

Tesis de Posgrado

Metabolismo de poliaminas en *Crithidia fasciculata* : Caracterización, clonado y secuenciación de la enzima ODC

Ceriani, María Carolina

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:

Ceriani, María Carolina. (1997). Metabolismo de poliaminas en *Crithidia fasciculata* : Caracterización, clonado y secuenciación de la enzima ODC. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2922_Ceriani.pdf

Cita tipo Chicago:

Ceriani, María Carolina. "Metabolismo de poliaminas en *Crithidia fasciculata* : Caracterización, clonado y secuenciación de la enzima ODC". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2922_Ceriani.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Metabolismo de poliaminas en *Crithidia fasciculata*.

Caracterización, clonado y secuenciación de la enzima ODC.

María Carolina Ceriani

Director: Dr. Israel D. Algranati

Instituto de Investigaciones Bioquímicas- "Fundación Campomar".

Tesis realizada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires.

1997

29

A los dos hombres de mi vida:
Santiago y Felipe.
Gracias por su paciencia infinita
a lo largo de estos años.

AGRADECIMIENTOS

A las autoridades del IIB-"Fundación Campomar", por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto.

Al Dr. Algranati, por su comprensión, por haberme guiado durante estos años brindandome todo su apoyo y confianza, pero por sobre todas las cosas, por ser una excelente persona.

A la Dra. Gonzalez, por contribuir enormemente a mi formación, y además ser una buena amiga.

A mis compañeros de laboratorio por los momentos compartidos, Carmela, Ezequiel, Inés y Cecilia.

A Liliana Sferco, Juan Mucci y Berta F.de Cazzulo, por haberme ayudado tantas veces, y hacer el trabajo mucho más agradable.

A todos mis compañeros del Instituto, pero en especial a mis amigos, Daniel Bassi, Irma Mastronardi, Mariano Salibe, Susana Raffo, Amy Curto, Alejandro Heuck, Santiago Mora García, Roberto Rodriguez Suarez, Pablo Cerdán, Verónica Pascuccelli, Sandra Fanchiotti, Patricia Barderi y Laura Cremona.

A mis amigos que ya estan trabajando afuera, y que siempre recuerdo con tanto cariño, Sandra Fernandez, Marcelo Rodriguez, Adrian Vojnov y Javier Martinez.

A mis compañeros del laboratorio de poliaminas de la Universidad de Lund, con quienes pasé momentos tan agradables: Fredrik Svensson, Eva Lökvist, Lo Persson, Inger Kockum y Ulla Kalmhoff.

A Margarita, Georgina, Cristina, Carlos, Ernesto, Carmen, Monica, Tilda, Griselda, Vanina, Aida, Silvia, Eva, Laura, Fabian, Francisco, Salvador, en fin, a todos aquellos que desde su lugar de trabajo contribuyeron a que todo funcionara mejor.

A mi familia.

ABREVIATURAS

ADC	Arginina decarboxilasa
Ado Met DC	S-adenosil metionina decarboxilasa
AZ	Antizima
CHA	Ciclohexilamina
CHx	Cicloheximida
CGP 48664	4- amidinoindan-1-uno 2'- amidinohidrazona
DAB	Diaminobutanona
DFMO	Difluorometilornitina
DMSO	Dimetilsulfoxido
DOC	Deoxicolato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiaminotetraacético
E - 64	Trans-Epoxisuccinil-L-leucilamida (4-guanidino)butano
FPLC	Fast protein liquid chromatography
MGBG	metilglioxal bis(guanilhidrazona)
MOPS	Acido morfolinopropanosulfónico
NP -40	Nonidet P - 40
ODC	Ornitina decarboxilasa
PCR	Polymerase chain reaction
PEST	Prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), treonina (T)
PLP	Piridoxal fosfato
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
POA	Poliامينooxidasa
PPO	2,5 difeniloxazol
SAT	Espermidina/espermina acetiltransferasa
SDS	Sodio dodecil sulfato
TCA	Acido tricloroacético
Z Abe Ado	5'-{[(Z)-4-amino-2-butenil]metilamino}-5'-deoxiadenosina

INDICE

RESUMEN	VI
---------	----

I. INTRODUCCION

POLIAMINAS

1- Reseña Histórica.	1
2- Características Generales.	1
3- Función en la Naturaleza.	2
4- Metabolismo de Poliaminas.	3
5- Características de las enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas.	5
5.1 Ornitina decarboxilasa.	5
5.2 S-Adenosilmetionina decarboxilasa.	8
5.3 Espermidina/Eespermina N- acetiltransferasa.	9
6- Inhibidores de la Ornitina decarboxilasa	
6.1 Inhibidores reversibles.	10
6.2 Inhibidores irreversibles.	11
7- Inhibidores de la S-Adenosilmetionina decarboxilasa.	12
8- Regulación de la biosíntesis de poliaminas.	13
8.1 Regulación de la ornitina decarboxilasa.	14
8.2 Regulación de la S-adenosilmetionina decarboxilasa.	15
8.3 Regulación de la SAT.	15
9- Funciones fisiológicas de las poliaminas	
9.1 Acidos nucleicos y poliaminas.	18
9.2 Poliaminas y t-RNA.	18
9.3 Poliaminas y Síntesis proteica.	19
10- Transporte de poliaminas.	19
11- Poliaminas en tripanosomátidos.	
Generalidades de Tripanosomátidos	20

II. MATERIALES Y METODOS

1- Cepa de parásitos.	25
2- Medios de Cultivo.	
2.1 Medio líquido para <i>C.fasciculata</i> .	25
2.2 HOS-MEM II.	26
3- Cultivo de protozoarios.	27
4- Determinación de metabolitos de poliaminas.	
Electroforesis en papel.	27
5- Contenido de poliaminas.	
Análisis por cromatografía.	28

