de la cadena de transporte de electrones, tales como azida, cianuro y dinitrofenol sugieren que la entrada de purinas al parásito no es dependiente de energía (Kidder y col., 1978).

Una 3'-nucleotidasa/nucleasa asociada a membrana ha sido identificada en *Leishmania spp.*, *Trypanosoma spp.* y en *C.luciliae* (Gottlieb y Dwyer, 1983; Dwyer y Gottlieb, 1984; Hassan y Coombs, 1987; Gottlieb y col., 1986; Gbnele y col., 1986; Gottlieb, 1985) la cual hidroliza 3'-ribonucleótidos extracelulares dando nucleósidos y fósforo inorgánico y también utiliza ácidos nucleicos, rindiendo 5'-nucleótidos (Neubert y Gottlieb, 1990).

Se postula que esta enzima, sola o en conjunto con otras enzimas desfosforilantes, pueden generar nucleósidos de purinas los cuales pueden ser fácilmente transportados a través de la membrana (Alleman y Gottlieb, 1996).

2.7.2. Metabolismo de pirimidinas

2.7.2.1. Síntesis *de novo*

Contrariamente a lo que sucede con el metabolismo de las purinas, los nucleótidos de pirimidina pueden ser sintetizados o bien presentar vías de recuperación en tripanosomátidos. La FIGURA 8 describe la vía de síntesis de pirimidinas que opera en tripanosomátidos y prácticamente no presenta diferencias con la observada en el resto de los eucariontes.

Hay una serie de evidencias que demuestran una vía de síntesis *de novo* de pirimidinas en Trypanosomatidae. La primera de ellas indica que las formas amastigote, epimastigote y tripomastigote de *T.cruzi* pueden incorporar bicarbonato radiactivo en las pirimidinas del ADN y del ARN (Gutteridge y Gaborak, 1979). Además, el carbono ureído de la citrulina es incorporado en las pirimidinas de *C.fasciculata*, probablemente vía la formación de carbamoil fosfato (Kidder y col., 1976).

En segundo lugar, choanomastigotes de *C.fasciculata* pueden ser cultivados en un medio definido libre de pirimidinas (Pizzi y Taliaferro, 1960; Frank y col., 1970).

Además, tampoco es necesario agregar pirimidinas para el crecimiento de promastigotes de *L.braziliensis* y *L.donovani*, confirmando una vía biosintética (James y Born, 1980; Steiger y Black, 1980).

En tercer lugar, todas las enzimas requeridas para la síntesis *de novo* de UMP han sido detectadas en extractos crudos de varias especies de tripanosomátidos (Gero y Coombs, 1980 y 1981; Hill y col., 1981)

Todas las enzimas de la vía de la síntesis de pirimidinas han sido detectadas en las formas tripomastigote, amastigote y epimastigote de *T.cruzi* (Hammond y Gutteridge, 1980), tripomastigotes de *T.brucei* y promastigotes de *L.mexicana amazonensis* (Hammond y Gutteridge, 1981), promastigotes de *L.tropica* y formas de cultivo de *C.fasciculata* (Hill y col., 1981). Las primeras tres enzimas de la vía (FIGURA 8) son citosólicas y aparecen como proteínas no asociadas en *C.luciliae* (Tampitag y O'Sullivan, 1986), contrario a lo que ocurre en mamíferos, las cuales co-purifican como un complejo multienzimático (Krenitsky y col., 1969). La dihidroorotato oxidasa de *Kinetoplastida* es una enzima soluble y que consume oxígeno, pero no está ligada a la cadena respiratoria (Hammond y Gutteridge, 1984). La misma enzima de *C.fasciculata* y de *T.brucei* exhibe un espectro característico de flavina, sugiriendo que probablemente sea una flavoproteína. Las enzimas orotato fosforibosiltransferasa y orotidina-5' fosfato decarboxilasa son citosólicas y existen como un complejo enzimático en eucariontes superiores (Jones, 1980), pero en tripanosomátidos son particuladas (Rubin y col., 1962; Gero y Coombs, 1980; Hammond y Gutteridge, 1981) y se observó que están asociadas a glicosomas en tripomastigotes de *T.brucei*, promastigotes de *L.mexicana amazonensis*

(Hammond y col., 1981), epimastigotes de *T.cruzi* (Hammond y Gutteridge, 1983) y *C.luciliae* (Pragobpol y col., 1984).

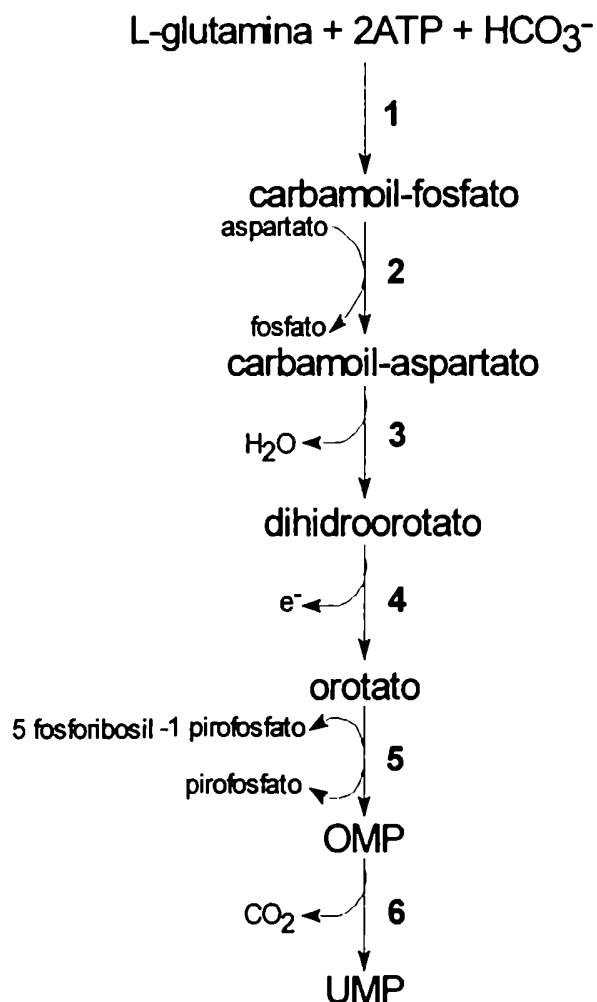


FIGURA 8: Vía de la síntesis de pirimidinas. Los números indican las siguientes enzimas: (1) carbamil-fosfato sintetasa II; (2) carbamil-aspartato transferasa; (3) dihidroorotasa; (4) dihidroorotato oxidasa; (5) orotato fosforibosiltransferasa; (6) orotidina-5' fosfato decarboxilasa.

2.7.2.2. Recuperación e interconversión de pirimidinas preformadas

Los tripanosomátidos pueden sintetizar UMP vía recuperación de bases preformadas (Hammond y Gutteridge, 1984) (FIGURA 9). Rubin y col., (1962) estudiaron la utilización de pirimidinas por *T.equiperdum* y encontraron que el uracilo es fácilmente incorporado en los ácidos nucleicos, posiblemente vía uridina fosforibosiltransferasa. Gutteridge y Gaborak (1979) informaron que el uracilo es incorporado mucho más lentamente por los amastigotes de *T.cruzi* que por los epimastigotes y tripomastigotes del mismo parásito. Además la uridina fosforibosiltransferasa fue detectada en epimastigotes y tripomastigotes, pero no en los amastigotes. También la uridina fosforibosiltransferasa fue detectada en extractos crudos de *L.mexicana amazonensis*, *L.tarentolae*, *C.fasciculata* (Hammond y Gutteridge, 1981) y en *C.luciliae* (Tampitag y col., 1986). La uridina fosforilasa y la uridina nucleosidasa han sido detectadas en *T.cruzi*, *T.brucei*, *C.fasciculata*, *C.luciliae*, *Leishmania spp* y en *Herpetomonas* (Hassan y Coombs, 1986; Miller y col., 1987; Kozalka y Krenitsky, 1979; Dewey y Kidder, 1973; Hammond y Gutteridge, 1981; Tampitag y O'Sullivan, 1986). Todas las formas de *T.cruzi* son capaces de utilizar la citidina para la síntesis de ácidos nucleicos (Gutteridge y Gaborak, 1979). La citidina deaminasa está presente en *C.fasciculata* y *T.cruzi* (Kidder, 1984), *Leishmania spp*, *Herpetomonas* y *T.brucei* (Hassan y Coombs, 1986). La enzima citidina nucleosidasa fue detectada en *C.fasciculata* (Dewey y Kidder, 1973) y *L.donovani* (Koszalka y Krenitsky, 1979).

La timidina es utilizada eficientemente por la mayor parte de los tripanosomátidos para la síntesis de ácidos nucleicos (Pizzi y Taliaferro, 1960; Gutteridge y Gaborak, 1979; Lafon y col., 1982; Mukkada y col., 1985; Cosgrove y col., 1979; Al Chalabi y Gutteridge, 1977).

La timidina fosforilasa está presente en varios tripanosomas, pero está ausente en *C.oncopelti* (Al Chalabi y Gutteridge, 1977), *Leishmania spp*, *Herpetomonas* y *C.fasciculata* (Hassan y Coombs, 1986). La timidina nucleosidasa ha sido identificada en promastigotes de *L.mexicana mexicana* y *C.fasciculata* (Hassan y Coombs, 1986). La timidina fosfotransferasa sólo ha sido identificada en *L.donovani* (Krenitsky y col., 1980).

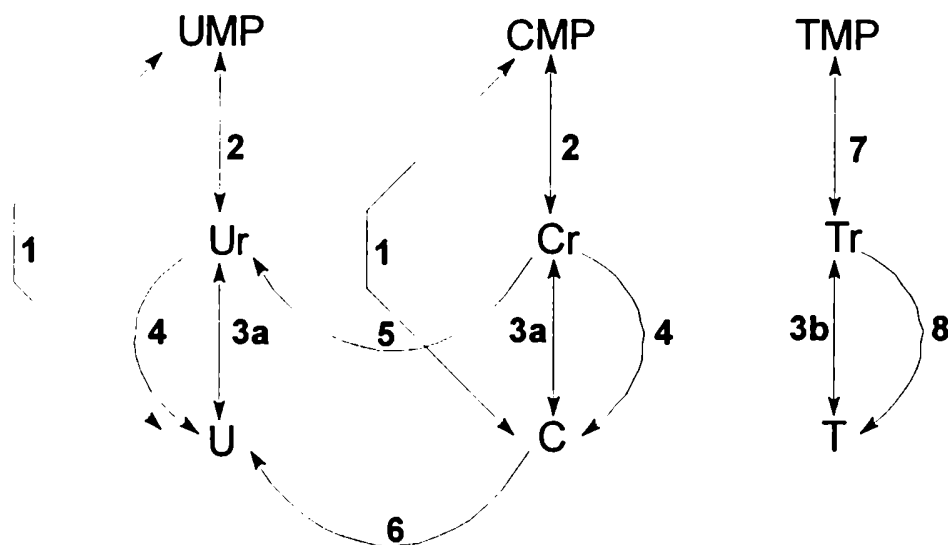


FIGURA 9 : Vías de recuperación de pirimidinas. Los números indican las siguientes enzimas:

(1) uridina fosforibosiltransferasa; (2) uridina (citidina) quinasa; (3a) uridina (citidina) fosforilasa; (3b) timidina fosforilasa; (4) uridina (citidina) nucleosidasa; (5) citidina deaminasa; (6) citosina deaminasa; (7) timidina quinasa; (8) timidina nucleosidasa.

Los tripanosomátidos también son capaces de interconvertir pirimidinas (FIGURA 10). En un gran número de protozoarios fue identificado el complejo bifuncional TS-DHFR (Garret y col., 1984; Ivanetich y Santi, 1990), el cual junto a la SHMT completan el ciclo del timidilato. La operatividad de este ciclo le permite al parásito sintetizar dTMP a partir de dUMP. De hecho ya fue clonado, secuenciado y expresado el gen del *T.cruzi* en *E.coli* (Reche y col., 1994), como también los correspondientes a *T.brucei* (Gamarro y col., 1995) y *L.major* (Grumont y col., 1988). El gen codifica para ambas enzimas, que funcionan como un complejo enzimático, como se indicó anteriormente (Garret y col., 1984; Ivanetich y Santi, 1990). También fue purificado este complejo enzimático a partir de promastigotes de *L.tropica* (Meek y col., 1985) y choanomastigotes de *C.fasciculata* (Ferone y Roland, 1980). Así, el MTF generado por la SHMT a partir de serina y THF, va a ser sustrato de la TS para la síntesis de dTMP a partir de dUMP con la consecuente formación de DHF. Finalmente el DHF es reducido por la DHFR-NADPH dependiente para regenerar al THF (FIGURA 10).

Ha sido detectada una inusual DHFR en *C.fasciculata*, la cual puede utilizar pteridinas no conjugadas como sustrato (Oe y col., 1983). Este parásito tiene un sistema de transporte dependiente de energía para el folato, el cual puede también ser utilizado para incorporar al metotrexate. Este metabolito es un conocido inhibidor de la DHFR (Hammond y Gutteridge, 1984), pero en *C.fasciculata* puede promover el crecimiento a la misma concentración que el folato. Esto sugiere que el metotrexate es metabolizado a compuestos activos que no tienen efecto inhibitorio sobre la actividad reductasa (Oe y col., 1983).

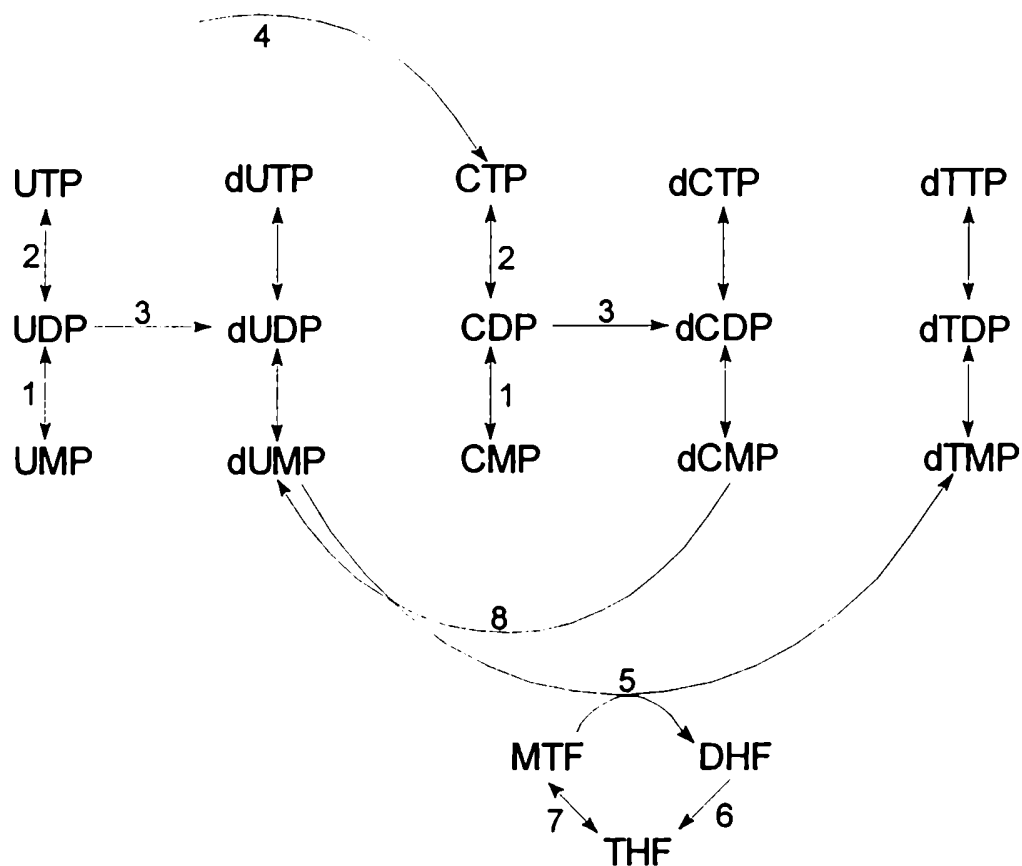


FIGURA 10: Interconversión de pirimidinas. Algunas de las enzimas son las siguientes: (1) citidilato (uridilato) quinasa; (2) nucleósido difosfato quinasa; (3) ribonucleótido reductasa; (4) CTP sintetasa; (5); timidilato sintetasa; (6) dihidrofolato reductasa; (7) SERINA HIDROXIMETILTRANSFERASA; (8) desoxicitidilato desaminasa.

2.7.3. Síntesis de fosforilcolina

En nuestro laboratorio, utilizando la técnica no invasiva de NMR, se pudo detectar la posible existencia de un metabolismo reductivo del CO₂ en el *T.cruzi* (Frydman y col., 1990).

Dicha vía es independiente de otras reacciones de carboxilación puestas de manifiesto con anterioridad en el microorganismo (Cannata y Cazzulo, 1984; Cazzulo, 1992), y conduce a la incorporación del mismo en la fosforilcolina (Frydman y col., 1990). En dichos experimentos se pudo comprobar que cuando las células eran incubadas en presencia de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ se obtenía, además de la señal a 182,5 ppm correspondiente a $1\text{-}^{13}\text{C}$ -succinato, un doblete en 59,39-59,19 ppm correspondiente a $1\text{-}^{13}\text{C}$ -fosforilcolina, un metabolito no detectado antes en tripanosomátidos. La vía que conduce a la síntesis de fosforilcolina podría ocurrir tentativamente de acuerdo al esquema de la FIGURA 11, en la cual la SHMT sería clave para su operatividad.

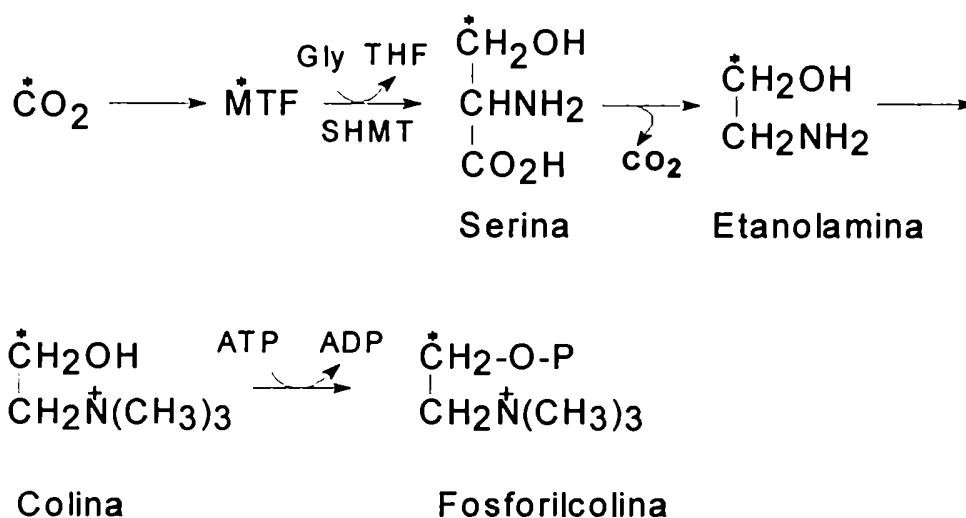


FIGURA 11 : Vía de síntesis de fosforilcolina propuesta en tripanosomátidos. Rol de la SHMT. El asterisco indica el destino del carbono proveniente del CO_2 .

La incorporación del CO₂ en el MTF ocurriría previa transformación del mismo en formiato por acción de una CO₂ reductasa del tipo de la descrita en *Clostridium pasteurianum* o una formiato deshidrogenasa descrita tanto en bacterias aeróbicas y anaeróbicas, como también en levaduras y animales, y que actúan con ferredoxina como agente de óxido-reducción (Thauer y col., 1977)

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio se correlacionan con los investigados en *S.cerevisiae* (Pasternack y col., 1994a). En primer lugar, el formiato exógeno es una fuente monocarbonada en la ausencia de serina. Fue demostrado que la vía de la C₁-THF sintetasa es la que se activa en presencia de este metabolito (Pasternack y col., 1992). Utilizando la técnica de NMR, se evidenció que cuando las levaduras eran incubadas con [2-¹³C] glicina y formiato, este causaba una drástica disminución de dos de las tres señales correspondientes a colina, una asociada al metil-THF y la otra al MTF, indicando que el formiato compite con la glicina en la síntesis de colina (Pasternack y col., 1996). Similares resultados fueron obtenidos al ensayar por NMR el destino de la [2-¹³C] glicina en cepas ser3 de *N.crassa*, las cuales son incapaces de sintetizar serina a partir de glucosa (Jeong y V.Schirch, 1996). Estos autores identificaron en el espectro de NMR las señales correspondientes a colina, serina y etanolamina, metabolitos que estarían involucrados en la vía propuesta por Frydman y colaboradores (Frydman y col., 1990).

Además fue demostrado que el flujo de unidades monocarbonadas provenientes de la mitocondria, fundamentalmente formiato y el C₃ de la serina, participan en la síntesis de colina y purinas de otros compartimientos, demostrando la comunicación que existe entre los compartimientos celulares (Pasternack y col., 1994a). También fue demostrado que el formiato mitocondrial es transportado al citosol y activado por la C₁-THF sintetasa, el cual podría competir con la marcación del C₂ y el C₈ proveniente de C₂ de la glicina. La activación del formiato es principalmente por la C₁-THF sintetasa citosólica (Pasternack y col., 1992).

El metabolismo predominante de formiato a serina es atribuido al sistema enzimático C₁-THF sintetasa/SHMT, al menos en levaduras. En primer lugar, cepas ser¹⁻ que son deficientes de la C₁-THF sintetasa citosólica no crecen en medios de cultivo aún en presencia de formiato y glicina (Pasternack y col., 1994b). Además no es posible detectar la marca del C₃ de la serina proveniente del formiato en ausencia de dicha enzima (Pasternack y col., 1992). En segundo lugar, aumentando la concentración de la SHMT resulta en un aumento de la actividad de la C₁-THF sintetasa (Strong y Schirch, 1989). Estos resultados confirman la idea de que el formiato es incorporado por el sistema C₁-THF sintetasa/SHMT con la formación de serina, y esta puede ser utilizada en numerosas vías metabólicas, como se mencionó anteriormente (ver FIGURA 2), y una de las posibles rutas metabólicas puede ser la propuesta por Frydman y col. (1990) con la formación de fosforilcolina o de fosfolípidos.

2.7.4. Síntesis de metionina

La enzima metilen THF reductasa está involucrada en la síntesis de metionina en eucariontes (ver sección 2.4.2.1.) al catalizar la formación de metilTHF a partir de MTF. La enzima ha sido identificada en varias *Leishmania spp* pero está ausente en *T.cruzi* (J.L.Avila y Nosei, 1983). Por otra parte, no se ha informado la presencia en tripanosomátidos de la metionina sintetasa.

El reciclaje de metionina en estos organismos se lleva a cabo a través de las transaminasas. Células intactas de *C.fasciculata* cultivadas en presencia de [¹⁵N] tirosina, permitieron detectar la presencia de [¹⁵N]metionina, demostrando que esta reacción ocurre en células viables (Berger y col., 1996). Este proceso es el paso final en el reciclaje de metionina a partir de metiltioadenosina, un producto de la S-adenosilmetionina decarboxilada proveniente de la vía de síntesis de poliaminas. Estos autores demostraron que tanto *C.fasciculata* como *T.b.brucei* transaminan aminoácidos aromáticos para regenerar metionina a partir de α -cetometiobutirato, que es un producto final de la S-adenosilmetionina. La SHMT no está involucrada en la vía de reciclaje de metionina propuesta por Berger y colaboradores.

2.8. Análisis estructural y evolutivo de las SHMTs

Tanto la técnica de isoelectroenfocado como la cromatografía de intercambio iónico son métodos fáciles que permiten separar a las isoformas de la SHMT, sin necesidad de aislar previamente a los compartimientos que las contienen (Zelikson y Luzzati, 1976; L.Schirch y Peterson, 1980; Ogawa y Fujioka, 1981; Masuda y col., 1987; Artigues y col., 1990; Sakamoto y col., 1991; Turner y col., 1992). La presencia de distintas formas moleculares puede ser debida a su codificación por genes diferentes (isoenzimas) o bien por modificaciones postraduccionales. Un estudio de péptidos conteniendo cisteína, obtenidos por digestión trípica, demostró que las isoenzimas aisladas de hígado de conejo tienen diferente estructura primaria (Gavilanes y col., 1982 y 1983). Además, fue determinada la estructura primaria completa de las SHMTc (Martini y col., 1987) y de la SHMTm (Martini y col., 1989) de ese origen, confirmando las diferencias observadas. Sin embargo, recientes estudios demostraron la deamidación e isomerización *in vivo* de un residuo 5 asparaginil en el 66% de la SHMTc de hígado de conejo, lo cual conduce a la modificación de su punto isoeléctrico (Artigues y col., 1990). Esta modificación ha sido propuesta como una señal para la degradación de la enzima (Artigues y col., 1993). Turner y col., (1992) purificaron la SHMT a partir de la mitocondria de hojas de *P.sativum* y demostraron que la actividad SHMTm eluída de una columna de Mono Q se podía resolver en dos picos bien definidos, los cuales correspondían a dos isoformas de la enzima mitocondrial. Estos resultados indican claramente que si bien existen SHMTs de diferente localización intracelular, también es

posible la modificación postraducciona que se manifiesta por la presencia de más de una isoforma con la misma localización intracelular.

Como se mencionó antes, las formas citosólicas y mitocondriales son codificadas por genes separados, que han sido mapeados por hibridización *in situ* por fluorescencia en las regiones cromosómicas humanas 17p11.2 y 12q13 respectivamente (Garrow y col., 1993) y probablemente surgieron por un evento de duplicación de las secuencias de las SHMTs, de acuerdo a la homología de secuencia que existe entre ellas. Este evento pudo haber ocurrido después de la divergencia de procariontes y eucariontes, ya que entre diez proteínas secuenciadas, existe un 20% de homología entre SHMTs procariontes y eucariontes, mientras que existe un 39% de homología entre las SHMTs eucariontes secuenciadas (Garrow y col., 1993).

La SHMTc de hígado de oveja (Usha y col., 1994) presenta un grado mayor de identidad con la SHMTm de hígado de conejo (Martini y col., 1989) que con la SHMTc de *N.crassa* (McClung y col., 1992), lo cual sugiere, a diferencia de lo anteriormente expuesto, la posibilidad de un evento de duplicación ocurrido después de la divergencia de animales y hongos.

La región alrededor del sitio de unión del PLP al residuo de lisina es altamente conservada en todas las SHMTs estudiadas (Bossa y col., 1976; Garrow y col., 1993). Esto es fácilmente explicable, puesto que todas las SHMTs secuenciadas hasta ahora fueron dependientes de PLP, el cual es esencial en esos casos para que las reacciones que catalizan se lleven a cabo.

En síntesis, la estructura primaria de la SHMT ha sido conservada a través de la evolución, lo cual refleja un requerimiento estricto para la unión y catálisis de sustratos.

2.9. Inhibidores de la SHMT

La existencia de factores inhibitorios permiten ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de acción de las enzimas. La SHMT no es la excepción; se han descrito numerosos inhibidores endógenos de la enzima, tales como el 5-formilTHF sobre la SHMT de hígado de conejo (Stover y V. Schirch, 1991) y el 5-metilTHF sobre las enzimas de hígado de conejo (L. Schirch y col., 1977; Stover y V. Schirch, 1991) e hígado de cerdo (Matthews y col., 1982). Debido a la alta afinidad de la SHMT por el 5-formilTHF y por el 5-metilTHF y la alta concentración de estos derivados del folato en las células, se ha sugerido que estos cofactores son capaces de regular la actividad de la SHMT *in vivo* (Stover y V. Schirch, 1991).

Recientemente se ha identificado y aislado un inhibidor endógeno de la SHMT, cuya estructura es muy diferente a la de un derivado del folato. Este inhibidor, aislado de semillas de *V. radiata*, es termoestable y se encuentra unido a una proteína de la cual se libera por calentamiento a 98°C (Vijaya y col., 1991). La mimosina es un aminoácido de los vegetales que inhibe la replicación del ADN en células de mamíferos (Mosca y col., 1992). Se ha demostrado que puede unirse efectivamente a las SHMTc y SHMTm de la línea celular CHO y por lo tanto se ha sugerido que la droga puede inhibir a las isoformas *in vivo* (Lin y col., 1996).

La D-cicloserina funciona como una droga antitumoral en ratones portando al virus de la leucemia de Freund por inhibición de la SHMT (Bukin y col., 1979). También fue demostrado que la D-cicloserina se une irreversiblemente a la SHMT de hígado de oveja formando una base de Schiff con el PLP, generando a la apoenzima (Manohar y col., 1984). Otro análogo de la L-serina, la O-amino-D-serina, es un inhibidor reversible no competitivo de la SHMT de alta eficacia, ya que a una concentración de 2 μ M produce un 50% de inhibición de la enzima (Baskaran y col., 1989).

La D-alanina es un inhibidor irreversible de la SHMT (L.Schirch, 1982). El mecanismo de inactivación es una lenta transaminación en la cual la D-alanina es convertida a piruvato y el PLP del sitio activo es convertido a piridoxamina fosfato (reacción 9, TABLA I). Este se disocia fácilmente del sitio activo, generando a la apoenzima, la cual, como se mencionó anteriormente, es inactiva. La L-cisteína es un inhibidor efectivo de la SHMT por disociar al PLP de la enzima (L.Schirch, 1982; Miyasaki y col, 1987).

La inhibición reversible de la SHMT observada por el tratamiento de la enzima con reactivos de grupos sulfidrilos, tales como nitrato de plata, *p*-cloromercuriobenzoato y el cloruro de mercurio, indica que existen uno o más grupos sulfidrilo involucrados en la actividad enzimática (Miyasaki y col., 1987). Evidencias respecto a la existencia de un grupo sulfidrilo en el sitio activo de la enzima fueron demostradas por el tratamiento de la SHMT de hígado de conejo (apoenzima) con iodoacetato (L. Schirch y col., 1980).

2.10. Patologías relacionadas con la SHMT en el Hombre

La incorporación del carbono β de la serina en el ADN y la actividad SHMT aumentan cuando las células son estimuladas para proliferar y también durante la fase S del ciclo celular (Eichler y col., 1981). El tratamiento con el mitógeno fitohemoaglutinina en células arrestadas resultó en un aumento de 4 a 9 veces en la actividad SHMT (Thorndike y col., 1979). Existen numerosos trabajos que demuestran un aumento de la actividad SHMT en ciertos tumores, tales como en carcinoma renal (Snell, 1985), carcinoma mamario (Snell, 1989), sarcoma y carcinoma de colon humano (Snell y col., 1988). Recientes trabajos demuestran que la SHMT puede ser inhibida en forma efectiva con agentes antiproliferativos e inmunosupresivos, tales como actinomicina, citarabina, asparaginasa y ciclosporina en combinación con 4-deoxipiridoxina (dB6), el cual es un antagonista de la vitamina B6 (Trakatellis y col., 1994).

Si bien la SHMT está expresada en todos los tejidos de mamíferos ensayados (Snell, 1985), la enzima tiene un rol importante en el sistema nervioso central (Daly y Aprison, 1974; Waziri y col., 1990). En el cerebro, la ruptura de serina por la SHMT es la fuente principal de glicina y unidades monocarbonadas (Shank y Aprison 1970). Una reducida actividad SHMT puede causar un aumento en los niveles de serina y glicina (Waziri y col., 1990; Devor y Waziri, 1993), los cuales pueden amplificar el efecto neurotóxico producido por el receptor del N-metil-D-aspartato (Waziri y col., 1990, 1992; Devor y Waziri, 1993).

Diversos estudios han sugerido que este proceso ocurre en los cerebros de psicóticos y esquizofrénicos, ya que en ellos fue observada una reducida actividad SHMT (Waziri y col., 1990 y 1992; Devor y Waziri, 1993). Además, al reducirse la actividad SHMT, puede conducir a una disminución de los niveles de adenosina, cuyo rol es el de actuar como neuromodulador de dopamina y glutamato y también como un agente neuroprotector. Por lo tanto, una reducción en la actividad SHMT puede promover un daño neuronal (Devor y Waziri, 1993).

Recientemente se ha sugerido que una deficiencia en la actividad de la SHMTc puede estar relacionada con el síndrome de Smith-Magenis (Elsa y col., 1995). Este síndrome se encuentra en individuos que presentan retraso en el crecimiento, anomalías faciales y conductas inusuales (Greenberg y col., 1991).

OBJETIVOS

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio con epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, utilizando la técnica no invasiva de resonancia magnética nuclear (NMR), permitieron identificar dos señales: una correspondiente a succinato y otra a fosforilcolina, cuando el parásito era cultivado en presencia de NaH [^{13}C]O₃. La presencia de fosforilcolina no había sido demostrada con anterioridad en tripanosomátidos, por lo que se sugirió la existencia de un metabolismo reductivo del CO₂ en el *T. cruzi* (Frydman y col., 1990).

En base a dichos experimentos, se decidió investigar la vía propuesta. Una de las enzimas involucradas en dicha vía es la SHMT. Esta enzima cumple diversos roles en eucariontes, ya que está relacionada con el metabolismo de unidades monocarbonadas, necesarias para la síntesis de purinas, timidilato, metionina y colina, entre otros compuestos. Hasta el momento, no ha sido demostrada una vía de síntesis de purinas en tripanosomátidos y no existen suficientes evidencias en relación al metabolismo de la colina y metionina. Es por todo ello que fue de interés demostrar la presencia de la enzima en dichos organismos, como también su purificación y caracterización. Para ello, se decidió trabajar con dos tripanosomátidos: *T. cruzi* y *Crithidia fasciculata*.

La SHMT de eucariontes existe como dos isoenzimas, de diferente localización subcelular, siendo identificadas en mitocondrias y citosol. También se ha informado una tercera, presente en cloroplastos de plantas superiores. Sin embargo, la SHMT puede estar también presente como isoformas de igual localización subcelular.

En base a esta información, se propuso investigar la presencia de isoformas en tripanosomátidos y si su existencia era confirmada, establecer un estudio comparativo en relación a sus propiedades moleculares, hidrodinámicas y cinéticas. Sabiendo que se han publicado trabajos que señalan que la SHMT puede ser o no dependiente de PLP para catalizar las reacciones que lleva a cabo, fue de interés demostrar la dependencia de las enzimas de ambos parásitos por el cofactor, utilizando diversas metodologías

Si se confirmaba la presencia de la enzima en dichos organismos y se lograba una efectiva purificación, entonces se procedería a la secuenciación del extremo amino terminal, para de esta manera, establecer un estudio comparativo con las ya descritas en procariontes y eucariontes.

También fue de interés investigar la regulación de la enzima en tripanosomátidos. Para ello se procedió a la búsqueda de algún inhibidor endógeno de la SHMT, análogo a los descritos a partir de otras fuentes. Si su existencia era demostrada, el paso a seguir consistiría en su purificación y caracterización.

MATERIALES Y METODOS

1. Organismos

Choanomastigotes de *Crithidia fasciculata*, pertenecientes a la cepa ATCC 11745.

Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, correspondientes a las cepas Dm28c, Tul 0, Tul 2, CL Brenner, Y, CA-I 72 hDNA, HO 3/5, Sylvio y RA.

2. Reactivos

2.1. Drogas

L-serina, L-cisteína, clorhidrato de hidroxilamina, ácido tetrahidrofólico (THF), β -mercaptoetanol, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), piridoxal-5'-fosfato (PLP), 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona (dimedona), ditioneitol (DTT), trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino)butano (E-64), Na-p-tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK), fenil metil-sulfonil fluoruro (PMSF), pepstatina A, Blue Sepharose CL-6B y Reactive Red Agarose tipo 3000 (unido a 4% de agarosa) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. 3-[14 C]-L serina (54mCi/mmol) fue obtenida de Amersham Co. DEAE celulosa (0,66 meq/g) fue obtenida de Serva Entwicklungslabor (Heidelberg). Citocromo c, ribonucleasa A, quimotripsinógeno A, ovoalbúmina, albúmina sérica bovina (BSA), β -amilasa, alcohol deshidrogenasa, catalasa, apoferritina, Blue Dextran 2000, Phenyl Sepharose CL-4B y Sephadex G200 fueron obtenidos de Pharmacia. El sulfato de amonio de grado enzimático fue obtenido de Mann. El resto de las drogas fueron de calidad analítica.

2.2. Enzimas

Las enzimas malato deshidrogenasa de corazón de cerdo, lactato deshidrogenasa de músculo de conejo y catalasa de hígado de vaca, utilizadas para ensayos enzimáticos fueron obtenidas de Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.

3. Centrifugaciones

Las centrifugaciones fueron realizadas entre 0 y 4° C, utilizando equipos Sorvall 5C-5B (rotores SS34 y GSA) y las ultracentrifugaciones mediante equipos Sorvall OTD55B (rotor Ti65). Las ultracentrifugaciones de los gradientes de sacarosa fueron realizadas con equipos Beckman L8-70M (rotor SW55 Ti).

4. Cultivos de los parásitos y obtención de los extractos crudos, libres de células

4.1. *C.fasciculata*

Los choanomastigotes de *C.fasciculata* fueron cultivados de acuerdo al método descrito por Bacchi y col., 1974. El medio de cultivo contenía por litro de solución (pH 7-7,4): infusión de hígado (5 gr), pluripectona (7,5 gr), infusión de cerebro-corazón (7,5 gr), ClNa (5 gr), ClK (2 gr), ácido ascórbico (0,2 gr), NaH₂PO₄.4H₂O (0,6 gr), MgSO₄.7H₂O (0,5 gr), sacarosa (0,5 gr), MOPS (0,5 gr), hemina (0,02 gr disueltos en 3 ml de 50% de trietanolamina) y agua.

El medio de cultivo fue esterilizado en autoclave durante 15 min. a 1,5 atm. Se sembró en dicho medio un stock de parásitos ($1-2 \times 10^6$ células/ml de concentración final) y se incubó a 28 °C durante 24 horas, con agitación continua. Al término de ese período los cultivos llegan al comienzo de la fase exponencial (precultivo) y se transfieren a un volumen aproximadamente diez veces mayor de medio fresco. Después de 48 horas de incubación a 28 °C con agitación continua, los parásitos (aproximadamente 10^8 células/ml) se cosecharon por centrifugación a 4000xg durante 10 min. a 4 °C, lavándose el sedimento 2 veces con amortiguador fosfato monopotásico disódico 20 mM, NaCl 154 mM, pH 7,4. Los parásitos se conservaron congelados a -25 °C para su posterior procesamiento.

A menos que se indique lo contrario, todas las operaciones de purificación descritas a continuación se llevaron a cabo a temperaturas entre 0 y 4 °C.

Para la preparación del extracto crudo, libre de células, las mismas se descongelaron y se resuspendieron en amortiguador fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 9 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8, en la proporción de 3 ml por cada gramo de peso húmedo. La suspensión fue sometida a un tratamiento ultrasónico consistente en la aplicación de 10 pulsos de 30 segundos cada uno a 45 Watts en baño de hielo (Sonifier Cell Disruptor, Model W 185, Heat Systems-Ultrasonic Inc. Plainview, I.L., N.Y.) y el extracto crudo fue centrifugado a 27000xg durante 30 min. El sobrenadante fue separado y el sedimento resultante fue suspendido en dos volúmenes y sometido a un tratamiento similar al anterior. El sedimento en este último

caso fue descartado y los sobrenadantes de ambos tratamientos combinados y utilizados como fuente de las isoformas de SHMT.

En algunos casos y para una mejor conservación de los extractos, los mismos fueron fraccionados por precipitación con sulfato de amonio. Para ello se utilizó una solución saturada de sulfato de amonio, borato/bórico 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5. La mayor parte de la actividad enzimática se localizó en la fracción que precipitó entre 30 y 70% de saturación. Este corte fue centrifugado a 27000xg durante 30 min y el sedimento fue resuspendido en fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 9 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8.

4.2. *T.cruzi*

Las distintas cepas de *T.cruzi*, utilizadas en este trabajo, fueron cultivados de acuerdo al protocolo descripto por Cazzulo y col. (1985). El medio de cultivo utilizado contenía, por litro de solución (pH 7,3-7,4): infusión cerebro-corazón (33 gr), triptosa (3 gr), Na_2HPO_4 (4 gr), KCl (0,4 gr), glucosa (0,3 gr) y hemina (0,02 gr en 3 ml de 50% de trietanolamina). La solución fue esterilizada en autoclave a 1 atmósfera de presión durante 20 min. Luego se agregó suero fetal bovino (10% v/v) inactivado por calor (45 min. a 57°C). Se sembró en ellos un inóculo de un precultivo en crecimiento exponencial (5×10^6 células/ml de concentración inicial), y se incubó a 28 °C durante 7 días con agitación constante. Al término de ese lapso se obtuvieron 8×10^7 células/ml, las cuales fueron cosechadas por centrifugación a 4000xg durante 15 min. El sedimento fue lavado dos veces con NaCl 145 mM. Los parásitos fueron conservados a - 25°C hasta su

procesamiento. Para la preparación del extracto crudo, libre de células, se procedió como en el caso de *C.fasciculata*, tal como se describió anteriormente.

5. Purificación parcial de la SHMT de hígado de rata

El hígado fue extraído de ratas de 60-120 días (cepa Wistar) e inmediatamente congelado a -20°C. Luego de dos horas, fue triturado y homogeneizado en tres volúmenes de amortiguador fosfato 100 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, EDTA 0,2 mM, PLP 0,02 mM, pH 7,5. El homogenato fue centrifugado a 27000xg durante 30 min. y el sobrenadante resultante fue sometido a un calentamiento a 55°C, descartando las proteínas desnaturalizadas por centrifugación a 18000xg durante 20 min. El sobrenadante fue llevado a 35% de saturación final de sulfato de amonio y luego de 24 horas fue centrifugado a 18000xg durante 30 min. El residuo fue descartado y el sobrenadante fue llevado a 65% de saturación de la misma sal y se procedió de la misma forma que antes. La proteína precipitada fue disuelta en un mínimo volumen del mismo amortiguador y sembrada y en una columna de Sephadex G200 (2,5 x 30 cm), equilibrada y desarrollada con amortiguador fosfato 200 mM, sulfato de amonio 5,1%, EDTA 0,1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8 (FIGURA 12). Fueron recogidas aquellas fracciones de máxima actividad SHMT y se precipitaron con solución saturada al 80% de sulfato de amonio, borato/bórico 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5. Este corte fue centrifugado a 27000xg durante 30 min y el sedimento fue resuspendido en fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 9 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8.