6- Captación de poliaminas.	
6.1.1 Captación de putrescina.	28
6.1.2 Captación de espermidina.	29
6.1.3 Captación de ornitina.	29
6.2 Efecto de inhibidores de la respiración.	29
6.3 Efecto de un inhibidor de síntesis proteica.	29
6.4 Ensayos de competencia en la captación de poliaminas.	29
6.5 Determinación de parámetros cinéticos.	30
7- Estudios bioquímicos de la ornitina decarboxilasa.	
7.1 Preparación del extracto enzimático.	30
7.2 Medición de la actividad de ODC.	30
7.3 Preparación de la apoenzima.	31
7.4 Determinación de la estabilidad de ODC.	31
7.5 Modulación de la actividad enzimática por poliaminas.	31
7.6 Medición de la actividad enzimática de ADC.	31
7.7 Inhibición de la actividad enzimática por análogos de poliaminas.	32
7.7.1 Inhibición por diaminobutanona (DAB).	32
7.7.2 Inhibición por diflurometilornitina (DFMO).	32
7.7.2.1 Recuperación de la actividad de ODC luego de la remoción del DFMO.	32
8- Inmunoprecipitación.	33
9- Determinación del peso molecular de la ODC de <i>C.fasciculata</i> en geles de SDS-PAGE.	33
9.1 Purificación parcial de la ODC.	33
9.1.1 Extracción con solventes orgánicos.	33
9.1.2 Cromatografía de intercambio iónico.	34
9.2 Unión a ³ H-DFMO.	34
9.3 Gel de poliacrilamida -SDS.	34
10- Cuantificación de proteínas.	35
11- Clonado y Secuenciación de la ODC de <i>C.fasciculata</i> .	
11.1 Preparación de DNA.	35
11.2 Síntesis de una sonda específica para ODC.	36
11.3 Clonado de la sonda.	37
11.4 Minipreparación de plásmido.	37
11.5 Detección del gen por análisis de Southern blot.	38
11.6 Preparación de la sonda radioactiva.	39
11.7 “Screening” de la biblioteca genómica.	39
11.8 Purificación del fago.	40
11.9 Secuenciación del gen.	40
12- RNA mensajero.	
12.1 Preparación de RNA.	42
12.2 Detección del mensajero de ODC por análisis de Northern blot.	42
12.3 Marcadores de peso molecular.	43

III. RESULTADOS

1. Determinación de la decarboxilación de ornitina por extractos enzimáticos de <i>Crithidia fasciculata</i> .	
1.1 Estequiometría de la reacción.	44
1.2 Síntesis de espermidina.	45
1.2.1 Inhibición de la síntesis de espermidina.	46
2 - Contenido endógeno de poliaminas.	47
3- Captación de poliaminas.	48
3.1 Características generales de la captación.	
3.1.1 Efecto de DFMO en la captación de putrescina.	48
3.1.2 Determinación de la concentración óptima de DFMO para lograr máximo efecto en la captación.	50
3.1.3 Determinación del tiempo de cultivo óptimo en presencia de DFMO para lograr máximo efecto en la captación.	50
3.1.4 Especificidad de la captación.	51
3.1.5 Curva de temperatura de captación de putrescina.	53
3.1.6 Captación en distintos puntos de la curva de crecimiento del parásito.	54
3.2 Requerimientos energéticos y de síntesis de proteínas para la captación de putrescina.	55
3.2.1 Efecto de inhibidores de la respiración.	55
3.2.2 Efecto de cicloheximida.	56
3.3 Ensayos de competencia.	
3.3.1 Competencia para la captación de putrescina.	57
3.3.2 Competencia para la captación de espermidina.	58
3.4 Parámetros cinéticos de la captación de putrescina.	
3.4.1 Determinación de la constante de afinidad (K_m).	59
4- Caracterización de la ornitina decarboxilasa de <i>Crithidia fasciculata</i> .	
4.1 Optimización del ensayo.	
4.1.1 Curva de temperatura.	61
4.1.2 Curva de pH.	62
4.1.3 Requerimientos de cofactor. Recuperación de la actividad por agregado de PLP a la apoenzima	62
4.1.4 Actividad de ADC.	64
4.1.5 Efecto de ácido oxiacético.	65
4.2 Parámetros cinéticos.	
4.2.1 Actividad de ODC en distintos puntos de la curva de crecimiento.	66
4.2.2 Recuperación de la actividad de ODC al reiniciar el crecimiento.	67
4.2.3 Determinación de la constante de afinidad para ornitina (K_m).	69
4.2.4 Estabilidad de la enzima.	70
4.2.5 Regulación por poliaminas.	
4.2.5.1 Ensayo "in vivo".	70
4.2.5.2 Ensayo "in vitro".	72

5 - Efecto de inhibidores.	
5.1 Efecto de diaminobutanona.	73
5.1.1 Ensayos “in vitro”.	73
5.1.2 Ensayos “in vivo”.	75
5.2 Efecto de α -DFMO.	75
5.2.1 Efecto de DFMO sobre la actividad de la enzima.	76
5.2.2 Efecto de DFMO sobre la actividad de ODC “in vivo”.	77
5.2.3 Recuperación de la actividad enzimática al remover el DFMO de los cultivos.	79
5.2.4 Ensayo de una posible amplificación génica.	80
5.2.5 Reversibilidad de la unión.	81
5.2.6 Estabilidad de la enzima.	82
5.2.7 Entrada de DFMO.	83
5.3 Cultivos resistentes a DFMO.	84
5.3.1 Curva de crecimiento.	85
5.3.2 Actividad de ODC.	85
5.3.3 Transporte de putrescina.	86
5.3.4 Contenido endógeno de poliaminas.	86
6 - Inmunoprecipitación.	87
7 - Determinación del PM de ODC de <i>C.fasciculata</i> en geles de SDS-PAGE.	
7.1 Purificación parcial de la ODC.	88
7.1.1 Tratamiento con solventes orgánicos.	89
7.1.2 Columna de intercambio iónico.	89
7.2 Incubación con ^3H -DFMO.	90
7.3 Gel de poliacrilamida-SDS.	90
8 - Clonado y secuencia de la enzima ODC.	
8.1 Detección del gen por hibridización.	91
8.2 Aislamiento del gen a partir de una biblioteca genómica.	93
8.3 Secuenciación del plásmido.	95
8.4 Secuencia de la proteína.	96
8.5 Comparación de la secuencia aminoacídica de ODC de <i>C.fasciculata</i> , <i>T.brucei</i> , <i>L.donovani</i> y mamífero.	97
9 - Detección del mensajero de ODC.	99
10 - Análisis molecular de la cepa resistente a DFMO.	100
IV. DISCUSION	102
V. BIBLIOGRAFIA	109

RESUMEN

En este trabajo, se han caracterizado distintos aspectos del metabolismo de poliaminas en el parásito tripanosomátido *C.fasciculata*, poniendo especial énfasis en la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), que cataliza el primer paso en la síntesis de estas sustancias.

El transporte de poliaminas al interior del parásito es muy bajo, y solo se ve aumentado cuando se expone a los cultivos a un inhibidor de la ODC, como es el difluorometilornitina (DFMO). Este dato indicaría que en condiciones normales, la maquinaria biosintética del parásito es suficiente para satisfacer sus requerimientos, pero que al someter a *C.fasciculata* a un ayuno de poliaminas por bloqueo de su biosíntesis se produce una marcada inducción de la entrada de estas sustancias desde el medio externo.

La enzima fue ampliamente caracterizada desde el punto de vista bioquímico y molecular. Se clonó y secuenció en su totalidad, determinándose a partir de estos datos su PM y las zonas que podrían ser importantes desde el punto de vista de su regulación "in vivo".

Por último se estudió la resistencia a DFMO del parásito y se determinó que este fenómeno no produce diferencias sustanciales en la expresión del gen de ODC.

Todas estas observaciones nos llevan a pensar que la enzima ODC de este parásito tiene propiedades que la hacen distintiva entre las estudiadas hasta el momento en otras células, y abren un nuevo capítulo en el estudio general de la estabilidad enzimática.

**Polyamine Metabolism in *Crithidia fasciculata*.
Characterization, cloning and sequencing of ODC enzyme.**

Key words: Polyamine, ODC, *Crithidia fasciculata*, PEST region.

In this work, different aspects of polyamine metabolism in the trypanosomatid parasite *Crithidia fasciculata* have been characterized, with special emphasis in ornithine decarboxylase (ODC), which catalyses the first step in the biosynthesis of these substances.

Polyamine transport inside the parasite is very low, but it is strongly increased when the cultures are exposed to an ODC inhibitors, like difluoromethylornithine (DFMO). This data could indicate that in normal conditions, the biosynthetic machinery of the parasite is enough to satisfy their requirements, but when *C. fasciculata* suffers polyamine starvation, by blocking their biosynthesis, there is a great induction of the transport of these substances from the external medium.

The enzyme was characterized from the biochemical and molecular point of view. It was cloned and sequenced, and the molecular weight, and some regions that could be considered important for its "in vivo" regulation were determined from the sequence.

Last, we studied the resistance to DFMO, and we determined that this phenomena does not produce substantial differences in the expression of the ODC gene.

Taken all together, these observations allow us to state that the ODC enzyme from this parasite has properties that make it different from the other studied up to this moment, opening a new chapter in the general study of enzyme stability.

INTRODUCCION

POLIAMINAS

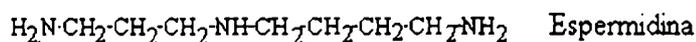
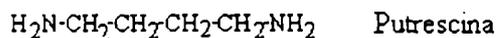
1- RESEÑA HISTÓRICA.

En 1678 Antonie van Leeuwenhoek describió en su famosa carta a la Royal Society en Londres el primer análisis microscópico de los espermatozoides humanos (Leeuwenhoek,1678). También describió la formación gradual de cristales incoloros en el fluido seminal, que recién cien años más tarde fueron conocidos como “espermina” (Landeburg, 1888). La sustancia se purificó y más tarde fue sintetizada por el grupo de Rosenheim (Rosenheim, 1924). Aun se desconoce la función fisiológica de altas concentraciones de espermina en el semen. Mientras se aislaba la espermina, se descubrió un compuesto relacionado: la espermidina (Dudley, 1924). A partir de animales en decomposición se aisló otro compuesto relacionado, al que se le dió el nombre de putrescina debido a su origen y a su potente olor.

2- CARACTERISTICAS GENERALES:

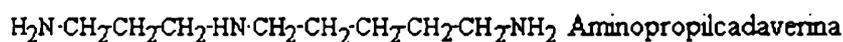
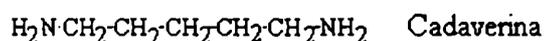
Las poliaminas son moléculas orgánicas sencillas, de bajo peso molecular, ampliamente distribuidas en todos los seres vivos. A pH fisiológico se encuentran como policationes, lo cual les permite interactuar con moléculas cargadas negativamente como ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos. Además, su esqueleto carbonado les permite interactuar hidrofólicamente con estructuras como las membranas celulares (Frydman, 1990).

Las poliaminas más comunes son la putrescina (1,4 diaminobutano), la espermidina (N-aminopropil 1,4, diaminobutano) y la espermina (N,N'-bisaminopropil 1,4- diaminobutano).



También existen en la naturaleza otras poliaminas “no comunes”. En la bacteria *Thermus thermophilus* (Oshima 1983, Oshima 1991) y otras termófilas fueron descritas una gran variedad de poliaminas nuevas como la norespermidina (caldina), la norespermina (termina), la caldopentamina y la homocaldopentamina. Aparentemente estos compuestos serían sintetizados cuando estos microorganismos crecen a muy altas temperaturas, y serían esenciales para estabilizar distintas macromoléculas, como así también para una fiel síntesis proteica.

La cadaverina (1-5 diaminopentano) y la aminopropilcadaverina han sido identificadas en varios organismos como *Neurospora crassa* y *E.coli*.



Cadaverina y aminopropilcadaverina se encuentran en mayor concentración en mutantes auxótrofas para poliaminas. También se han encontrado concentraciones muy altas de estas poliaminas en plantas leguminosas (Gamarnik et al., 1991; Smith, 1975) en las que podrían participar en las distintas rutas metabólicas que conducen a la biosíntesis de alcaloides.