La enzima, parcialmente purificada (TABLA III) fue utilizada como fuente de enzima para los estudios del inhibidor de *T.cruzi*.

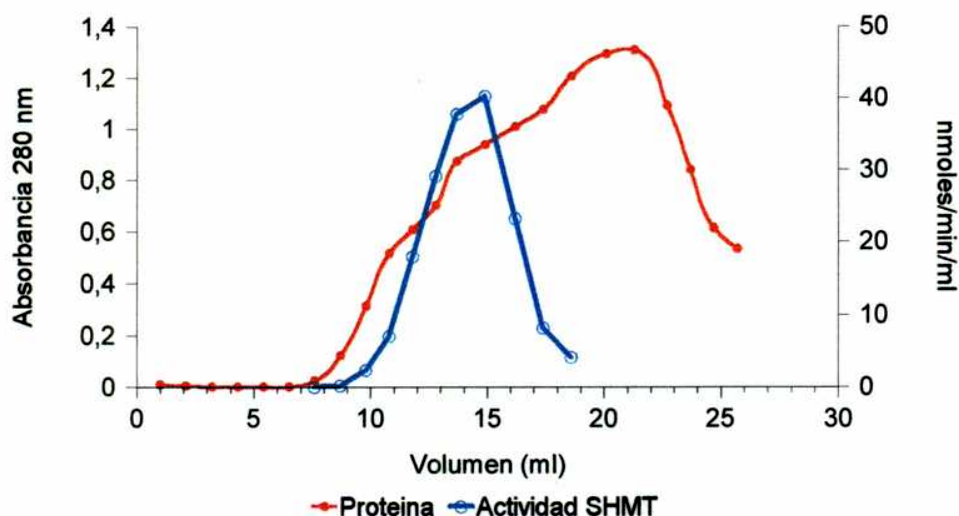


FIGURA 12: Filtración molecular en Sephadex G200 del corte 35-65% de saturación en sulfato de amonio de la SHMT de hígado de rata.

0,3 ml de la solución (9,8 mg de proteínas) fueron sembrados en una columna de Sephadex G200 (2,5 x 20 cm), equilibrada y desarrollada con amortiguador fosfato 200 mM, sulfato de amonio 5,1%, EDTA 0,1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. Se colectaron fracciones de 1,1 ml.

Etapas	Proteínas Totales (mg)	Actividad total (nmoles/min)	Actividad específica (nmoles/min/mg)	Purificación (veces)	Recuperación (%)
Extracto crudo	1814	10051	5,54	1	100
Sobrenadante 55°C	531	8470	15,96	3	84
(NH ₄) ₂ SO ₄ 65% de sat.	254	5488	21,62	4	55
Sephadex G200	100	4800	48,00	9	48

TABLA III: Purificación parcial de la SHMT de hígado de rata.

6. Detección de un inhibidor endógeno de la SHMT a partir de epimastigotes de *T.cruzi*. Preparación de los extractos crudos del parásito

Células correspondientes a la cepa Tul 0 de epimastigotes de *T.cruzi*, fueron congeladas a -20°C y descongeladas a 4°C. Posteriormente, las células fueron suspendidas en dos volúmenes de amortiguador fosfato 100 mM, pH 7,5 conteniendo β -mercaptoetanol 9 mM y EDTA 0,2 mM y sometidas a tratamiento ultrasónico tres veces a 55 Watts durante 30 segundos cada ciclo. El extracto crudo resultante fue centrifugado a 27000xg durante 30 min. y el sedimento obtenido sometido a otro tratamiento ultrasónico en las mismas condiciones que el anterior. Los sobrenadantes obtenidos en los tratamientos se combinaron y precipitaron con una solución saturada de sulfato de amonio en amortiguador borato/bórico 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5 hasta 45% de saturación final. Después de 24 horas, la suspensión fue centrifugada a 27000xg durante 30 min. El sedimento, conteniendo al inhibidor, fue suspendido en un mínimo volumen del amortiguador mencionado anteriormente (corte 45%), el cual fue centrifugado a 80000xg durante 60 min. para clarificar a la muestra, descartándose el residuo resultante.

7. Ensayo de la actividad SHMT

Se utilizó una modificación del método descrito por Taylor y Weissbach (1965), el cual mide la velocidad de la reacción en el sentido de formación de glicina. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 0,4 ml: Tris-acetato 50 mM, pH 8,3 conteniendo 3-[^{14}C] -L serina 0,5 mM (320 dpm/nmol), PLP 0,25 mM, THF 1 mM y β -mercaptoetanol 10 mM. La reacción fue iniciada por el agregado de la enzima y después de 15 min. de incubación a 37 °C fue detenida por la adición de 0,3 ml de dimedona (3 mg/ml) en acetato de sodio 1 M, pH 4,3. La mezcla fue calentada 5 min. en baño de agua hirviendo y el aducto formaldehído-dimedona formado fue extraído vigorosamente con 3 ml de tolueno. La radioactividad presente en la fase orgánica fue medida en contadores de centelleo líquido (Beckman LS 6800 y Tracor Analytic Delta 300) agregando 2 ml de la misma a 5 ml de tolueno conteniendo 2,5 g/l de 2,5-difenil-oxazol y 0,05 g/l de 2,2'-p-fenilen bis (5-feniloxazol) . Dado que las actividades medidas fueron en general de un orden de magnitud menor que el $\mu\text{mol}/\text{min}$, se prefirió definir a la unidad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la síntesis de 1 nmol/min de formaldehído a 37°C. La actividad específica de la enzima fue expresada como nmoles de formaldehído producidos/min/mg de proteína.

8. Ensayo del inhibidor endógeno de la SHMT de *T.cruzi*

Preparaciones de SHMTs parcialmente purificadas a partir de hígado de rata y extractos crudos de epimastigotes de la cepa RA de *T.cruzi* fueron preincubados a 4 °C durante 5 min. con extractos crudos o parcialmente purificados del parásito, que contenían al inhibidor. Luego se iniciaba la

reacción con el agregado de los restantes componentes de la mezcla de reacción. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición en relación a un control realizado en las mismas condiciones en ausencia de inhibidor.

9. Determinación de la concentración de proteínas

Para seguir el perfil de elución de las proteínas en los distintos pasos de purificación, se utilizó el método de Warburg y Christian (1941), que permite determinar la concentración proteica aproximada de cada muestra midiendo la relación de absorbancias de cada una de ellas a 260 y 280 nm.

Sin embargo el método antes descripto es orientador, por lo cual fue conveniente utilizar la modificación de Bensadoun y Weinstein (1976), al método de Lowry original (Lowry y col., 1951). Esta modificación, al eliminar las interferencias que presenta el método mencionado y utilizar alícuotas más grandes y soluciones proteicas más diluídas, permite determinar con precisión las concentraciones proteicas.

Las modificaciones consisten en llevar las muestras a 3 ml con agua destilada, agregar 0,025 ml de desoxicolato de sodio al 2%. Después de 15 min., se precipitan las proteínas con ácido tricloroacético al 24%. Las muestras son centrifugadas a 4000xg durante 30 min. y se resuspenden en la mezcla cuproalcalina descripta por Lowry y luego se procede de la forma usual. En estos casos fue utilizada BSA (0,423 mg/ml) como standard.

10. Determinación de la concentración de ortofosfato

La concentración real de fosfato de cada una de las fracciones eluídas de las cromatografías en DEAE celulosa, por la aplicación de gradientes lineales de fosfato, fue determinada aplicando el método de Ernster y Lindberg (1950).

11. Preparación de la Hidroxilapatita

La Hidroxilapatita fue preparada de acuerdo a Tiselius y colaboradores (1956). Se utilizó una preparación envejecida entre 6 y 7 años y mantenida durante ese lapso a 4° C en cámara fría.

12. Concentración y desalado de las preparaciones enzimáticas

En algunos casos, y cuando se indica, las preparaciones enzimáticas diluídas se concentraron por ultrafiltración a través de membranas anisotrópicas utilizando los concentradores Centricon de Amicon de 2 ml, provistos de membranas con un límite de retención de 30 kDa. En una primera etapa, la solución a concentrar se colocó en el reservorio del concentrador destinado para la muestra y se centrifugó a 1085xg a 4 °C hasta que el volumen retenido fuera de aproximadamente 0,05 ml. Esta operación se repitió tantas veces como fuera necesario, para concentrar toda la muestra. En la etapa de recuperación, se colocó el tubo destinado a recoger la muestra concentrada sobre el reservorio para la muestra diluída, se invirtió el conjunto y se volvió a centrifugar con lo cual se recupera la muestra concentrada en un 100%.

Este sistema también se utilizó para desalado de las muestras, para lo cual se procedió como se indicó anteriormente para concentrar las muestras y luego se reconstituyó el volumen original de la misma con el amortiguador diluido y se volvió a centrifugar. Esta operación fue repetida de dos a tres veces.

13. Determinación de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de las SHMTs

13.1. Coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$)

Para la determinación del coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) fue utilizada la técnica de ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (Martin y Ames, 1961). Para ello, se prepararon gradientes entre 5 a 20% P/V de sacarosa en amortiguador Tris-HCl 50 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6. En otros casos se utilizó la misma solución pero conteniendo PLP 0,02 mM. Los gradientes fueron preparados en tubos de acetato de celulosa de 5 ml correspondientes al rotor SW 55 Ti.

Los gradientes fueron mantenidos tres horas a 4°C y luego sobre cada uno de ellos fueron depositados 0,2 ml de una mezcla que contenía 18 μ g de la preparación del último paso de purificación de la isoforma I de *C.fasciculata* (designada SHMT I) o 45 μ g de isoforma II (SHMT II) o bien 18 μ g de la isoforma III (SHMT III) y las siguientes proteínas marcadoras: 125 μ g de catalasa de hígado bovino, 200 μ g de lactato deshidrogenasa de músculo de conejo, 200 μ g de malato deshidrogenasa de corazón porcino,

40 μ g de citocromo c de corazón de caballo y fue completado a 0,2 ml con amortiguador Tris -HCl 50 mM, pH 7,6.

Las centrifugaciones fueron realizadas a 80000xg (utilizando la centrífuga y el rotor mencionados en la sección 3.) durante 13 horas, al cabo de las cuales fueron recogidas fracciones de 0,2 ml desde la parte superior del gradiente inyectando en el fondo del tubo una solución de sacarosa 2 M en Tris-HCl 50 mM pH 7,6 utilizando para ello el equipo colector de gradientes Beckman.

Los $S_{20,w}$ de las proteínas marcadoras fueron los siguientes: catalasa, 11,3 S; láctico deshidrogenasa, 7,3 S; málico deshidrogenasa, 4,3 S y citocromo c 1,7 S (Haga y col., 1977). La posición de las proteínas marcadoras en los respectivos gradientes y que corresponden a los valores de r , es decir la distancia recorrida por cada una de ellas desde el borde superior del gradiente hasta la posición alcanzada al finalizar la centrifugación, se determinó en cada caso en la forma que se indica a continuación:

a) Catalasa: Para su detección, fue utilizado un método espectrofotométrico que consiste en la determinación de la disminución de la absorbancia a 240 nm provocada por el consumo de H_2O_2 (Chance, 1954).

b) Lactato deshidrogenasa: Su presencia fue identificada espectrofotométricamente por el consumo de NADH en presencia de piruvato y por lo tanto la disminución de la absorbancia a 340 nm (Bergmeyer y Bernt, 1974).

c) Malato deshidrogenasa: La actividad de esta enzima fue determinada espectrofotométricamente midiendo el consumo de NADH en presencia de oxaloacetato por la disminución de la absorbancia a 340 nm (Bergmeyer y col., 1974).

d) Citocromo c: Fue identificado espectrofotométricamente, por su absorción característica a 410 nm , denominada de Soret .

La representación gráfica de r en función de los respectivos valores de $S_{20,w}$ dieron en todos los casos, rectas con una correlación mayor a 0,995. Los respectivos $S_{20,w}$ fueron calculados por interpolación a partir de dichas rectas.

13.2. Radio de Stokes (a) y coeficiente de difusión libre ($D_{20,w}$)

Los radios de Stokes de las distintas isoformas de la SHMT fueron calculados mediante la técnica de filtración molecular utilizando una columna de Sephadex G200 (2,5 x 95 cm), equilibrada y posteriormente desarrollada con amortiguador fosfato 200 mM, sulfato de amonio 5,1%, EDTA 0,1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. La columna fue calibrada con las proteínas de radios de Stokes y pesos moleculares conocidos, que se indican a continuación: citocromo c de corazón de caballo (17,4 Å ;12,4 kDa), ribonucleasa A de páncreas bovino (16,4 Å ;13,2 kDa), quimotripsinógeno A de páncreas bovino (20,9 Å ; 25 kDa), ovoalbúmina de pollo (30,5 Å ;43 kDa), BSA (35,5 Å ,66 kDa), alcohol deshidrogenasa de levadura (45,5 Å ; 150 kDa), β -amilasa de papa dulce (48,8 Å ;200 kDa),

catalasa de hígado bovino (52,2 Å ;232 kDa) y apoferritina (61 Å ;443 kDa). Estos valores fueron tomados del folleto provisto por Pharmacia, LKB.

En cada caso se sembraron 1,5 ml de las soluciones de proteínas marcadoras en concentraciones que variaron entre 1,5 y 2 mg/ml y se recogieron fracciones de 3,5 ml y sus densidades ópticas se midieron a 280 nm, a excepción del citocromo c, que se midió a 408 nm. La representación gráfica de los radios de Stokes de las proteínas marcadoras versus $[-\log K_d]^{1/2}$ (Beattie y Merrill, 1996) fue la que presentó la mejor línea de ajuste para la curva standard, con valores de correlación de 0,997. Los correspondientes valores de K_d se calcularon mediante la ecuación:

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

en la cual V_e es el volumen de elución de cada proteína, V_o es el volumen de exclusión de la columna determinado con Blue Dextran 2000 (que se midió por su absorbancia a 625 nm) y V_t es el volumen total de la misma determinado con agua tritiada (3 mCi/ml).

Los coeficientes de difusión libre ($D_{20,w}$) fueron calculados a partir de los radios de Stokes previamente determinados mediante a la ecuación de Stokes-Einstein:

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

donde k es la constante de Boltzmann ($k = 1.38047 \text{ J/mol/}^\circ\text{K}$), T es la temperatura absoluta correspondiente a 20°C ($293 \text{ }^\circ\text{K}$), a es el radio de Stokes y $\eta_{20,w}$ es la viscosidad del agua a 20°C ($1,1 \times 10^{-2} \text{ g/cm/seg}$).

14. Estimación del peso molecular de las enzimas nativas (M)

14.1. Método de Andrews

Los pesos moleculares de las enzimas nativas fueron calculados por filtración por gel utilizando una columna de Sephadex G200 e iguales proteínas marcadoras y condiciones experimentales a las utilizadas para determinar los radios de Stokes. Los valores obtenidos fueron analizados de acuerdo al método de Andrews (Andrews, 1965) graficando en este caso el log del peso molecular en función de las relaciones V_e/V_o .

14.2. Aplicando la ecuación de Svedberg

Mediante la ecuación de Svedberg, fueron calculados también los pesos moleculares de las SHMTs nativas, utilizando los valores de $S_{20,w}$, $D_{20,w}$ calculados previamente y el volumen parcial específico (V_p), en cuyo caso se adoptó el valor de $0,735 \text{ cm}^3/\text{g}$ aceptado para SHMTs eucariontes (Martínez Carrion y col., 1972):

$$M = \frac{S_{20,w}}{D_{20,w}} \frac{RT}{[1 - (V_p \delta_{20,w})]}$$

donde R es la constante de los gases ($8,3144 \times 10^{-7} \text{ dyn cm/}^\circ\text{K mol}$) y δ es la densidad del solvente (densidad del agua a 20°C , $\delta_{20,w} = 0,998203 \text{ g/cm}^3$).

15. Coeficiente friccional (f/f_0)

Los coeficientes friccionales se calcularon de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$f/f_0 = \frac{a}{(3 V_p M / 4 R N)^{1/3}}$$

donde N es el número de Avogadro, a es el radio de Stokes, Vp es el volumen parcial específico y M es el peso molecular calculado por la ecuación de Svedberg.

16. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las electroforesis fueron realizadas en geles de poliacrilamida en presencia de lauril sulfato de sodio (SDS) y en condiciones reductoras con un sistema discontinuo (Laemmli, 1970). Los geles de corrida fueron de 10% de acrilamida-N,N'metilenbisacrilamida (Bio-Rad) y los separadores de 5%. Las electroforesis se realizaron en minigeles (de 9,5 x 8 cm) en una cuba Mighty Small II SE 250 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) refrigerada con agua a 10°C. Las muestras se desnaturalizaron previamente en presencia de β -mercaptoetanol 0,13 mM, por calentamiento en baño de agua durante 5 min. a 100°C. La intensidad de la corriente se mantuvo durante la corrida a 15 mA cuando las muestras permanecían en el gel separador, mientras que se elevaba a 20 mA al pasar al gel de corrida. Después de la electroforesis, los geles fueron fijados y teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% (Sigma Chemical Co.) en ácido

acético 9% y metanol 45% y desteñidos en metanol:ácido acético:agua (3:1:6).

Los pesos moleculares de las subunidades de cada isoforma de SHMT fueron determinados por comparación con las movilidades relativas de las proteínas standard (Weber y Osborn, 1969). Las proteínas marcadoras utilizadas (Manual de electroforesis en geles de poliacrilamida, Pharmacia, LKB) fueron: fosforilasa b de músculo de conejo (94 kDa), BSA (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocito bovino (30 kDa), inhibidor de tripsina de poroto de soja (20,1 kDa) y α -lactoalbúmina de leche bovina (14,4 kDa). En todos los casos las muestras fueron dializadas exhaustivamente contra un amortiguador de baja fuerza iónica, antes de ser sometidas a electroforesis.

17. pH óptimo

Los pH óptimos de reacción fueron calculados utilizando amortiguador Tris-acetato 50 mM en la mezcla de reacción, con pHs comprendidos en el rango de 6 hasta 9,5.

Los sustratos y cofactores de la reacción catalizada por la SHMT fueron disueltos en cada caso en el amortiguador del pH en estudio.

18. Remoción del PLP unido a la enzima

18.1. Precipitación de la enzima con sulfato de amonio

Cada una de las isoformas pertenecientes a *C.fasciculata* o la SHMT de *T.cruzi* provenientes de la cromatografía en DEAE celulosa fueron precipitadas con sulfato de amonio sólido al 80% de saturación final, pH 7. Se midió actividad SHMT antes y después del agregado de PLP 1 mM.

18.2. Preincubación de la enzima con L-cisteína o clorhidrato de hidroxilamina

Cada una de las isoformas de la SHMT de *C.fasciculata*, provenientes del último paso de purificación, fueron preincubadas con L-cisteína 2 mM o con clorhidrato de hidroxilamina 1 mM, en presencia de BSA 1 mg/ml durante 60 min. a 4 °C. La mezcla fue dializada exhaustivamente contra fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,8 para remover el exceso de L-cisteína o de hidroxilamina, según el tratamiento. La actividad enzimática fue medida antes y después de la diálisis. La presencia de BSA durante la preincubación se justifica por el hecho de que las enzimas altamente purificadas son muy sensibles a la diálisis, probablemente debido a la unión inespecífica de las mismas a la membrana de diálisis, dado el carácter hidrofóbico que presentan, en cuyo caso puede perderse hasta un 80% de su actividad original. Sin embargo hemos comprobado que este inconveniente puede ser subsanado llevando a cabo la diálisis en presencia de BSA, en cuyo caso la recuperación es de aproximadamente 60%.

La enzima dializada o no, fue también ensayada después de la preincubación en presencia de PLP (1 mM) durante 10 min. a 4°C.

En el caso de *T.cruzi*, extractos crudos del parásito fueron preincubados con L-cisteína (2 y 5 mM) o con clorhidrato de hidroxilamina (1 y 5 mM), en las condiciones descriptas para las isoformas de *C.fasciculata*.

19. Análisis espectrales

Los espectros a diferentes longitudes de onda de cada una de las isoformas de *C.fasciculata*, como también el espectro correspondiente al inhibidor de *T.cruzi*, fueron realizados con un equipo Perkin Elmer, modelo 550 UV/visible a temperatura ambiente.

20. Secuenciación del extremo amino terminal de las proteínas

Las SHMTs I, II y III de *C.fasciculata* fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) como se indicó anteriormente y luego transferidas a una membrana PVDF (Immobilon) en presencia de ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico (CAPS) 10 mM, metanol 10%, pH 11 a 5°C durante 2 horas a 190 mA (Yuen y col., 1989). Al cabo de ese período, las bandas sobre el PVDF fueron teñidas con Coomassie Blue R-250 0,1% en metanol 50%, durante 30 seg., desteñidas con metanol:ácido acético: agua (5:1:4) durante 3 min. y posteriormente secadas a temperatura ambiente.

Las proteínas fueron secuenciadas directamente desde el PVDF por el método de degradación de Edman, utilizando un secuenciador Modelo 477 A de Applied Biosystems del Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (LANAIS-PRO) a cargo del Dr. José Santomé.

21. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados al menos por duplicado. Para los cálculos de las constantes cinéticas, de los parámetros moleculares e hidrodinámicos, como también para la concentración de proteínas en cada paso de purificación, fue aplicado el método estadístico de Regresión Lineal. Estos se realizaron mediante el uso de un programa de computación que permitió obtener todos los coeficientes de regresión correspondientes.

RESULTADOS

1. Propiedades de las SHMTs de tripanosomátidos en extractos crudos

En experimentos realizados con extractos crudos, libres de células, se midieron las actividades específicas de las SHMTs de *T. cruzi* y de *C. fasciculata*, bajo condiciones de ensayo standard descritas en Materiales y Métodos, y se las comparó con las correspondientes a hígado y riñón de rata.

Extracto Crudo	Cepa	Actividad específica (nmoles/min/mg)*
Hígado de rata	Wistar	6,290 ± 0,967
Riñón de rata	Wistar	3,880 ± 0,504
<i>C. fasciculata</i>	ATCC 11745	4,198 ± 0,360
<i>T. cruzi</i>	Tul 0	1,625 ± 0,075
<i>T. cruzi</i>	Tul 2	0,795 ± 0,205
<i>T. cruzi</i>	Dm28c	1,403 ± 0,229
<i>T. cruzi</i>	CA-I 72 hDNA	1,480 ± 0,090
<i>T. cruzi</i>	HO 3/5	1,800 ± 0,020
<i>T. cruzi</i>	Sylvio	1,059 ± 0,108
<i>T. cruzi</i>	CL Brenner	0,705 ± 0,189
<i>T. cruzi</i>	RA	0,604 ± 0,039

TABLA IV: Actividad SHMT en extractos crudos de diferentes cepas de *T. cruzi*, de la cepa ATCC 11745 de *C. fasciculata* y de hígado y riñón de rata.

*Expresada como nmoles de formaldehído producido por minuto por mg de proteína. Los valores son el promedio ± desviación standard (n=3).

Existe una variación de la actividad específica de la enzima en *T.cruzi*, con un promedio (entre distintas cepas) de 1,2 U/mg, mientras que en *C.fasciculata*, la enzima presentó una actividad específica de 4,2 U/mg, es decir casi 4 veces más que la correspondiente a *T.cruzi*, similar a la de riñón de rata pero menor de la correspondiente a hígado de rata (TABLA IV).

La SHMT en extractos crudos de *T.cruzi* fue altamente inestable a 4°C, inactivándose un 90%, al cabo de 24 horas (FIGURA 13). La enzima no fue estabilizada significativamente por agentes reductores tales como DTT (1 mM) o β -mercaptoetanol (9 mM) (FIGURA 14). En cambio, la SHMT de *C.fasciculata* (sin discriminar a las isoformas) fue mucho más estable en extractos crudos, inactivándose menos del 20% en 24 hs. en las mismas condiciones experimentales (FIGURA 13). La presencia de DTT (1 mM) o de β -mercaptoetanol (9 mM) no aumentó la estabilidad de la SHMT de extractos crudos de *C.fasciculata* (FIGURA 15).

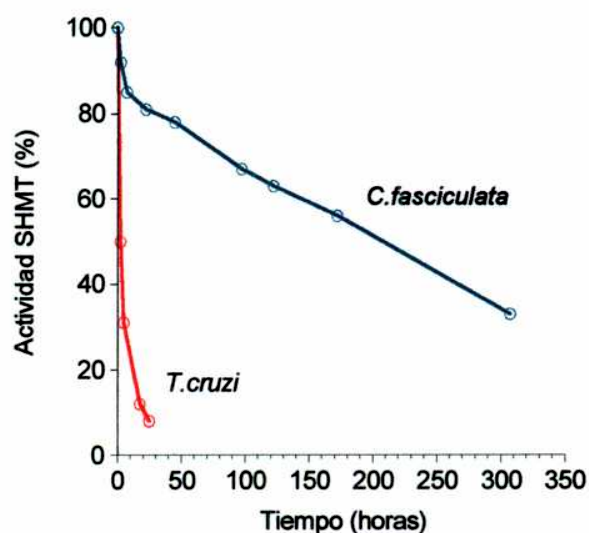
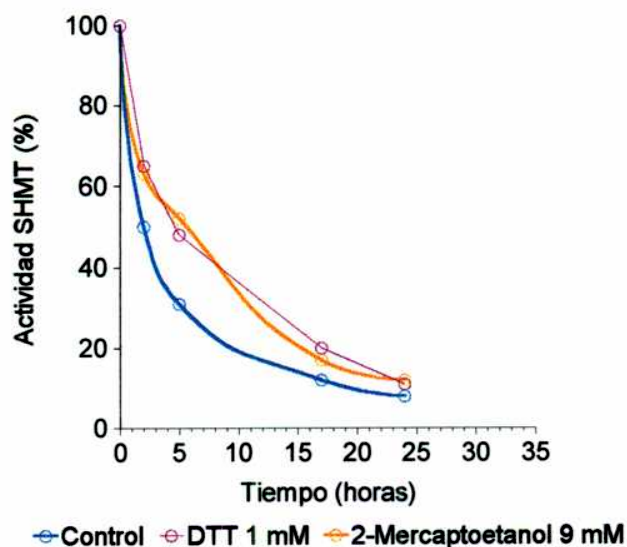


FIGURA 13: Estabilidad de las SHMTs en extractos crudos de *T. cruzi* (cepa Dm28c) y *C. fasciculata* (cepa ATCC 11745). Homogenatos de *T. cruzi* (11,3 mg/ml) y *C. fasciculata* (23,2 mg/ml) fueron preparados en amortiguador fosfato 100 mM, EDTA 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8 y mantenidos a 4°C y alícuotas fueron ensayadas para determinar la actividad residual a los tiempos indicados en la figura.



Ver leyenda en la página siguiente

FIGURA 14: Estabilidad de la SHMT en extractos crudos de *T.cruzi* (cepa Dm28c). Homogenatos de *T.cruzi* (10,5 mg/ml de proteínas) fueron preparados en amortiguador fosfato 100 mM, EDTA 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8 (Control), o con el agregado de DTT 1 mM o β -mercaptoetanol 9 mM y mantenidos a 4°C. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas y se midieron las actividades residuales respectivas.

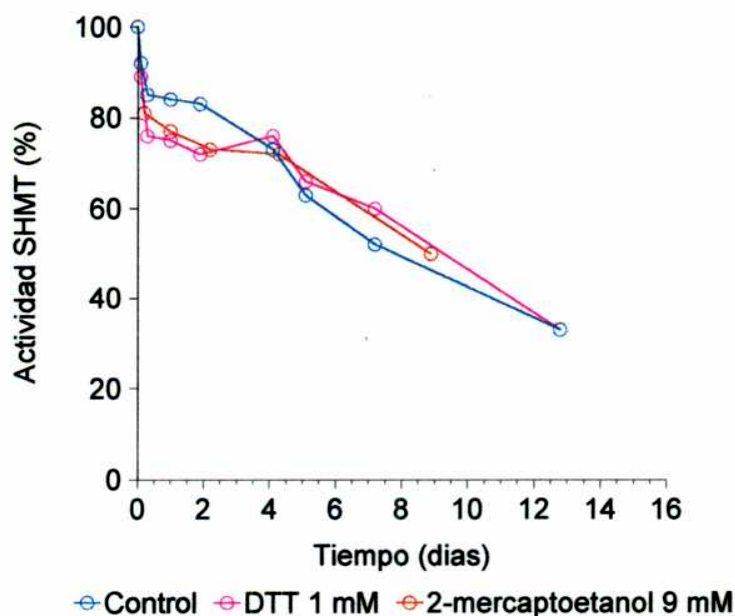


FIGURA 15: Estabilidad de la SHMT en extractos crudos de *C.fasciculata*. Homogenatos del parásito (14 mg/ml de proteínas) fueron preparados en amortiguador fosfato 100 mM, EDTA 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8 (Control), o con el agregado de DTT 1 mM o β -mercaptoetanol 9 mM y mantenidos a 4°C. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas y se midieron las actividades residuales respectivas.

La enzima en extractos crudos de *T.cruzi* fue menos inestable por congelamiento a -25°C, ya que en 24 horas perdió un 30-50% de actividad comparado con el 90% de la pérdida de la misma a 4°C. En cambio, el congelamiento a -25°C de la SHMT en extractos crudos de *C.fasciculata* no mostró variación en la pérdida de actividad cuando se la compara con la inactivación observada a 4°C. En ambos casos la inactivación al cabo de 100 horas fue del 30%.

La SHMT de extractos crudos de *T.cruzi* fue altamente sensible a una diálisis exhaustiva contra 100 volúmenes de amortiguador fosfato 10 mM, pH 6,8 al cabo de 18 horas y a 4°C, y aún en presencia de PLP (0,1 mM), se observó entre 70 y 80% de inactivación. En cambio, en las mismas condiciones, la enzima de *C.fasciculata* mantuvo gran parte de su actividad catalítica (80%).

La SHMT de *T.cruzi* presente en extractos crudos fue estabilizada significativamente en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas compuesto de E-64 (1 µg/ml), pepstatina A (7 µg/ml), PMSF (174 µg/ml), TLCK (37 µg/ml) y EDTA 5 mM. En estas condiciones, la enzima conservó un 80% su actividad luego de 24 horas a 4°C, mientras que en ausencia de estos inhibidores y en las mismas condiciones la enzima perdió un 90% de su actividad (FIGURA 16). Sin embargo, si la enzima de *T.cruzi* con el cóctel de inhibidores de proteasas, era dializada exhaustivamente durante 24 horas contra 1000 volúmenes de amortiguador fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,8, la misma perdía un 90% de la actividad inicial, indicando claramente que la inhibición sobre la/s proteasa/s fue reversible (FIGURA 16).

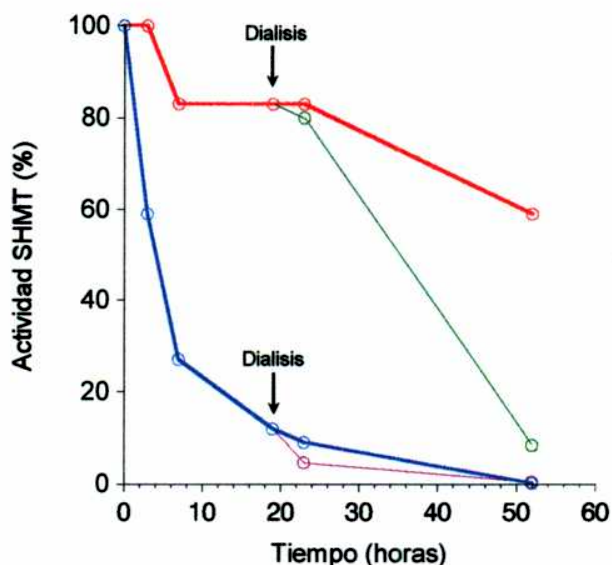


FIGURA 16: Efecto de los inhibidores de proteasas sobre la actividad SHMT de *T. cruzi*. La enzima, proveniente de extractos crudos (9,29 mg/ml), fue incubada a 4°C en presencia (rojo) y en ausencia (azul) de un cóctel de inhibidores de proteasas descrito en el texto. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas y se midieron las actividades residuales respectivas. Se indica el tiempo en el que se inició la diálisis y la medición de la actividad SHMT del control (lila) y de la preparación en presencia de los inhibidores de proteasas (verde).

2. SHMT de *C. fasciculata*

2.1. Separación de las tres isoformas de la enzima

El extracto crudo obtenido como se describió en Materiales y Métodos fue clarificado por centrifugación a 80000xg durante 60 minutos a 4 °C y sometido a cromatografía en una columna de DEAE celulosa (2,5 x 42 cm), equilibrada con amortiguador fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. Luego de sembrada la muestra, la columna se lavó exhaustivamente con el amortiguador de equilibrio. Se eluyó en esas

condiciones un primer pico de actividad (designado SHMT I), no retenido en la columna. Posteriormente se aplicó un gradiente de fosfato de sodio entre 20 y 100 mM. Un segundo pico de actividad enzimática (designado SHMT II) fue eluido con 40 mM de fosfato, mientras que un tercero (designado SHMT III) fue eluido con 78 mM del mismo amortiguador (FIGURA 17). Se juntaron las fracciones que presentaban máxima actividad de cada una de las isoformas y se precipitaron, separadamente, con sulfato de amonio sólido hasta un 80% de saturación final y manteniendo el pH cercano a 6,8 por el agregado de hidróxido de amonio concentrado. Esta metodología fue la más conveniente ya que las enzimas, en esas condiciones, exhibieron una elevada estabilidad.

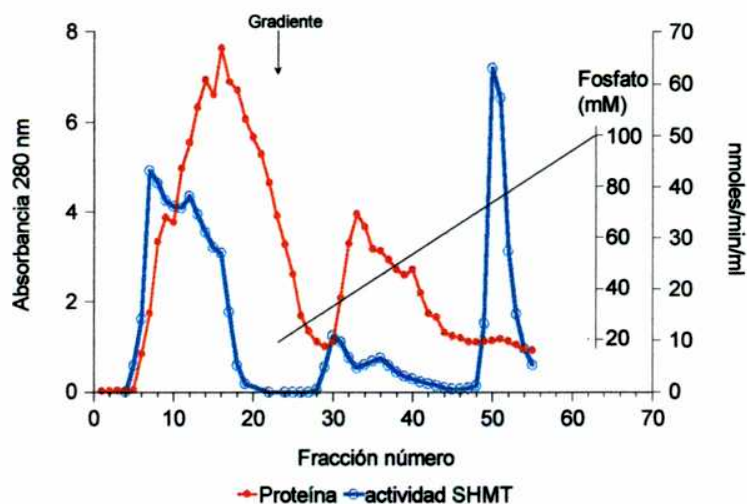
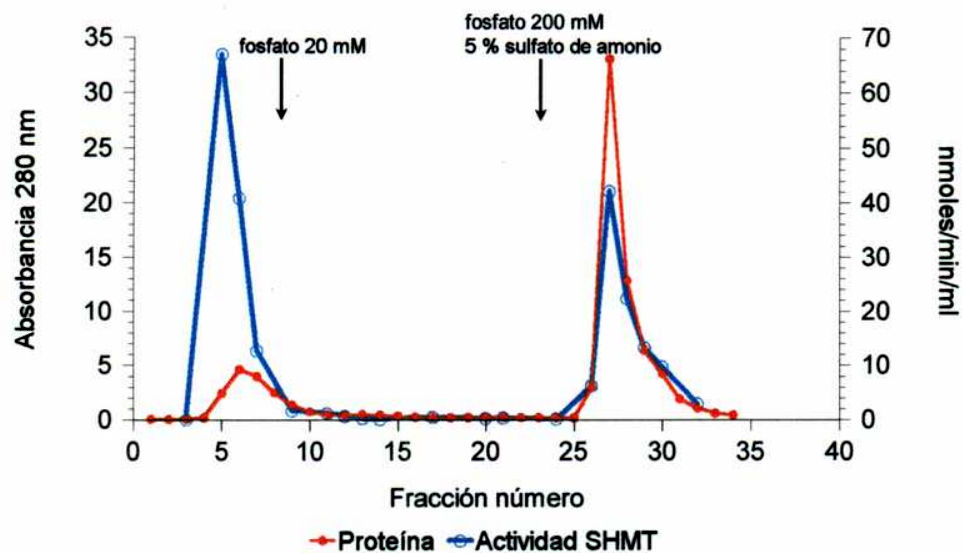


FIGURA 17: Perfil de elución típico de una cromatografía en columna de DEAE celulosa a partir del sobrenadante de choanomastigotes de *C.fasciculata*: Separación de las tres isoformas.

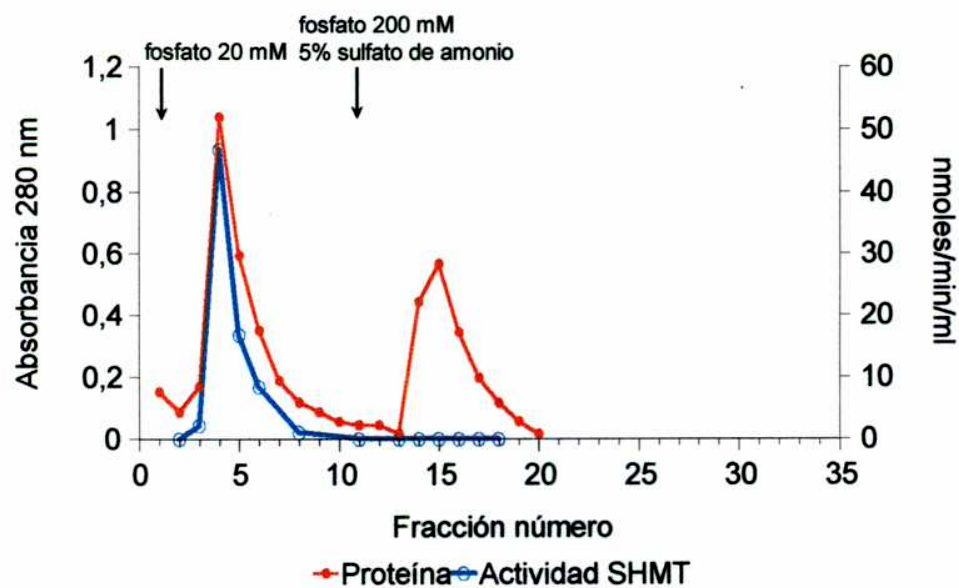
En este experimento se sembraron 254,8 ml (2,7 gramos de proteínas) en una columna de 2,5 x 42 cm equilibrada con amortiguador fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. En dichas condiciones fue eluida la SHMT I (primer pico azul). Posteriormente se aplicó un gradiente de fosfato de entre 20 y 100 mM (200 ml de cada amortiguador en cada reservorio), eluyéndose secuencialmente las SHMTs II y III (segundo y tercer pico azul respectivamente). El volumen de cada fracción fue de 12 ml. El resto de las condiciones experimentales están descritas en el texto.

Recromatografía de las isoformas por separado o combinadas reprodujeron el comportamiento individual de cada una de ellas en la mezcla original, lo cual descartó la posibilidad de que la existencia de tres picos de actividad fueran debido a un artificio experimental. En las FIGURAS 18 y 19 se muestran experimentos de ese tipo. En la FIGURA 18 se muestra la cromatografía de un extracto crudo. La SHMT I no fue retenida por la matriz, mientras que las otras dos formas fueron eluidas conjuntamente con un amortiguador de alta fuerza iónica (fosfato 200 mM, sulfato de amonio 5%, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8) (FIGURA 18 A). Se reunieron las fracciones de máxima actividad SHMT I, se concentraron por precipitación con 80% de saturación en sulfato de amonio, se dializaron contra 500 volúmenes de amortiguador fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,8 (dos veces) y fueron recromatografiadas en la misma columna (previo regeneramiento de la matriz) y en las mismas condiciones, observándose un comportamiento similar al original (FIGURA 18 B).

A



B



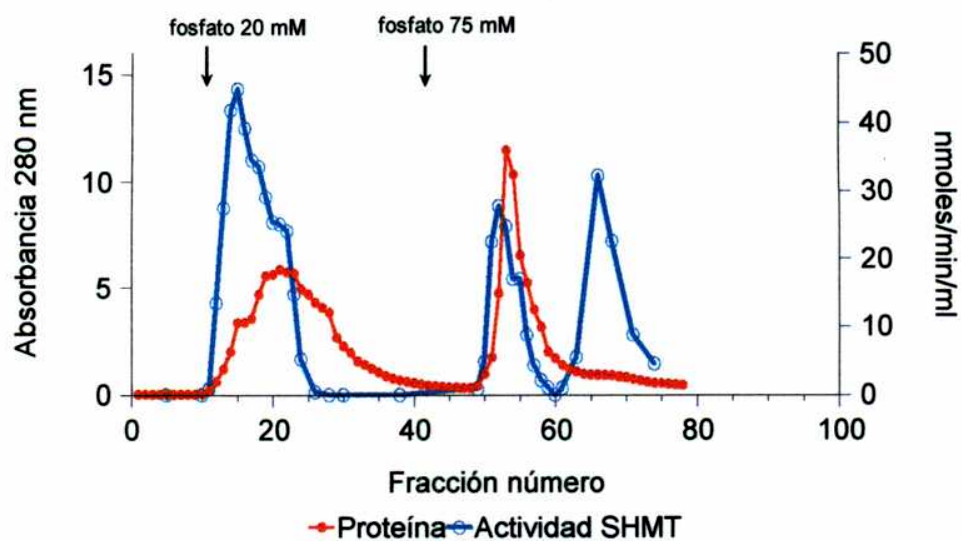
Ver leyenda en la página siguiente

FIGURA 18: Recromatografía en columna de DEAE celulosa de la SHMT I de *C.fasciculata*.