3- FUNCION EN LA NATURALEZA.

Aunque está claro que la presencia de las poliaminas es esencial para el desarrollo celular, aun no se han podido establecer completamente sus funciones “in vivo”. Participan en una gran cantidad de procesos biológicos como la síntesis de DNA, RNA y proteínas (Algranati et al., 1977), estabilidad de las membranas biológicas (Mogh, 1959) y la regulación de proteínas quinasas (Kuehn et al., 1983; Jacob et al., 1983).

Además, pese a que en la naturaleza se encuentran en forma libre, se las puede encontrar como derivados acetilados, conjugados con otros compuestos fisiológicos, formando parte de moléculas complejas o alcaloides, y unidas a estructuras macromoleculares (Tabor et al., 1976; Bachrach, 1973).

El esquema muestra el camino de biosíntesis y degradación de las poliaminas. En células de mamíferos, eucariontes inferiores, hongos y la mayoría de los protozoarios, la única ruta para la biosíntesis de putrescina involucra la enzima ornitina decarboxilasa, ODC (EC.4.1.1.17). En plantas y bacterias el panorama es un poco diferente: la primera de las poliaminas se puede sintetizar a partir de ornitina por acción de la ODC, o indirectamente, vía arginina y arginina decarboxilasa (ADC), a través del intermediario agmatina (Morris et al., 1966; Smith, 1985).

En células animales el aminoácido ornitina puede ser tomado del plasma o bien sintetizarse intracelularmente a partir del aminoácido arginina a través de una reacción enzimática catalizada por la arginasa. Una vez decarboxilada la ornitina por acción de la ODC, se le adiciona un grupo aminopropilo mediante una reacción catalizada por una aminopropiltransferasa, la espermidina sintasa. A la espermidina se le agrega un nuevo grupo aminopropilo, esta vez a través de una segunda aminopropiltransferasa, originando la espermina. El compuesto dador de grupos aminopropilos es S-adenosilmetionina decarboxilado, que a su vez se forma a partir de S-adenosilmetionina por acción de la enzima S-adenosilmetioninadecarboxilasa (AdoMetDC).

Las reacciones enzimáticas catalizadas por las aminopropiltransferasas son irreversibles, pero tanto la espermina como la espermidina pueden ser convertidas en putrescina por la acción sucesiva de dos enzimas: la espermidina/espermina-N-acetiltransferasa (SAT) y la poliaminooxidasa (POA). SAT cataliza la conversión de espermina en N-acetilespermina, siendo acetilCoA el dador del grupo acetilo. El compuesto N-acetilespermina es degradado por la acción de POA, originando espermidina y 3-acetamidopropanal. De la misma manera, la espermidina es sustrato de la SAT, originando finalmente putrescina y 3-acetamidopropanal.

5- CARACTERISTICAS DE LAS ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA BIOSINTESIS DE POLIAMINAS

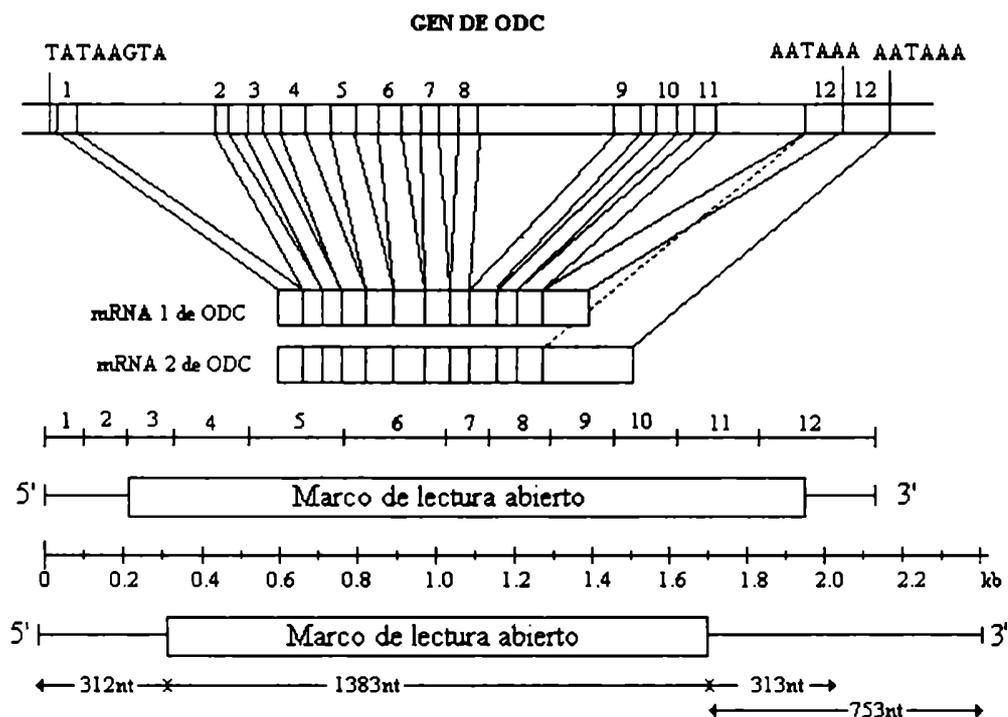
5.1 ORNITINA DECARBOXILASA

Como se mencionó, la ODC cataliza el paso limitante en la biosíntesis de poliaminas, sugiriendo que todo el proceso está estrictamente modulado, un concepto que ha sido confirmado en las últimas dos décadas. Esta es una enzima dependiente de piridoxal fosfato (PLP) que se caracteriza por rápidos cambios en su nivel, en respuesta a varios estímulos tróficos (Tabor et al., 1976, 1984; Pegg, 1982).

El análisis del DNA genómico de ratón por Southern blot reveló que las sondas de cDNA hibridaban con múltiples loci (McColongue et al., 1984; Kahana et al., 1984; Gupta et al., 1985) indicando la presencia de una familia de genes. En líneas celulares con el gen de la ODC amplificado por el agregado del compuesto α -DFMO, inhibidor específico e irreversible de la enzima, se observó que solo se amplificaba un fragmento de 6-7 Kb, lo que indicaría que hay sólo un gen activo en el genoma, y que las otras bandas corresponderían a pseudogenes (Kahana, 1989; Coffino, 1989).

El gen está compuesto por 11 intrones, dos de ellos ubicados en la región 5' no traducida. En esta región se encontró una TATA box canónica, una secuencia consenso responsable de la unión del factor transcripcional SP1 y otra de unión para cAMP. Además, esta zona resultó ser muy rica en G+C. El último exon (número 12) tiene dos secuencias de poliadenilación (AATAAA).

Las células de ratón expresan dos tipos de transcriptos, uno de 2 a 2.4Kb, y otro de 2.6 a 2.7Kb (Heby et al., 1990), probablemente surgidos a partir de los dos sitios de poliadenilación mencionados anteriormente. El mensajero tiene una región líder no traducida de 312 ó 313 nucleótidos, muy ricos en G+C, especialmente entre las posiciones -297 y -196, donde 85 de 102 bases son guanina o citocina. Esta composición de bases en el mensajero probablemente dé lugar a estructuras secundarias estables. Algunos autores postulan que las poliaminas se unirían a estas regiones, alterando la estructura secundaria, y modulando así su propia síntesis (Coffino et al., 1986, Grens et al., 1990).

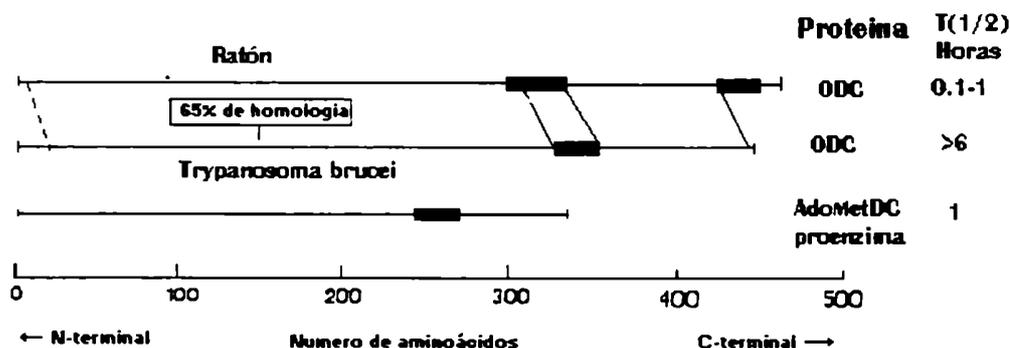


La ODC se encuentra en muy bajas concentraciones en las células, representando solo el 0.0001% de la fracción proteica citoplasmática. Ha sido clonada a partir de un gran número de organismos; entre otros: *Escherichia coli* (Boyle et al., 1994), varias especies de mamíferos: *Mus musculus* (ratón) (McConlogue et al., 1984), *Rattus norvegicus* (rata) (van Kranen et al., 1987) *Homo sapiens* (hombre) (Hickok et al., 1987), *Bos taurus* (bovino) (Yao et al., 1995); los nematodos *Caenorhabditis elegans* (Macrae et al., 1995) y *Panagrellus redivivus* (Von Besser et al., 1995); insectos: *Drosophila melanogaster* (Rom et al., 1993), levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* (Fonzi et al., 1987); los tripanosomátidos *Leishmania donovani* (Hanson et al., 1992) y *Trypanosoma brucei* (Phillips et al., 1987); hongos *Neurospora crassa* (Williams et al., 1992), existiendo entre estas enzimas una gran diferencia de tamaño y de identidad en secuencia de aminoácidos. La ODC de mamíferos se encuentra naturalmente formando un homodímero.

	Identidad (%)	Tamaño del monómero número de aminoácidos
<i>Mus musculus</i>	100	461
<i>Rattus norvegicus</i>	99	461
<i>Homo sapiens</i>	95	461
<i>Bos taurus</i>	94	461
<i>Trypanosoma brucei</i>	64	445
<i>Saccharomices cerevisiae</i>	47	466
<i>Drosophila melanogaster</i>	43	394
<i>Caenorhabditis elegans</i>	43	422
<i>Panagrellus redivivus</i>	43	435
<i>Leishmania donovani</i>	41	707
<i>Neurospora crassa</i>	41	484
<i>Escherichia coli</i>	15	732

La ODC de mamífero es una de las enzimas más inestables conocidas hasta el momento, con una vida media menor a los 30 minutos (Hayashi et al., 1995). Tiene dos regiones (aminoácidos 298-333 y 423-449) que son muy ricas en los aminoácidos prolina (P), glutámico (E), serina (S) y treonina (T) que se han denominado “regiones PEST”. Estas regiones, fundamentalmente la que está localizada en el extremo 3’ del gen, se cree que son las responsables de su rápida degradación intracelular (Rogers et al., 1986). Se pudo transformar la ODC de mamíferos de una proteína con corta vida media intracelular a una estable, eliminando solamente los últimos 37 aminoácidos de su extremo carboxilo terminal (Ghoda et al., 1989). Por otro lado, se demostró que la proteína de *T. brucei*, que tiene una vida media de alrededor de 6 horas, se podía transformar en inestable, construyendo una proteína quimérica, con el agregado del extremo 3’ de la ODC de mamífero (Ghoda et al., 1990).

En la página siguiente se ve un esquema de las enzimas ODC de ratón y *T. brucei*, y la enzima AdoMet DC. En todos los casos la zona marcada en negro indica la región PEST.