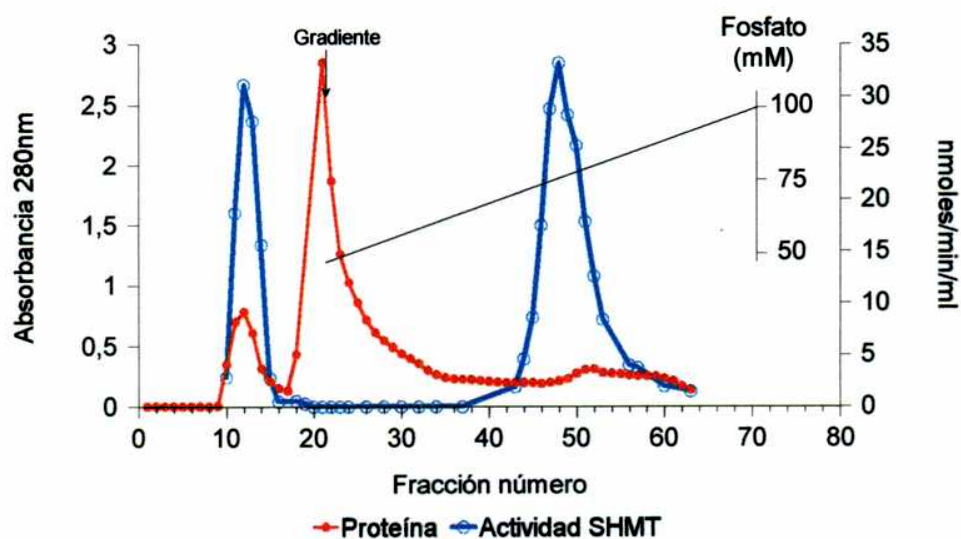
5 ml (100 mg de proteínas) de una fracción sobrenadante de *C.fasciculata* fueron sembrados en una columna de DEAE celulosa (2 x 6 cm) indicada en el gráfico A . Se indica la elución de la SHMT I (primer pico azul) y de las otras dos formas eluyendo juntas (segundo pico azul). Las fracciones de la SHMT I se precipitaron con 80% de saturación en sulfato de amonio y luego la solución saturada se centrifugó a 27000xg durante 30 minutos, descartándose el sobrenadante. El residuo fue suspendido en un mínimo volumen de amortiguador fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 9 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8, dializado exhaustivamente contra 500 volúmenes de fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,8 (dos veces) y los 0,94 ml resultantes (8,7 mg de proteínas) fueron sembrados en la misma columna (gráfico B), equilibrada con el mismo amortiguador. En azul se indica la elución de la SHMT I. El volumen de cada fracción fue de 3 ml en ambos experimentos.

Un experimento similar (FIGURA 19), confirmó la existencia de las otras dos formas moleculares como entes independientes. Se procedió experimentalmente como en el caso anterior. Pero, después de lavar exhaustivamente la columna con amortiguador fosfato 20 mM, para eliminar a la SHMT I, se eluyeron las otras dos isoformas aumentando la concentración de fosfato a 75 mM, en cuyas condiciones la SHMT II eluyó fácilmente de la columna con el frente del amortiguador, mientras que la SHMT III fue retenida parcialmente y su elución fue retardada con relación a la SHMT II (Figura 19 A). Se reunieron las fracciones que contenían a las dos isoformas y se recromatografiaron en la forma indicada en la leyenda de la FIGURA 19 B. Como puede observarse en dicha figura, el lavado de la columna con amortiguador fosfato 40 mM permitió eluir a la SHMT II, mientras que la SHMT III fue eluída con 80 mM, por aplicación de un gradiente entre 40 y 100 mM del mismo amortiguador (FIGURA 19 B).

A



B



Ver leyenda en la página siguiente

FIGURA 19: Recromatografía en columna de DEAE celulosa de las SHMTs II y III de *C. fasciculata*.

En este experimento 83,5 ml de un homogenato del parásito (1837 mg de proteínas) fueron sembrados en una columna de DEAE celulosa (2,5 x 26 cm; gráfico A) equilibrada previamente con amortiguador fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. Se indican los perfiles de elución de las tres isoformas (azul). Se reunieron las fracciones 50 a 75 conteniendo a las SHMTs II y III y se concentraron por precipitación con sulfato de amonio al 80% de saturación final. Esta suspensión fue centrifugada a 27000xg durante 30 min y el sobrenadante fue descartado. El residuo fue suspendido en un mínimo volumen de fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 9 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8, dializado exhaustivamente contra 500 volúmenes de fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,8 (dos veces) y los 20,8 ml resultantes (177 mg de proteínas) fueron sembrados en la misma columna equilibrada con el mismo amortiguador. Se lavó la columna, primero con una concentración de fosfato del amortiguador 40 mM y luego donde se indica, se aplicó un gradiente del mismo amortiguador entre 40 y 100 mM de fosfato. En el gráfico B se indica en color azul el perfil de elución de las SHMTs II y III. El volumen de cada fracción fue de 7 ml en ambos experimentos

2.2. Purificación de la SHMT I

2.2.1. Cromatografía en Phenyl Sepharose

La proteína precipitada con sulfato de amonio proveniente de la cromatografía en DEAE celulosa, conteniendo a la SHMT I, (ver sección 2.1.) fue centrifugada a 22000xg durante 30 min. El sobrenadante fue descartado y el residuo fue suspendido en un mínimo volumen de fosfato 20 mM, sulfato de amonio 20%, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 9 mM, PLP 0,02 mM, pH 7,1. La suspensión fue sembrada en una columna de Phenyl Sepharose (2,7 x 27 cm), la cual fue previamente equilibrada y desarrollada como se indica en la leyenda de la FIGURA 20. Como puede observarse en dicha figura, la actividad enzimática comenzó a aparecer con la cola del pico de proteína eluído con el amortiguador que contiene 5% de sulfato de amonio, pero se desabsorbió completamente al eliminar esta última sal de la

solución amortiguadora. Fueron reunidas aquellas fracciones de mayor actividad enzimática y precipitadas con sulfato de amonio sólido al 80% de saturación final manteniendo el pH cercano a 7 mediante el agregado de hidróxido de amonio.

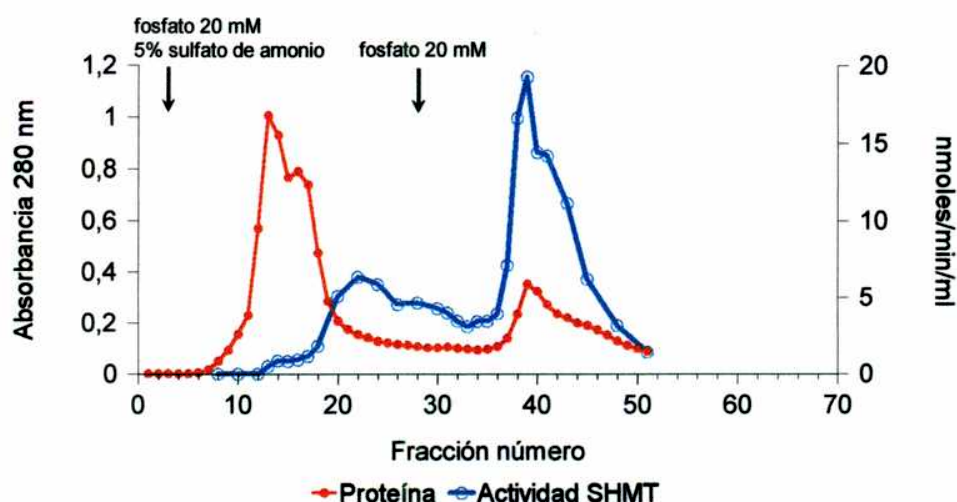


FIGURA 20: Cromatografía en columna de Phenyl Sepharose de la SHMT I de *C.fasciculata*.

El pool de la SHMT I (11,7 ml conteniendo 229 mg de proteínas totales) fue sembrado en una columna de Phenyl Sepharose (2,7 x 27 cm), previamente equilibrada con fosfato 20 mM, sulfato de amonio 20%, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 7,1. La columna fue lavada con fosfato 20 mM, sulfato de amonio 5%, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 7,1 hasta que la absorbancia a 280 nm fuera menor a 0,05. Posteriormente se lavó con fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 7,1. Se recogieron fracciones de 7 ml. Otros detalles experimentales se encuentran indicados en el texto.

2.2.2. Cromatografía en Hidroxilapatita

La proteína precipitada con sulfato de amonio proveniente del paso anterior fue centrifugada a 22000xg durante 30 min. El sobrenadante fue descartado y el residuo resultante fue suspendido en amortiguador fosfato

20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 9 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8 y dializado exhaustivamente contra 200 volúmenes de fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,8, dos veces, durante 24 horas. La proteína dializada fue sembrada en una columna de Hidroxilapatita (2,1 x 3,5 cm), equilibrada con fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. La columna fue lavada con el amortiguador de equilibrio hasta que la absorbancia fuera menor a 0,05 y posteriormente fue lavada sucesivamente con concentraciones crecientes del fosfato del amortiguador mencionado (100, 150 y 200 mM respectivamente), tal como se indica en la FIGURA 21. Como puede apreciarse en dicha figura, la actividad enzimática se eluyó exclusivamente con el amortiguador 200 mM.

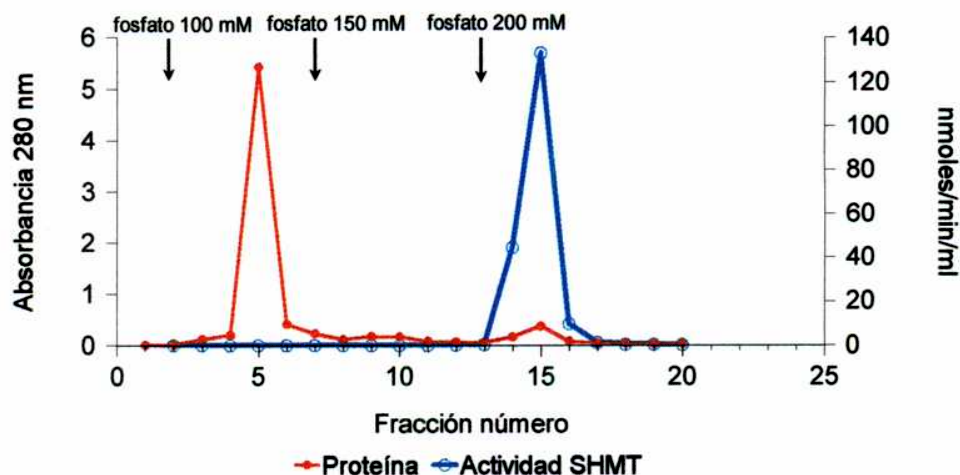


FIGURA 21: Cromatografía en columna de Hidroxilapatita de la SHMT I de *C. fasciculata*.

Diagrama de elución típico de la SHMT I utilizando una columna de Hidroxilapatita (2,1 x 3,5 cm), previamente equilibrada con fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. Se sembraron 5,9 ml (33 mg de proteínas). La enzima fue eluida con fosfato 200 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. Se colectaron fracciones de 5,3 ml cada una. El resto de las condiciones experimentales se describen en el texto.

2.2.3. Cromatografía en Reactive Red Agarose

Se reunieron las fracciones con actividad de SHMT provenientes de la cromatografía en Hidroxilapatita. La solución resultante se diluyó al medio con fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,8 y se sembró directamente en una columna de Reactive Red Agarose (2 x 3,5 cm) previamente equilibrada con fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. La columna fue desarrollada en las condiciones indicadas en la leyenda de la FIGURA 22. La enzima fue fuertemente retenida por la matriz y se logró eluir con el agregado de ClNa 1 M al amortiguador. Se reunieron las fracciones con mayor actividad SHMT y la solución resultante se concentró por filtración a través de filtros Amicon (ver Materiales y Métodos).

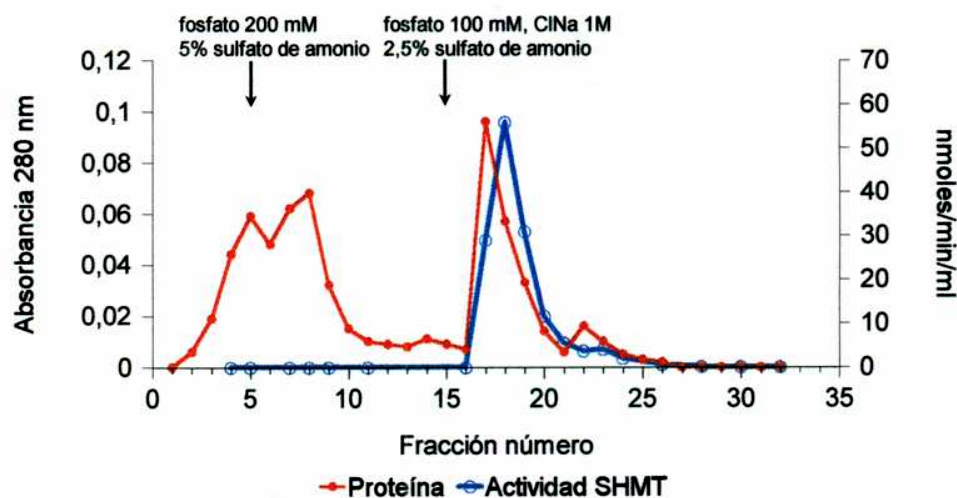


FIGURA 22: Cromatografía en columna de Reactive Red Agarose de la SHMT I de *C. fasciculata*.

Fueron sembrados 15,6 ml (2,5 mg de proteína) y la columna fue lavada con fosfato 200 mM, sulfato de amonio 5%, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8 hasta que la absorbancia a 280 nm fuera menor a 0,02. La enzima fue eluida con amortiguador fosfato 100 mM, sulfato de amonio 2,5%, ClNa 1 M, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. El volumen de cada fracción fue de 3,9 ml. Otras condiciones experimentales se describen en el texto.

2.2.4. Filtración molecular en Sephadex G200

Una porción de la enzima proveniente de la cromatografía en Reactive Red Agarose (300 unidades enzimáticas), fue sometida a filtración molecular en Sephadex G200, en las condiciones indicadas en la leyenda de la FIGURA 23. Como puede apreciarse en dicha figura, la actividad eluyó en un único pico. Los tubos que presentaron actividad de SHMT fueron reunidos y concentrados en la forma indicada para la etapa anterior de purificación.

La preparación enzimática obtenida en esas condiciones presentó un alto grado de pureza como se demostrará más adelante (FIGURA 33) y fue utilizada para la determinación de su peso molecular y para los estudios espectrales y de secuenciación. El motivo por el cual sólo se utilizó en este experimento una parte del total de la enzima se debió a que la filtración molecular en Sephadex G200 dió lugar a una muy baja recuperación de la enzima sembrada debido a la incrementada inestabilidad de la misma en esta etapa de su purificación (20 a 25% de rendimiento). El mismo problema se generó cuando se realizó el mismo experimento con las SHMTs II y III.

La SHMT I fue purificada 399 veces hasta la etapa de cromatografía en columna de Reactive Red Agarose, con un rendimiento del 16% respecto al extracto crudo, libre de células y considerando que el 100% atribuido al extracto crudo, corresponde al conjunto de las tres isoformas de la SHMT. Los resultados de la purificación de la SHMT I se incluyen en la TABLA V. No se incluye en la misma la etapa de filtración molecular en Sephadex

G200, debido a que la cantidad de proteína obtenida fue tan baja, que no permitió una precisa determinación de su concentración.

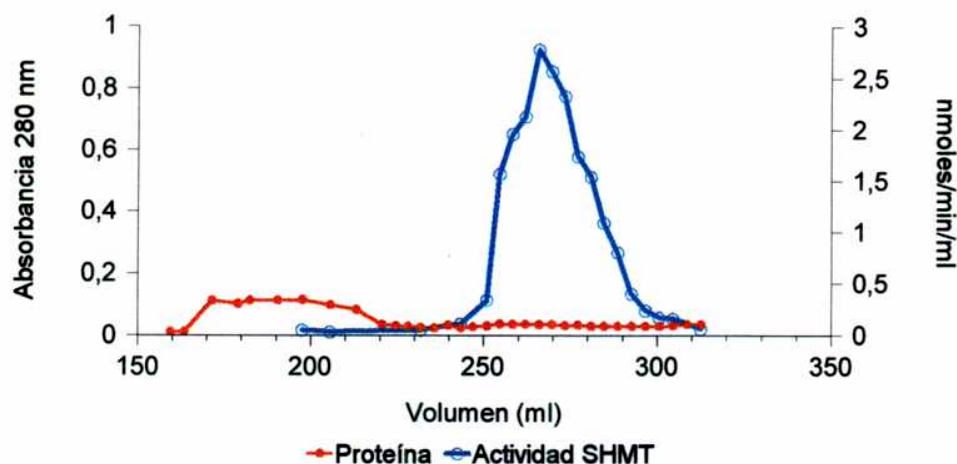


FIGURA 23: Filtración molecular en Sephadex G200 de la SHMT I de *C.fasciculata*. En este experimento 1,5 ml (0,36 mg de proteínas) provenientes de la cromatografía en Reactive Red Agarose fueron sembrados en una columna de Sephadex G200 (2,5 x 95 cm), equilibrada con fosfato 200 mM, EDTA 0,1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. El volumen de cada fracción fue de 3,4 ml. Debido a la baja concentración de proteína sembrada, las lecturas espectrofotométricas a 280 nm fueron sólo aproximadas.

Etapas	Proteínas Totales (mg)	Actividad total (nmoles/min)	Actividad específica (nmoles/min/mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1772,0	6670	3,76	1	100
Sobrenadante	1610,0	5364	3,33	1	81
DEAE celulosa	228,7	2376	10,34	3	36
Phenyl	33,0	1208	34,70	9	18
Sephadex					
Hidroxilapatita	2,5	1120	448,00	119	17
Reactive Red	0,7	1049	1498,57	399	16
Agarose					

TABLA V: Purificación de la SHMT I a partir de 28 gramos (peso húmedo) de choanomastigotes de *C.fasciculata*

2.3. Purificación de la SHMT II

2.3.1. Cromatografía en Phenyl Sepharose

La proteína precipitada con sulfato de amonio al 80% proveniente de la cromatografía en DEAE celulosa (sección 2.1.), conteniendo a la SHMT II, fue centrifugada en las mismas condiciones descriptas para la SHMT I. El sedimento fue disuelto en un mínimo volumen de amortiguador fosfato 20 mM, 20% de saturación en sulfato de amonio, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 9 mM, PLP 0,02 mM, pH 7,1 y la solución fue sembrada en una columna de Phenyl Sepharose (2,7 x 19 cm), equilibrada con fosfato 20 mM, 20% de saturación en sulfato de amonio, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 7,1. La columna fue lavada con el mismo amortiguador pero conteniendo 5% sulfato de amonio hasta que la absorbancia fuera menor a 0,05. La enzima fue eluída con el mismo amortiguador pero en ausencia de sulfato de amonio (FIGURA 24). El posterior lavado de la columna con un amortiguador fosfato 5 mM conteniendo 12% de etilen glicol, nos permitió asegurar que toda la actividad enzimática había sido previamente eluída. Se reunieron las fracciones de mayor actividad enzimática, las cuales fueron precipitadas con sulfato de amonio sólido al 80% de saturación final y neutralizadas con hidróxido de amonio.

2.3.2. Cromatografía en Hidroxilapatita

La muestra precipitada con sulfato de amonio provenientes de la cromatografía en Phenyl Sepharose fue centrifugada como se describió anteriormente y suspendida en un mínimo volumen de fosfato 20 mM, EDTA

1 mM, β -mercaptoetanol 9 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. La suspensión fue dializada exhaustivamente contra 200 volúmenes de amortiguador fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,8, con dos cambios de amortiguador durante 24 horas. La solución enzimática dializada fue sembrada en una columna de Hidroxilapatita (3 x 4,5 cm) equilibrada previamente con amortiguador fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. La columna fue a continuación lavada sucesivamente con los amortiguadores indicados en la FIGURA 25. Como se puede apreciar en dicha figura, la enzima recién se eluyó con el amortiguador de mayor fuerza iónica (200 mM de fosfato). Se reunieron las fracciones con mayor actividad SHMT y la solución obtenida fue utilizada como tal en el siguiente paso de purificación.

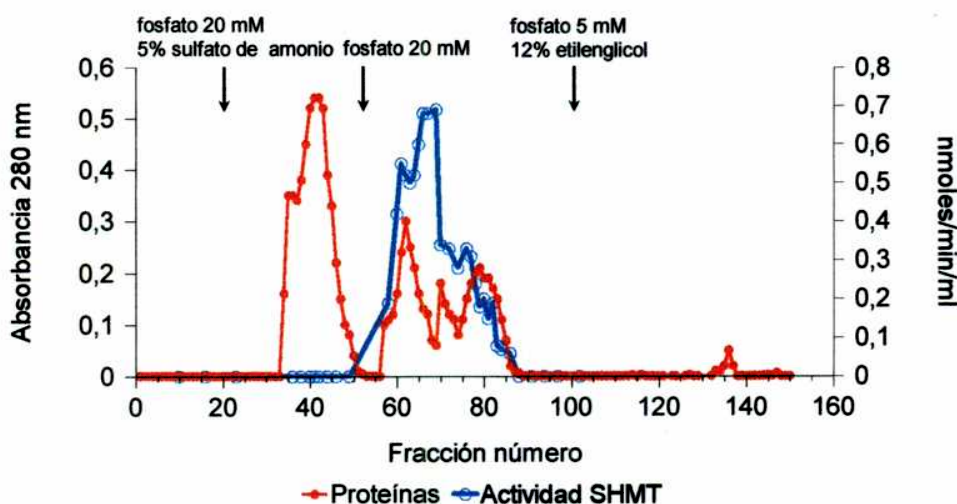


FIGURA 24 Cromatografía en columna de Phenyl Sepharose de la SHMT II de *C. fasciculata*.

En este experimento de sembraron 30,9 ml (479 mg de proteína) en una columna de Phenyl Sepharose (2,7 x 19 cm) previamente equilibrada con amortiguador fosfato 20 mM, 20% de saturación en sulfato de amonio, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 7,1 y eluida con los amortiguadores indicados en el texto y en la figura. El volumen de cada fracción fue de 11 ml.

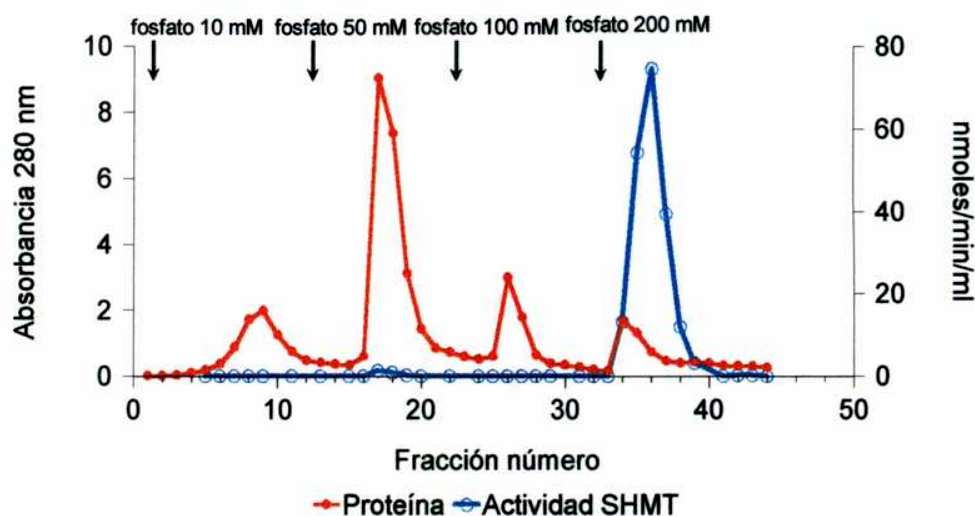


FIGURA 25: Cromatografía en columna de Hidroxilapatita de la SHMT II de *C.fasciculata*.

En este experimento se sembraron 22,2 ml (214 mg de proteínas) en una columna de Hidroxilapatita (3 x 4 cm), equilibrada previamente con fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. La elución se realizó aumentando la concentración de fosfato por etapas (10 mM, 50 mM, 100 mM y 200 mM) y el volumen de cada fracción fue de 6 ml.

2.3.3. Cromatografía en Blue Sepharose

La solución enzimática del paso anterior fue diluída al medio con amortiguador fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,8 y sembrada directamente en una columna de Blue Sepharose (2 x 6,2 cm), equilibrada previamente con fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. La columna fue lavada con fosfato 200 mM EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8 hasta que la absorbancia a 280 nm fuera menor a 0,05. La enzima fue eluída de la columna con amortiguador fosfato 180 mM, conteniendo 4,8% de sulfato de amonio y

ClNa 200 mM, pH 6,8 (FIGURA 26). Las fracciones conteniendo actividad SHMT fueron concentradas y equilibradas con amortiguador fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 9 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8, utilizando los concentradores descritos anteriormente (ver Materiales y Métodos).

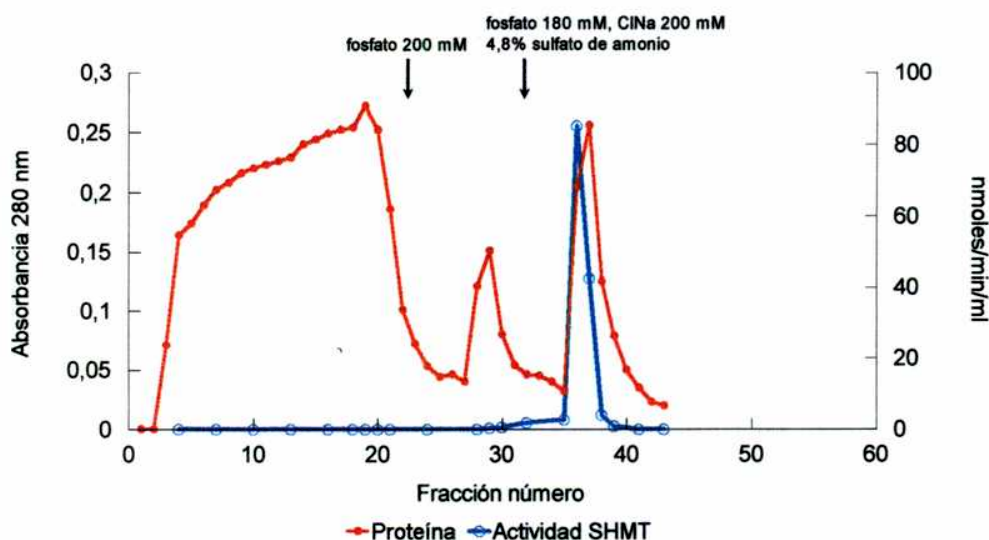


FIGURA 26: Cromatografía en columna de Blue Sepharose de la SHMT II de *C.fasciculata*

En este experimento se sembraron 116 ml (30,2 mg de proteínas) en una columna de Blue Sepharose (2 x 6,2 cm), previamente equilibrada con fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. Luego la columna se lavó con fosfato 200 mM y la misma concentración del resto de los componentes. La enzima eluyó con amortiguador fosfato 180 mM, sulfato de amonio 4,8% ClNa 200 mM, pH 6,8. El volumen de cada fracción fue de 6 ml.

2.3.4. Cromatografía en Reactive Red Agarose

La muestra concentrada y obtenida como se describió en la sección 2.3.3. fue sembrada en una columna de Reactive Red Agarose (2 x 4,5 cm), equilibrada con fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. La columna fue lavada con amortiguador fosfato 200 mM,

sulfato de amonio 5%, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8 hasta reducir la absorbancia a 0,02 y luego la enzima fue eluída con fosfato 100 mM, 2,5% sulfato de amonio, ClNa 1 M, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8 (FIGURA 27). Las fracciones con máxima actividad fueron concentradas y lavadas por filtración, como se describió anteriormente.

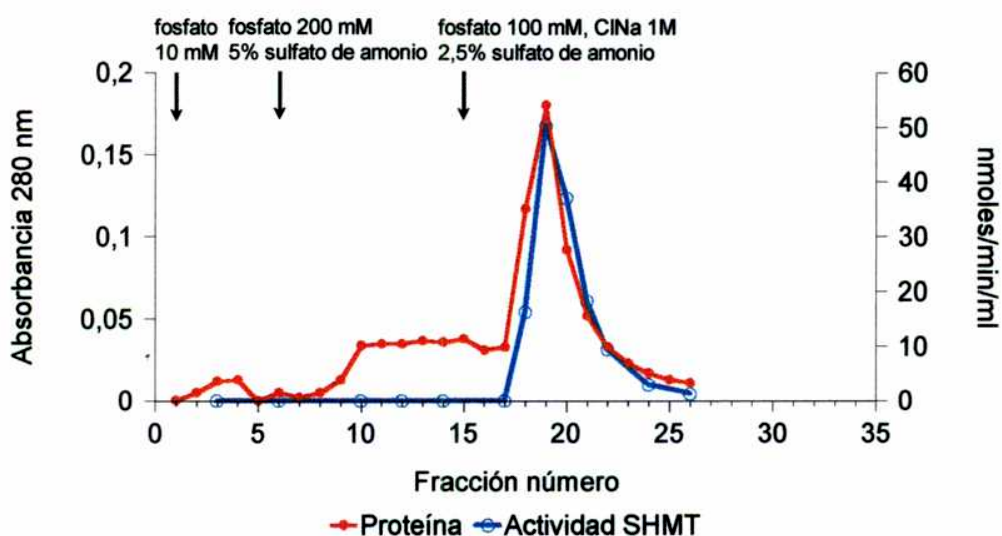


FIGURA 27: Cromatografía en columna de Reactive Red Agarose de la SHMT II de *C. fasciculata*.

En este experimento se sembró 1 ml (2,61 mg) en una columna de Reactive Red Agarose (2 x 4,5 cm), previamente equilibrada con fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. luego fue aumentada la concentración de fosfato a 200 mM y finalmente la enzima fue eluída con amortiguador fosfato 100 mM, 2,5% sulfato de amonio, ClNa 1 M, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. El volumen de cada fracción fue de 4 ml.

2.3.5. Filtración molecular en Sephadex G200

Una porción de la enzima del paso anterior (300 unidades enzimáticas), fue sometida a filtración molecular en una columna de

Sephadex G200, como se describió para la SHMT I (FIGURA 28). En estas condiciones, sólo se pudo identificar a la enzima por su actividad, debido a la baja concentración de proteína en las fracciones recogidas. La preparación enzimática obtenida se encontró al estado homogéneo, de acuerdo a criterios de pureza derivados de experimentos de SDS-PAGE (FIGURA 33). La enzima eluída fue utilizada para la determinación de su peso molecular y para los estudios espectrales y de secuenciación.

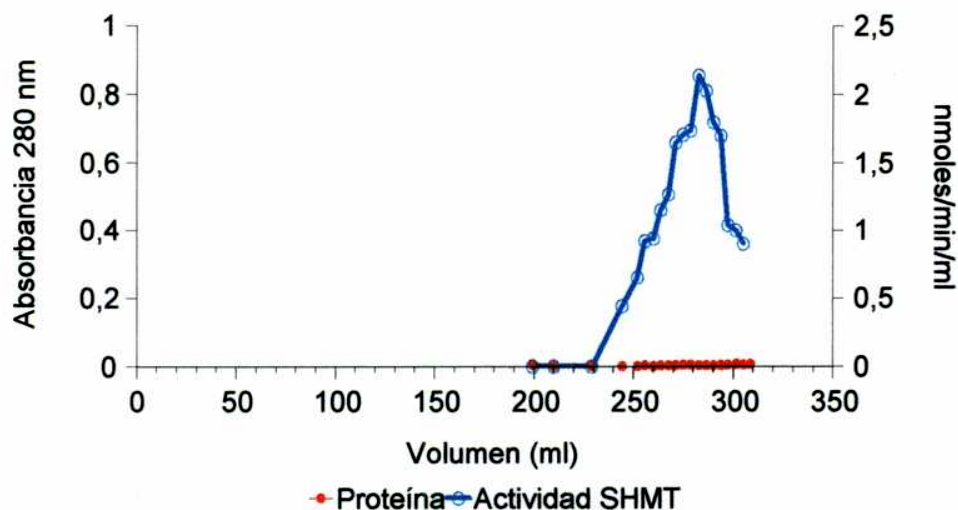


FIGURA 28: Filtración molecular en Sephadex G200 de la SHMT II de *C. fasciculata*.

En este experimento se sembraron 1,5 ml (0,5 mg de proteínas) en una columna de Sephadex G200 (2,5 x 95 cm), equilibrada y desarrollada con fosfato 200 mM, EDTA 0,1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. El volumen de cada fracción fue de 3,4 ml.

La SHMT II fue purificada 157 veces hasta la etapa de cromatografía en Reactive Red Agarose, con un rendimiento del 7%, referido al extracto crudo conteniendo a las tres formas moleculares de la enzima. El detalle de la purificación se encuentra en la TABLA VI.

Etapa	Proteínas Totales (mg)	Actividad total (nmoles/min)	Actividad específica (nmoles/min/mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	3524,0	17080	4,85	1,0	100
Sobrenadante	2719,0	13891	5,11	1,0	81
DEAE celulosa	479,0	1697	3,54	1,0	10
Phenyl Sepharose	213,6	1358	6,36	1,3	8
Hidroxilapatita	30,1	1159	38,50	8,0	7
Blue Sepharose	2,6	1203	462,79	100,0	7
Reactive Red Agarose	1,6	1220	762,50	157,0	7

TABLA VI: Purificación de la SHMT II a partir de 55 gramos (peso húmedo) de choanomastigotes de *C.fasciculata*

2.4. Purificación de la SHMT III

2.4.1. Cromatografía en Phenyl Sepharose

La suspensión de proteína precipitada con sulfato de amonio, proveniente de la cromatografía en DEAE celulosa, conteniendo a la SHMT III (ver sección 2.1.), fue centrifugada en las condiciones descriptas anteriormente para las SHMTs I y II, y suspendida en un mínimo volumen de amortiguador fosfato 20 mM, 20% de saturación en sulfato de amonio, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 9 mM, PLP 0,02 mM, pH 7,1. La solución fue sembrada en una columna de Phenyl Sepharose (2,7 x 15 cm), equilibrada previamente con el amortiguador mencionado anteriormente, pero con β -mercaptoetanol 9 mM. La columna fue luego lavada sucesivamente con los amortiguadores indicados en la leyenda de la FIGURA 29. Se reunieron las

fracciones con máxima actividad de SHMT y la solución resultante se utilizó como tal en el siguiente paso de purificación.

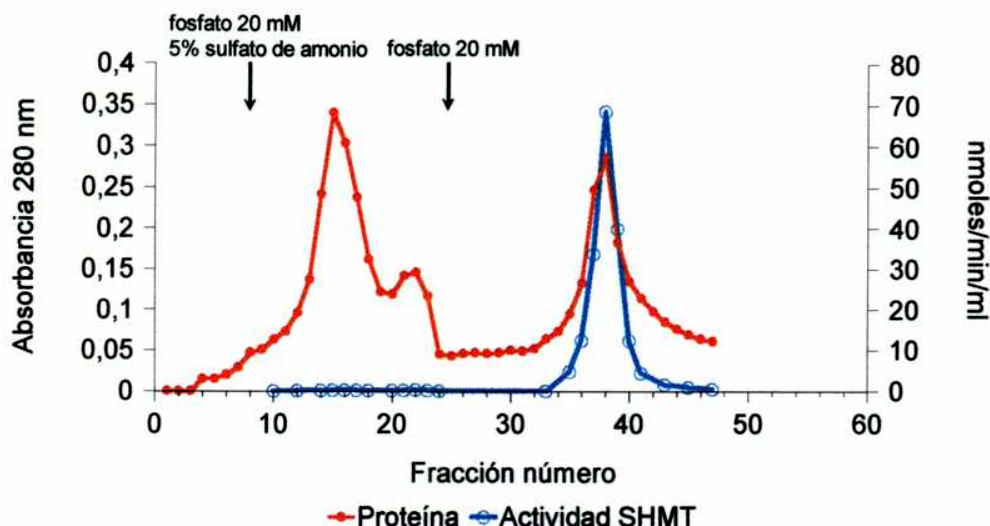


FIGURA 29: Cromatografía en columna de Phenyl Sepharose de la SHMT III de *C.fasciculata*

En este experimento se sembraron 7,7 ml (58,8 mg de proteínas) en una columna de Phenyl Sepharose (2,7 x 15 cm), equilibrada con fosfato 20 mM, 20% de saturación en sulfato de amonio, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 7,1. La columna se lavó con el mismo amortiguador pero conteniendo 5% de sulfato de amonio y la enzima fue eluída con el mismo amortiguador pero sin sulfato de amonio. El volumen de cada fracción fue de 6,1 ml.

2.4.2. Cromatografía en Hidroxilapatita

La solución enzimática proveniente de la cromatografía en columna de Phenyl Sepharose fue sembrada en una columna de Hidroxilapatita (2,1 x 2 cm), previamente equilibrada y lavada con amortiguador fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. La enzima fue eluída aumentando la concentración de fosfato a 50 mM (FIGURA 30). La posterior aplicación de un amortiguador de alta fuerza iónica permitió eluir

una considerable cantidad de proteína, sin actividad de SHMT, indicativo de que la muestra sembrada estaba libre de la SHMT II.

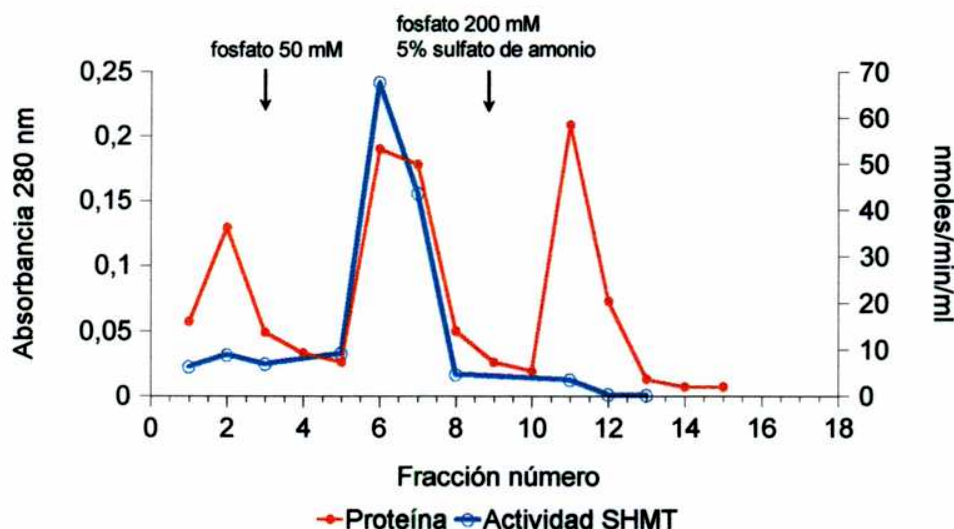


FIGURA 30: Cromatografía en columna de Hidroxilapatita de la SHMT III de *C. fasciculata*.

En este experimento se sembraron 2,3 ml (4,8 mg de proteínas) en una columna de Hidroxilapatita (2 x 2,1 cm), previamente equilibrada con fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. La SHMT fue eluida de la columna aumentando la concentración de fosfato a 50 mM. El volumen de cada fracción fue de 5,3 ml.

2.4.3. Cromatografía en Blue Sepharose

Se reunieron las fracciones de máxima actividad enzimática provenientes de la cromatografía en Hidroxilapatita. La solución resultante se diluyó al medio con fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,8 y se sembró en una columna de Blue Sepharose (2,1 x 7 cm), previamente equilibrada con fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. La columna fue lavada sucesivamente con los amortiguadores indicados en la FIGURA 31. En dicha figura, se puede apreciar que la actividad de SHMT

tan sólo pudo ser eluída cuando se aplicó un amortiguador de alta fuerza iónica con muy buen rendimiento y alto grado de pureza. Las fracciones con actividad SHMT fueron reunidas y concentradas por filtración, de la manera que se describió anteriormente.

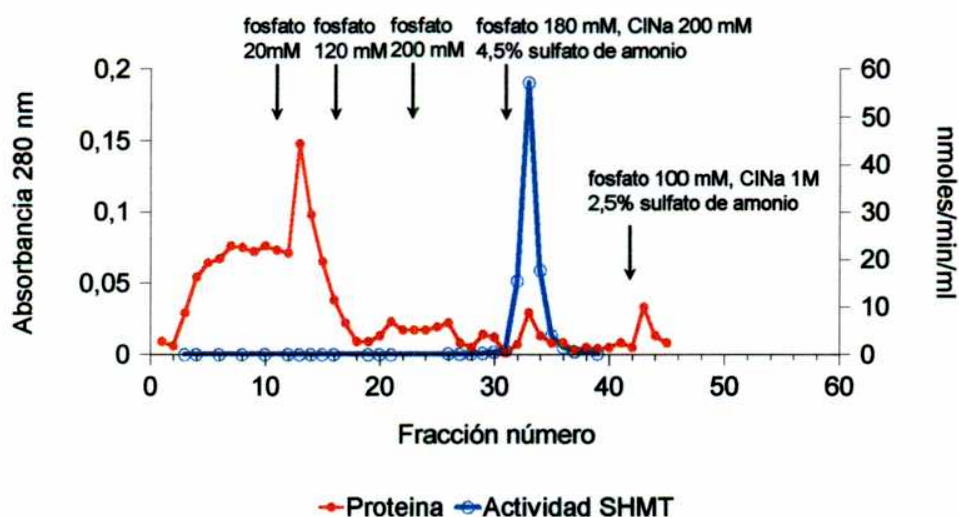


FIGURA 31: Cromatografía en columna de Blue Sepharose de la SHMT III de *C. fasciculata*.