Se ha determinado la localización del sitio activo. La región comprendida entre los aminoácidos 290 a 340 conforman un dominio altamente hidrofílico (Heby et al., 1990). Esta región se halla muy conservada en las ODC provenientes de rata, ratón, células humanas, *T.brucei* y *L. donovani*. Se realizaron estudios de unión a DFMO radioactivo, y se determinó que la cisteína en posición 360 se une covalentemente al compuesto. Esa cisteína se halla comprendida en el nonapéptido WGPTCDGL(I)D conservado en todas las proteínas mencionadas anteriormente. La región que contiene los primeros 423 aminoácidos es la que mantiene la capacidad catalítica (Ghoda et al., 1989).

Por otro lado, una lisina ubicada en la posición 69, y que está comprendida en la región PFYAVKCN, sería la responsable de formar una base de Schiff reversible con el cofactor PLP. Esta secuencia se halla muy conservada también entre las especies mencionadas anteriormente (Poulin et al., 1992).

5.2 S-ADENOSILMETIONINA DECARBOXILASA

La AdoMetDC, al igual que la ODC, se encuentra a muy bajas concentraciones en las células, pero es inducida por estímulos de crecimiento (Heby et al., 1990). Al igual que en el caso de la ODC, los análisis de Northern blot revelan dos mensajeros de distinta longitud, de 1.7-2.4 y otro de 3-3.6 Kb, que se atribuyen a la presencia de dos sitios de poliadenilación (Marie et al., 1992). Estos mensajeros se expresan en forma diferencial dependiendo de la especie, el tejido y las condiciones fisiológicas.

El mensajero tiene una secuencia no traducida muy rica en G y C, que podría formar estructuras estables.

La AdoMetDc es la única dentro del grupo de decarboxilasas de mamíferos que utiliza un piruvato unido en forma covalente como cofactor, en lugar de PLP (Pegg, 1977). Se sintetiza como una proenzima de 38.4 kD, y posteriormente se cliva en dos subunidades de 30.7 y 7.7 kD respectivamente. El clivaje ocurre entre los residuos de glutamina 67 y serina 68. Luego del clivaje, la glutamina se transforma en el extremo carboxilo terminal de la subunidad pequeña (subunidad β) mientras que la serina se convierte en piruvato y queda situada en el extremo amino terminal de la subunidad grande (subunidad α) (Stanley et al., 1989). La enzima nativa contiene dos subunidades α y dos β , formando por lo tanto un heterotetrámero. La putrescina estimula el clivaje de la proenzima, y también aumenta la actividad de la enzima disminuyendo el K_m por el sustrato AdoMet. También es de rápido recambio, con una vida media de menos de una hora (Heby et al., 1990; Pegg, 1984). Tiene una región PEST en la subunidad α , aunque los factores que afectan su regulación no están muy estudiados.

5.3 ESPERMIDINA/ESPERMINA N-ACETILTRANSFERASA:

Los niveles de esta enzima son normalmente muy bajos, pero aumentan rápidamente por poliaminas ó sus derivados. La enzima se expresa como un monómero de 20kDa, y aparentemente no sufre modificaciones post-traduccionales. En su forma activa probablemente existe como un dímero ó un tetrámero, y tiene una vida media de alrededor de 30 min, aunque no se le han encontrado secuencias PEST, como en otras proteínas de rápido recambio (Xiao et al., 1995). Se expresa como un único transcrito de 1.3 kb, que contiene un marco de lectura abierto de 171 aminoácidos. Es llamativo que la SAT, al igual que la ODC y la AdoMet DC, tiene una larga región 5' no transcripta muy rica en G y C. Entre todas las SAT estudiadas hasta el momento, existe una región aún más conservada que la secuencia de la zona traducida, localizada 120 nucleótidos río arriba del primer AUG. Aun se halla en estudio el papel que juega esta secuencia tan conservada en el control transcripcional de la SAT (Xiao et al., 1995).

6- INHIBIDORES DE LA ORNITINA DECARBOXILASA:

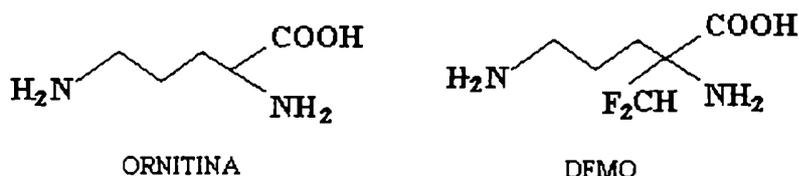
6.1 INHIBIDORES REVERSIBLES:

Los primeros inhibidores que se han descrito para la ODC, son principalmente análogos estructurales de la ornitina y la putrescina, y su uso brindó información muy valiosa sobre los requerimientos de unión al sitio activo, a pesar de que en muchos casos no eran lo suficientemente eficaces como para modificar los niveles intracelulares de poliaminas (Mamont et al., 1980; Stevens et al., 1980). Dos compuestos fueron de particular importancia en este aspecto, la α -metilornitina y la α -hidrazinoornitina. El primero es un inhibidor competitivo, que puede ser utilizado para bloquear la acción de ODC en aquellos cultivos donde la concentración de ornitina es baja, pero no es lo suficientemente activo para uso general. El otro, por el contrario, es un inhibidor muy potente, pero reacciona con el PLP, por lo tanto carece de especificidad. Se encontró que ambos inhibidores estabilizan a la ODC en el interior de las células, y por ende disminuyen su efectividad. Otro inhibidor preparado con la esperanza de que actuara como un "ejemplo de multisustrato", fue el N-(5'-fosfopiridoxil)-ornitina. Resultó ser un buen competidor del PLP, aunque era captado en muy baja cantidad por las células.

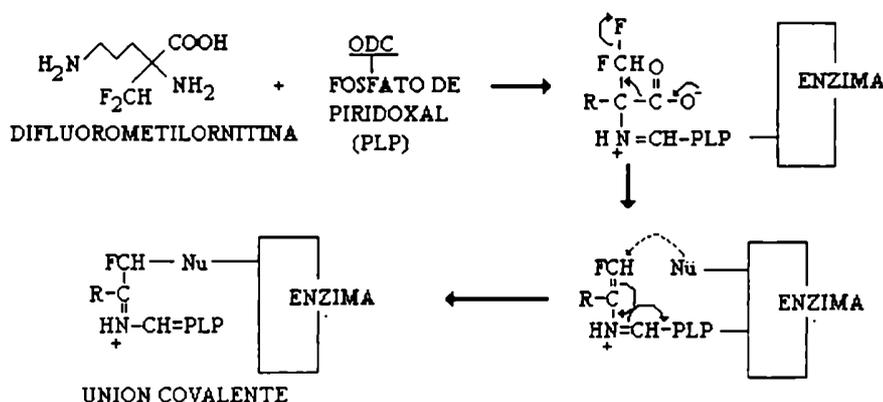
También se han descrito algunas aminas que tienen actividad inhibitoria sobre la ODC, entre ellas la 1,4-diaminobutanona, análogo estructural de la putrescina. Este compuesto es inhibidor competitivo de la ODC, causa una disminución en el contenido intracelular de espermidina y espermina, y es capaz de activar a la AdoMetDC; sin embargo se vió que muchas de estas aminas no solo afectaban a la ODC sino también a la AdoMetDC y a la espermidina sintasa (Stevens et al., 1977).

6.2 INHIBIDORES IRREVERSIBLES:

El primer inhibidor de la ODC realmente útil, fue el difluorometilornitina (DFMO). Fue diseñado como un inhibidor irreversible activado por la enzima (Metcalf et al., 1978). Es un análogo estructural de la ornitina, al que se le reemplazó un hidrógeno del carbono en posición α por un metilo con dos fluoruros. Este compuesto es reconocido y decarboxilado por la ODC.



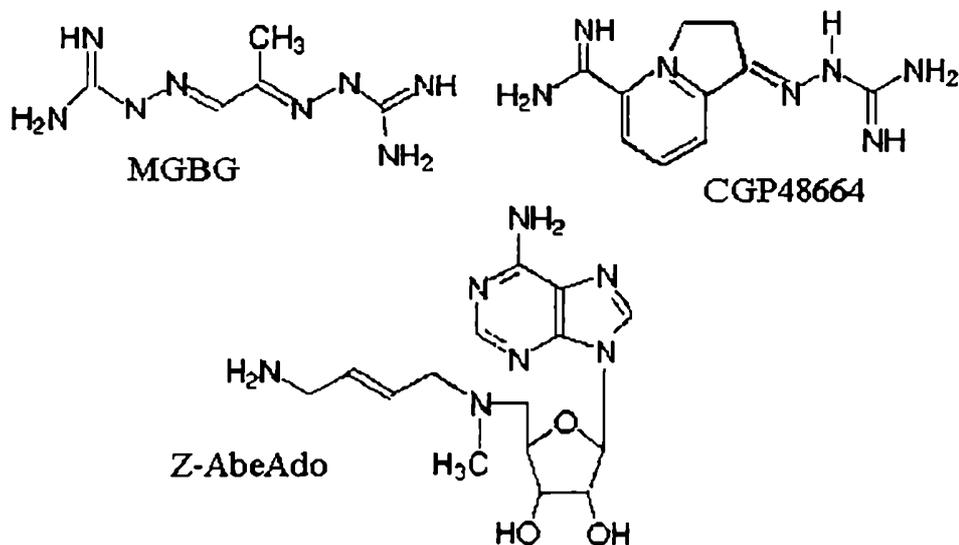
Una vez decarboxilado, da lugar a un compuesto altamente reactivo, que reacciona con un residuo de cisteína situado en posición 360 (que estaría involucrado en el sitio activo), quedando unido covalentemente a la enzima (Poulin et al., 1992).



7- INHIBIDORES DE LA S-ADENOSILMETIONINA DECARBOXI- LASA

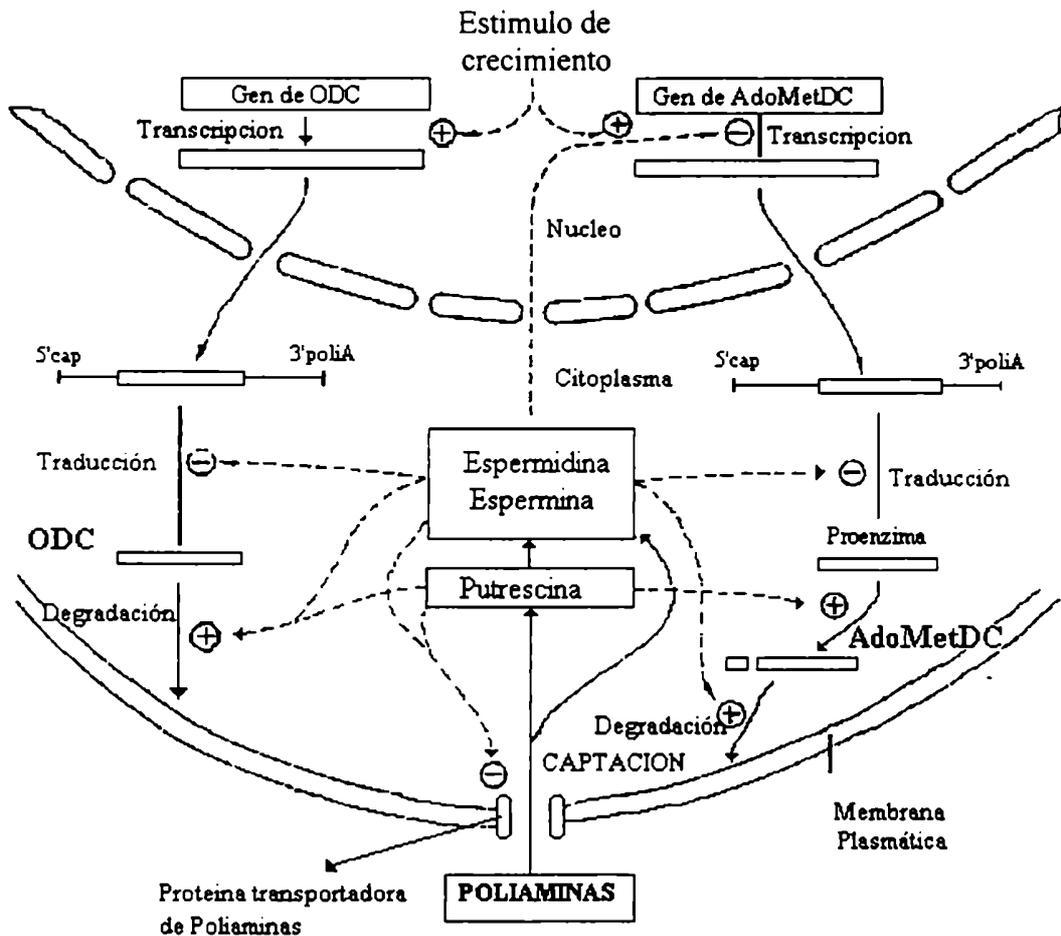
El agente antileucémico metilglioxal bis (guanilhidrazona) (MGBG) es un potente inhibidor de la enzima (Williams-Ashman et al., 1972). Es un inhibidor competitivo de la AdoMetDC activada por putrescina. A pesar de ser un inhibidor muy potente, no es demasiado específico, ya que también inhibe a la diamino oxidasa, induce a la SAT, y ejerce una variedad de efectos tóxicos en la mitocondria. Además, estabiliza a la AdoMetDC, previniendo su degradación y aumentando su vida media más de diez veces. Recientemente, se han sintetizado análogos del MGBG, que son inhibidores más potentes y específicos; el que ha dado mayor resultado es el 4-amidinoindan-1-uno 2'amidinohidrazona (CGP 48664) (Regenass et al., 1994).