En este experimento se sembraron 116 ml (2,55 mg de proteínas) de la solución enzimática en una columna de Blue Sepharose (2,1 x 7 cm), previamente equilibrada con fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. La columna se lavó primero con fosfato 120 mM y luego con 200 mM y la misma concentración del resto de los componentes en ambos casos. La enzima eluyó con amortiguador fosfato 180 mM, 4,8% sulfato de amonio, CNa 200 mM, pH 6,8. El volumen de cada fracción fue de 3,6 ml.

2.4.4. Filtración molecular en Sephadex G200

Una porción de la solución enzimática del paso anterior (300 unidades enzimáticas) fue sembrada en la columna de Sephadex G200, descrita anteriormente, y en las mismas condiciones experimentales. El perfil de elución de la enzima se muestra en la FIGURA 32, indicando solamente la actividad de la enzima ya que, como ocurrió en los casos anteriores, la

concentración proteica de las fracciones fue insuficiente para su detección espectrofotométrica a 280 nm. La SHMT III se encontró pura, de acuerdo a criterios de pureza aplicando la técnica de SDS-PAGE (FIGURA 33). La preparación enzimática así obtenida fue utilizada para la determinación de su peso molecular, estudios espectrales y de secuenciación.

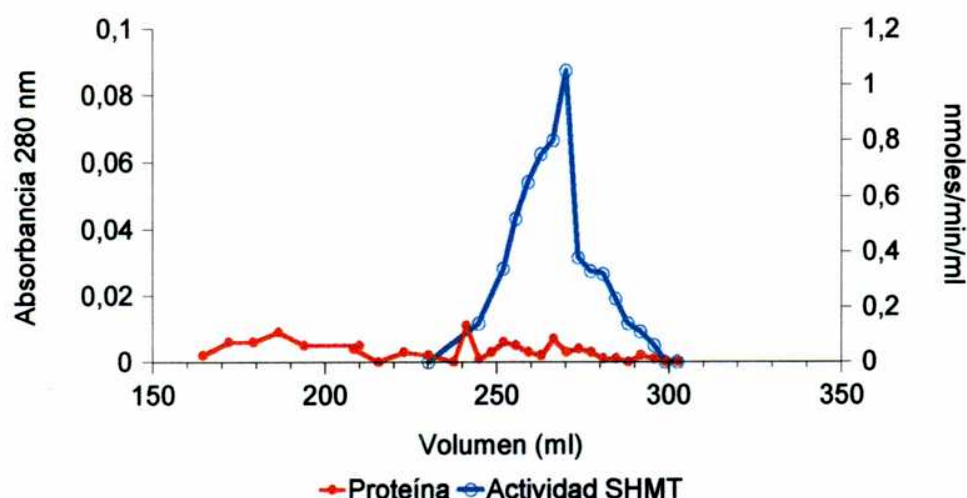


FIGURA 32: Filtración molecular en Sephadex G200 de la SHMT III de *C. fasciculata*.

En este experimento se sembró 1 ml (0,13 mg de proteínas) en una columna de Sephadex G200 (2,5 x 95 cm), equilibrada y desarrollada con fosfato 200 mM, EDTA 0,1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. El volumen de cada fracción fue de 3,4 ml.

La SHMT III fue purificada 665 veces con un rendimiento del 7%, respecto al extracto crudo conteniendo a las tres isoformas de SHMT. Un resumen del método de purificación se muestra en la TABLA VII.

Etapas	Proteínas Totales (mg)	Actividad total (nmoles/min)	Actividad específica (nmoles/min/mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1771,6	6670	3,76	1	100
Sobrenadante	1610,0	5364	3,33	1	81
DEAE	58,8	1287	21,90	6	19
celulosa					
Phenyl	4,8	954	198,75	53	14
Sepharose					
Hidroxilapatita	2,6	788	303,00	81	12
Blue	0,18	450	2502,00	665	7
Sepharose					

TABLA VII: Purificación de la SHMT III a partir de 28 gramos (peso húmedo) de choanomastigotes de *C.fasciculata*.

Es de mencionar el hecho de que, si bien la purificación total a homogeneidad de acuerdo a criterios de pureza mediante la técnica de SDS-PAGE sólo se alcanzó después de la etapa de filtración molecular en Sephadex G200 (FIGURA 33), las preparaciones obtenidas en las etapas respectivas inmediatamente anteriores, mostraron también un alto grado de homogeneidad proteica de acuerdo al mismo criterio de pureza (entre el 80-90%). Además en esas etapas de purificación, las tres isoformas de SHMT fueron altamente estables en solución a 4°C y en presencia de β -mercaptoetanol 9 mM y PLP 0,02 mM por lapsos de por lo menos 6 meses, sin mostrar una variación significativa de la actividad enzimática. Es digno de mencionar que las isoformas fueron significativamente estables en presencia de L-serina 3,6 mM, ya que conservaron 75-90% de la actividad al cabo de 2 semanas en solución a 4 °C. En cambio, el ácido fólico 5 mM

no protegió a las isoformas, ya que perdieron un 80% de su actividad SHMT en las mismas condiciones experimentales.

Las SHMTs I, II y III se inactivaron totalmente cuando fueron congeladas a -25°C durante 12 horas. El glicerol (25% V/V) no protegió a las isoformas de la inactivación por congelamiento. Por esta razón, las preparaciones obtenidas y conservadas en la forma indicada en primer término, fueron utilizadas para realizar los experimentos cinéticos e hidrodinámicos descritos más adelante. En cambio, las preparaciones enzimáticas obtenidas después de la filtración molecular en Sephadex G200, presentaron una considerable inestabilidad, muy posiblemente debida al amortiguador empleado en esa etapa.

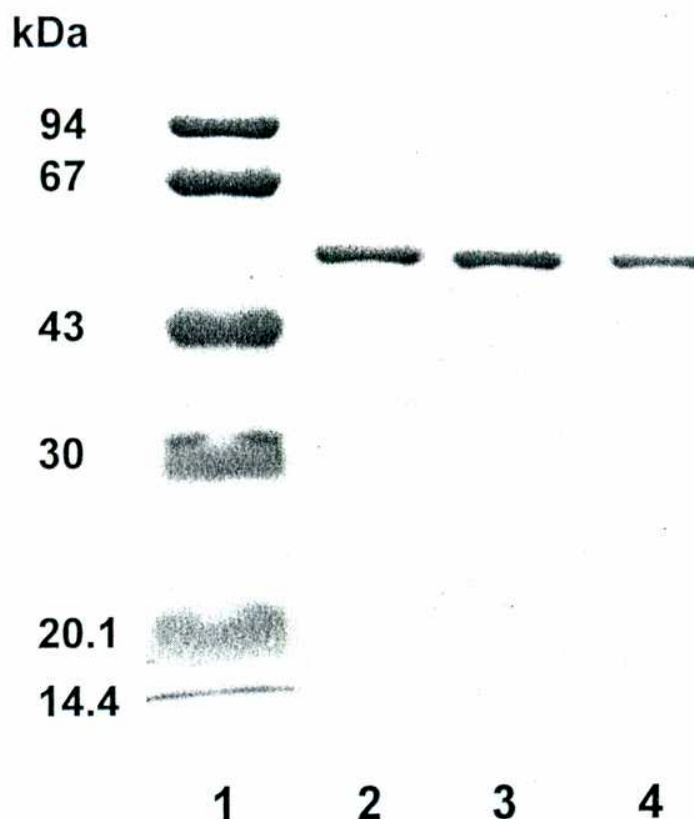


FIGURA 33 : Electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE) de las SHMTs I, II y III de *C. fasciculata*. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

Calle 1: Marcadores de pesos moleculares conocidos: Fosforilasa b (94 kDa); BSA (67 kDa); Ovoalbúmina (43 kDa); Anhidrasa carbónica (30 kDa); Inhibidor de tripsina (20 kDa); α lactoalbúmina (14,4 kDa).

Calle 2: SHMT I *C. fasciculata*

Calle 3: SHMT II *C. fasciculata*

Calle 4: SHMT III *C. fasciculata*

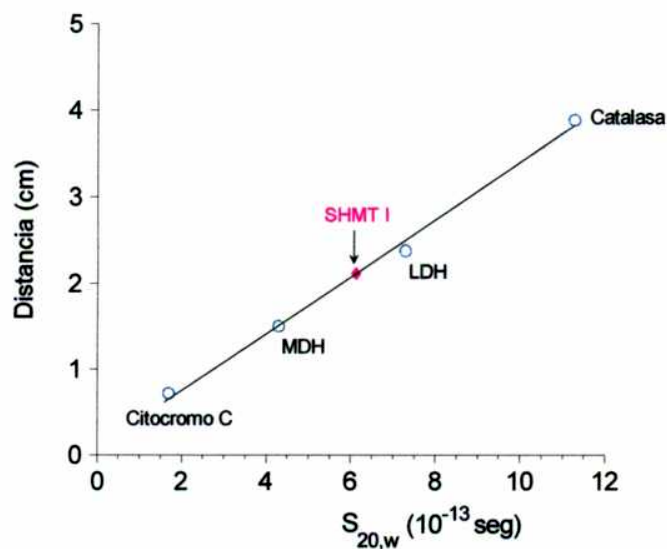
2.5. Parámetros moleculares e hidrodinámicos de las isoformas

2.5.1. Coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$)

Los coeficientes de sedimentación ($S_{20,w}$) de cada una de las isoformas de la SHMT de *C.fasciculata*, fueron calculados aplicando el método de Martin y Ames (1961) como se describe en Materiales y Métodos, utilizando las enzimas provenientes del último paso de purificación indicado en la tabla de purificación respectiva. En las FIGURAS 34 (SHMT I), 35 (SHMT II) y 36 (SHMT III) se representan los resultados obtenidos a partir de experimentos realizados en presencia y ausencia de PLP 0,02 mM en los gradientes respectivos. Los valores de los $S_{20,w}$ calculados en presencia de PLP fueron: $8,82 \times 10^{-13}$ seg. (SHMT I), $8,65 \times 10^{-13}$ seg. (SHMT II) y $8,94 \times 10^{-13}$ seg. (SHMT III) y en ausencia de PLP fueron: $6,14 \times 10^{-13}$ seg., $6,7 \times 10^{-13}$ seg. y $8,86 \times 10^{-13}$ seg. respectivamente.

Cabe aclarar que en todos los casos se observaron picos simétricos en los gradientes de sacarosa y los valores de r determinados según el marcador por triangulación del pico de actividad enzimática o de absorbancia a una determinada longitud de onda.

A



B

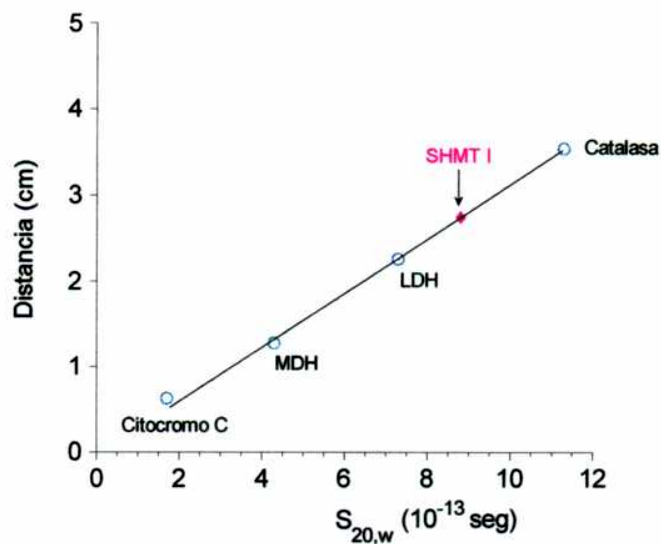
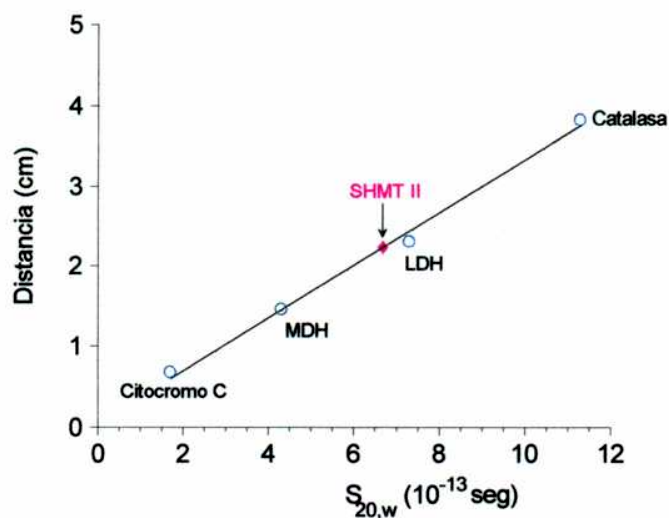


FIGURA 34: Determinación del coeficiente de sedimentación de la SHMT I de *C. fasciculata* por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, en ausencia (gráfico A) y presencia de PLP 0,02 mM (gráfico B). Las condiciones experimentales y los $S_{20,w}$ correspondientes a las proteínas marcadoras se indican en Materiales y Métodos.

A



B

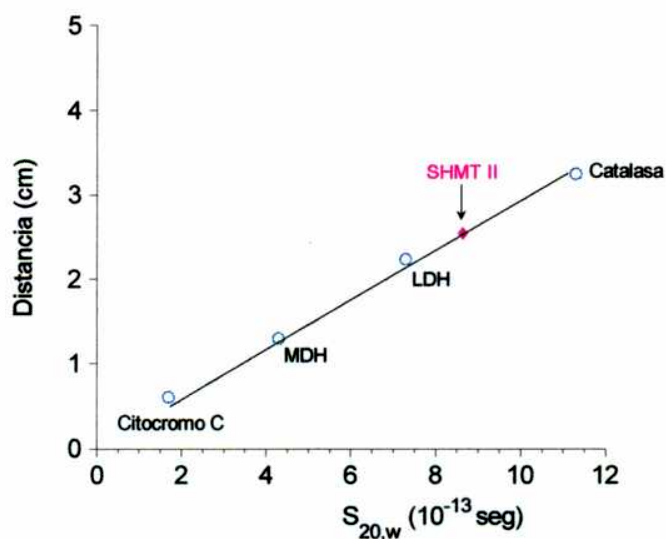
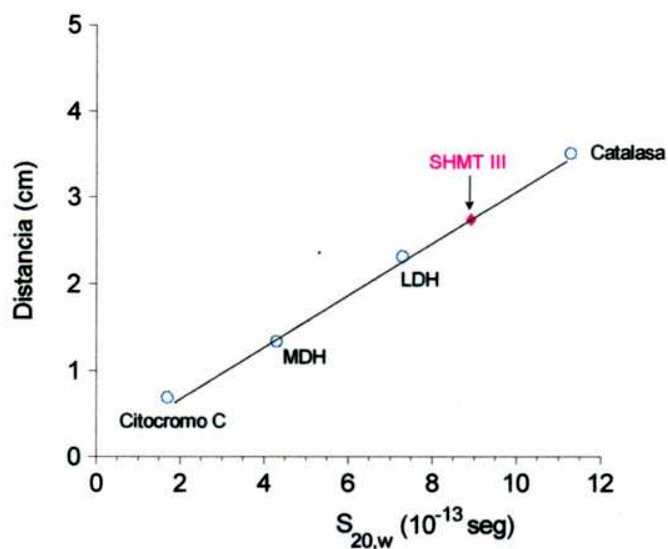


FIGURA 35: Determinación del coeficiente de sedimentación de la SHMT II de *C. fasciculata* por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, en ausencia (Gráfico A) y presencia de PLP 0,02 mM (Gráfico B). Las condiciones experimentales y los $S_{20,w}$ correspondientes a las proteínas marcadoras se indican en Materiales y Métodos.

A



B

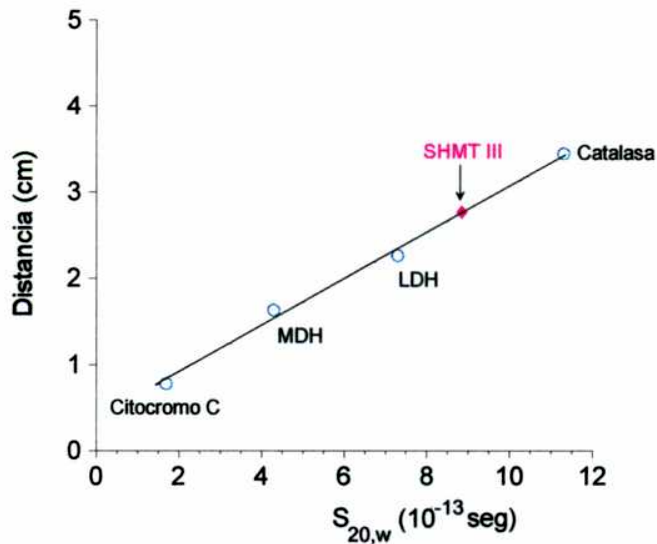


FIGURA 36: Determinación del coeficiente de sedimentación de la SHMT III de *C. fasciculata* por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, en ausencia (Gráfico A) y presencia de PLP 0,02 mM (Gráfico B). Las condiciones experimentales y los $S_{20,w}$ correspondientes a las proteínas marcadoras se indican en Materiales y Métodos.

2.5.2. Radio de Stokes (a) y coeficiente de difusión libre ($D_{20,w}$)

Los radios de Stokes (a) de las tres isoformas se determinaron mediante la técnica de filtración molecular y análisis de los datos experimentales, como se indica en Materiales y Métodos. La FIGURA 37 muestra la representación gráfica de los valores de $[-\log K_d]^{1/2}$ calculados en función de los radios de Stokes de las proteínas marcadoras. Por interpolación en la recta de los respectivos valores experimentales obtenidos para las tres isoformas de la SHMT, se pudieron calcular los respectivos valores de sus radios de Stokes que resultaron ser 50,1, 46,3 y 49,1 Å para las SHMTs I, II y III respectivamente.

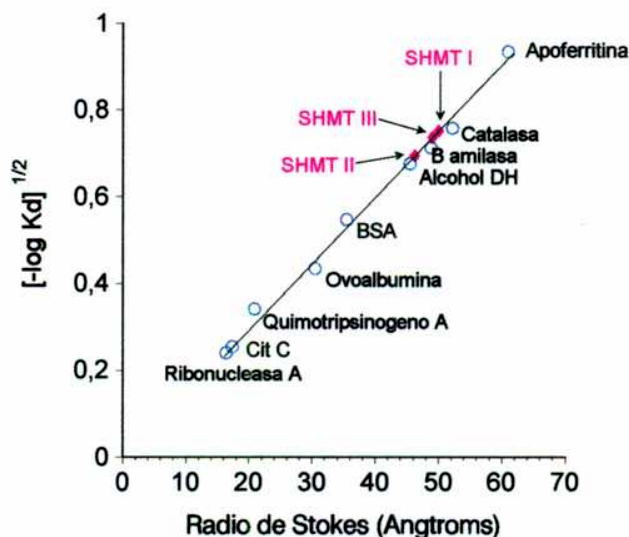


FIGURA 37: Determinación de los radios de Stokes de las tres isoformas de la SHMT de *C. fasciculata*. Los detalles experimentales, así como los radios de Stokes de las proteínas marcadoras se encuentran descritos en Materiales y Métodos.

Se calcularon también sus correspondientes coeficientes de difusión libre ($D_{20,w}$) Los valores calculados fueron de $4,27 \times 10^{-7}$, $4,63 \times 10^{-7}$ y $4,36 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ para las SHMTs I, II y III respectivamente.

2.5.3. Peso molecular de las enzimas nativas

2.5.3.1. Aplicando la técnica de filtración molecular (Andrews)

En la FIGURA 38 se representan los volúmenes de elución normalizados para las proteínas marcadoras en función de los log de los pesos moleculares. De este gráfico, y por interpolación de los valores experimentales de V_e/V_o obtenidos para las tres isoformas de SHMT, se calcularon los pesos moleculares de las enzimas nativas en estudio. Los valores hallados fueron de 226, 173 y 211 kDa para las SHMTs I, II y III respectivamente.

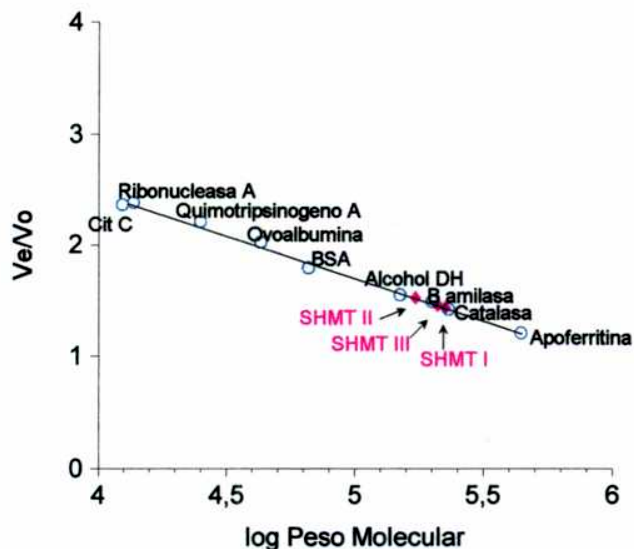


FIGURA 38: Determinación del peso molecular de las enzimas nativas por el método de Andrews.. Las condiciones experimentales se indican en Materiales y Métodos.

En un experimento preliminar, una muestra conteniendo a las tres isoformas de la SHMT de *C.fasciculata*, obtenida por precipitación con sulfato de amonio de un extracto crudo, había sido sometida a filtración molecular en la misma columna de Sephadex G200. Se pudo detectar la presencia simultánea de tres picos principales de actividad con volúmenes de elución de 264,4, 271,1 y 282,2 ml (FIGURA 39), los cuales resultaron muy similares a los hallados para las enzimas purificadas filtradas individualmente: 266,2 ml (SHMT I); 270,3 ml (SHMT II) y 283 ml (SHMT III). En un segundo experimento se obtuvieron valores concordantes: 262 ml, 271,4 ml y 282,9 ml respectivamente.

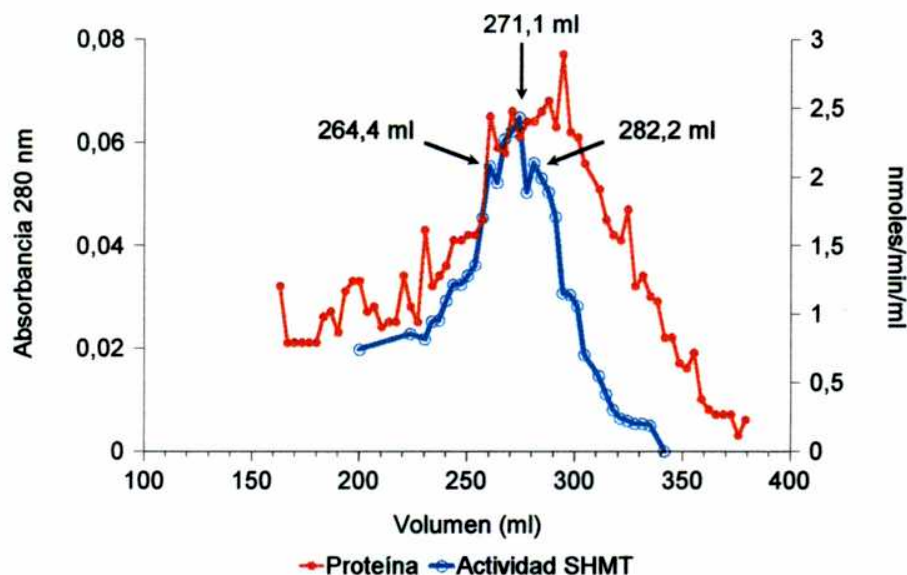


FIGURA 39: Filtración molecular en Sephadex G200 de una preparación de *C.fasciculata* conteniendo a las tres isoformas.

Se sembró 1 ml (8,5 mg de proteínas) en una columna de Sephadex G200 (2,5 x 95 cm), equilibrada y desarrollada con amortiguador fosfato 200 mM, EDTA 0,1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. Los valores indicados en el gráfico corresponden a los máximos de actividad enzimática.

2.5.3.2. Aplicando la ecuación de Svedberg

Los pesos moleculares de cada una de las isoformas de la SHMT de *C.fasciculata* también fueron calculados mediante la ecuación de Svedberg, según se describe en Materiales y Métodos. Para ello fueron utilizados el volumen parcial específico de la SHMT de eucariontes (Martínez Carrion y col., 1972), el $S_{20,w}$ y el $D_{20,w}$ de cada una de las isoformas, estos dos últimos hallados experimentalmente en presencia de PLP. Los pesos moleculares calculados fueron estimados en 190, 171 y 186 kDa para las SHMTs I, II y III respectivamente, valores estuvieron dentro del rango de los obtenidos por el método de Andrews.

Los cocientes friccionales f/f_0 , calculados como se indica en Materiales y Métodos, fueron de 1,32, 1,26 y 1,30 para las SHMTs I, II y III respectivamente, lo que sugiere que las tres enzimas son ligeramente asimétricas.

2.6. Determinación del peso molecular de las subunidades

Este parámetro molecular fue determinado mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes, de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos. Para ello se corrieron simultáneamente y en diferentes calles, las muestras y los marcadores de pesos moleculares conocidos. Para determinar los pesos moleculares de las subunidades de cada isoforma, se trazó una curva de calibración representando el logaritmo del peso molecular versus el R_f , que es la relación entre la distancia recorrida por la banda proteica y la recorrida por el colorante marcador (azul de bromofenol). De acuerdo a este análisis, se

pudo determinar para las subunidades pesos moleculares de 53,8, 50,7 y 51,7 kDa para las SHMTs I, II y III respectivamente (FIGURA 40).

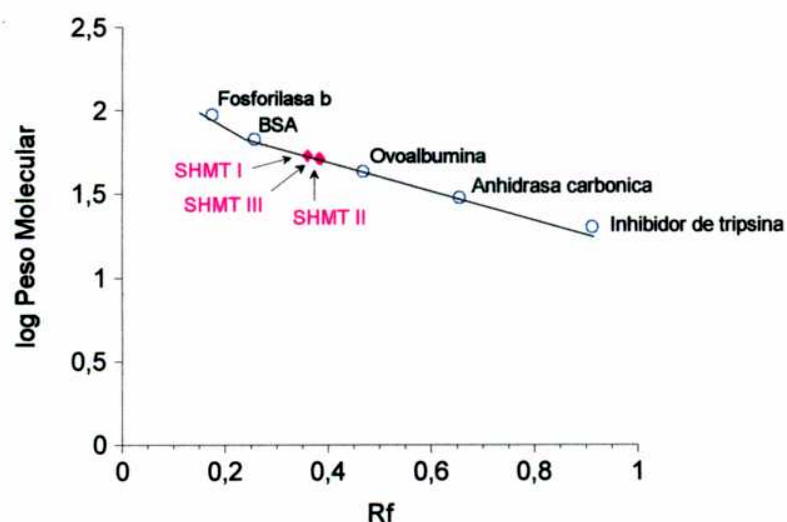


FIGURA 40: Determinación del peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Las electroforesis se realizaron en sistemas discontinuo en geles disociantes, según Laemmli (1970). Con flechas se indican las posiciones de las bandas correspondientes a las isoformas de la SHMT. Los valores de los pesos moleculares de las proteínas marcadoras, como así también los detalles experimentales se incluyen en Materiales y Métodos.

En la TABLA VIII se resumen los parámetros físicoquímicos de las isoformas de la SHMT de *C.fasciculata*.

Parámetros	Método	PLP (0,02 mM)	Isoforma de SHMT	Valor
Coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$)	Velocidad de sedimentación (Método de Martin y Ames)	Sí	I	$8,82 \times 10^{-13}$ seg
			II	$8,65 \times 10^{-13}$ seg
			III	$8,94 \times 10^{-13}$ seg
		No	I	$6,14 \times 10^{-13}$ seg
			II	$6,70 \times 10^{-13}$ seg
			III	$8,86 \times 10^{-13}$ seg
Radio de Stokes (a)	Filtración por gel (Método de Ackers)	Sí	I	50,1 Å
			II	46,3 Å
			III	49,1 Å
Coeficiente de difusión libre ($D_{20,w}$)	Ecuación de Stokes-Einstein	Sí	I	$4,3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$
			II	$4,6 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$
			III	$4,4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$
Peso Molecular (M)	Filtración por gel (Método de Andrews)	Sí	I	226 kDa
			II	173 kDa
			III	211 kDa
	A partir de los datos de $D_{20,w}$, $S_{20,w}$ y V_p	Sí	I	190 kDa
			II	171 kDa
			III	186 kDa
Peso Molecular de las subunidades	SDS-PAGE (Método de Laemmli)	No	I	53,8 kDa
			II	50,7 kDa
			III	51,7 kDa
Coeficiente friccional (f/f_0)	A partir de los datos de V_p y M	Sí	I	1,32
			II	1,26
			III	1,30

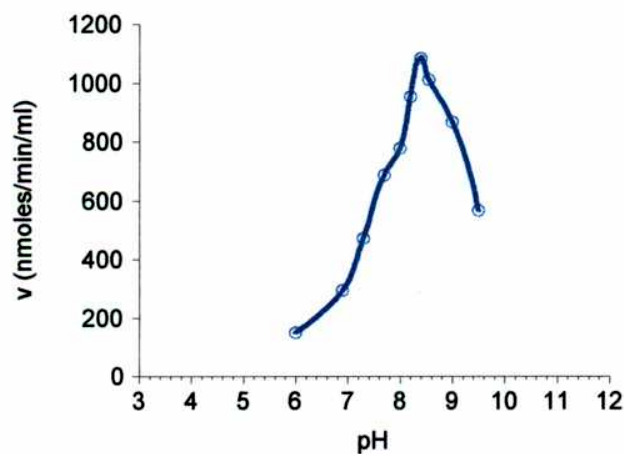
TABLA VIII: Parámetros moleculares e hidrodinámicos de las SHMTs de *C. fasciculata*.

2.7. Características cinéticas

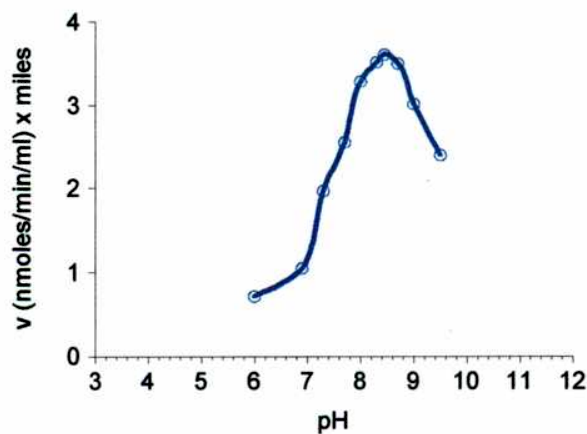
2.7.1. Variación de la actividad enzimática con el pH

Fue determinado el pH óptimo de reacción para todas las enzimas estudiadas, utilizando el método de detección de la actividad enzimática de Taylor y Weissbach (1965), descrito en Materiales y Métodos. Las tres isoformas de la SHMT de *C.fasciculata* presentaron un pH óptimo de reacción de 8,2-8,4 (FIGURA 41 A, B y C).

A



B



C

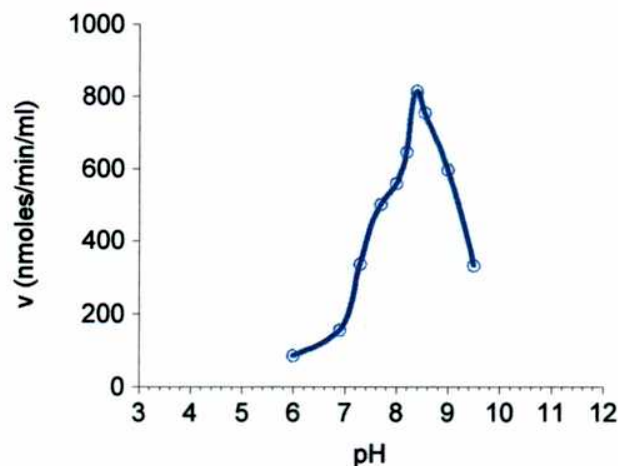


FIGURA 41: Variación de la actividad enzimática de las isoformas de la SHMT de *C. fasciculata* con el pH. En la figuras se representa la actividad enzimática de las SHMTs I (gráfico A), II (gráfico B) y III (gráfico C) en función del pH de reacción. Aplicando el método de Taylor y Weissbach (1965), fue medida la actividad de las enzimas, variando el pH del amortiguador de la reacción (Tris acetato 50 mM) en el rango comprendido entre 6 y 9,5. Para estas determinaciones se utilizaron preparaciones enzimáticas correspondientes al último paso de purificación de cada isoforma (Cromatografía en Reactive Red Agarose para las SHMTs I y II y Blue Sepharose para la SHMT III). Los sustratos y el PLP fueron disueltos en el amortiguador con el pH en estudio.

2.7.2. Determinación de los parámetros cinéticos

Se determinaron los parámetros cinéticos de cada una de las isoformas, para las reacciones de interconversión serina con glicina, utilizando preparaciones del último paso de purificación, indicado en la tabla de purificación respectiva y al pH óptimo de reacción. Los valores de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ se obtuvieron en cada caso, a menos que se indique lo contrario, en presencia de concentraciones saturantes de los otros sustratos de la reacción.

2.7.2.1. Parámetros cinéticos para el THF

Las tres isoformas de la SHMT fueron absolutamente dependientes de THF (FIGURAS 42, 43 y 44). En la FIGURA 42 se representa la actividad de la SHMT I en función de la concentración de THF, en presencia de concentraciones no saturantes (0,5 mM) y saturantes (2 mM) de L-serina. Como se puede apreciar en el primer caso, se observa inhibición por exceso de sustrato (FIGURA 42 A, curva a) que desaparece cuando la concentración es saturante (FIGURA 42 A, curva b). El gráfico doble recíproco, aplicando la ecuación de Lineweaver-Burk, para concentraciones saturantes de L-serina se incluye en la FIGURA 42 B. El K_M y la $V_{m\acute{a}x}$ de la SHMT I para el THF, calculados a concentraciones saturantes de L-serina (2 mM), fueron de 0,19 mM y 1778 nm/min/mg, respectivamente. En el caso de trabajar a condiciones no saturantes de L-serina (0,5 mM), el K_M de la SHMT I para el THF fue de 0,34 mM.

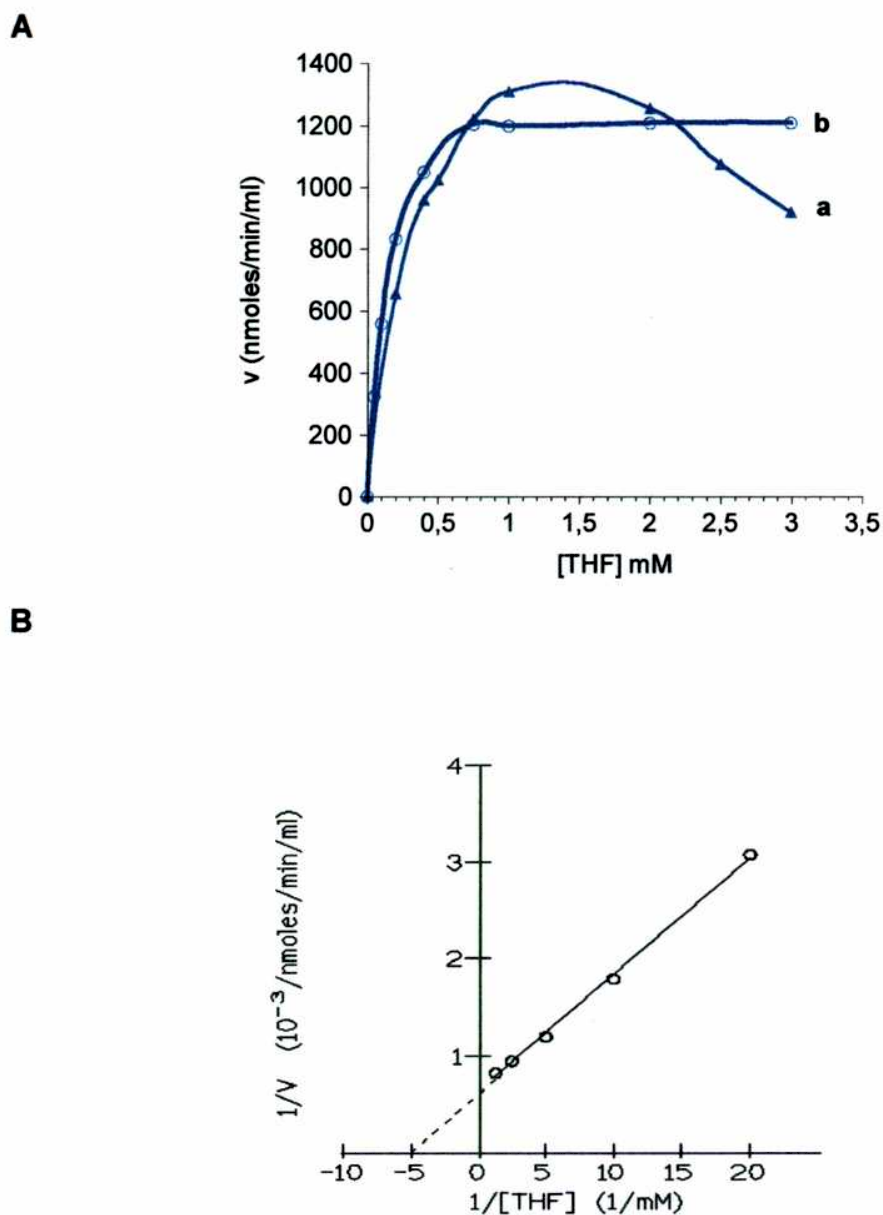
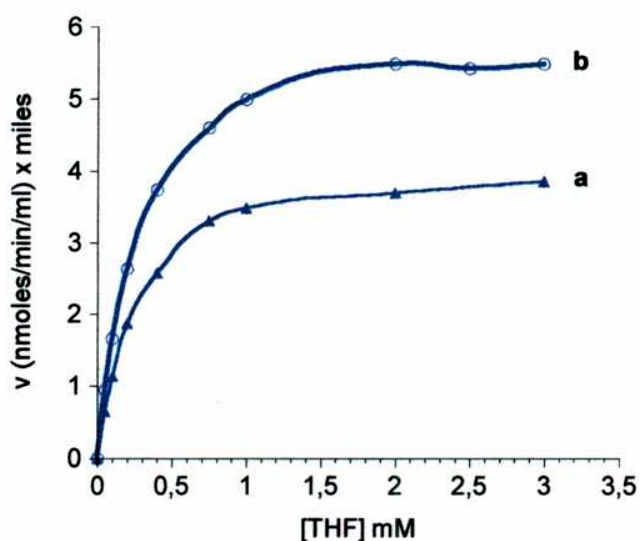


FIGURA 42: Efecto de la variación de la concentración de THF sobre la velocidad de la reacción catalizada por la SHMT I de *C. fasciculata*. Para este ensayo, se utilizaron 0,45 μ g de proteína. **A**: Representación primaria, a: A concentración no saturante de L-serina (0,5 mM), b: A concentración saturante de L-serina (2 mM), **B**: Representación doble recíproca de Lineweaver y Burk (para L-serina 2 mM). $K_M = 0,19$ mM; $V_{m\acute{a}x} = 1778$ nmoles/min/mg

El mismo experimento realizado con la SHMT II demostró que en ninguna de las condiciones (concentraciones saturantes y no saturantes), se pudo detectar el fenómeno de inhibición por exceso de THF (FIGURA 43 A, curvas a y b). El gráfico de doble recíproca, aplicando la ecuación de Lineweaver-Burk, para concentraciones saturantes de L-serina, se indica en la FIGURA 43 B. El K_M de la SHMT II calculado para el THF fue de 0,29 mM y la $V_{m\acute{a}x}$ fue de 1388 nmoles/min/mg. El K_M para el THF, a concentración no saturante de L-serina fue de 0,31 mM.

En el caso de la SHMT III de *C.fasciculata*, el comportamiento observado fue similar al de la SHMT I. Sin embargo, en este caso, el fenómeno de inhibición por exceso de THF a concentraciones no saturantes de L-serina fue mucho más marcado que el de la SHMT I, llegando a obtenerse una inhibición de casi el 90% a concentraciones de THF de 3 mM (FIGURA 44 A, curva a). El gráfico de doble recíproca, aplicando la ecuación de Lineweaver-Burk, para concentraciones saturantes de L-serina (FIGURA 44 B), permitió determinar el K_M de la SHMT III para el THF que fue de 0,2 mM y la $V_{m\acute{a}x}$ fue de 4676 nmoles/min/mg. El K_M para el THF, a concentración no saturante de L-serina fue de 0,14 mM.

A



B

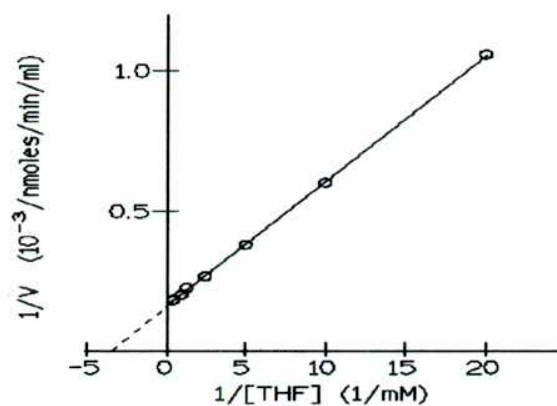
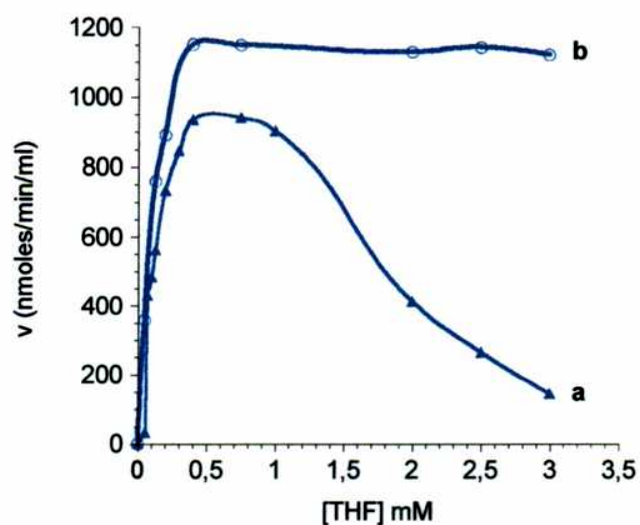


FIGURA 43: Efecto de la variación de la concentración de THF sobre la velocidad de la reacción catalizada por la SHMT II de *C.fasciculata*. Fueron utilizados para este experimento, 1,5 μ g de proteína. A: Representación primaria, a: A concentración no saturante de L-serina (0,5 mM), b: A concentración saturante de L-serina (2 mM), B: Representación doble recíproca de Lineweaver y Burk (para L-serina 2 mM), $K_M = 0,29$ mM; $V_{m\acute{a}x} = 1388$ nmoles/min/mg

A



B

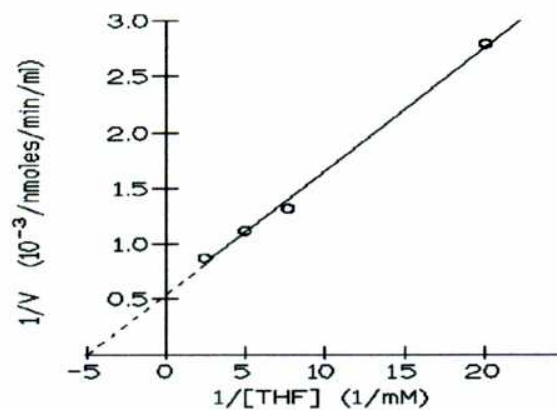


FIGURA 44: Efecto de la variación de la concentración de THF sobre la velocidad de la reacción catalizada por la SHMT III de *C.fasciculata*. Para este experimento fueron utilizados 0,4 μ g de proteína. A: Representación primaria, a: A concentración no saturante de L-serina (0,5 mM), b: A concentración saturante de L-serina (2 mM), B: Representación doble recíproca de Lineweaver y Burk (para L-serina 2 mM). $K_M = 0,2$ mM; $V_{m\acute{a}x} = 4676$ nmoles/min/mg

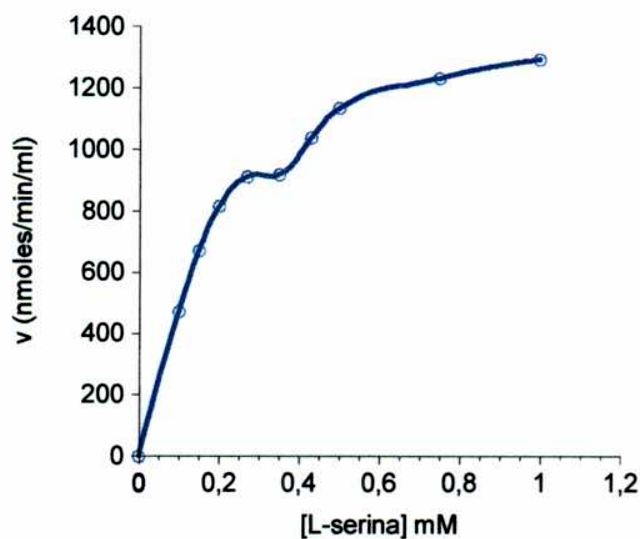
2.7.2.2. Parámetros cinéticos para la L-serina

En la FIGURA 45 A, se muestra la actividad enzimática de la SHMT I en función de la concentración de L-serina. La SHMT I presentó un comportamiento bimodal para el sustrato, es decir se observó una primera curva michaeliana con un K_M de 0,57 mM y una segunda curva después de una meseta en aproximadamente 0,3 mM de L-serina, con un K_M de 0,21 mM. El gráfico de doble recíproca, aplicando la representación de Lineweaver-Burk, se indica en la FIGURA 45 B.

La SHMT II de *C.fasciculata* mostró una tenue curva bimodal, (FIGURA 46 A), que se pone de manifiesto cuando los datos experimentales se representan de acuerdo a Lineweaver-Burk (FIGURA 46 B) con K_{Ms} calculados de 0,29 y 0,22 mM, para concentraciones de L-serina menores y mayores de 0,4 mM, respectivamente.

La SHMT III exhibió un comportamiento similar a la SHMT I cuando se varió la concentración de L-serina. Fue observada una curva bimodal, alcanzando una primera meseta cuando la concentración de L-serina fue de 0,35 mM, para luego volver a aumentar la actividad y tender a valores constantes para concentraciones mayores de L-serina 2 mM. (FIGURA 47 A). La FIGURA 47 B muestra la representación de Lineweaver-Burk de la SHMT III para concentraciones variables de L-serina en presencia de THF 0,75 mM. Los K_{Ms} de la SHMT III de *C.fasciculata* para L-serina fueron 0,15 y 0,68 mM, para concentraciones de L-serina menores y mayores de 1 mM, respectivamente.

A



B

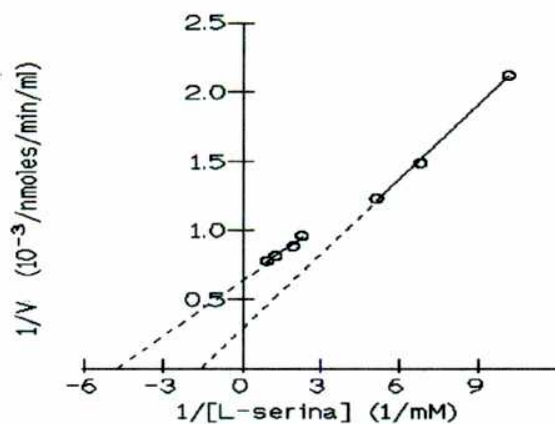
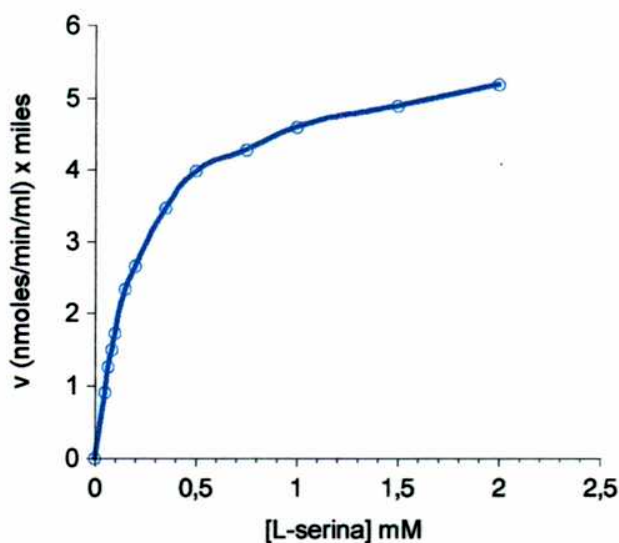


FIGURA 45: Efecto de la variación de la concentración de L-serina sobre la velocidad de la reacción catalizada por la SHMT I de *C.fasciculata*. Para este experimento, fueron utilizados 0,45 μ g de proteína y la actividad SHMT se midió a concentración saturante de THF (1 mM). A: Representación primaria, B: Representación doble recíproca de Lineweaver y Burk K_{M1} = 0,57 mM; $V_{máx1}$ = 3556 nmoles/min/mg K_{M2} = 0,21 mM; $V_{máx2}$ = 1766 nmoles/min/mg.

A



B

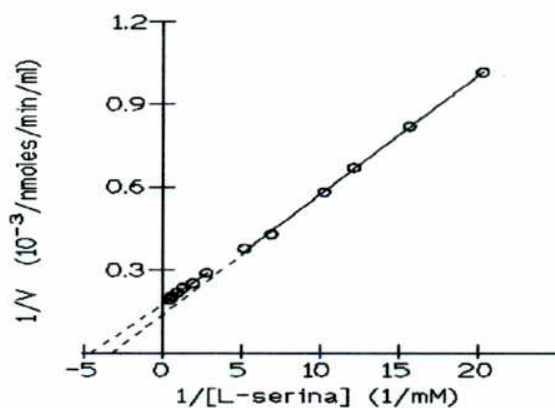
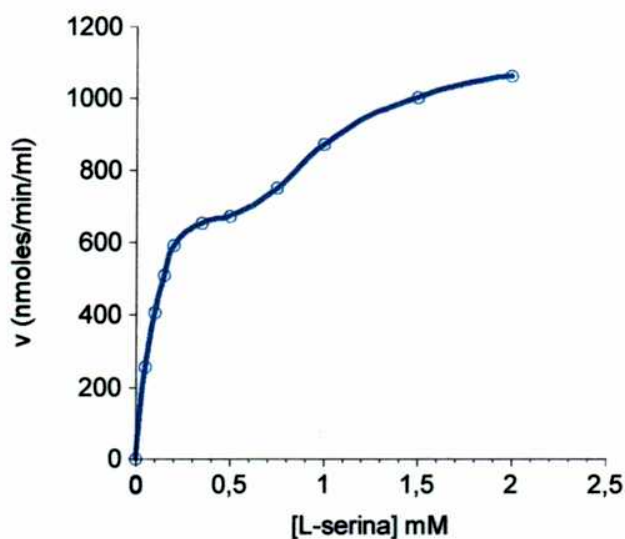


FIGURA 46: Efecto de la variación de la concentración de L-serina sobre la velocidad de la reacción catalizada por la SHMT II de *C. fasciculata*. En estos experimentos, se utilizaron 1,5 μg de proteína y la actividad SHMT fue medida a concentración saturante de THF (1,5 mM). A: Representación primaria, B: Representación doble recíproca de Lineweaver y Burk $K_{M1} = 0,29 \text{ mM}$; $V_{\text{máx}1} = 1452 \text{ nmoles/min/mg}$ $K_{M2} = 0,22 \text{ mM}$; $V_{\text{máx}2} = 1229 \text{ nmoles/min/mg}$

A



B

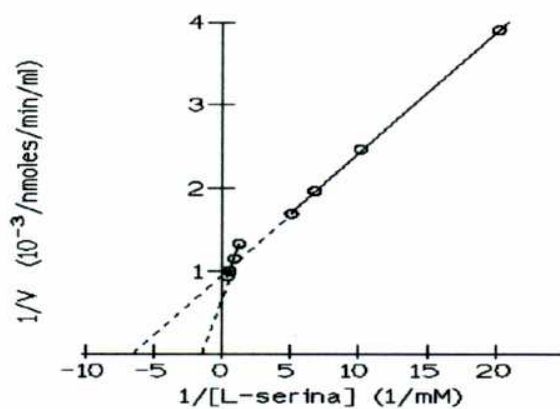


FIGURA 47: Efecto de la variación de la concentración de L-serina sobre la velocidad de la reacción catalizada por la SHMT III de *C. fasciculata*. En este experimento fueron utilizados 0,4 μ g de proteína y se midió la actividad SHMT a concentración saturante de THF (0,75 mM). A: Representación primaria, B: Representación doble recíproca de Lineweaver y Burk K_{M1} = 0,15 mM; $V_{máx1}$ = 2615 nmoles/min/mg K_{M2} = 0,68 mM; $V_{máx2}$ = 3684 nmoles/min/mg

2.8. Dependencia de las SHMTs de PLP

2.8.1. Efecto del sulfato de amonio

Se estudió el efecto del sulfato de amonio sobre la interacción de la enzima con el PLP. Cuando cualquiera de las tres formas moleculares provenientes de preparaciones crudas y en presencia de PLP, eran precipitadas con sulfato de amonio al 80% de saturación final, resuspendidas en amortiguador fosfato 100 mM en ausencia de PLP y se medía la actividad SHMT en ausencia del cofactor, no se detectaba actividad enzimática. Si estas preparaciones carentes del PLP, se preincubaban con 1 mM del cofactor, las enzimas recuperaban su actividad primitiva (TABLA IX). Esto indicaba claramente que el tratamiento con el sulfato de amonio a 80% de saturación final, liberaba al PLP de la enzima convirtiéndola en la apoenzima correspondiente, carente de actividad enzimática. Este resultado demostró que las tres isoformas de la SHMT en extractos crudos de *C. fasciculata* son dependientes del PLP.

Preincubación con PLP	% de Actividad SHMT *		
	SHMT I	SHMT II	SHMT III
-	0	0	0
1 mM	100	100	100

Ver leyenda en la página siguiente

TABLA IX: Efecto del sulfato de amonio sobre la actividad SHMT de cada una de las isoformas de *C.fasciculata*. Las SHMTs I, II y III provenientes de una cromatografía en DEAE celulosa fueron precipitadas con sulfato de amonio al 80% de saturación final y volúmenes iguales de cada una de los precipitados fueron centrifugados a 27000xg durante 30 min a 4 °C. Cada sedimento resultante fue suspendido en iguales volúmenes de amortiguador fosfato 100 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 9 mM, pH 6,8 . Las reacciones fueron medidas preincubando con PLP 1 mM o en ausencia del mismo (según se indica) durante 10 min a 4°C. La reacción fue iniciada por el agregado de los componentes de la mezcla de reacción.

* Referida a la actividad primitiva de cada una de las isoformas, previa a la precipitación con sulfato de amonio.

2.8.2. Efecto de la L-cisteína

Es ampliamente conocida la acción de la L-cisteína sobre las enzimas dependientes del PLP. Este aminoácido se asocia con el PLP formando un complejo tiazolidina, el cual tiene una baja afinidad por el sitio activo de la enzima y en estas condiciones la holoenzima se convierte en apoenzima, inactiva en ausencia de PLP. Trabajando con preparaciones altamente purificadas correspondientes al último paso de la purificación, se midió el efecto de la L-cisteína 2 mM sobre cada una de las isoformas de la SHMT.

La SHMT I fue inhibida un 80%, respecto al control realizado sin tratamiento con L-cisteína (FIGURA 48 I, barras A y C). Si se dializaba exhaustivamente a la enzima tratada con L-cisteína contra fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,8 y se medía la actividad SHMT, la enzima permanecía inactiva en un 81%, respecto al control (barras E y G), ya que la diálisis sólo producía la eliminación del exceso de L-cisteína y de los complejos tiazolidinas formados. Si la enzima tratada con L-cisteína y sometida a diálisis (barra G) era preincubada con PLP 1 mM durante 10 minutos a 4 °C (barra H), se recuperaba un 60% de la actividad SHMT del control respectivo

(barra F). El mismo efecto se observaba si la preparación tratada con L-cisteína y sin diálisis (barra C) era preincubada con exceso de PLP (en relación a la cantidad de L-cisteína utilizada) durante 10 minutos a 4°C. En efecto, como se observa en la FIGURA 48 I, la preincubación con PLP 5 mM luego del tratamiento con L-cisteína y sin diálisis (barra D), permitió recuperar la actividad SHMT del control (barra B) en un 80%. Estos resultados indicaron que la SHMT I fue altamente dependiente de PLP.

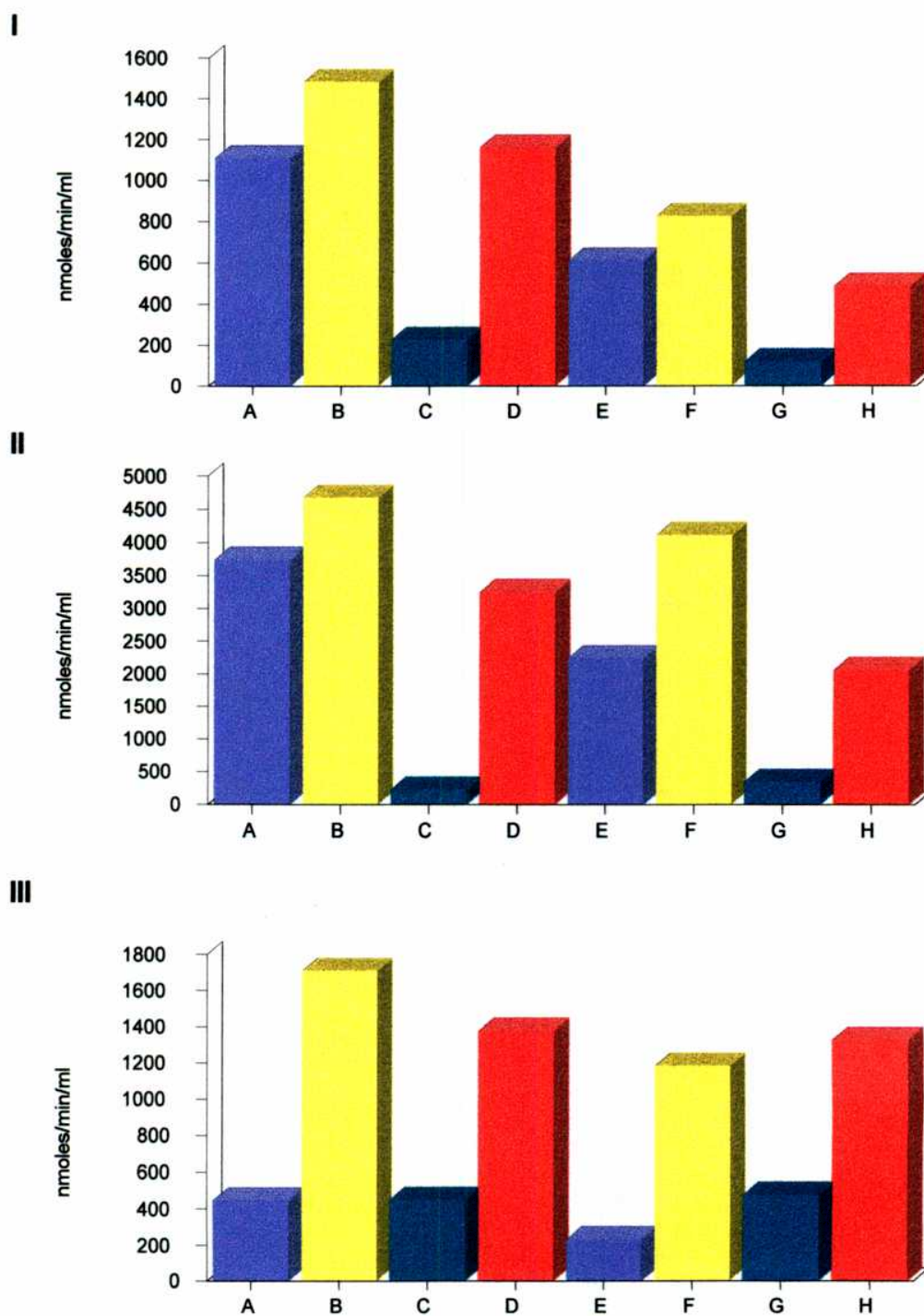
La SHMT II exhibió un comportamiento similar al de la SHMT I (FIGURA 48 II). El tratamiento con L-cisteína inhibió a la enzima en un 92% (barra C), comparada con el control (barra A). Si la enzima era dializada en las mismas condiciones que la SHMT I, la misma aún se encontraba fuertemente inactivada en un 85% (barra G), comparada con el control respectivo (barra E). Si luego de este tratamiento, la SHMT II era preincubada 10 minutos con exceso de PLP (barra H), de la misma manera que la SHMT I, se recuperaba un 50% de la actividad enzimática en relación al control respectivo (barra F). Cuando la preincubación con exceso de PLP se realizaba con la enzima no dializada, el resultado era similar, ya que la enzima recuperaba un 70% de la actividad SHMT (barras B y D). Similarmente a la SHMT I, la SHMT II fue inactivada con L-cisteína y demostró ser altamente dependiente de PLP.

Una notable diferencia fue encontrada cuando fue ensayado el efecto de la L-cisteína 2 mM sobre la SHMT III de *C.fasciculata* (FIGURA 48 III). En primer lugar, la enzima obtenida por el método de purificación descripto oportunamente, no fue inactivada por el tratamiento con L-cisteína, en relación al control respectivo (barras A y C). Después de ser dializada, la

enzima tratada con L-cisteína (barra G) mantuvo su actividad inicial (barra C), a diferencia del control (barra A) que perdió un 49% de actividad después de la diálisis (barra E). A diferencia de lo que ocurría con las SHMTs I y II, la SHMT III nativa fue muy activada por preincubación con PLP 1 mM (barras A y B). Esta activación también se observó con la enzima tratada previamente con L-cisteína con posterior diálisis (barras G y H) o sin diálisis (barras C y D) aunque en ambos casos la activación fue ligeramente menor.

Estos resultados sugieren que las proporciones relativas de holoenzima/apoenzima son mayores para las preparaciones obtenidas por los métodos de purificación respectivos para las SHMTs I y II que para la SHMT III.

Como se indicó en Materiales y Métodos, todos los experimentos descriptos se realizaron en presencia de BSA 1 mg/ml por las razones expuestas en la correspondiente sección.



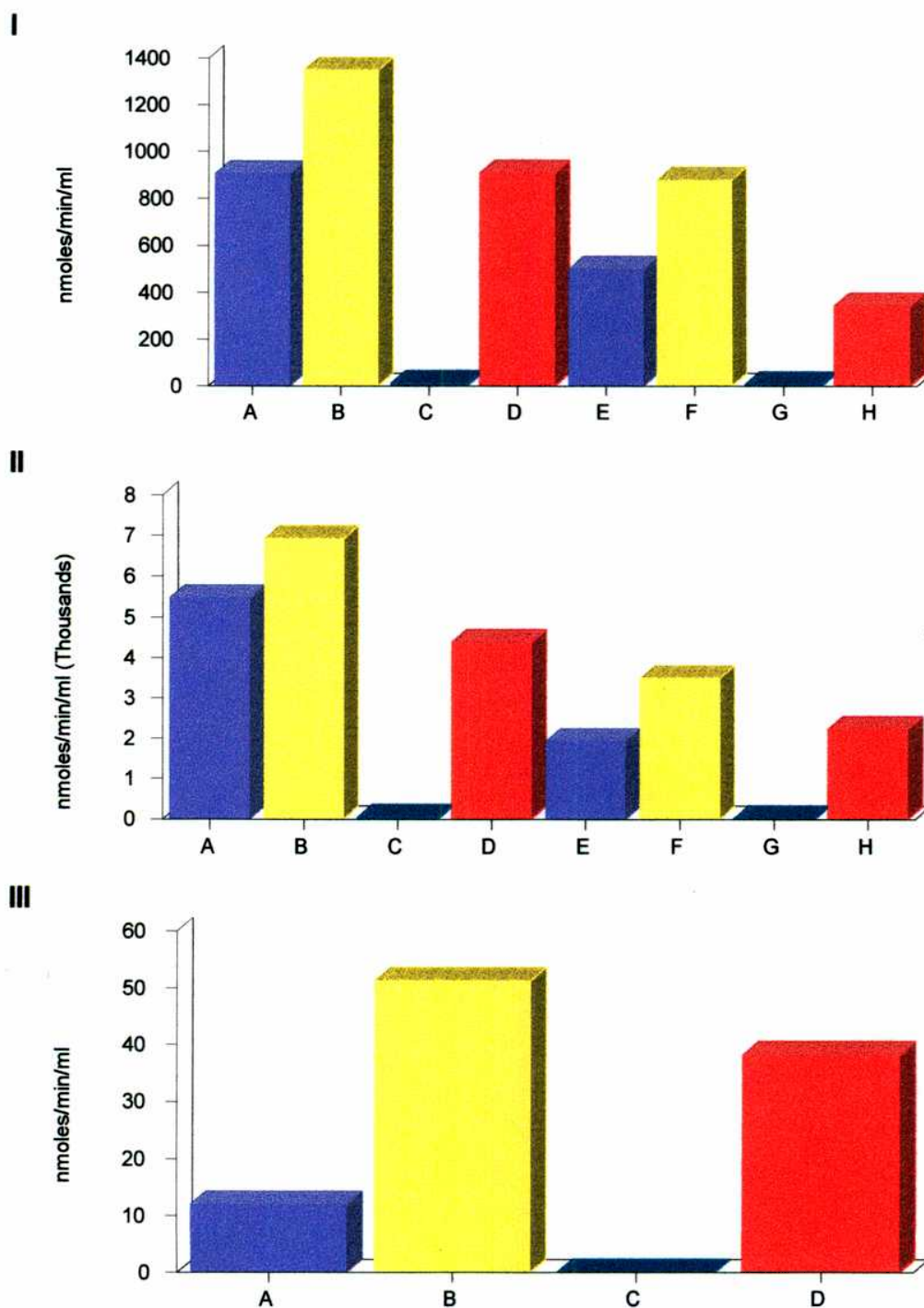
Ver leyenda en la página siguiente

FIGURA 48: Efecto de la L-cisteína sobre las isoformas de la SHMT de *C.fasciculata*. Gráfico I: SHMT I; Gráfico II: SHMT II; Gráfico III: SHMT III. Preparaciones altamente purificadas provenientes del último paso de purificación de cada una de ellas fueron preincubadas con L-cisteína 2 mM durante 60 min en presencia de BSA 1 mg/ml . En los casos que se indican, la enzima fue dializada 2 horas contra 200 volúmenes de amortiguador fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, pH 6,8 y conteniendo BSA 1 mg/ml, con dos cambios.

- (A) Control de la actividad enzimática antes del tratamiento con L-cisteína y en ausencia de PLP.
- (B) es como (A) pero se midió la actividad SHMT después de preincubar la mezcla en presencia de PLP 1 mM durante 10 min a 4°C.
- (C) actividad de la enzima tratada con L-cisteína antes de la diálisis.
- (D) es como (C) pero se midió la actividad SHMT después de preincubar la mezcla en presencia de PLP 5 mM durante 10 min a 4°C.
- (E) es como (A), pero después de la diálisis.
- (F) es como (E) pero se midió actividad SHMT después de preincubar la mezcla en presencia de PLP 1 mM durante 10 min a 4°C.
- (G) es como (C) pero después de la diálisis.
- (H) es como (G) pero se midió actividad SHMT después de preincubar la mezcla en presencia de PLP 5 mM durante 10 min a 4°C.

2.8.3. Efecto del clorhidrato de hidroxilamina

Efectos similares a los obtenidos por tratamiento con L-cisteína, se observaron utilizando clorhidrato de hidroxilamina 1 mM como agente disociante. Sin embargo, es de destacar que en este caso la inhibición que se obtuvo fue del 100% sobre las tres isoformas (FIGURAS 49 I, II y III).



Ver leyenda en la página siguiente

FIGURA 49: Efecto del clorhidrato de hidroxilamina sobre las isoformas de la SHMT de *C.fasciculata*. Gráfico I: SHMT I; Gráfico II: SHMT II; Gráfico III: SHMT III. Preparaciones altamente purificadas provenientes del último paso de purificación de cada una de ellas fueron preincubadas con clorhidrato de hidroxilamina 1 mM durante 60 min en presencia de BSA 1 mg/ml. En los casos que se indican, la enzima fue dializada 2 horas contra 200 volúmenes de amortiguador fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, pH 6,8 y conteniendo BSA 1 mg/ml, con dos cambios.

(A) Control de la actividad enzimática antes del tratamiento con clorhidrato de hidroxilamina y en ausencia de PLP.

(B) es como (A) pero se midió la actividad SHMT después de preincubar la mezcla en presencia de PLP 1 mM durante 10 min a 4°C.

(C) actividad de la enzima tratada con clorhidrato de hidroxilamina antes de la diálisis.

(D) es como (C) pero se midió la actividad SHMT después de preincubar la mezcla en presencia de PLP 5 mM durante 10 min a 4°C.

(E) es como (A), pero después de la diálisis.

(F) es como (E) pero se midió actividad SHMT después de preincubar la mezcla en presencia de PLP 1 mM durante 10 min a 4°C.

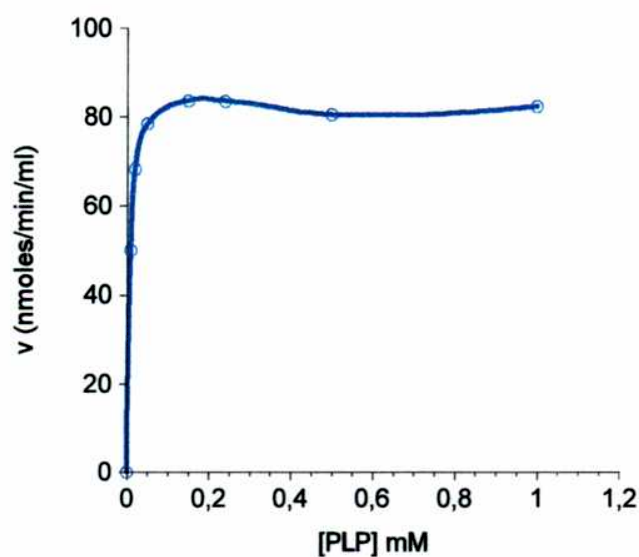
(G) es como (C) pero después de la diálisis.

(H) es como (G) pero se midió actividad SHMT después de preincubar la mezcla en presencia de PLP 5 mM durante 10 min a 4°C.

2.8.4. Parámetros cinéticos para el PLP

Se midieron las afinidades por el PLP de cada una de las isoformas de *C.fasciculata*, provenientes de preparaciones previamente disociadas por precipitación con sulfato de amonio o tratamiento con clorhidrato de hidroxilamina (apoenzimas). Se utilizaron concentraciones saturantes de L-serina y THF y al pH óptimo de reacción, según la isoforma en estudio. Todas presentaron cinéticas michaelianas (FIGURAS 50 A, 51 A y 52 A). De la representación de Lineweaver y Burk, según se indica (FIGURAS 50 B, 51 B y 52 B), se calcularon los K_{Ms} para el PLP, cuyos valores fueron de 0,008, 0,02 y 0,024 mM para las SHMTs I, II y III respectivamente.

A



B

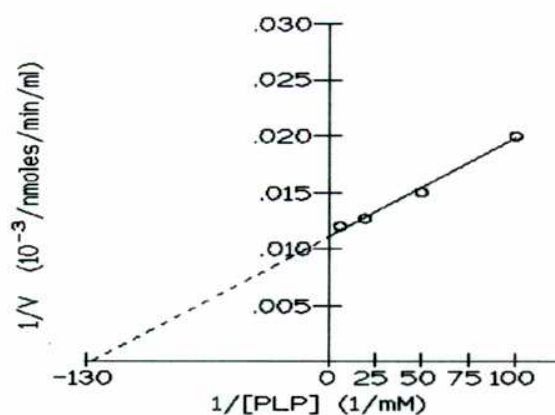
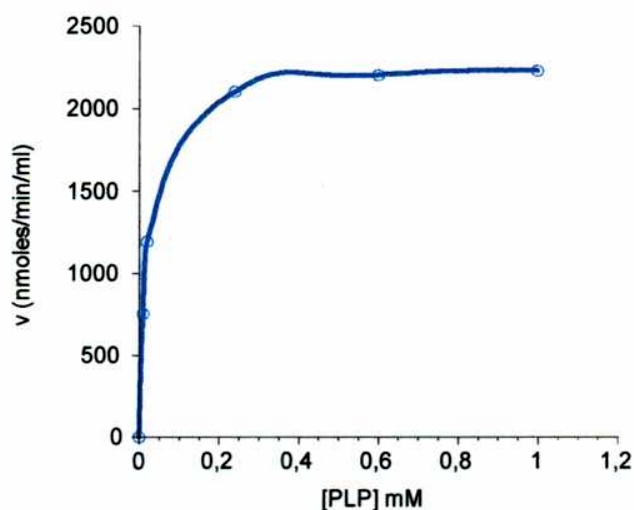


FIGURA 50: Efecto de la concentración de PLP sobre la actividad de las SHMT I de *C.fasciculata*. Los experimentos fueron realizados en presencia de concentraciones saturantes de THF y de L-serina y al pH óptimo de reacción. Para este experimento, se utilizó una preparación proveniente de una cromatografía en columna de DEAE celulosa y posteriormente precipitada con sulfato de amonio al 80% de saturación final. A: Representación primaria B: Representación doble recíproca de Lineweaver y Burk
 $K_M = 0,008 \text{ mM}$

A



B

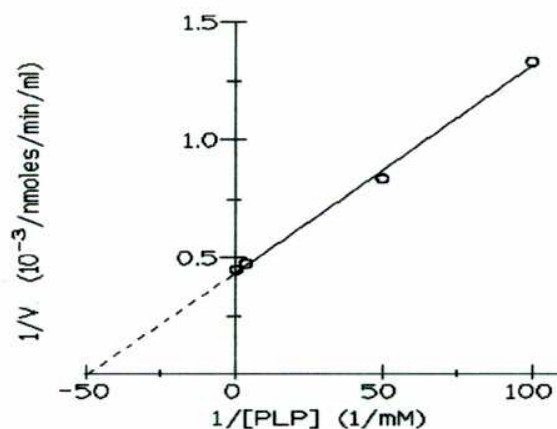
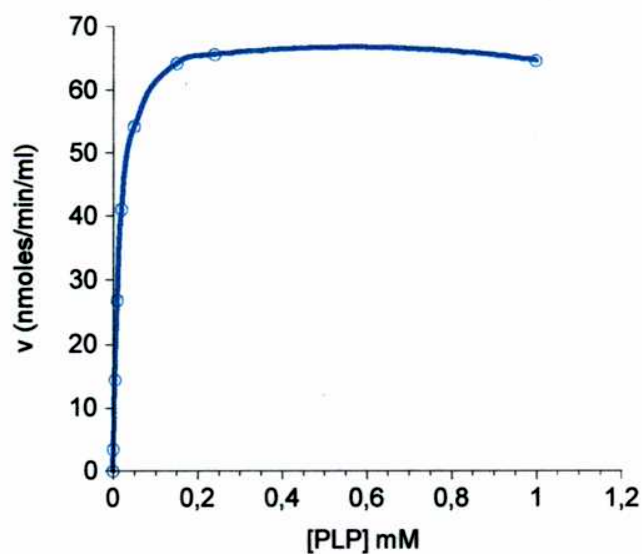


FIGURA 51: Efecto de la concentración de PLP sobre la actividad de las SHMT II de *C.fasciculata*. Los experimentos fueron realizados en presencia de concentraciones saturantes de THF y de L-serina y al pH óptimo de reacción. Para ello se utilizó una preparación proveniente del último paso de purificación indicado en la tabla de purificación respectiva, preincubada con hidroxilamina 1 mM durante 60 min a 4°C. Luego fue dializada 2 horas contra 200 volúmenes de amortiguador fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, pH 6,8 en presencia de BSA 1 mg/ml, con dos cambios. A: Representación primaria, B: Representación doble recíproca. $K_M = 0,020$ mM

A



B

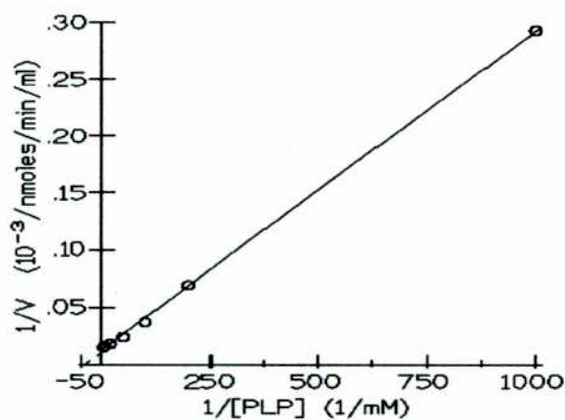


FIGURA 52: Efecto de la concentración de PLP sobre la actividad de las SHMT III de *C.fasciculata*. Los experimentos fueron realizados en presencia de concentraciones saturantes de THF y de L-serina y al pH óptimo de reacción. Para este experimento, se utilizó una preparación proveniente de una cromatografía en columna de DEAE celulosa y posteriormente precipitada con sulfato de amonio al 80 % de saturación final; A: Representación primaria, B: Representación doble recíproca de Lineweaver y Burk .
 $K_M = 0,024 \text{ mM}$

2.9. Espectros de absorción de las SHMTs

Un espectro de absorción a pH 6,8 de las SHMTs I y II, electroforéticamente homogéneas (después de la etapa de filtración molecular en Sephadex G200), se muestran en las FIGURAS 53 y 54. Ambas exhibieron un espectro clásico, con un máximo a 278 nm y otro a 403 nm, este último característico de las enzimas dependientes de PLP, debido a la base de Schiff protonada formada entre el PLP y el grupo ϵ amino de un residuo de lisina de la enzima. Las relaciones $A_{278}: A_{403}$ fueron de aproximadamente 4,3 para la SHMT I y de 4,7 para la SHMT II.

El espectro de absorción a pH 6,8 de la SHMT III, también electroforéticamente homogénea obtenida en las mismas condiciones que las anteriores, fue ligeramente diferente a las otras isoformas, con un máximo cercano a 250 nm y otro a 403 nm (FIGURA 55) y con una relación de $A_{278}:A_{403}$ de aproximadamente 3,0.

En los espectros de las tres isoformas se observó, con diferente grado de magnitud, un hombro en la zona de 330 nm, que lo presentan SHMTs de otro origen.

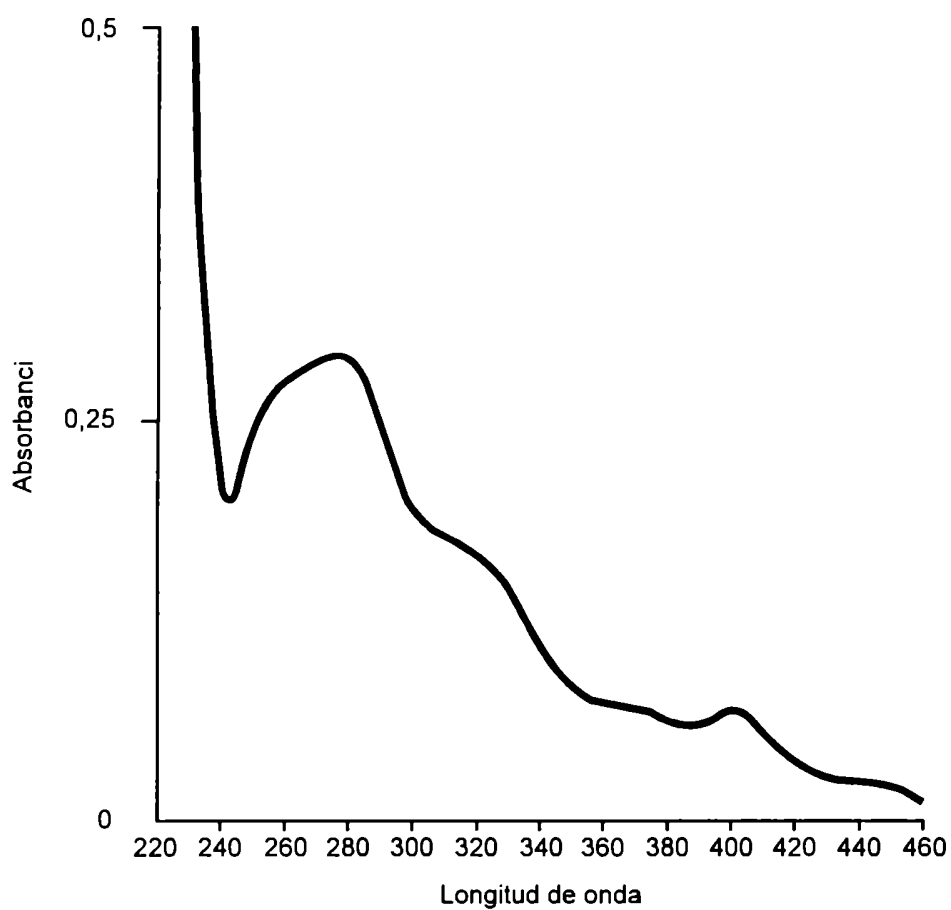


FIGURA 53: Espectro de absorción de la SHMT I de *C.fasciculata* (holoenzima). Los espectros fueron realizados con la enzima eluida de la columna de Sephadex G200, la cual fue previamente desalada, como se indica en Materiales y Métodos y equilibrada con amortiguador fosfato 100 mM, EDTA 1 mM, pH 6,8. El espectro fue obtenido contra el mismo amortiguador, colocado en la cuba de referencia.

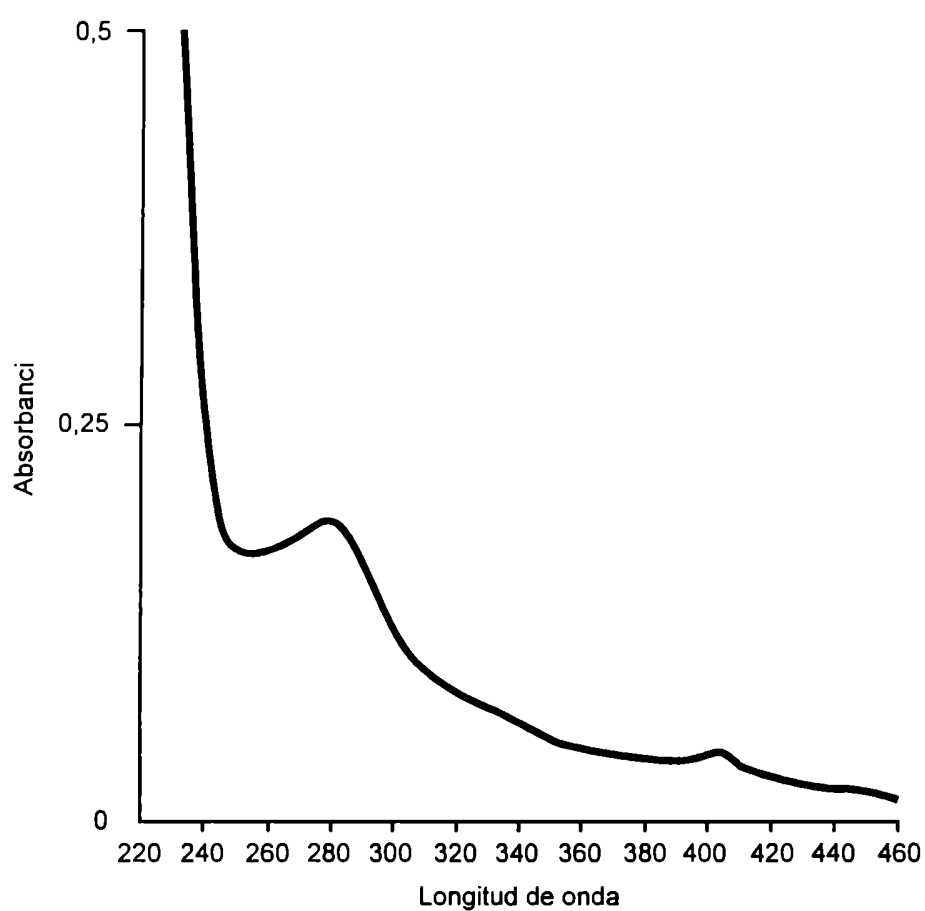


FIGURA 54: Espectro de absorción de la SHMT II de *C. fasciculata* (holoenzima). Las condiciones experimentales son las mismas que la FIGURA 53.

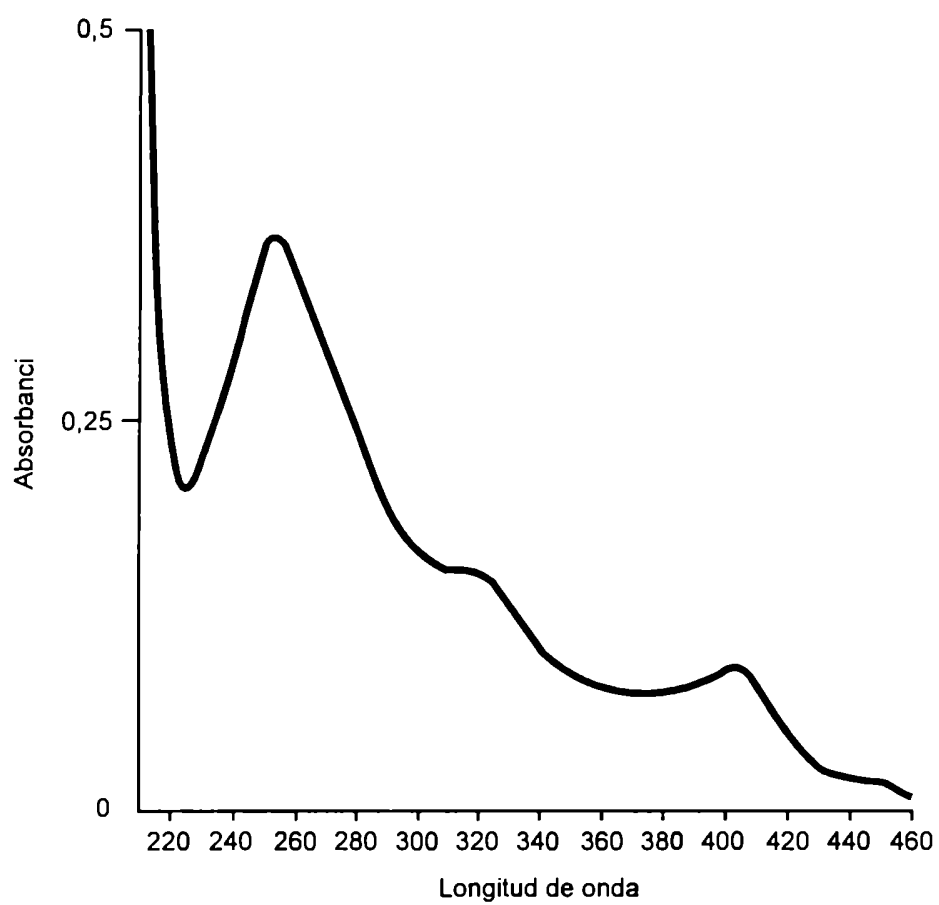


FIGURA 55: Espectro de absorción e la SHMT III de *C.fasciculata* (holoenzima). Las condiciones experimentales fueron las mismas que la FIGURA 53.

2.10. Secuenciación del extremo amino terminal de las SHMTs

Los extremos amino terminal de las SHMTs I y II de *C.fasciculata* fueron sometidos a secuenciación por el método de degradación de Edman (Ver Materiales y Métodos). Como se observa en la FIGURA 56, dichas secuencias mostraron entre sí un 100% de homología en los primeros 33 aminoácidos.

Contrariamente a lo que sucedió con las otras dos isoformas, la SHMT III presentó el extremo amino terminal bloqueado. Intentos de desbloquearlo por tratamiento previo con ácido trifluoracético/metanol 1:1 que elimina acetilos de los extremos amino terminales de las proteínas (Bergman y col., 1996), no tuvieron éxito.

CfSHMTI	SGLNKVCSMEEAVSGMKDGIHVAFGGFGNAGVP
CfSHMTII	SGLNKVCSMEEAVSGMKDGIHVAFGGFGNAGVP

FIGURA 56: Secuencias aminoacídicas del extremo amino terminal de las SHMTs I y II de *C.fasciculata*.

3. SHMT de *T.cruzi*

3.1. Estudios sobre la posible existencia de isoformas

Con el fin de comprobar si, tal como ocurrió en *C.fasciculata*, el *T.cruzi* poseía más de una forma molecular de la SHMT, se realizó un experimento de cromatografía en DEAE celulosa, similar al descrito en la sección 2.1. para la *C.fasciculata*. Para ello se utilizó un extracto crudo de epimastigotes de la cepa Dm28c de *T.cruzi*, preparado como se indica en Materiales y Métodos, en presencia del cóctel de inhibidores de proteasas descrito en la sección 1. (ver también FIGURA 16). Las condiciones experimentales utilizadas se detallan en la leyenda de la FIGURA 57. En dicha figura, se puede apreciar que una gran cantidad de proteína carente de actividad enzimática fue eluída con el amortiguador de lavado y luego de la aplicación del gradiente, la actividad de SHMT pudo ser eluída como un sólo pico simétrico a una concentración de fosfato de aproximadamente 120 mM.

El posterior lavado de la columna con un amortiguador de alta fuerza iónica (fosfato 200 mM, sulfato de amonio 5%, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8) y la concomitante elución de proteína inerte, permitió descartar la presencia de alguna otra forma molecular de la enzima que podría haber sido retenida por la columna con alta afinidad (dato no mostrado). Debido a que la cromatografía en DEAE celulosa es un método utilizado en muchos trabajos para separar isoformas de la SHMT (ver Introducción), el resultado de este experimento sugiere, la existencia de una sola forma de la enzima en *T.cruzi*, en contraposición con las tres formas detectadas en *C.fasciculata*. La enzima eluída en estas

condiciones, exhibió un alto grado de inestabilidad. Mantenida a 4°C durante 8 hs, conservó un 70% de la actividad original, pero a las 24 hs tan sólo un 29% de la misma. Debido a esta inestabilidad y al bajo rendimiento de esta cromatografía (30%), no se descarta la posibilidad de que exista alguna otra forma que se haga totalmente inestable en las condiciones experimentales empleadas y que no se pueda detectar.

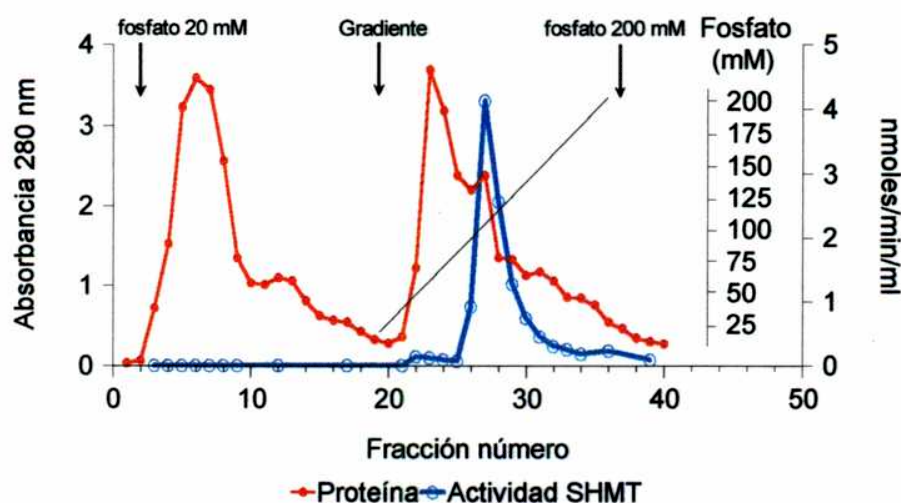


FIGURA 57: Cromatografía en DEAE celulosa de la SHMT de *T. cruzi* (cepa Dm28c)

En el experimento se sembraron 27,5 ml (138 mg de proteínas) en una columna de DEAE celulosa (3 x 17 cm), previamente equilibrada con fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8 y lavada exhaustivamente con el mismo amortiguador. Luego se aplicó un gradiente de fosfato comprendido entre 20 y 200 mM (50 ml en cada reservorio). El volumen de cada fracción fue de 6,5 ml. El resto de las condiciones experimentales se encuentran detalladas en el texto.

3.2. Purificación parcial de la enzima

La purificación parcial de la enzima fue realizada en ausencia del cóctel de inhibidores de proteasas, de acuerdo a los resultados mostrados en la FIGURA 16 y a los obtenidos con la enzima eluída de la cromatografía en DEAE celulosa, por lo que las preparaciones enzimáticas fueron conservadas por congelamiento a -25°C y sólo se descongelaron inmediatamente antes de iniciar una etapa de purificación.

3.2.1. Filtración molecular en Sephadex G200

El corte 30-70% de saturación en sulfato de amonio, obtenido según se describe en Materiales y Métodos, fue centrifugado a 100000xg durante 60 minutos y el sedimento resultante fue descartado. El sobrenadante fue sometido a filtración molecular a través de una columna de Sephadex G200 (2,5 x 95 cm) equilibrada y desarrollada con amortiguador fosfato 200 mM, sulfato de amonio 5,1%, EDTA 0,1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. Fueron reunidas aquellas fracciones exhibiendo máxima actividad de SHMT (FIGURA 58).

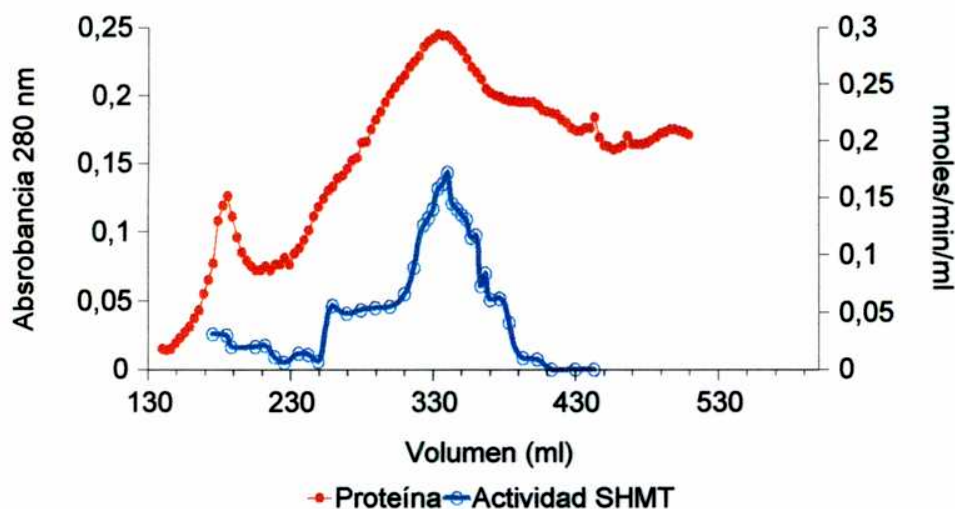


FIGURA 58: Filtración molecular en Sephadex G200 de la SHMT de la cepa Dm28c de *T. cruzi*.

Se sembraron 1,5 ml (56 mg de proteínas) en una columna de Sephadex G200 (2,5 x 95 cm), equilibrada y desarrollada con fosfato 200 mM, sulfato de amonio 5,1%, EDTA 0,1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. El volumen de cada fracción fue de 3,4 ml.

3.2.2. Cromatografía en Phenyl Sepharose

La solución del paso anterior fue sometida a una cromatografía de interacción hidrofóbica en una columna de Phenyl Sepharose, en las condiciones descritas en la leyenda de la FIGURA 59. Como puede apreciarse en la mencionada figura, la enzima recién eluyó con un amortiguador de muy baja fuerza iónica (fosfato 5 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 7,1). Las fracciones activas fueron reunidas y concentradas por filtración a través de filtros Amicon, como se describió anteriormente.

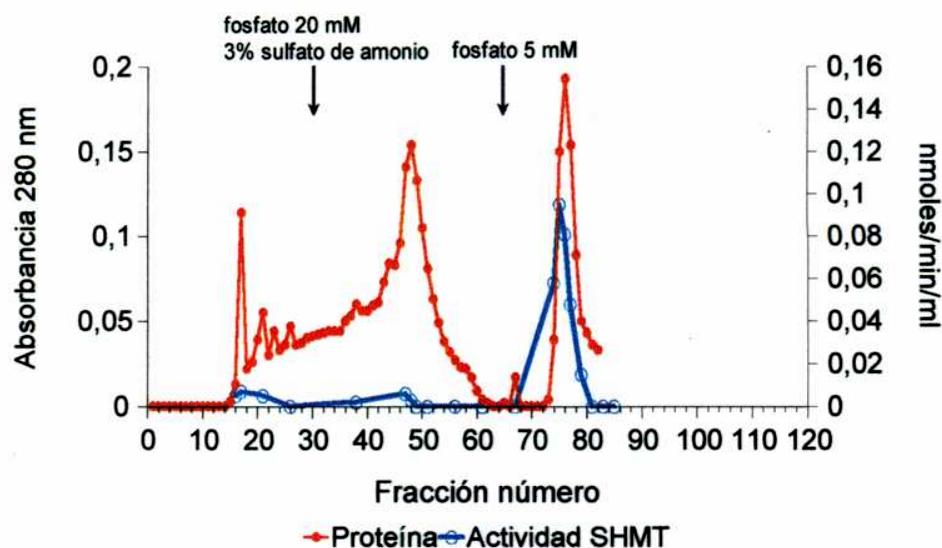


FIGURA 59: Cromatografía en Phenyl Sepharose de la SHMT proveniente de la cepa Dm28c de *T. cruzi*.

En este caso se sembraron 96 ml (23 mg de proteínas) en una columna de Phenyl Sepharose (1,4 x 10 cm), previamente equilibrada con fosfato 20 mM, 20% de saturación en sulfato de amonio, EDTA 0,1 mM, PLP 0,02 mM, pH 7,1. Luego se lavó con el mismo amortiguador pero conteniendo 3% de saturación en sulfato de amonio. La enzima fue posteriormente eluída reduciendo la concentración de fosfato del amortiguador a 5 mM y sin sulfato de amonio. El volumen de cada fracción fue de 1 ml.

La purificación alcanzada fue de 13 veces relativa al extracto crudo, con un rendimiento del 36% (TABLA X). La enzima eluída de la columna de Phenyl Sepharose fue altamente inestable en esas condiciones. Este inconveniente, sumado a que se partió de una cantidad pequeña de células, impidieron proseguir con la purificación de la enzima.

Etapas	Proteínas Totales (mg)	Actividad total (nmoles/min)	Actividad específica (nmoles/min/mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	145	27,3	0,188	1,0	100
Corte 30-70%	56	18,0	0,321	1,7	66
Sephadex G200	23	17,3	0,752	4,0	64
Phenyl Sephadex	4	9,9	2,475	13,1	36

TABLA X: Purificación parcial de la SHMT a partir de 1 gramo (peso húmedo) de epimastigotes de la cepa Dm28c de *T.cruzi*.

3.3. Parámetros moleculares e hidrodinámicos de la enzima

3.3.1. Peso molecular de la enzima nativa

Con los datos obtenidos del experimento de filtración molecular en columna de Sephadex G200 descrito en la FIGURA 58 se pudo calcular, aplicando el método de Andrews, el peso molecular de la enzima nativa. En la FIGURA 60 se representan los volúmenes de elución normalizados de las proteínas marcadoras en función de los log de los pesos moleculares de cada una de ellas. De este gráfico, y por interpolación del correspondiente volumen de elución de la enzima, se calculó un peso molecular de 69 kDa.

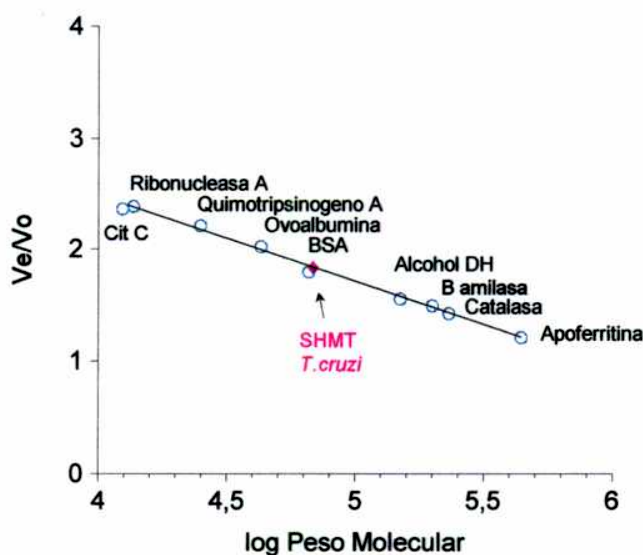


FIGURA 60: Determinación del peso molecular de la SHMT de *T. cruzi* por el método de Andrews.

Las condiciones experimentales y los pesos moleculares de las proteínas marcadoras se indican en Materiales y Métodos.

3.3.2. Radio de Stokes (a) y coeficiente de difusión libre ($D_{20,w}$)

Se determinaron en la forma oportunamente consignada para las isoformas de la SHMT de *C. fasciculata*. En la FIGURA 61 se representan los valores de $[-\log K_d]^{1/2}$ calculados experimentalmente en función de los radios de Stokes de las proteínas marcadoras (ver Materiales y Métodos). Por interpolación en la recta del correspondiente valor experimental obtenido para la SHMT, se determinó el radio de Stokes, cuyo valor resultó ser de 35,45 Å.

A partir del mismo y aplicando la ecuación de Stokes-Einstein, se calculó el valor de $D_{20,w}$ que fue de $5,5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$.

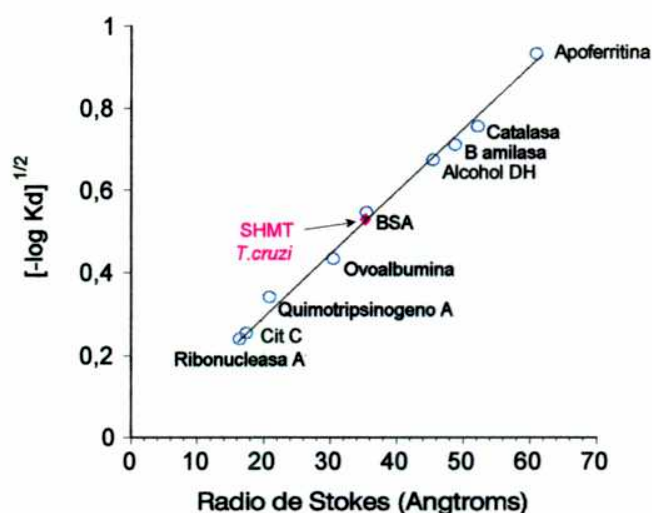


FIGURA 61: Determinación de los radios de Stokes de la SHMT de *T.cruzi*. Los detalles experimentales, así como los radios de Stokes de las proteínas marcadoras se encuentran descritos en Materiales y Métodos.

3.4. Características cinéticas

Debido al elevado grado de inestabilidad que exhibieron las preparaciones de la enzima, aún purificadas tan sólo parcialmente (en algunos casos la actividad remanente al cabo de 24 hs. fue de menos del 20%), se prefirió realizar estos estudios con preparaciones correspondientes a un extracto crudo, que como se demostró anteriormente contenían una sola forma molecular de la enzima. Dichos extractos crudos fueron obtenidos a partir de epimastigotes de *T.cruzi* (cepa Dm28c), como se mencionó en

Materiales y Métodos, centrifugados a 80000xg durante 30 min a 4°C, descartando el residuo resultante. El sobrenadante fue la fuente de enzima para los experimentos mostrados en esta sección.

3.4.1. Variación de la actividad enzimática con el pH

El pH óptimo de reacción fue investigado utilizando amortiguador Tris acetato 50 mM de concentración final en la mezcla de reacción y con los sustratos y cofactores a concentraciones saturantes y de acuerdo al método de Taylor y Weissbach (1965). Cabe aclarar que los sustratos y cofactores fueron disueltos en el amortiguador al pH en estudio. El máximo de actividad SHMT resultó ser a pH 8,2. El perfil de variación del pH con la actividad se muestra en la FIGURA 62.

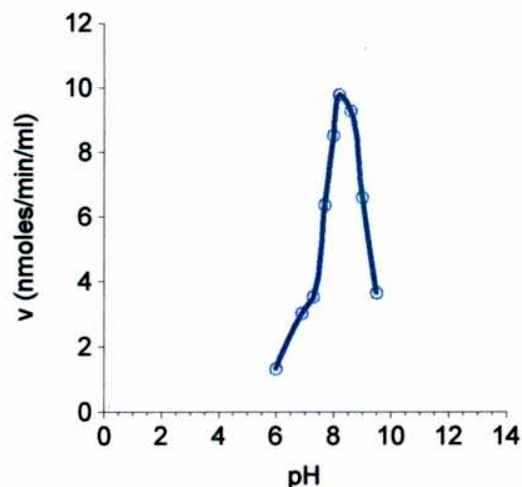


FIGURA 62: Variación de la actividad enzimática de la SHMT de *T.cruzi* con el pH. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las descritas en la FIGURA 41.

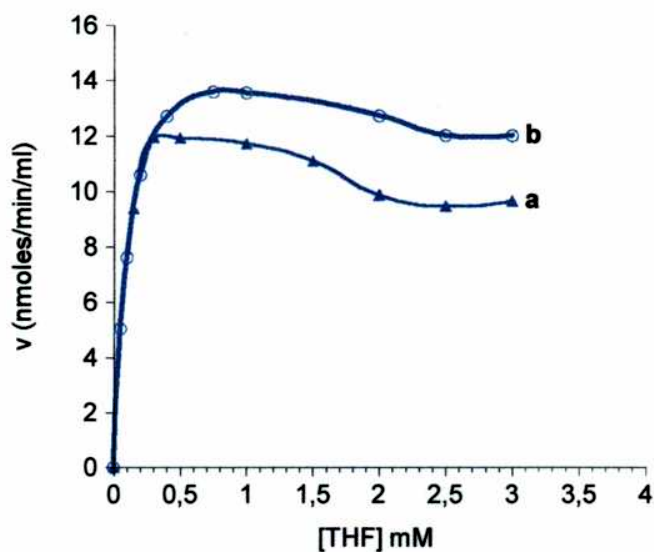
3.4.2. Parámetros cinéticos para el THF y L-serina

Los parámetros cinéticos de la enzima del parásito, K_M y $V_{m\acute{a}x}$, fueron estudiados en el pH óptimo de reacción y a menos que se indique lo contrario, en presencia de concentraciones saturantes de los otros sustratos de la reacción.

Como se puede observar en la FIGURA 63 A, la enzima exhibió un comportamiento michaeliano en relación al THF. Utilizando una concentración no saturante de L-serina de 0,5 mM, la enzima presentó inhibición por exceso de sustrato a concentraciones mayores de 0,5 mM (curva a). A concentraciones mayores de L-serina (2 mM), el THF también inhibió a la SHMT, pero menos marcadamente y a concentraciones mayores de 1 mM (curva b). De la representación doble recíproca (FIGURA 63 B) se calcularon valores para el K_M y la $V_{m\acute{a}x}$ de 0,11 mM y 2,66 nmoles/min/mg respectivamente. El K_M para el THF, calculado a concentraciones no saturantes de L-serina (0,5 mM) fue de 0,15 mM.

A diferencia de lo que se observó con las isoformas de *C.fasciculata*, la SHMT de *T.cruzi* mostró una curva hiperbólica clásica de actividad en función de la concentración de L-serina. Como se indica en la FIGURA 64 A, la SHMT tendió a mostrar una actividad enzimática constante a concentraciones de L-serina mayores de 2 mM y a concentraciones de THF saturantes (1 mM). El K_M de la enzima del *T.cruzi* para la L-serina fue de 0,28 mM y la $V_{m\acute{a}x}$ de 2,78 nmoles/min/mg de proteína (FIGURA 64 B).

A



B

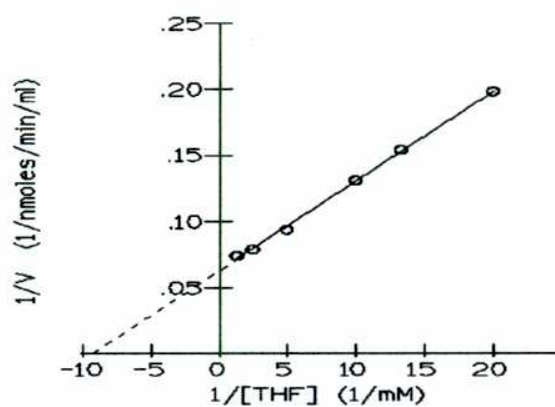
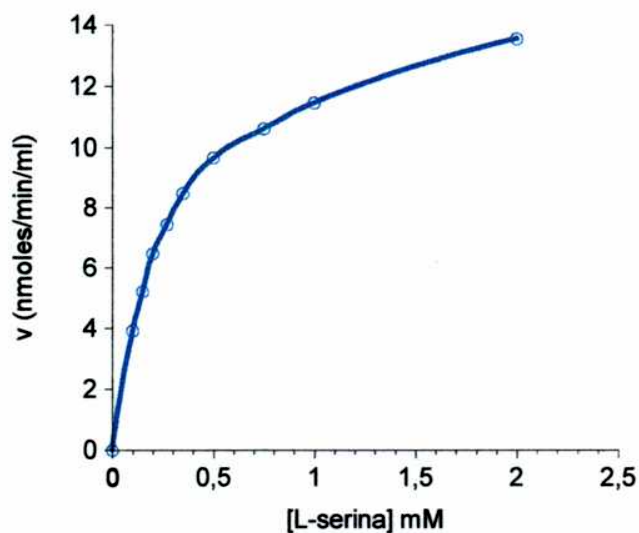


FIGURA 63 : Efecto de la concentración de THF sobre la actividad de la SHMT de *T.cruzi* . Los experimentos fueron realizados en presencia de concentraciones saturantes de L-serina y al pH óptimo de reacción. Se utilizaron 140 μ g de proteínas en cada reacción. A: Representación primaria, a : A concentración no saturante de L-serina (0,5 mM), b:A concentración saturante de L-serina (2 mM), B: Representación doble recíproca de Lineweaver y Burk $K_M = 0,11$ mM; $V_{m\acute{a}x} = 2,78$ nmoles/min/mg

A



B

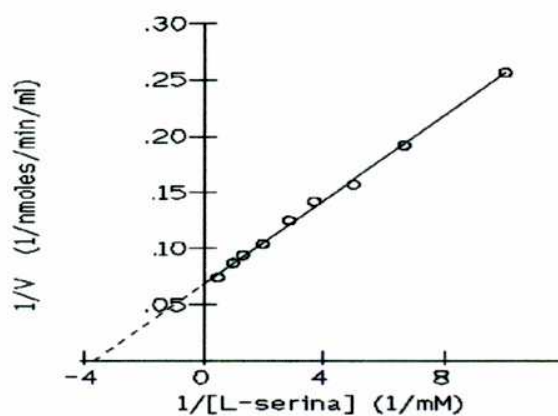


FIGURA 64: Efecto de la concentración de L-serina sobre la actividad de la SHMT de *T.cruzi*. Los experimentos fueron realizados en presencia de concentraciones saturantes de THF y al pH óptimo de reacción. Se utilizaron 160 μg de proteínas en cada reacción. A: Representación primaria, B: Representación doble recíproca de Lineweaver y Burk
 $K_M = 0,28 \text{ mM}$ $V_{m\acute{a}x} = 2,33 \text{ nmoles/min/mg}$

3.5. Dependencia de la SHMT de PLP

3.5.1. Efecto del sulfato de amonio, de la L-cisteína y del clorhidrato de hidroxilamina

Se estudió el efecto de estas sustancias sobre la SHMT de extractos crudos de *T.cruzi*. Los extractos crudos fueron preparados como se indicó en la sección 3.4., excepto que la solución de suspensión de los parásitos no contuvo PLP. En un experimento preliminar, al precipitar un extracto crudo con 80% de saturación en sulfato de amonio (ver Materiales y Métodos), se observó que quedó un 30% de actividad SHMT residual después del tratamiento (dato no mostrado), lo que indicó que la precipitación con sulfato de amonio no disoció totalmente al PLP de la enzima.

El PLP (1 mM) activa 7 veces a la enzima nativa en el extracto crudo (FIGURA 65, barra B). El tratamiento de la SHMT con L-cisteína 2 mM la inhibió un 60% (barra C) comparada con su respectivo control (barra A), mientras que con 5 mM del aminoácido la enzima fue inhibida un 100% (barra D). El agregado de PLP en exceso (en relación a la cantidad de L-cisteína) sobre la preparación tratada con L-cisteína 2 mM permitió recuperar a la actividad SHMT en un 80% (barra E) con respecto a su control (barra B), pero si la concentración de L-cisteína utilizada era de 5 mM, la recuperación de la actividad enzimática por agregado de un exceso de PLP (15 mM) no fue posible (barra F).

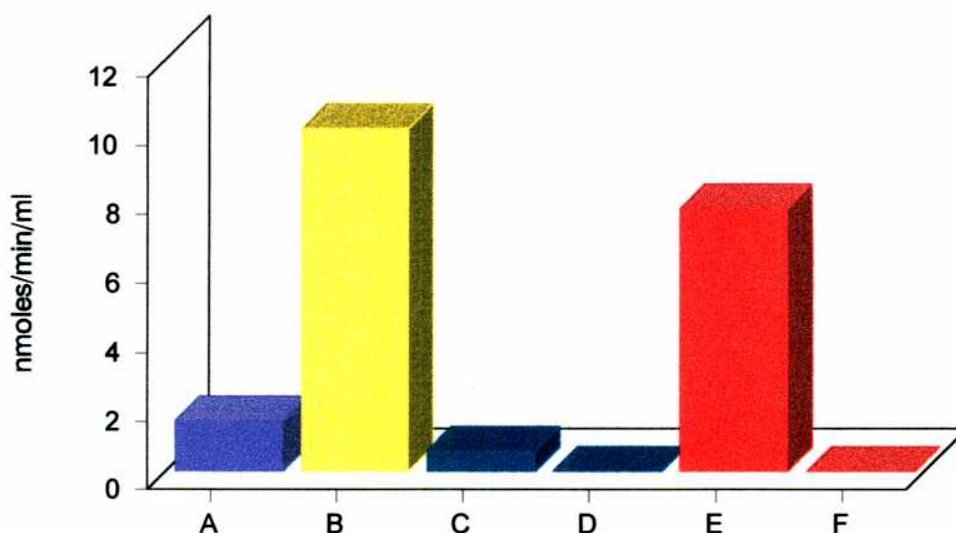


FIGURA 65: Efecto de la L-cisteína sobre la SHMT de extractos crudos de *T.cruzi*. Una preparación del parásito obtenida como se indicó en la sección 3.4., excepto que fue omitido el PLP en la solución, fue preincubada con L-cisteína 2 mM (C) o 5 mM (D) durante 60 min a 4 °C.

- (A) Control de la actividad enzimática antes del tratamiento con L-cisteína y en ausencia de PLP.
- (B) es como (A) pero se midió la actividad SHMT después de preincubar la mezcla en presencia de PLP 1 mM durante 10 min a 4°C.
- (C) actividad de la enzima tratada con L-cisteína 2 mM
- (D) es como (C) pero en presencia de L-cisteína 5 mM
- (E) es como (C), pero con una preincubación, posterior al tratamiento de L-cisteína, con PLP 5 mM durante 10 min a 4° C.
- (F) es como (D) pero con una preincubación, posterior al tratamiento con L-cisteína, con PLP 15 mM durante 10 min a 4° C .

El tratamiento de la SHMT de extractos crudos del parásito con clorhidrato de hidroxilamina 1 mM mostró una inhibición enzimática del 51% (FIGURA 66, barra C) con respecto al control (barra A), mientras que en presencia de 5 mM de la misma sustancia, la enzima fue inhibida un 100% (barras D). En este experimento, la activación de la enzima nativa por PLP (1 mM) fue también de 7 veces (barra B). El agregado de exceso de PLP sobre la preparación enzimática tratada con clorhidrato de hidroxilamina 1 mM, permitió recuperar a la actividad SHMT sólo en un 60% (barra E) en relación a su control (barra B), mientras que en las mismas condiciones pero con 5 mM del reactivo de grupos carbonilo, no fue posible una recuperación de la actividad enzimática (barra F). Esta serie de resultados mostrados en esta sección indican que la SHMT de *T. cruzi* es una enzima dependiente de PLP ya que fue activada siete veces por el agregado del cofactor y fue inhibida por la L-cisteína y por el clorhidrato de hidroxilamina y la acción de estos factores revertida por un exceso de PLP, cuando la concentración de las mismas fueron de 2 mM y 1 mM respectivamente.

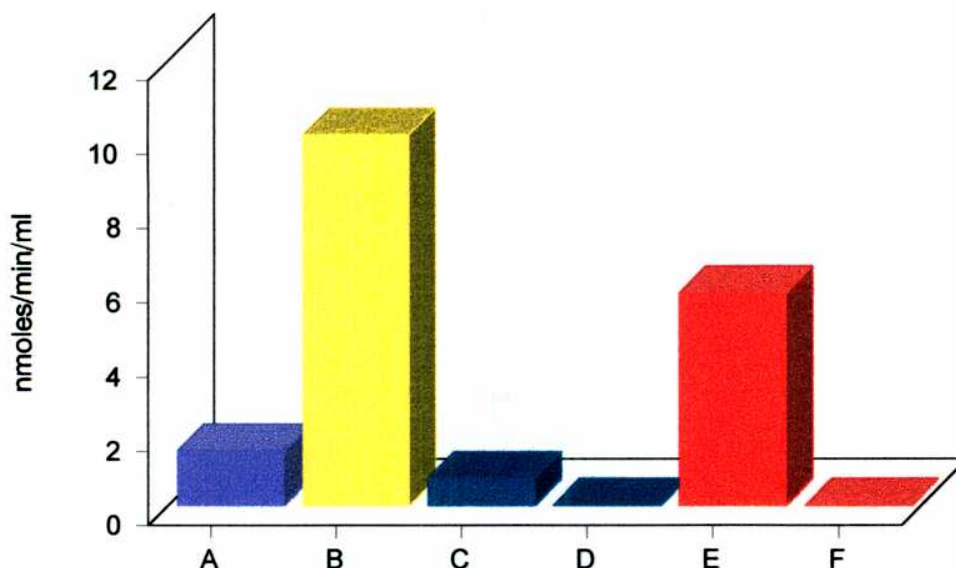


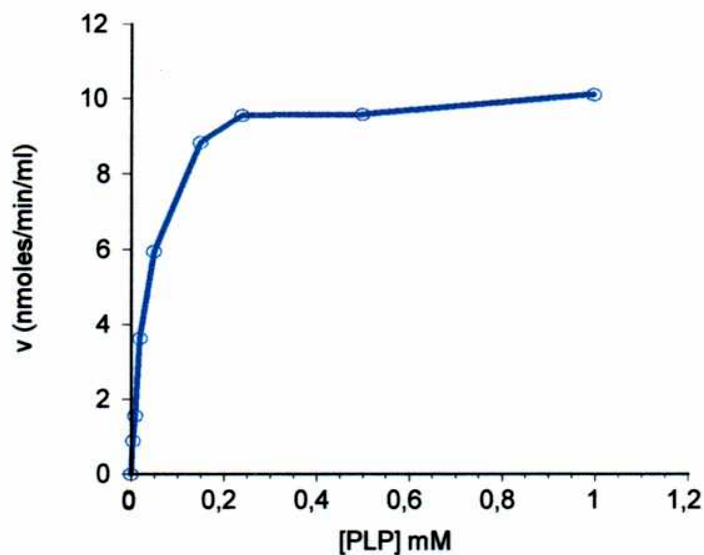
FIGURA 66: Efecto del clorhidrato de hidroxilamina sobre la SHMT de extractos crudos de *T. cruzi*. Una preparación del parásito obtenida como se indicó en la sección 3.4., excepto que fue omitido el PLP en la solución, fue preincubada con clorhidrato de hidroxilamina 1 mM (C) o 5 mM (D) durante 60 min a 4 °C.

- (A) Control de la actividad enzimática antes del tratamiento con clorhidrato de hidroxilamina y en ausencia de PLP.
- (B) es como (A) pero se midió la actividad SHMT después de preincubar la mezcla en presencia de PLP 1 mM durante 10 min a 4°C.
- (C) actividad de la enzima tratada con clorhidrato de hidroxilamina 1 mM.
- (D) es como (C) pero en presencia de clorhidrato de hidroxilamina 5 mM.
- (E) es como (C), pero con una preincubación, posterior al tratamiento con clorhidrato de hidroxilamina, con PLP 5 mM durante 10 min a 4° C.
- (F) es como (D) pero con una preincubación, posterior al tratamiento con clorhidrato de hidroxilamina, con PLP 15 mM durante 10 min a 4° C.

3.5.2. Parámetros cinéticos para el PLP

Para estudiar el efecto de la concentración del PLP sobre la actividad de la enzima, las preparaciones fueron hechas en ausencia del cofactor y los experimentos fueron realizados a concentraciones saturantes de los sustratos (THF 1 mM y L-serina 2 mM) y al pH óptimo de reacción (8,2). Si bien existe una pequeña, pero reproducible actividad SHMT en ausencia del cofactor (dato no mostrado), la enzima fue activada al aumentar las concentraciones del mismo. Como se observa en la FIGURA 67 A, la SHMT mostró un comportamiento hiperbólico, alcanzando saturación a concentraciones de PLP mayores de 0,2 mM. Mediante el gráfico de doble recíproca, fue calculado el K_M de la SHMT del *T.cruzi* para el PLP, que fue de 0,08 mM y la $V_{m\acute{a}x}$ fue de 2,66 nmoles/min/mg (FIGURA 67 B).

A



B

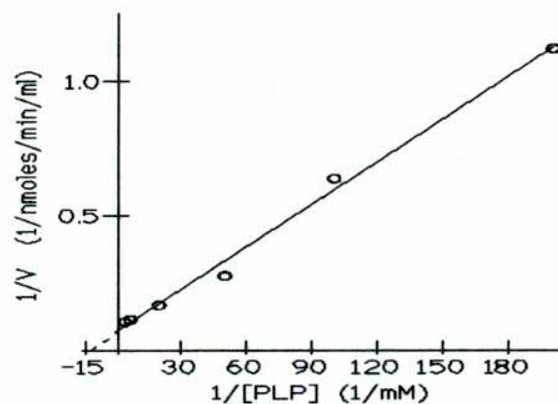


FIGURA 67: Efecto de la concentración del PLP sobre la actividad de la SHMT de *T.cruzi*. Los experimentos fueron realizados en presencia de concentraciones saturantes de THF, L-serina y al pH óptimo de reacción. Se utilizaron 140 μ g de proteínas en cada reacción. A: Representación primaria, B: Representación doble recíproca de Lineweaver y Burk $K_M = 0,08$ mM; $V_{m\acute{a}x} = 2,66$ nmoles/min/mg.

4. Presencia de un inhibidor endógeno de la SHMT en epimastigotes de *T.cruzi*

En extractos crudos, libres de células, provenientes de las diferentes cepas de *T.cruzi* (ver Materiales y Métodos) se midió la actividad SHMT bajo condiciones de ensayo standard (ver TABLA IV) y se las comparó con las correspondientes a hígado y riñón de rata. En todos los casos, las actividades específicas para las enzimas de tripanosomas variaron entre los valores extremos de 0,6 a 1,8 nmoles/min/mg de proteínas, considerablemente más bajos que los hallados para hígado y riñón de rata (6,3 y 3,9 nmoles/min/mg de proteína respectivamente). Por otra parte cuando se estudió la variación de la actividad SHMT en función de la cantidad de extracto enzimático en la mezcla de reacción utilizando preparaciones crudas, se obtuvo una respuesta no lineal (FIGURA 68), más marcada en cepas no virulentas (como por ejemplo la cepa Tul 0), que en las virulentas (como la cepa RA), efecto que desaparecía cuando la preparación se sometía a una purificación parcial (resultado no mostrado).

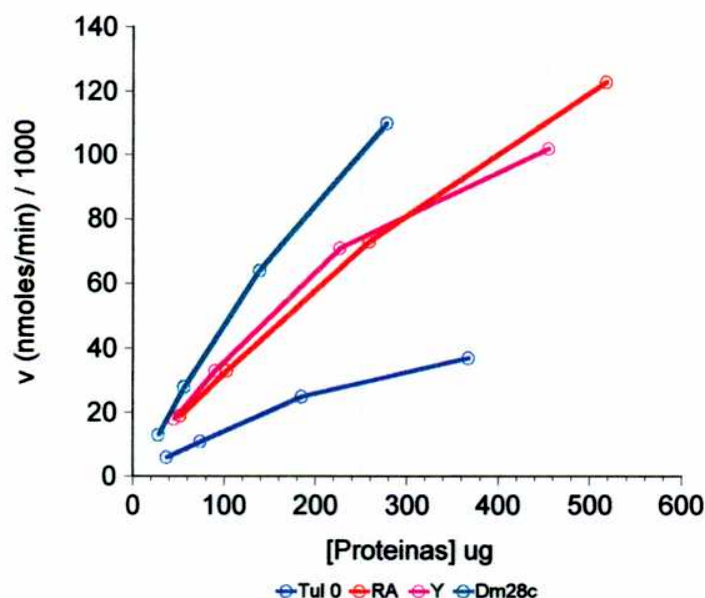


FIGURA 68: Ausencia de proporcionalidad entre la actividad SHMT de extractos crudos de *T. cruzi* y la cantidad de proteína presente en dichos extractos.

En este experimento se prepararon extractos crudos de la cepas Tul 0 (7,33 mg/ml), Dm28 5,53 mg/ml, Y (9,1 mg/ml) y RA (10,37 mg/ml), tal como se describe en Materiales y Métodos, y se midió la actividad SHMT de cada uno de ellos, a diferentes concentraciones de proteína.

Este comportamiento nos llevó a sospechar la presencia en los extractos crudos de los tripanosomas de un inhibidor endógeno de la enzima. En efecto, la preincubación de la SHMT de extractos crudos de hígado de rata, utilizadas como blanco del hipotético inhibidor, con extractos crudos del *T. cruzi* (cepa Tul 0), en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos, produjo una inhibición de las enzimas en aproximadamente 60-65%. Este efecto se observó en mayor o menor medida con todas las cepas de *T. cruzi* como se aprecia en la TABLA XI.

Cepa <i>T.cruzi</i>	Inhibición (%)
Tul 0	65
Tul 2	55
Dm28c	34
RA	14
CL	44
Y	44

TABLA XI: Efecto de los extractos crudos de epimastigotes de *T.cruzi* sobre la actividad SHMT de extractos crudos de hígado de rata.

Extractos crudos de hígado de rata fueron preincubados durante 5 min. a 4°C con extractos crudos de las cepas indicadas en la tabla (aprox. 300 µg de proteínas de cada extracto), para luego iniciar la reacción con el agregado de los sustratos de la enzima. El % de inhibición se determinó tomando como referencia la actividad SHMT residual de cada alícuota de los extractos crudos del parásito. Otros detalles experimentales se indican en Materiales y Métodos

4.1. Propiedades del inhibidor

Para realizar los primeros estudios del inhibidor fue purificada parcialmente la SHMT de hígado de rata la cual fue utilizada como su blanco, como se indicó anteriormente. La metodología aplicada para la purificación parcial de la enzima mencionada (descrita en Materiales y Métodos; FIGURA 12 y TABLA III), nos permitió obtener una preparación 9 veces más pura con un rendimiento cercano al 50%.

En la TABLA XII se muestra que el factor inhibitorio fue termoestable, ya que toleró un calentamiento a 100 °C durante 5 minutos. No fue dializable, a menos que sea calentado en las condiciones mencionadas, en cuyo caso se perdió un 50% de la actividad inhibitoria, la cual apareció concomitantemente en el líquido de diálisis. Estos resultados sugirieron que

el inhibidor se encontraba unido aparentemente a una proteína con alta afinidad y que se liberaba de la misma por calentamiento.

Al estudiar su termoestabilidad, se observó que al prolongar el tiempo de calentamiento hasta por lo menos 20 min, el inhibidor aumentó su actividad inhibitoria sobre la SHMT de hígado de rata, indicando que probablemente la liberación de la proteína era dependiente del tiempo de calentamiento. (FIGURA 69).

Por otra parte se obtuvo un espectro de absorción a pH 7, de una muestra proveniente de la cepa Tul 0, obtenida por precipitación con sulfato de amonio al 45% de saturación final, dializada exhaustivamente, calentada y centrifugada en las condiciones descritas anteriormente, y luego dializada por segunda vez de manera que el inhibidor pasara al líquido de diálisis. En dicho espectro la muestra conteniendo al inhibidor mostró dos máximos de absorbancia: uno a 200 nm, el mismo que el observado con el descrito en semillas de *V.radiata* (Vijaya y col., 1991) y otro a 260 nm (FIGURA 70). Como espectros parecidos son exhibidos por nucleótidos, se ensayaron algunos de ellos, tales como el AMP, ADP, ATP, NAD⁺ y NADP⁺, y con ninguno de ellos se obtuvo una inhibición sobre la SHMT de hígado de rata.

Tratamiento de la Fracción sobrenadante de Tul 0 de <i>T.cruzi</i> (8,5 mg/ml)	Inhibición de la SHMT (%)
Ninguno	58
Calentamiento a 100°C por 5 min*	61
Diálisis**	56
Calentamiento y luego diálisis***	
- Extracto dializado	30
- Líquido de diálisis	100

TABLA XII: Termoestabilidad y dializabilidad del inhibidor en epimastigotes de la cepa Tul 0 de *T.cruzi*. La actividad inhibitoria se midió sobre la SHMT parcialmente purificada de hígado de rata, utilizando la técnica descrita en Materiales y Métodos.

*La fracción ensayada fue calentada como se indica en el texto y luego fue sometida a tratamiento sónico y centrifugada. El sobrenadante resultante se utilizó como fuente de inhibidor.

**La diálisis se realizó contra 100 volúmenes de agua durante 2 horas.

***Luego de la diálisis, el extracto dializado y el líquido de diálisis fueron congelados a -20 °C. El líquido de diálisis fue concentrado por liofilización y el residuo fue suspendido en un volumen de agua equivalente al original de la muestra.

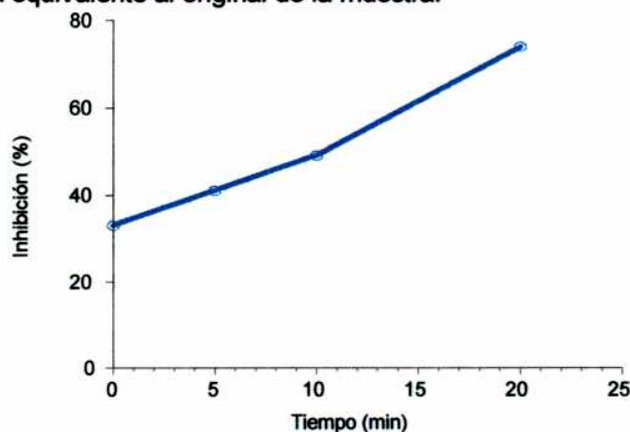


FIGURA 69: Liberación del inhibidor por calentamiento. El corte 45% de saturación en sulfato de amonio en amortiguador borato/bórico 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5 (15,37 mg/ml) fue calentado a ebullición a los tiempos indicados en la figura y cada muestra fue tratada como se describe en la TABLA XII. La actividad inhibitoria fue medida sobre la SHMT parcialmente purificada de hígado de rata, utilizando 65 µl de la solución de inhibidor obtenida.

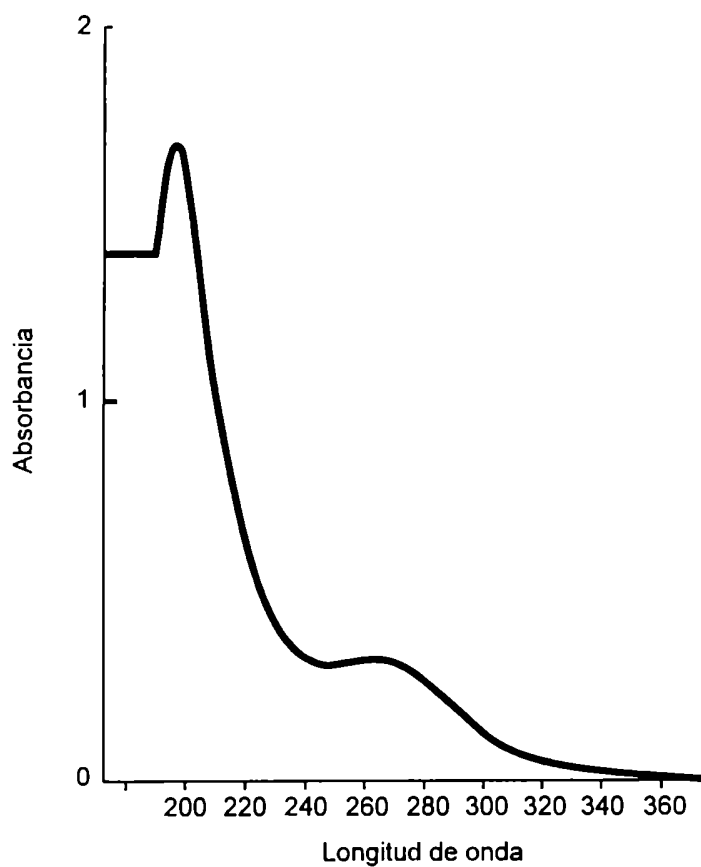


FIGURA 70: Espectro ultravioleta de absorción del inhibidor. Los detalles experimentales se describen en el texto.

4.2. Purificación parcial del inhibidor

En base a las propiedades del inhibidor, se ensayó su purificación por precipitación con 45% de saturación en sulfato de amonio de un extracto crudo del parásito (cepa Tul 0) y posterior cromatografía en Phenyl Sepharose. Como se observa en la FIGURA 71, en este último caso se adsorbió fuertemente a la matriz, ya que fue retenida en la columna la proteína que liga al inhibidor y recién pudo ser eluída con el agregado de 50% de etilenglicol en agua. Las fracciones de máxima actividad inhibitoria sobre la SHMT de hígado de rata fueron reunidas y utilizadas en los experimentos subsiguientes.

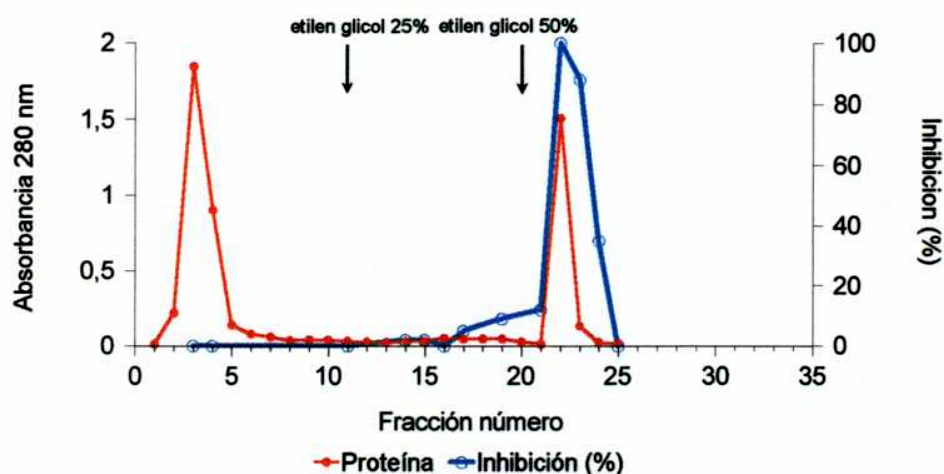


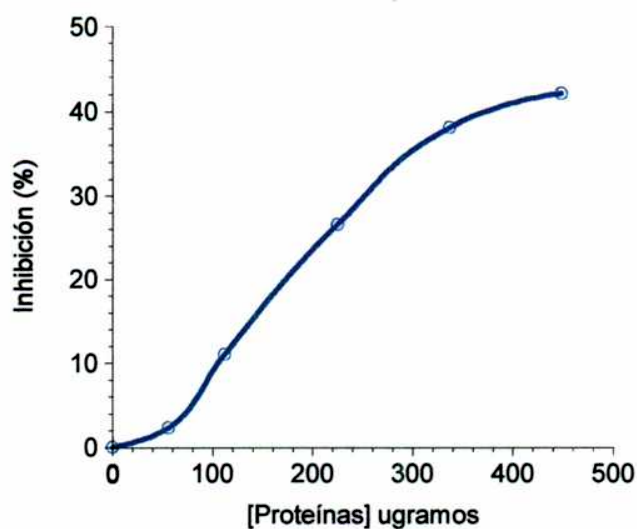
FIGURA 71: Cromatografía en columna de Phenyl Sepharose del inhibidor presente en *T. cruzi*.

1 ml (3,75 mg/ml de proteínas) proveniente de la precipitación de un extracto crudo con 45% de saturación en sulfato de amonio en amortiguador borato/bórico 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5 fue sembrado en una columna de Phenyl Sepharose (0.8 x 8.5 cm) equilibrada previamente con 100 mM fosfato, 0,1 mM EDTA, 2,5% sulfato de amonio, 10% etilen glicol, pH 7 y desarrollada por elución sucesiva con soluciones acuosas de etilen glicol 25 y 50%. Se colectaron fracciones de 1 ml. La presencia del inhibidor fue seguida por su actividad sobre la SHMT parcialmente purificada de hígado de rata y por la absorbancia a 280 nm. de la proteína a la cual se encuentra unida.

4.3. Estudios cinéticos del inhibidor

La preparación parcialmente purificada obtenida de la cromatografía en Phenyl Sepharose se concentró por liofilización y esta muestra fue ensayada para estudiar su comportamiento sobre las SHMT parcialmente purificada de hígado de rata y sobre un extracto crudo de la cepa RA de *T.cruzi*. La elección de la cepa RA fue debido a la baja concentración del inhibidor en dicha cepa (9-22% de inhibición sobre la SHMTs de hígado de rata). La respuesta de la SHMT de hígado de rata frente al inhibidor fue de tipo sigmoidea (FIGURA 72 A), con un coeficiente de Hill (n_H) de 1,5 ($n=3$). En cambio, la respuesta de la enzima del parásito fue de tipo hiperbólica (FIGURA 72 B), reflejando diferencias en las respuestas entre ambas enzimas.

A



B

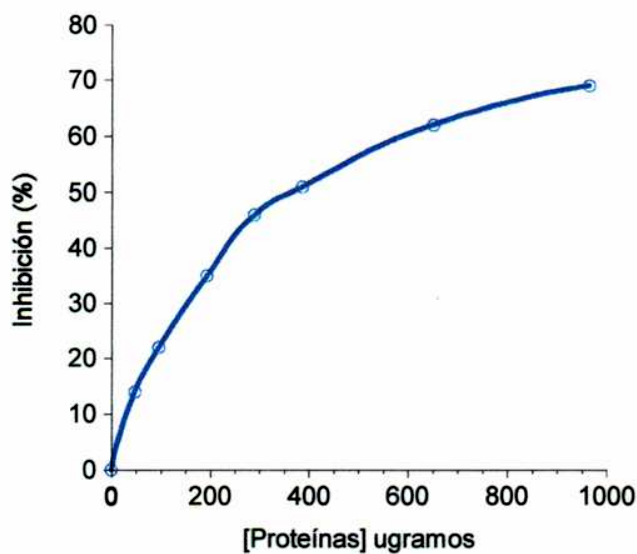


FIGURA 72: Efecto del inhibidor proveniente de la cepa Tul 0 de *T. cruzi* sobre la SHMT de hígado de rata (gráfico A) y sobre la SHMT de la cepa RA del mismo parásito (gráfico B). En ambos experimentos fueron utilizados volúmenes crecientes de inhibidor (2 mg/ml) frente a concentraciones constantes de preparaciones parcialmente purificadas de la SHMT de hígado de rata (5 μ g de proteína) o de la SHMT de extractos crudos de la cepa RA de *T. cruzi* (370 μ g de proteína).

DISCUSSION

Para corroborar la operatividad del metabolismo reductivo del CO₂ propuesto en *T.cruzi* (Frydman y col., 1990), se iniciaron estudios relacionados a una de las enzimas involucradas en la vía metabólica indicada en la FIGURA 11. La enzima, la SHMT, no sólo fue identificada en dicho parásito, sino también lo fue a partir de otro tripanosomátido relacionado, *C.fasciculata*.

El presente trabajo es el primero que informa la purificación a homogeneidad y caracterización cinética, físicoquímica y molecular de una SHMT a partir de un tripanosomátido. En particular, fueron aisladas tres isoformas de la enzima a partir de choanomastigotes de *C.fasciculata*, según fue demostrado por su separación cromatográfica en DEAE celulosa y confirmado por sus recromatografías a través de la misma resina y purificadas a homogeneidad de acuerdo a los resultados mostrados en el SDS-PAGE y por filtración en gel por Sephadex G200. En relación a esta última, al sembrar un extracto parcialmente purificado conteniendo a las tres isoformas de la enzima, pudo identificarse la presencia de tres máximos de actividad que coincidieron con el volumen de elución de cada una de las isoformas sembradas por separado en la misma columna y en idénticas condiciones. Estos resultados confirmaron la existencia de tres formas moleculares de la enzima en *C.fasciculata*. En eucariontes se ha demostrado la existencia de isoformas de la SHMT (ver Introducción), de diferente localización celular (mitocondrial, citosólica, cloroplastos e incluso nuclear) y de la misma localización celular, como las SHMTs de mitocondrias de *P.sativum* (Turner y col., 1992) y las SHMTs citosólicas de hígado de conejo (L.Schirch, 1984; Artigues y col., 1990).

Por otra parte fue parcialmente purificada y caracterizada la SHMT a partir de epimastigotes de *T.cruzi*. El resultado obtenido en la cromatografía en DEAE celulosa a partir de un extracto crudo del parásito sugirió la existencia de una sola forma de la enzima. La cromatografía en DEAE celulosa ha sido ampliamente utilizada como método para separar a las isoformas de la SHMT en diferentes organismos sin necesidad de aislar las organelas o compartimientos que las contienen (L.Schirch y Peterson, 1980; Ogawa y Fujioka, 1981; Sakamoto y col., 1991; Turner y col., 1992). Estos antecedentes y los resultados mostrados en esta Tesis, sugieren la existencia de una sola forma molecular de la SHMT en el parásito, aunque la elevada inestabilidad que exhibe y el bajo rendimiento obtenido luego de la cromatografía (30% contra 85% de rendimiento en el caso de *C.fasciculata*) hace posible la existencia de alguna otra isoforma que se inactive por completo durante la separación cromatográfica y que nos impide detectarla adecuadamente.

Notables diferencias fueron observadas entre las SHMTs de extractos crudos de *C.fasciculata* y de *T.cruzi*. En primer lugar, la SHMT de *T.cruzi*, tanto en extractos crudos como parcialmente purificados, fue altamente inestable perdiéndose en algunos casos hasta un 90% de la actividad enzimática de los extractos crudos en 24 horas a 4°C. Contrariamente, la SHMT de *C.fasciculata* (sin discriminar a las isoformas) sólo perdió menos del 20% en las mismas condiciones experimentales. Existen numerosos antecedentes de SHMTs altamente inestables, que impidieron ser purificadas, como ocurrió con la enzima de *L.minor*, la cual perdió un 70% de su actividad a las 5 horas de la preparación de la muestra a 4°C (Wong y

Cossins, 1976). La SHMT (forma succinato dependiente) de *M.organophilum* perdió un 80% de actividad a las 12 horas de preparado el extracto crudo a 4 °C, mientras que la enzima de la misma fuente, forma metanol dependiente, fue totalmente estable en las mismas condiciones experimentales (O'Connor y Hanson, 1975). En el caso de la enzima del protozooario *P.chabaudi*, la misma sólo pudo ser purificada 35 veces con 14% de rendimiento debido a su alta inestabilidad, especialmente cuando se encontraba parcialmente purificada (Ruenwongsa y col., 1989). También fue informado que la SHMT de hígado porcino fue altamente inestable tanto a 4°C como a -90°C (Braman y col., 1981).

La presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas compuesto por E-64, pepstatina A, PMSF, TLCK y EDTA en un extracto crudo de *T.cruzi*, incrementó la estabilidad de la enzima a 4 °C, ya que en 24 horas perdió menos del 20% de la actividad original en esas condiciones, comparada con el 90% de la pérdida de la actividad en ausencia de dichos inhibidores y en las mismas condiciones experimentales, indicando que la enzima puede ser sustrato de alguna/s proteasa/s del parásito. Dicha inhibición fue reversible, ya que la diálisis eliminó el efecto protector de los inhibidores de las proteasas y la enzima se inactivó por completo. Sabiendo que la mayor parte de los inhibidores de proteasas utilizados tienen acción irreversible, a excepción del EDTA y no sabemos cual de ellos es el responsable del fenómeno observado, será necesario trabajar más detenidamente sobre ello, ya que de acuerdo a lo expuesto, la reversibilidad observada no es fácilmente explicable.

La inestabilidad de la SHMT de *T.cruzi*, como también de cada una de las isoformas de la SHMT purificadas de *C.fasciculata* que exhibieron durante los procesos de diálisis fue otro factor limitante para encarar sus estudios. La SHMT de extractos crudos de *T.cruzi* fue inactivada entre un 70-80% cuando fue sometida a diálisis durante 18 hs contra fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PLP 0,02 mM, pH 6,8. Las isoformas de *C.fasciculata* (altamente purificadas) fueron también inestables durante la diálisis, perdiendo hasta un 80% de su actividad luego de 4 hs de diálisis contra fosfato 10 mM, EDTA 1 mM y β -mercaptoetanol 1 mM, pH 6,8. La presencia de BSA 1 mg/ml protegió parcialmente a las isoformas de la inactivación por la diálisis (se inactivaron entre un 40-55% en las mismas condiciones experimentales) y fue utilizada esta protección parcial para los experimentos de dependencia de las isoformas de *C.fasciculata* de PLP. Existen trabajos que informan la sensibilidad de la SHMT a la diálisis, provenientes de otras fuentes. La enzima de *P.lophurae* perdió hasta un 50% de la actividad en esas condiciones (Platzer y Campuzano, 1976). La SHMT de *S.oleracea* fue inestable luego de la diálisis, ya que perdió un 35% de la actividad luego de 24 horas (Henricson y Ericson, 1988).

El DTT (1 mM) y el β -mercaptoetanol (9 mM) prácticamente no protegieron a las enzimas en estudio presentes en extractos crudos, contrariamente a lo informado con la SHMT de hojas de espinaca, la cual fue totalmente estable a 4°C en presencia de estos reactivos de grupos sulfidrilos (Woo, 1979).

De acuerdo a lo consignado en las tablas de purificación respectivas, las isoformas de *C.fasciculata* fueron purificadas 399 (SHMT I), 157 (SHMT II) y 665 veces (SHMT III) con rendimientos del 16, 7 y 7% respectivamente. Sin embargo, cabe aclarar que estos valores fueron calculados considerando a la suma de actividades de las tres isoformas de la enzima presentes en el extracto crudo, libre de células, del parásito como referencia. Mediante cromatografía en DEAE celulosa de dicho extracto crudo se logró separar a las tres isoformas, como se mencionó antes, y se pudo en esa forma determinar el porcentaje de cada una de ellas en dicho extracto. La SHMT I fue la enzima mayoritaria, ya que representó el 55% del total de enzima presente, mientras que las SHMT II y III correspondieron al 12,5 y 32,5% respectivamente. Con estos porcentajes se pudo calcular la actividad real de cada una de las isoformas presentes en el extracto crudo y calcular el grado de purificación y rendimiento reales obtenidos en cada caso, que fueron de: 724 veces con 29% de rendimiento para la SHMT I, 1258 veces con 57% de rendimiento para la SHMT II y 2044 veces con 21% de rendimiento para la SHMT III. Cabe aclarar que para la purificación conjunta de las SHMTs I y III, se partió de 28 gramos de células (peso húmedo), mientras que para la purificación de la SHMT II se necesitaron 55 gramos de células (peso húmedo), con lo cual estos cálculos se realizaron a partir de dos preparaciones independientes, no así el porcentaje de cada isoforma en el extracto crudo, el cual se calculó a partir de una misma preparación. De todas maneras la riqueza relativa de cada una de las isoformas en los extractos crudos del parásito fue similar en ambas preparaciones. Si tenemos en cuenta que el método de obtención de los extractos crudos es un método muy drástico, que permite la extracción de un

elevado porcentaje de todas las enzimas presentes en los choanomastigotes de *C.fasciculata*, aún de las presentes en glicosomas y si además aceptamos que las tres isoformas se extraen en la misma proporción, se podría decir que los porcentajes indicados son un reflejo muy cercano al real de la riqueza relativa del parásito en las tres isoformas. En cambio, al haber detectado una sola forma de la enzima en el *T.cruzi* empleando el mismo procedimiento, el grado de purificación real fue el calculado experimentalmente, es decir sólo de 13 veces con 36% de rendimiento.

Los pesos moleculares de cada una de las isoformas de la SHMT de *C.fasciculata*, determinadas por el método de Andrews, y de sus subunidades correspondientes determinadas por SDS-PAGE, demostraron que las tres isoformas presentan una estructura cuaternaria tetramérica de subunidades de idéntico peso molecular. La SHMT I fue la de mayor masa molecular, con 226 kDa conteniendo 4 subunidades de 54 kDa cada una; la SHMT II presentó un peso molecular de 173, con 4 subunidades de aproximadamente 51 kDa cada una; la SHMT III tuvo un peso molecular de 211 y compuesta de 4 subunidades de 52 kDa cada una. Los pesos moleculares de cada isoforma fueron confirmadas con otro método (ecuación de Svedberg) calculándose en ese caso pesos moleculares de 190, 171 y 186 kDa para las SHMTs I, II y III respectivamente. Estos valores son aproximados a los calculados por el método de Andrews. Estos resultados coincidieron con los pesos moleculares de todas las SHMTs eucariontes estudiadas (ver TABLA II, Introducción).

En cambio el peso molecular de la SHMT nativa de *T.cruzi* fue de 69 kDa. Este valor es sorprendente teniendo en cuenta las semejanzas metabólicas con *C.fasciculata*. Sin embargo, fue informado que la SHMT del protozoario *P.lophurae* presentó un peso molecular de 68 (Platzer y Campuzano, 1976), muy aproximado al calculado para la enzima de *T.cruzi*. También fue determinado el peso molecular de la SHMT de otro protozoario, *P.chabaudi*, cuyo valor fue de 250 kDa (Ruenwongsa y col., 1989). Sin embargo los autores de este trabajo aclararon que probablemente el valor calculado no sea el real, sino el correspondiente a un estado de agregación de la enzima (Ruenwongsa y col., 1989). También fue determinado el peso molecular de la SHMT del protozoario fotosintético *E.gracilis* Z, el cual fue de 90 kDa, con dos subunidades de 45 kDa cada una (Sakamoto y col., 1991). Esta limitada pero valiosa información, sugiere que el peso molecular de la enzima de *T.cruzi* es el correcto y la diferencia con el resto de los eucariontes la hace atractiva para estudios comparativos.

Los radios de Stokes de las isoformas de la SHMT de *C.fasciculata* fueron de 50,1 Å (SHMT I), 46,3 Å (SHMT II) y 49,1 Å (SHMT III), mientras que el radio de Stokes de la enzima de *T.cruzi* fue de 35,5 Å. El único radio de Stokes determinado a partir de enzima aislada de otra fuente, fue en el caso de la enzima de hígado de mono, cuyo valor fue de 40 Å (Ramesh y N.A.Rao, 1980).

Los $D_{20,w}$ de las isoformas de *C.fasciculata* fueron de $4,1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\text{seg}^{-1}$ (SHMT I), $4,7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\text{seg}^{-1}$ (SHMT II) y $4,2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\text{seg}^{-1}$ (SHMT III), mientras que el correspondiente a *T.cruzi* fue de $5,5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\text{seg}^{-1}$. El único $D_{20,w}$ informado en la literatura para una SHMT es el correspondiente a

H.methylovorum, cuyo valor fue de $3,7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\text{seg}^{-1}$ (Miyasaki y col., 1987).

Los $S_{20,w}$ para las SHMTs I, II y III de *C.fasciculata* fueron de 8,82, 8,65 y 8,94 S respectivamente, en presencia de PLP. Estos datos coinciden con los hallados para otras SHMTs eucariontes: la enzima mitocondrial de hígado de rata presentó un $S_{20,w}$ de 8,5 y la citosólica fue de 8,8 S (Fujioka, 1969); la SHMT de hígado de cordero tuvo un valor de 9 S (Ulevitch y Kallen, 1977); la enzima de hígado de mono presentó un valor de 8,9 S (Ramesh y N.A.Rao, 1980) y el $S_{20,w}$ de la SHMT de hígado de oveja fue de 8.7 S (Brahatheeswaran y col., 1996).

Cuando la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa fue realizada en ausencia de PLP, los valores obtenidos para el $S_{20,w}$ fueron de 6.14, 6.70 y 8.86 S para las SHMTs I, II y III respectivamente. Este resultado no es para nada llamativo, ya que la centrifugación en gradiente de sacarosa realizado con la SHMTc de hígado de oveja y en ausencia de PLP, mostró también una variación en la sedimentación de la enzima, cambiando el $S_{20,w}$ de 8.7 S a 5.7 S (Brahatheeswaran y col., 1996), similar a los cambios vistos para las SHMTs I y II. Los autores postularon que estos cambios se deberían a que el PLP mantiene la integridad estructural de la enzima, previniendo la disociación de la SHMT en dímeros. En otras palabras, la apoenzima de hígado de oveja tiene tendencia a disociarse de tetrámero a dímero, mientras que el PLP unido a la enzima (holoenzima) lo previene.

Probablemente esto sucedió con las SHMTs I y II. Sin embargo, esto no ocurrió con la SHMT III, la cual en ausencia de PLP, mantuvo el mismo

comportamiento en el gradiente, lo que indicaría que el PLP se encuentra unido con alta afinidad a la enzima. Sin embargo, debemos consignar que estos datos e interpretación de los mismos están en contradicción con los resultados incluidos en las secciones 2.8.2. y 2.8.3., en las cuales se demuestra que las SHMTs I y II nativas altamente purificadas son poco activables por el PLP lo que indicaría que prevalece la forma holoenzima sobre la apoenzima en esas preparaciones, mientras que con la SHMT III ocurre lo contrario. Estas contradicciones desaparecerían si postulamos que en el caso de la SHMT III, el PLP no es necesario para mantener la integridad del oligómero y por lo tanto no es disociable durante la ultracentrifugación en ausencia del cofactor.

Estos resultados se correlacionan bien con los obtenidos por el tratamiento con L-cisteína 2 mM. La L-cisteína forma un complejo tiazolidina con el PLP, disociando a este de la enzima (L.Schirch, 1982). Esta reacción convierte a la holoenzima en apoenzima, la cual es inactiva en ausencia de PLP. El tratamiento de las SHMTs I y II de *C.fasciculata* con L-cisteína las inactivó entre un 80-90%, mientras que la SHMT III fue totalmente insensible al tratamiento, debido a que en este caso prevalece la forma apoenzima y el PLP remanente de la holoenzima presente podría ser poco accesible a la L-cisteína. El tratamiento con clorhidrato de hidroxilamina, un reactivo de grupos carbonilo que disocia muy eficientemente al PLP de las enzimas dependientes del cofactor, permitió corroborar estos resultados. La SHMT III (como también las SHMTs I y II) fue inactivada totalmente luego de la preincubación con clorhidrato de hidroxilamina 1 mM durante 1 hora a 4°C y pudo recuperar su actividad en un 70% por el agregado de exceso de PLP,

lo que indicó que la enzima fue dependiente de cofactor. Por otra parte, el tratamiento de las isoformas en extractos parcialmente purificados, con 80% de saturación final en sulfato de amonio confirmó los resultados observados. Las tres isoformas de *C.fasciculata* perdieron al PLP en esas condiciones, y por lo tanto fueron totalmente inactivadas por el tratamiento.

Los resultados obtenidos con el tratamiento de L-cisteína, con clorhidrato de hidroxilamina, gradientes de sacarosa y precipitación con sulfato de amonio permitieron concluir que las tres isoformas de la SHMT de *C.fasciculata* fueron dependientes de PLP.

En relación a *T.cruzi*, la SHMT de extractos crudos del parásito fue inhibida un 60% por L-cisteína 2 mM, pero inactivada 100% aumentando la concentración del aminoácido a 5 mM. El agregado de PLP en exceso permitió recuperar un 80% de la actividad a la SHMT tratada con 2 mM de L-cisteína, pero la actividad de la enzima no pudo ser recuperada por el agregado de PLP en exceso cuando la misma fue incubada con 5 mM de L-cisteína.

Similares resultados se obtuvieron cuando se trató a la enzima con clorhidrato de hidroxilamina 1 mM (50% de inhibición) y 5 mM (100% de inhibición). Si se trataba con 1 mM, el agregado de exceso de PLP permitió reconstituir a la enzima en un 60%, pero la presencia de 5 mM de clorhidrato de hidroxilamina en la preparación enzimática con el agregado de PLP 15 mM, impidió la recuperación de la actividad SHMT en los extractos crudos del parásito.

Se han publicado resultados análogos a los observados con la SHMT de *T.cruzi*. La SHMT de *V.radiata* fue inhibida un 70% por clorhidrato de hidroxilamina 1 mM, pero fue totalmente inactivada en presencia de 10 mM del inhibidor (Sukanya y col., 1991). La SHMT de *H.methylovorum* fue inhibida un 100% por este compuesto a una concentración de 0,1 mM y reconstituida un 70% respecto al control por el agregado de PLP 0,1 mM, mientras que el tratamiento con 1 mM de clorhidrato de hidroxilamina también la inhibió un 100%, pero no pudo ser reconstituida por el agregado de PLP 0,1 mM (Miyasaki y col., 1987). Por lo tanto, podemos concluir que la SHMT del *T.cruzi* también es una enzima dependiente de PLP. Si bien existen numerosos trabajos en los que se demuestra la dependencia de la SHMT por el PLP (Hoyt y col., 1986; Miyasaki y col., 1987; Sakamoto y col., 1991; Sukanya y col., 1991; Kruschwitz y col., 1994 y 1995; Brahatheeswaran y col., 1996), ha sido también informado que las enzimas de *L.minor* (Wong y Cossins, 1976), *A.aegypti* (Jaffe y Chrin, 1978), espinaca (Woo, 1979) y *V.radiata* (Sukanya y col., 1991) fueron aparentemente independientes de PLP.

Se midieron las constantes de afinidad de las SHMTs de *C.fasciculata* y *T.cruzi* por el PLP. Los K_{Ms} de las SHMTs I, II y III de *C.fasciculata* para el cofactor fueron de 0,008, 0,02 y 0,024 mM respectivamente. El K_M de la SHMT de extractos crudos de *T.cruzi* para el PLP fue de 0,08 mM. Estos valores fueron del mismo orden que el informado para las SHMTs de *M.organophilum*, formas metanol y succinato dependiente (O'Connor y Hanson, 1975) que fue de 0,02 mM, pero más bajos que los informados para las SHMTc y SHMTm de *S.cerevisiae* (Zelikson y Luzzati, 1976) y la de

P.chabaudi (Ruenwongsa y col., 1989) en cuyo caso los valores respectivos fueron 0,15, 0,18 y 0,15 mM.

Los pH óptimos de reacción de las isoformas de la SHMT de *C.fasciculata* fueron de 8,2-8,4. El pH óptimo de la enzima de *T.cruzi*, medida en extractos crudos fue también del mismo orden, de 8,2. Existen numerosos trabajos que indican un pH óptimo similar al determinado en este trabajo: la SHMTm de *G.max* (Mitchell y col., 1986), de *S.oleracea* (Hericson y Ericson, 1988), la enzima de la fracción soluble de *V.radiata* (D.N.Rao y N.A.Rao, 1982), las isoformas citosólica y mitocondrial de *S.cerevisiae* (Zelikson y Luzzati, 1976) y la SHMT de *P.chabaudi* presentaron un pH óptimo de reacción de 8,5.

Al estudiar la afinidad de las isoformas de la SHMT de *C.fasciculata* por la L-serina, a concentraciones saturantes de THF, se observó una curva hiperbólica bifásica con una meseta acentuada para el caso de las SHMTs I y III, y menos acentuada para el caso de la SHMT II, pero cuya bifasidad se hizo evidente al aplicar la representación gráfica de Lineweaver-Burk. Los K_{Ms} de las SHMTs de *C.fasciculata* para la L-serina fueron de: 0,57 y 0,21 mM (SHMT I); 0,22 y 0,29 mM (SHMT II) y 0,15 y 0,68 mM (SHMT III). Curvas bifásicas del mismo tipo fueron descriptas en *V.radiata* con K_{Ms} de 1,25 y 68 mM (D.N. Rao y N.A. Rao, 1982) y en *G.max* con K_{Ms} de 1,5 y 40 mM (Mitchell y col., 1986). Los resultados obtenidos con las isoformas de *C.fasciculata* pueden indicar la existencia de dos sitios de unión, de similares afinidades para el sustrato L-serina, pero que uno se satura a bajas concentraciones del sustrato y otro se satura a altas concentraciones del mismo.

La existencia de curvas de saturación bifásicas pueden ser explicadas, según D.N.Rao y N.A.Rao (1982), por los siguientes mecanismos:

- (a) heterogeneidad de sitios activos
- (b) comportamientos histeréticos
- (c) acoplamientos entre sitios activos sobre diferentes cadenas polipeptídicas
- (d) acoplamientos entre el sitio efector y el sitio activo.

También este comportamiento sería posible en el caso de realizar estos experimentos con una mezcla de isoformas con distintas características cinéticas. Sin embargo, en nuestro caso, la aparición de bandas únicas en el SDS-PAGE y el perfil de elución de las isoformas en la filtración molecular por Sephadex G200 descartaron esa posibilidad.

El K_M aparente de la SHMT de extractos crudos de *T.cruzi* para la L-serina fue de 0,28 mM, aproximado al calculado por Nosei y Avila (1985) para extractos crudos del mismo parásito (0,4 mM) y de *Leishmania spp* (0,15 mM), y también similares a los calculados en extractos de *S.cerevisiae* (0,7 mM para la SHMTm y 0,65 mM para la SHMTc) (Zelikson y Luzzati, 1976).

Los análisis cinéticos demostraron que a concentraciones no saturantes de L-serina (0,5 mM), las SHMT I y III de *C.fasciculata* fueron inhibidas, con diferente grado, por exceso del otro de los sustratos de la reacción, el THF. En contraposición, la SHMT II no fue inhibida por el THF

en las mismas condiciones experimentales. Dicha inhibición por exceso de THF fue eliminada cuando las SHMTs I y III fueron incubadas con concentraciones mayores de L-serina (2 mM).

Los K_{Ms} para el THF fueron de 0,19, 0,31 y 0,2 mM para las SHMTs I, II y III respectivamente, siendo mayores a los hallados en *E.coli* (0,08 mM; V.Schirch y col., 1985), con la SHMTc de *N.crassa* (0,03 mM; Kruschwitz y col., 1994), las enzimas de *B.pahangi* y *D.immitis* (0,04 mM; Jaffe y Chrin, 1980), en plantas como las SHMTm y la presente en cloroplastos de *S.oleracea* (0,038 mM y 0,046 mM respectivamente; Besson y col., 1995), en mamíferos como la enzima mitocondrial de hígado de conejo (0,045 mM; L.Schirch y Peterson, 1980) o la citosólica recombinante de hígado humano (0,04 mM; Kruschwitz y col., 1995) pero menores o similares a los K_{Ms} calculados para las SHMTs de los protozoarios tales como *P.chabaudi* (2,91 mM; Ruenwongsa y col., 1989), *P.lophurae* (0,25 mM; Platzer y Campuzano, 1976), de plantas tales como *G.max* (0,25 mM; Mitchell y col., 1986), *V.radiata* (0,98 mM; D.N.Rao y N.A.Rao, 1982) y de mamíferos como el K_M de la SHMT de riñón de cerdo (1,7 mM; Harish Kumar y col., 1976).

En cambio el K_M de la SHMT de extractos crudos de *T.cruzi* por el THF fue de 0,11 mM, tres veces menor al calculado por Nosei y Avila en extractos del mismo parásito (0,30 mM) y seis veces menor al calculado en extractos de *Leishmania spp* (0,60 mM)(Nosei y Avila, 1985). Los K_{Ms} calculados en extractos crudos de otros organismos son mayores: 0,2 mM en *A.aegypti* (Jaffe y Chrin, 1978), 3 mM para la SHMTm de *S.cerevisiae* y 0,15 mM para la SHMTc del mismo organismo.

Los análisis de los espectros de absorción de las SHMTs I y II de *C.fasciculata* (holoenzimas) indicaron que las mismas presentaron espectros similares, con dos máximos: uno a aproximadamente 280 nm y otro a 403 nm, a pH 6,8, mientras que la SHMT III presentó un máximo aproximadamente a 250 nm y otro a 403 nm. La absorbancia a 403 nm es característica del PLP unido como una aldimina interna a un residuo de lisina en el sitio activo de la enzima. Las relaciones $A_{278}:A_{403}$ fueron de 4,3 y 4,7 para las SHMTs I y II respectivamente. En cambio el espectro de la SHMT III del mismo parásito fue ligeramente diferente, con una relación $A_{278}:A_{403}$ de 3. En otros organismos, el máximo de absorbancia generado por la unión del PLP con la enzima varía de 400 a 440 nm, y usualmente se mide la absorbancia a 428 nm a pHs entre 6,5 y 7,5. Al calcular la relación $A_{278}:A_{428}$ a pH 6,8, los valores fueron los siguientes: 9,7 (SHMT I), 8,1 (SHMT II) y 8,3 (SHMT III).

En bacterias como *H.methylovorum*, la relación $A_{280}:A_{415}$ a pH 7,3 resultó ser igual a 4,6 (Miyasaki y col, 1987), mientras que la relación $A_{278}:A_{428}$ resultó ser 6,8 para la SHMTc de *N.crassa* (Kruschwitz y col., 1994); la misma relación para las SHMTc y SHMTm de hígado de rata fueron 7,5 y 8 respectivamente (Masuda y col., 1987); la correspondiente para las isoformas citosólica y mitocondrial de hígado de conejo fueron de 8,9 y 6,3 respectivamente (Fujioka, 1968); la relación $A_{280}:A_{425}$ para la forma soluble de la SHMT de hígado de carnero fue de 9,3 (Ulevitch y Kallen, 1977) y para la SHMT recombinante de hígado humana, la relación $A_{278}:A_{428}$ fue de 6,2 (Kruschwitz y col, 1995). Por lo tanto, los valores obtenidos en este

trabajo, coinciden mayormente con aquellos publicados para SHMTs de otras fuentes.

La secuencia de los primeros 33 aminoácidos de la región amino terminal de las SHMT I y SHMT II de *C.fasciculata* indicó un 100% de homología entre ellas. El bloqueo de la región amino terminal de la SHMT III impidió su secuenciación, aún con tratamientos previos para desbloqueo de grupos acetilo. Las 18 SHMTs secuenciadas al día de hoy, indican que si bien hay un 20% de identidad entre las proteínas (procariontes y eucariontes) y aproximadamente un 40% de identidad entre las secuencias eucariontes publicadas, no existen secuencias conservadas en la región amino terminal de dichas proteínas (FIGURA 73). La región amino terminal de las SHMT I y II de *C.fasciculata* no presentó homología con las secuencias amino terminal de las SHMTs indicadas en la FIGURA 73 en los 33 aminoácidos secuenciados, lo que significa que probablemente la regiones amino terminales secuenciadas de las SHMT I y II estén más alejadas de la zona conservada que los amino terminales de las proteínas indicadas en la FIGURA 73. Tampoco hubo homología de secuencias de las SHMTs I y II con otras proteínas conocidas incluidas en el *GenBank*.

hSHMTc	MTMPVNGAHKDADLWSSHDK	MLAQPLKDSD--VEVYNI IKKE
cSHMTc	AT-AVNGAPRDAALWSSHEQ	MLAQPLKSDA--EVYDI IKKE
oSHMTc	AT-AVNGAPRDADLWSLHEK	MLAQPLKSDNDVEVYNI IK--
rSHMTI	M-----ADRDATLWASHEK	MLSQPLKSDA--EVYSI IKK-
rSHMTII	M-----ADRDATLWASHEK	MLSQPLKSDA--EVYSI IKK-
NcSHMTc	M-----STYSLSETHKA	MLS--LVESD--PQVAEIMKKE
ScSHMTc	M-----PY--TLSDAHHK	LITSHLVDTDPEVD--SI IKDE
hSHMTm	-A-AQTQTGEANRGWTGQE-	---S-L--SDSDPEMWELLQRE
cSHMTm	KA-AQTQTGEASRGWTGQE-	---S-L--SDTDPEMWELLQRE
PsSHMTm	SLP-DEAVYDKENPRVTWPK	QLNSPLEVI--DPEIADI IELE
ScSHMTm	MFPRASALAKCMATVHRRGL	---LTSGAQSLVSKPVSEGDPE
SotSHMT	MAMAAIALRRLSATVDKPVK	SLYNGGSLY YMSSLPNEAVYD-
EcSHMT	-MRMLK-----	----EMNIADYDAELWQAMEQE
StSHMT	---MLK--R-----	----EMNIADYDAELWQAMEQE
BjSHMT	-MTSAKTA-----SAPDS	FFTASLDQADP--EIAAAI KGE
CjSHMT	-M-----	----SLEMFDK--EIFDLTNKE
HmSHMT	-----MSSAPAAGTASTSR-	FFKSHVSETDPD--IFS AIQKE
MeSHMT	-----MS-AGTATD TDLDS	FFSAHLAETDPE--IAKAISQE

CfSHMTI	SGLNKVCSMEEAVSGMKDGIHVAFGGFGNAGVP
CfSHMTII	SGLNKVCSMEEAVSGMKDGIHVAFGGFGNAGVP

FIGURA 73: Comparación de los primeros 40 aminoácidos de la región amino terminal de las SHMTs procariontes y eucariontes.

Las secuencias alineadas son las siguientes SHMTs: citosólica (hSHMTc) y mitocondrial humana (hSHMTm) (Garrow y col., 1993); citosólica (cSHMTc) y mitocondrial de conejo (cSHMTm) (Martini y col., 1987 y 1989); citosólica de hígado de oveja (oSHMTc) (Usha y col., 1994); isoforma I y II de hígado de ratón (rSHMT I y rSHMT II respectivamente) (Nakshatri y col., 1996); citosólica de *N.crassa* (ncSHMTc) (McClung y col., 1992); citosólica (scSHMTc) y mitocondrial de *S.cerevisiae* (scSHMTm) (McNeil y col., 1994); mitocondrial de *P.sativum* (psSHMT) (Turner y col., 1992); mitocondrial de *S.tuberosum* (sotSHMTm) (Kopriva y Bauwe, 1995); de *E.coli* (ecSHMT) (Plamann y col., 1983); de *Salmonella typhimurium* (stSHMT) (Urbanowski y col., 1984); de *Bradyrhizobium japonicum* (bjSHMT) (Rossbach y Hennecke, 1991); de *Campylobacter jejuni* (cjSHMT) (Chan y Bingham, 1991); de *H.methylovorum* (hmSHMT) (Miyata y col., 1993) y de *M.extorquens* (meSHMT Chistoserdova y Lidstrom, 1994).

Abajo: secuencia amino terminal de las SHMTs I y II de *C.fasciculata* (cfSHMT I y cfSHMT II respectivamente)

Una serie de trabajos indican que no existe homología de secuencias de aminoácidos en la región amino terminal entre SHMTs de un mismo organismo pero de diferente localización intracelular (Martini y col., 1987 y 1989; Garrow y col., 1993; McNeil y col., 1994). Sin embargo, fue informada recientemente la identificación de dos genes que codifican para SHMTs de hígado de ratón, que presentan la misma secuencia amino terminal (FIGURA 73), pero difieren en la región carboxi terminal (Nakshatri y col., 1996). Esto puede correlacionarse con los resultados mostrados en esta Tesis, ya que las SHMTs I y II presentan la misma región amino terminal, pero presentan claras diferencias en cuanto al comportamiento en la cromatografía en DEAE celulosa, peso molecular (tanto nativa como en sus subunidades) y en los comportamientos cinéticos, lo que hace pensar que las diferencias pueden estar en la región carboxi terminal, o bien las diferencias observadas entre ellas se deban a modificaciones post-traduccionales de una de ellas o de ambas. Aquí que caben dos posibilidades respecto a la localización celular de las SHMT I y II: (a) se encuentran en diferentes compartimientos y son codificadas por genes diferentes (isoenzimas); (b) se encuentran en el mismo compartimiento y pueden ser codificadas por el mismo gen pero que sufren modificaciones post-traduccionales (isoformas) o son codificadas por diferentes genes y tienen diferentes funciones en el mismo compartimiento celular (isoenzimas). En relación a la SHMT III, si bien no se pudo determinar su secuencia amino terminal por encontrarse bloqueada, este dato junto con los obtenidos en relación a su comportamiento en la cromatografía en DEAE celulosa (la isoforma más retenida por la resina), su comportamiento cinético, sus características moleculares y físicoquímicas y su insensibilidad

al tratamiento con L-cisteína, sugieren que se trate de una proteína con una secuencia diferente a las otras dos isoformas, es decir una isoenzima.

Por otra parte fue detectada la presencia de un inhibidor endógeno de la SHMT en epimastigotes de *T.cruzi*. De acuerdo a los resultados obtenidos, es una molécula no dializable por estar firmemente unida a una proteína con alta afinidad de la cual se puede liberar por calentamiento a 100 °C. En estas condiciones, el inhibidor fue totalmente resistente al calentamiento y se hizo dializable. Este último resultado sugiere que se trata de una molécula de bajo peso molecular (< 12000, ya que puede atravesar membranas de diálisis con un límite de retención de 12 kDa).

El inhibidor coprecipitó con la proteína a la cual se encuentra unido, por precipitación con 45% de saturación en sulfato de amonio. La proteína aparentemente no fue la SHMT del parásito, porque a esa concentración de la sal la enzima se mantuvo en solución y recién pudo precipitar con 80% de saturación de la sal (dato no mostrado). El inhibidor demostró estar asociado a una molécula altamente hidrofóbica, ya que fue retenida muy eficientemente en una columna de Phenyl Sepharose, y sólo pudo ser eluída de la misma por una solución de 50% de etilen glicol en agua, apareciendo en un pico que absorbió a 280 nm.

Un espectro de absorción a pH 7 realizado con una preparación obtenida como se muestra en la FIGURA 70, indicó que esta molécula presentó un máximo de absorbancia a 200 nm y otro a 260 nm. En relación a este último, se ensayaron diversos nucleótidos que presentan espectros

similares, y en todos los casos no hubo inhibición de la SHMT parcialmente purificada de hígado de rata, utilizada como blanco del inhibidor de *T.cruzi*.

Hasta el momento, sólo se ha detectado un inhibidor natural de la SHMT en semillas de *V.radiata* (Vijaya y col., 1991). Los autores identificaron un inhibidor de naturaleza no proteica, unido a una proteína con alta afinidad, no identificada, de la cual se liberó de la misma por calentamiento. Este inhibidor fue purificado a homogeneidad por precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en Phenyl Sepharose y calentamiento. Su caracterización reveló una porción glucídica, un grupo O-amino y dos grupos alcoholes vecinales. Además, el análisis del espectro de absorbancia indicó que presenta un máximo de absorbancia a 200 nm, como el inhibidor endógeno de *T.cruzi*.

Estudios realizados con el inhibidor de *T.cruzi* indicaron una diferencia en los comportamientos cinéticos de las SHMTs de hígado de rata y la enzima del mismo parásito. La curva de inhibición de la SHMT de hígado de rata fue sigmoidea, con un n_H de 1,5 (sugiriendo que se unen de 1 a 2 moléculas de inhibidor por enzima), mientras que la curva de inhibición de la SHMT de *T.cruzi* fue hiperbólica, indicando una diferencia en las respuestas de las enzimas frente a la acción del inhibidor.

Finalmente, un hecho que hay que mencionar y que merece un estudio más exhaustivo es el de la riqueza relativa de inhibidor de las distintas cepas de *T.cruzi*, en las cuales investigamos su presencia. Efectivamente, del análisis de los datos de la TABLA XI, surge la observación de que aquellas cepas que presentan mayor grado de virulencia

como la RA son las menos ricas en el inhibidor. En cambio, cepas como la Tul 0 que es muy poco o nada virulenta, es relativamente más rica en el mismo. Si esta observación pudiera extenderse a otras cepas que abarquen un gran rango de virulencias habría que estudiar muy cuidadosamente el significado fisiológico y/o taxonómico de la presencia de este inhibidor endógeno del parásito.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander, N. y Greenberg, D.M. (1956) *J. Biol. Chem.* 220, 775- 785 .
- Al Chalabi, K. y Gutteridge, W.E. (1977) *Parasitol.* 74, 299-312.
- Alleman, M.M. y Gottlieb, M. (1996) *Mol. Biochem. Parasitol.* 76, 279-287.
- Andrews, P. (1965) *Biochem. J.* 96, 595-606.
- Appling, D.R. (1991) *FASEB J.* 5, 2645-2651.
- Aronow, B.; Kaur, K.; McCartan, K. y Ullman, B. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 22, 29-40.
- Artigues, A.; Birkett, A. y Schirch, V. (1990) *J. Biol. Chem.* 265 (9), 4853-4858.
- Artigues, A.; Farrant, H. y Schirch, V. (1993) *J. Biol. Chem.* 268 (19), 13784-13791.
- Avila, J.L. y Avila, A. (1981) *Exp. Parasitol.* 51, 318-324.
- Avila, J.L. y Nosei, C. (1983) *Mol. Biochem. Parasitol.* 7, 1-8.
- Azogue, E.; La Fuente, C. y Darras, C.H. (1985). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 176-182.
- Bacchi, C.; Lambros, C.; Goldberg, B.; Hubair, S. y de Carvahlo, G. (1974) *Antimicrob. Agents Chemoth.* 6, 785-790.
- Baskaran, N; Prakash, V.; Rao, A.G.A.; Radhakrishnan, H.; Savithri, H. y Rao, N.A. (1989) *Biochemistry* 28, 9607-9612.
- Beattie, B. y Merrill, A.R. (1996) *Biochemistry* 35, 9042-9051.
- Bell, S. y Turner, J. (1977) *Biochem. J.* 166, 209-216.
- Bensadoun, A. y Weinstein, D. (1976) *Anal. Biochem.* 70, 241-250.

- Berens, R.L.; Marr, J.J.; Lafon, S.W. y Nelson, D.J. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* 3, 187-196.
- Berger, B.; Dai, W.W.; Wang, H.; Stark, R. y Cerami, A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 4126-4130.
- Bergman, T.; Gheorghe, M.T.; Hjelmqvist, L. y Jornvall, H. (1996) *FEBS Lett.* 390, 199-202.
- Bergmeyer, H.U. y Bernt, E. (1974) *Methods of Enzymatic Analysis*. 1, 485. Editado por Hans Ulrich Bergmeyer (segunda edición). Academic Press.
- Bergmeyer, H.U.; Gawehn, K. y Grassl, M. (1974) *Methods of Enzymatic Analysis*. 2, 574. Editado por Hans Ulrich Bergmeyer (segunda edición) Academic Press.
- Besson, V.; Neuberger, M.; Rebeille, F. y Douce, R. (1995) *Plant Physiol. Biochem.* 33 (96), 665-673..
- Bettencourt, A.L. (1976). *J. Dis. Am Child* 130, 97-105.
- Blakley, R.L. (1955) *Biochem. J.* 61, 315-323.
- Blakley, R.L. (1969) en *Frontiers of Biology*, Neuberger A. y Tatum E.D. (editores) Amsterdam. Capítulo 8, 267-331.
- Bone, G.J. y Steinert, M. (1956) *Nature* 178, 308-309.
- Bossa, F.; Barra, D.; Martini, F.; Schirch, L. y Fasella, P. (1976) *Eur. J. Biochem.* 70, 397-401.
- Bourguignon, M.; Neuberger, M. y Douce, R. (1988) *Biochem. J.* 255, 169-178.
- Brahatheeswaran, B.; Prakash, V.; Savithri, H. y Rao, N.A. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* 330 (2), 363-372.
- Braman, J.; Black, M. y Mangum, J. (1981) *Preparative Biochem.* 11 (1), 23-32.

Brener, Z. (1973). *Ann. Rev. Microbiol.*, 27, 289-356.

Brener, Z. (1984) *Laboratory-acquired Chagas' disease: An endemic disease among parasitologists?* Editado por C.M. Morel (editor): *Genes and Antigens of parasites: A laboratory manual*. Rio de Janeiro, Oswaldo Cruz, 3-39.

Broderick, D.; Candland, K.; North, J. y Mangum, J. (1972) *Arch. Biochem. Biophys* 148, 196-198

Brosnan, J.T. (1987) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 2355-2362.

Bukin, Y.; Draudin-Krylenko, V. y Korytnyk, W. (1979) *Biochem. Pharmacol.* 28, 1669-1680.

Burns, J.M. Jr.; Schreffler, W.G.; Rosman, D.E. y colaboradores.(1992). *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89, 1239-1244.

Burton, E.G. y Metzenberg R.L. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 168, 219-229.

Cannata, J.J.B. y Cazzulo, J.J. (1984) *Comp. Biochem. Physiol.* 79B, 297-308.

Cazzulo, J.J.; Franke de Cazzulo, B.; Engel, J. y Cannata, J.J.B. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 329-343.

Cazzulo, J.J. (1992) *FASEB J.* 6, 3154-3161.

Ceron, C.R.; Caldas, A. de A.; Felix, C.R.; Mundim, M.H. y Roitman, I. (1979) *J. Protozool.* 26, 479-483.

Chan, V.L. y Bingham, H. (1990) *Gene* 101, 51-58.

Chance, B. (1954) *Methods of Biochemical Analysis.* 1, 410-424. Interscience Publishers Inc. New York.

Chasin, L.; Feldman, A.; Konstam, M. y Urlaub, G. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 71 (2), 718-722.

- Chen, M.S. y Schirch, L. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 3631- 3635.
- Chistoserdova, L. y Lidstrom, M. (1994) *J. Bacteriol.* 176 (21), 6759-6763.
- Cook, R. y Blair, J. (1979) *Biochem. J.* 178, 651-659.
- Cosgrove, W.B.; Skeen, M. y Hadjuk, S.L. (1979) *J. Protozool.* 2, 643-648.
- Cossins, E.A. y Sinha, S.K. (1964) *Biochem. J.* 101, 542-549.
- Cossins, E. A. y Shuh, S. (1972) *Phytochem.* 11, 587-593.
- Cybulski, R.L. y Fisher, R.R. (1976) *Biochemistry* 15 (15) 3183-3187.
- Daly, E.D. y Aprison, M.A. (1974) *J. Neurochem.* 22, 877-885.
- Deodhar, S. y Sakami, W. (1953) *Federation Proc.* 12, 195-200.
- Devor, E.J. y Waziri, R. (1993) *Biol. Psychiatry* 34, 221-225.
- Dewey, V.C. y Kidder, G.W. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 157, 380-387.
- Dwyer, D.M. y Gottlieb, M. (1984) *Mol. Biochem. Parasitol.* 10, 139-150.
- Eichler, H.G.; Hubbard, R. y Snell, K. (1981) *Biosci. Rep.* 1, 101-106.
- Elsea, S.; Juyal, R.; Jiralerspong, S.; Finucane, B.; Pandolfo, M.; Greenberg, F.; Baldini, A.; Stover, P. y Patel, P. (1995) *Am. J. Hum. Genet.* 57, 1342-1350.
- Ema, M.; Kakimoto, T. y Chibata, Y. (1979) *Appl. Environm. Microbiol.* 37 (6), 1053-1056.
- Ernster, L. y Lindberg, A. (1950) *Acta Chem. Scand.* 4, 942-947.
- Fernandes, J.F. y Castellani, O. (1958) *Exp. Parasitol.* 7, 224-235.
- Ferone, R. y Roland, S. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5802-5806.

- Ferreira, H.O. (1988). *J. do Pediatria*, 64, 1-8.
- Finkelstein, J.D. (1990) *J. Nutr. Biochem.* 1, 228-237.
- Fish, W.R.; Marr, J.J. y Berens, R.L. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 714, 422-428.
- Frank, O.; Baker, H. y Hutner, S.H. (1970) *J. Protozool.* 17, 153-158.
- Frydman, B.; de los Santos, C.; Cannata, J.J.B. y Cazzulo, J.J. (1990) *Eur. J. Biochem.* 192, 363-368.
- Fujioka, M. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 185, 338-349.
- Fujiwara, K.; Okamura, K.; Ohmura, Y. y Motokawa, Y. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 251 (1), 123-127.
- Gamarro, F.; Yu, P.; Zhao, J.; Edman, P.; Greene, P. y Santi, D. (1995) *Mol. Biochem. Parasitol.* 72, 11-22.
- Garrow, T.; Brenner, A.; Whitehead, M.; Chen, X.N.; Duncan, R.; Korenberg, J. y Shane, B. (1993) *J. Biol. Chem.* 268 (16), 11910-11916.
- Garret, C.; Coderre, J.; Meek, T.; Garvey, E.; Claman, D.; Beverley, S.M. y Santi D. (1984) *Mol. Biochem. Parasitol.* 11, 257-265.
- Gavilanes, F.; Peterson, D. y Schirch, L. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 11431-11436.
- Gavilanes, F.; Peterson, D.; Bullis, B. y Schirch, L. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 13155-13159.
- Gbenle, G.O.; Oppendoes, F. y Van Roy, J. (1986) *Acta Trop.* 43, 295-305.
- Gero, A.M. y Coombs, G.H. (1980) *FEBS Lett.* 118, 130-132.
- Gero, A.M. y Coombs, G.H. (1981) *Exp. Parasitol.* 54, 185-195.
- Gottlieb, M. y Dwyer, D.M. (1983) *Mol. Biochem. Parasitol.* 7, 303-317.

- Gottlieb, M. (1985) *Science* 227, 72-74.
- Gottlieb, M.; Gardiner, P.R. y Dwyer, D.M. (1986) *Comp. Biochem. Physiol.* 83B, 63-69.
- Green, J.; Ballou, D. y Matthews, R. (1988) *FASEB J.* 2, 42-47.
- Greenberg, F.; Guzzeta, V.; Montes de Oca-Luna, R.; Magenis, R.; Smith, A.; Richter, S. y Kondo, I. (1991). *Am. J. Hum. Genet.* 49, 1207-1218.
- Grumont, R.; Sirawaraporn, W. y Santi, D. (1988) *Biochemistry* 27, 3776-3784.
- Gutteridge, W.E. y Gaborak, M. (1979) *Int. J. Biochem.* 10, 415-422.
- Haga, T.; Haga, K. y Gilman, A.G. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5776-5780
- Hammond, D.J. y Gutteridge, W.E. (1980) *FEBS Lett.* 118, 259-262.
- Hammond, D.J. y Gutteridge, W.E. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 718, 1-10.
- Hammond, D.J.; Gutteridge, W.E. y Oppendoes, F. (1981) *FEBS Lett.* 128, 27-29.
- Hammond, D.J. y Gutteridge, W.E. (1983) *Mol. Biochem. Parasitol.* 7, 319-330.
- Hammond, D.J. y Gutteridge, W.E. (1984) *Mol. Biochem. Parasitol.* 13, 243-261.
- Hansen, B.D. y Webster, H.K. (1981) *Fed. Proc.* 40, 776-780.
- Hansen, B.D.; Arbelo, J.; Walkony, J.F. y Hendricks, L.D. (1982) *Parasitol.* 85, 271-282.
- Harish Kumar, P.; Mangum, J. y Rao, N.A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (6), 1950-1953.
- Hassan, H.F. y Coombs, G.H. (1986) *Comp. Biochem. Physiol.* 84B, 217-223

- Hassan, H.F. y Coombs, G.H. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 23, 285-296.
- Henricson, D. y Ericson, Y. (1988) *Physiol. Plantarum* 74, 602-606.
- Hedrick, J.L. y Smith, A.J.(1968) *Anal. Biochem.* 101, 327-331.
- Herwaldt, B.L. y Juranek, D.D. (1993). *Am J. Trop. Med. Hyg.* 48, 313-317.
- Hill, B.; Kilsby, J.; Rogerson, G., McIntosh, R. y Ginger, C.D. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* 2, 123-134.
- Hoare, C.Z. (1964). *J. Protozool.* 11, 206-207.
- Hoff, R.; Teixeira, R.S.; Carvalho, J.S. y colaboradores. (1978). *N. Eng. J. Med.* 298, 604- 610.
- Hofflin, J.M.; Sadler, R.H. y Araujo, F.G.(1987). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 437-442.
- Hopkins, S. y Schirch, V. (1986) *J. Biol. Chem.* 261,3363-3369.
- Horne, D.W.; Patterson, D. y Cook, R. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 270, 729-733.
- Horne, D.W.; Holloway, R.S. y Said, H.M. (1992) *J. Nutr.* 122, 2204-2209.
- Hoyt, J.C.; Oren, A.; Escalante-Seremena, J. y Wolfe, R. (1986) *Arch. Microbiol.* 145, 153-158.
- Huennekens, F.M.; Hatefi, Y. y Kay, L.D. (1957) *J. Biol. Chem.* 224, 435-437.
- Hulse, J.D.; Ellis, S.R. y Henderson, L.M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1654-1659.
- Ide, H.; Hamaguchi, K.; Kobata, S.; Murakami, A.; Kimura, Y.; Makino, K.; Kamada, M.; Miyamoto, S.; Nagaya, T.; Kamogawa, K. e Izumi, Y. (1992) *J. Chromatogr.* 596, 203-209.

- Iovannisci, D.M.; Kaur, K.; Young, L. y Ullman, B. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4, 1013-1019.
- Ivanetich, K. y Santi, D. (1990) *Exp. Parasitol.* 70, 367-371.
- Jaffe, J. y Chrin, L. (1978) *J.Parasitol.* 64 (5) 769-774.
- Jaffe, J. y Chrin, L. (1980) *J. Parasitol.* 66 (1) 53-58.
- James, D.H. y Born, G.V. (1980) *Parasitol.* 81, 383-393.
- Jeong, S.S. y Schirch, V. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* 335 (2), 333-341.
- Jones III, C. y Priest, D. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 174, 305-311.
- Jones, E.W. y Lam, K. (1973) *Mol. Gen. Genet.* 123, 209-218.
- Jones, M.E. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* 49, 253-279.
- Kao, F. y Puck T.T. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60, 1275-1281.
- Kidder, G.W.; Dewey, V.C. y Nolan, I.L. (1976) *Can. J. Biochem.* 54, 32-41.
- Kidder, G. W.; Dewey, V.C. y Nolan, L.L. (1978) *J. Cell. Physiol.* 96, 165-170.
- Kidder, G.W. (1984) *J. Protozool.* 31, 298-300.
- Kikuchi, G. (1973) *Mol. Cell. Biochem.* 1, 169-187.
- Kim, J.S.; Lowe, K.E. y Shane, B. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 21680-21685.
- Kirchhoff, L.V. y Neva, F.A. (1985). *JAMA* 254, 3058-3064.
- Kirchhoff, L.V.(1990). *Biology of trypanosomas*. Editado por G.L. Mandell, ; R.G. Douglas y J.E. Bennett. *Principles and practice of infectious diseases* (tercera edición) New York, John Wiley & Sons, página 2077.
- Kirchhoff, L.V. (1993). *Inf. Dis. Clin. North Amer.* 7 (3), 487-502.

- Kopriva, S. y Bauwe, H. (1995) *Plant Physiol.* 107 (1), 271-272.
- Koszalka, G.W. y Krenitsky, T.A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 8185-8193.
- Krenitsky, T.A.; Neil, S.; Elion, G.B. y Hitchings, G. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4779-4784.
- Krenitsky, T.A.; Koszalska, G.W.; Tuttle, J.V.; Adamczyk, D.L.; Elion, G.E. y Marr, J.J. (1980) *Purine salvage enzymes in man and Leishmania donovani*. En *Purine Metabolism in man*. Editado por A.Rapadao y R.Watts. Parte III, 51-55. Plenum, New York.
- Kruschwitz, H.; McDonald, D.; Cossins, E. y Schirch, V. (1993) *Adv. Exp. Med. Biol.* 338, 719-722.
- Kruschwitz, H.; McDonald, D.; Cossins, E. y Schirch, V. (1994) *J. Biol. Chem.* 269 (46), 28757-28763.
- Kruschwitz, H.; Ren, S.; Di Salvo, M. y Schirch, V. (1995) *Protein Expression and Purification* 6, 411-416.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-686.
- Lafon, S.W.; Nelson, d.J.; Berens, R.L. y Marr, J.J. (1982) *Biochem. Pharmacol.* 31, 231-238.
- Lascelles, J. y Woods, D.D. (1950) *Nature* 166, 649- 654.
- Lee, J.; Hutner, S. y Bovee, E. (1985) En *An illustrated guide to the protozoa*. 3, 143-153.
- Levine, N.D.; Corliss, J.O.; Cox, F.E.; Devoux, G.; Grain. J.; Honigberg, B.M.; Leedale, G.F.; Polzansky, G.; Spragne, V.; Vassa, J. y Wallace, F.G. (1980) *J. Protozool.* 27, 37-54.
- Lewandowska, I.; Balinska, M.; Natorff, R. y Paszewski, A. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1290, 89-94.

Lewis, K.; Randolph, V.; Nemeth, E. y Frisell, W. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 185, 443-449.

Lin, B.F. y Shane, B. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 9705-9713.

Lin, H.B.; Falcheto, R.; Mosca, P.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. y Hamlin, J.L. (1996) *J. Biol. Chem.* 271 (5), 2548-2556.

Lowry, M.; Hall, D. y Brosnan, J.T. (1986) *Am. J. Physiol.* 250, F649-F658.

Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. y Randall, Z. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

McKenzie, K.Q. y Jones, E.W. (1977) *Genetics* 86, 85-102.

Maguire, J.H.; Hoff, R.; Sherlock, Y. y colaboradores. (1987) *Circulation*, 75, 1140-1151.

Manohar, K.; Ramesh, K. y Rao, N.A. (1982) *J. Biosci.* 4, 31-50.

Manohar, R.; Rao, A.G.A. y Rao, N.A. (1984) *Biochemistry* 23, 4116- 4122.

Marr, J.J.; Berens, R.L. y Nelson, D.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 544, 360-371.

Marr, J.J. y Docampo, R. (1986). *Rev. Infect. Dis.* 8, 884-890.

Martin, R.G. y Ames, B.C. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1372-1379.

Martínez Carrion, M.; Critz, W. y Quashnock, J. (1972) *Biochemistry* 11 (9), 1613-1615.

Martini, F.; Angelaccio, S.; Pascarella, S.; Barra, D.; Bossa, F. y Schirch, V. (1987) *J. Biol. Chem.* 262 (12), 5499-5509.

Martini, F.; Maras, B.; Tanci, P.; Angelaccio, S.; Pascarella, S.; Barra, D.; Bossa, F. y Schirch, V. (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (15), 8509-8519.

Masuda, T.; Ozaki, H. y Tai, A. (1986) *Agric. Biol. Chem.* 50 (11) 2763-2769.

- Masuda, T.; Sakamoto, M.; Nishizaki, Y.; Hayashi, H.; Yamamoto, M. y Wada, H. (1987) *J. Biochem.* 101, 643-652.
- Matthews, R.; Ross, J.; Baugh, C.; Cook, J. y Davis, L. (1982) *Biochemistry* 21, 1230-1238.
- Mazelis, M., y Liu, E. (1967) *Plant Physiol.* 42, 1763-1768.
- McClung, C.; Davis, C.; Page, K. y Denome, S. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 1412-1421.
- McNeil, J.B.; McIntosh, E.; Taylor, B.; Zhang, F.; Tang, S. y Bognar, A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269 (12), 9155-9165.
- McNeil, J.B.; Bognar, A. y Pearlman, R. (1996) *Genetics* 142, 371-381.
- Meek, T.; Garvey, E. y Santi, D. (1985) *Biochemistry* 24, 678-686.
- Miller, R.L., Sabourin, C.L.K. y Krenitsky, T.A. (1987) *J. Biol. Chem.* 259, 5073-5077.
- Mitchell, P.; Reynolds, P. y Blevina, D. (1986) *Plant Physiol.* 81, 553-557.
- Miyasaki, S.; Toki, S.; Izumi, Y. y Yamada, H. (1987) *Eur. J. Biochem.* 162, 533-540.
- Miyata, A.; Yoshida, T.; Yamaguchi, K.; Tanabe, T.; Toh, H.; Mitsunaga, T. e Izumi, Y. (1993) *Eur. J. Biochem.* 212, 745-750.
- Morgan, C.L.; Turner, S. y Rawstorne, S. (1993) *Planta* 190, 468-473.
- Mosca, P.; Dijkwel, P. y Hamlin, J.L. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 4375-4383.
- Mukkada, A.J.; Meade, J.C.; Glaser, T.A. y Bonventre, P.F. (1985) *Science* 229, 1099-1101.
- Mundim, M.H. y Roitman, I. (1977) *J. Protozool.* 24, 329-331.
- Nakamura, K.; Trewyn, R. y Parks, L. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 327, 328-335.

- Nakshatri, H., Bouillet, P., Bhat-Nashatri, P. y Chambon, P. (1996) *Gene* 174, 79-84.
- Narkewicz, M.; Sauls, S.D.; Tjoa, S.; Teng, C. y Fennessey, P.V. (1996) *Biochem. J.* 313, 991-996.
- Neubert, T.A. y Gottlieb, M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 7236-7242.
- Neuburger, M.; Rebeille, F.; Jourdain, A.; Nakamura, S. y Douce, R. (1996) *J. Biol. Chem.* 271 (16), 9466-9472.
- Newton, B.A. (1957) *J. Gen. Microbiol.* 17, 708-717.
- Nosei, C. y Avila, J.L. (1985) *Comp. Biochem. Physiol.* 81B (3), 701-704.
- O'Connor, M. y Hanson, R. (1975) *J. Bacteriol.* 124 (2), 985-996.
- O'Daly, J.A. y Rodriguez, M.B. (1987) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 1-2.
- Oe, H.; Kohashi, M.; Matsuura, S. e Iwai, K. (1983) *Agric. Biol. Chem.* 47, 425-427.
- Ogawa, H. y Fujioka M. (1981) *J. Biochem.* 90, 381-390.
- Ogur, M.; Liu, T.N.; Cheung, Y.; Palavicius, Y.; Walesm, W.; Mehnert, D. y Blaise, D. (1977) *J. Bacteriol.* 129, 926-933.
- Oliver, D. (1994) *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 45, 323-337.
- Palekar, A.G.; Tate, S.S. y Meister, A. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1158- 1167.
- Pasternack, L.; Laude, D. Jr. y Appling, D.R. (1992) *Biochemistry* 31, 8713-8719.
- Pasternack, L.; Laude, D.Jr. y Appling, D.R. (1994a) *Biochemistry* 33, 74-82.
- Pasternack, L.; Laude, D. Jr. y Appling, D.R. (1994b) *Biochemistry* 33, 7166-7173.

- Pasternack, L.; Littlepage, L.; Laude, D. Jr. y Appling, D.R. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* 326 (1), 158-165.
- Paukert, J.L.; Strauss, L. y Rabinowitz, J.C. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 5104-5111.
- Pfender, W. y Pizer, L.I. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 200, 503-512.
- Pizzi, T. y Taliaferro, W. (1960) *J. Infect. Dis.* 107, 100-107.
- Plamann, M.D; Stauffer, L.T.; Urbanowski, H. y Stauffer, G. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 2065-2075.
- Platzer, E. y Campuzano, H. (1976) *J. Protozool.* 23 (2), 282-286.
- Platzer, E. (1977) *Life Sciences* 20, 1417-1424.
- Pragobpol, S.; Gero, A.M.; Lee, C.S. y O'Sullivan, W.J. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 230, 285-293.
- Prather, C. y Sisler, E. (1966) *Plant Cell Physiol.* 7, 457-463.
- Ramesh, K. y Rao, N.A. (1980) *Biochem. J.* 187, 623-636.
- Rao, D.N. y Rao, N.A. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 92 (4), 1166-1171.
- Rao, D.N. y Rao, N.A. (1982) *Plant Physiol.* 69, 11-18.
- Rassi, A. y Ferreira, H.O. (1971). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 5, 235-243.
- Rassi, A. (1979). *Clínica: Fase aguda*,. Editado por Z. Brener y Z.A.Andrade *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, página 249.
- Ravnikar, P.D. y Somerville, R.L. (1987) *J. Bacteriol.* 169, 2611-2617.
- Reche, R.; Arrebola, A.; Olmo, D; Santi, D. Gonzalez-Pacanowska, D. y Ruiz Perez, L. (1994) *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, 247-258.

- Rezende, J.M. (1979). *Clínica: Manifestações digestivas*. Editado por Z. Brener y Z.A.Andrade Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pag. 312.
- Rossbach, S. y Hennecke, H. (1991) *Mol. Microbiol.* 5, 39-47.
- Rubin, R.J.; Jaffe, J.J. y Handschumacher, R.E. (1962) *Biochem. Pharmacol.* 11, 563-572.
- Ruenwongsa, P.; Luanvararat, M. y O'Sullivan, W. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 265-272.
- Sakami, W. (1958) Editado por W.D.Mc Elroy y H.B.Glass. *Amino acid metabolism*. Johns hopkins, Baltimore, pag. 658.
- Sakamoto, Z.; Masuda, T., Yanagimoto, Y.; Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1991) *Agric. Biol. Chem.* 55 (9), 2243-2249.
- Santi, D. y Danenberg, P. (1984) *Folates in pyrimidine nucleotide biosynthesis*. En: *Folates y Pteridines*, Vol 1, *Chemistry and Biochemistry of Folates*.
- Schirch, D.; Della Fratte, S.; Iurescia, S.; Angelaccio S.; Contestabile, R.; Bossa, F. y Schirch, V. (1993) *Adv. Exp. Med. Biol.* 715-718.
- Schirch, L. y Mason, M. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 1032- 1038.
- Schirch, L. y Jenkins, W.T. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 3801- 3807.
- Schirch, L. y Gross, T. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 5651-5660.
- Schirch, L.; Tatum, C. y Benkovic, S. (1977) *Biochemistry* 16 (3), 410-419.
- Schirch., L. y Peterson, D. (1980) *J. Biol. Chem.* 250 (16), 7801-7806.
- Schirch, L.; Slagel, S.; Barra, D.; Martini, F. y Bossa, F. (1980) *J. Biol. Chem.* 255 (7), 2986-2989.
- Schirch, L. (1982) *Rel. Areas Biochem. Biol. Mol.* 53, 83-112.

- Schirch, L. (1984) *Folates in serine and glycine metabolism*. En *"Folates and Pterines"* Editado por R.L. Blakley y S. Benkovic. 1, 399-402. Wiley, New York
- Schirch, V.; Hopkins, S.; Villar, E. y Angelaccio, S. (1985) *J. Bacteriol.* 163 (1), 1-7.
- Schirch, V. y Strong, W.B. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 229, 371-380.
- Schmunis, G.A. (1991). *Transfusion*, 31, 547-553.
- Shane, B. (1989) *Vitam. Horm.* 45, 263-335.
- Shank, R.P. y Aprison, M.H. (1970) *J. Neurochem.* 49, 1461-1475.
- Shemin, D. (1946) *J. Biol. Chem.* 162, 297-307.
- Skiba, W.; Taylor, M.; Wells, M.; Mangum, J. y Awad W. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 14944-14948.
- Snell, K. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 843, 276-281.
- Snell, K.; Natsumeda, Y.; Eble, J.N.; Glover, J.L. y Weber, G. (1988) *Br. J. Cancer* 57, 87-90.
- Snell, K. (1989) Editado por P. Bannasch; D. Keppler y G. Weber. *Liver Cell Carcinoma*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, páginas 375-387.
- Somerville, C.R. y Ogren, W.L. (1981) *Plant Physiol.* 67, 666-671.
- Staben, C. y Rabinowitz, J.C. (1984) *Formation of formylmethionyl-tRNA and initiation of protein synthesis*. En *Folates and Pterines* Editado por R.L. Blakley y S.J. Benkovic. Wiley, New York. 4, 457-495.
- Stauffer, G.; Baker, C. y Brenchley, J. (1974) *J. Bacteriol.* 120 (3), 1017-1025
- Steiger, R.F. y Steiger, E. (1977) *J. Protozool.* 24, 437-441.
- Steiger, R.F. y Black, C.D.V. (1980) *Acta Trop.* 37, 195-198.

- Stover, P. y Schirch, V. (1991) *J. Biol. Chem.* 266 (21) 1543-1550.
- Stover, P.; Zamora, M.; Shostak, K.; Gautam-Basak, M. y Schirch, V. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17679-17687,
- Stover, P.; Kruschwitz, H. y Schirch, V. (1993) *Adv. Exp. Med. Biol.* 679-685.
- Strong, W.; Tendler, S.; Seither, R.; Goldman, D. y Schirch V. (1990) *J. Biol. Chem.* 265 (21), 12149-12155.
- Strong, W. y Schirch, V. (1989) *Biochemistry* 28, 9430-9439.
- Sukanya, N.; Vijaya, M.; Savithri, H.S.; Radhakrishnan y Rao N.A. (1991) *Plant Physiol.* 95, 351-357.
- Synold, T.; Willits, E. y Barredo, J.C. (1996) *Leukemia and Lymphoma* 21, 9-15.
- Tampitag, S y O'Sullivan, W.J. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 19, 125-134.
- Tan, L.; Drury, E. y MacKenzie R. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 1117-1122.
- Tanowitz, H.B.; Kirchhoff, L.V. Simon, D. y colaboradores (1992). *Clin. Microbiol Rev.* 5, 400-412.
- Taylor R. y Weissbach, H. (1965) *Anal. Biochem.* 13, 80-84.
- Thauer, R.K.; Fuchs, G. y Jungerman, K. (1977) En *Iron sulfur protein* (Editado por W.Lovenberg) 3 , 121. Academic Press.
- Thorndike, J.; Pelliniemi, T. y Beck, W.S. (1979) *Cancer Res.* 39, 3435-3440.
- Tiselius, A.; Hjertén, S. y Levin, O. (1956) *Arch. Biochem. Biophys.* 65, 132-155.
- Trakatellis, A.; Dimitriadou, A.; Exindari, M.; Christodoulou, D.; Malissovass, N.; Antoniadis, N. y Haitoglou, K. (1994) *Postgrad. Med. J.* 70 (suplemento), S89-S92.

- Turner, S.; Ireland, R.; Morgan, C. y Rawsthorne S. (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (19) 13528-13534.
- Ulevitch, R.J. y Kallen, R.G. (1977) *Biochemistry*. 16, 5342-5349.
- Urbanowski, M.L.; Plamann, M.D.; Stauffer, L.T. y Stauffer, G. (1984) *Gene* 27, 47-54.
- Urbina, J.A.; Payares, A.; Molina, J.; Liendo, A.; Lazard, K.; Piras, M.; Piras, R.; Perez, N.; Wincker, P. y Ryley, J. (1996) *Science* 273, 969-971.
- Usha, R.; Savithri, H. y Rao, N.A. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1204, 75-83.
- Utey, C.; Marcell, P.; Allen, R.; Antony, A. y Kolhouse, J. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 13656-13665.
- Uyeda, K. y Rabinowitz, J. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 123, 271-278.
- Vijaya, M.; Sukanya, N.; Savithri, H. y Rao, N.A. (1991) *Ind. J. Biochem. Biophys.* 28, 252-256.
- Wagner, C. (1996) *J.Nutr.* 126, 1228S-1234S.
- Warburg, O. y Christian, W. (1941) *Bioch. Z.* 310, 384-421.
- Waziri, R.; Baruah, S.; Hegwood, T. y Sherman, A. (1990) *Neurosci. Lett.* 120, 237-240.
- Waziri, R.; Baruah, S. y Sherman, A.D. (1992) *Schizophr. Res.* 8, 233-243.
- Weber, K. y Osborn, M.J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- Whitehouse, S.; Sanders, P. y Snell, K. (1995) *Biochem. Soc. Trans.* 23, 625S.
- Wilkinson, A.P. y Davies, D.D. (1958) *Nature* 181, 1070-1071.
- Wilson, E.M. y Snell, E.E. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 3171-3175

Wong, K. y Cossins, E. (1976) *Phytochem.* 15, 921-925.

Woo, K. (1979) *Plant Physiol.* 63, 783-787.

Wright, B.E. (1955) *Biochim. Biophys. Acta* 16, 165-166.

Yuen, S.; Chui, A.; Wilson, K. y Yuan, P. (1989) *Biotechniques* 7 (1), 74-82.

Zelikson, R. y Luzzati, M. (1976) *Eur. J. Biochem.* 64, 7-13.

Zieske, L. y Davis, L. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 10355-10359.



DANIEL CAPELLUTO