Otro tipo de inhibidores que se utilizó fueron compuestos nucleósidos análogos de la AdoMet ó la AdoMetDC, como es la Z-Abe-Ado (Casara et al., 1989). Esta molécula reacciona con el piruvato de la subunidad α , y a través de una transaminación lo transforma en alanina (Shantz et al., 1992).



8- REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE POLIAMINAS

De todas las enzimas involucradas en los sucesivos pasos metabólicos que conducen a la biosíntesis de poliaminas, son importantes desde el punto de vista regulatorio la ODC, la AdoMetDC y la SAT. La POA y las espermidina y espermina sintasas se sintetizan en forma constitutiva, y se hallan siempre en exceso en el interior de las células.

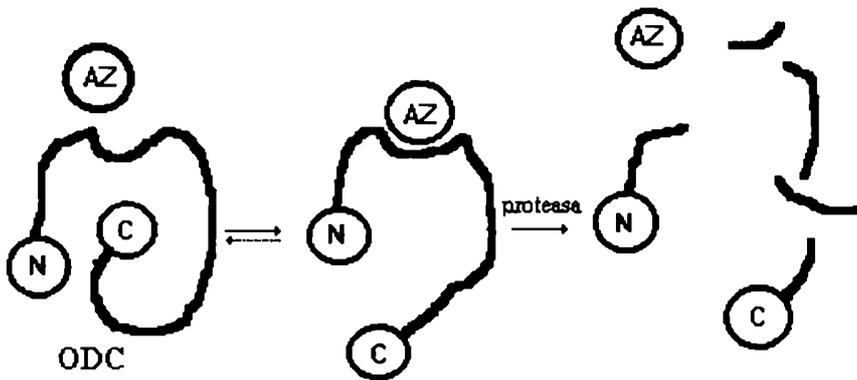


8.1 REGULACION DE LA ODC

La ODC, que cataliza el primer paso que conduce a la síntesis de putrescina, es la enzima más regulada. En células de mamíferos es una proteína minoritaria (el 0.0001% del total), pero su actividad aumenta cientos de veces luego de un estímulo hormonal, por factores de crecimiento ó inducción de la regeneración tisular (Porter et al., 1987). Este cambio en la actividad puede ser producido por una variación en la velocidad a la que se transcribe el mensajero, o por amplificación del gen de la ODC por algun estímulo exógeno como el agregado de alguna droga inhibitoria (Hayashi, 1989, Hanson et al., 1992); tambien puede suceder que la enzima se modifique de algun modo que aumente su afinidad por el sustrato.

Por otro lado, tambien existen mecanismos de regulación que disminuyen la actividad de la enzima, como la interconversión de la proteína activa a una forma inactiva ó el aumento de la síntesis de antizima, una proteína que en células de mamíferos dirige la degradación de ODC (Heller et al., 1976; Canellakis et al., 1985).

La antizima inhibe la actividad de ODC al formar un complejo ODC-antizima. que causa la exposición del extremo carboxilo de la proteína (Li et al., 1993), acelerando su degradación por el proteosoma 26S. Este proceso es dependiente de ATP, pero no de ubiquitina (Murakami et al., 1992).



8.2 REGULACION DE LA S-ADENOSILMETIONINA DECARBOXILASA

Las poliaminas espermidina y espermina tienen efecto inhibitorio sobre la transcripción del mensajero de la AdoMetDC, mientras que la putrescina no. Cuando las células se depletan de poliaminas, utilizando inhibidores específicos, los niveles de mensajero de AdoMetDC aumentan casi al doble, y este efecto puede ser contrarrestado por el agregado de espermidina ó espermina, siendo espermidina más eficiente. De todas maneras, este aumento en la transcripción no explica completamente el enorme aumento en la tasa de síntesis de la AdoMetDC. Además, las poliaminas espermidina y espermina afectan la traducción del mensajero. Esto condice con el movimiento del mensajero de la enzima desde pequeños a grandes polisomas luego del agregado de DFMO, que produce la disminución de los niveles de poliaminas intracelulares. Se piensa que la putrescina podría actuar en este punto, activando la conversión de la proenzima en los dos polipéptidos. La degradación de AdoMet DC, es estimulada por espermina, y en menor proporción por espermidina, mientras que la putrescina no tiene ningún efecto.

Resumiendo, la AdoMetDC es estabilizada cuando disminuye el contenido intracelular de poliaminas; sin embargo, todos los inhibidores de la enzima conocidos hasta el momento, actúan también directamente sobre la misma.

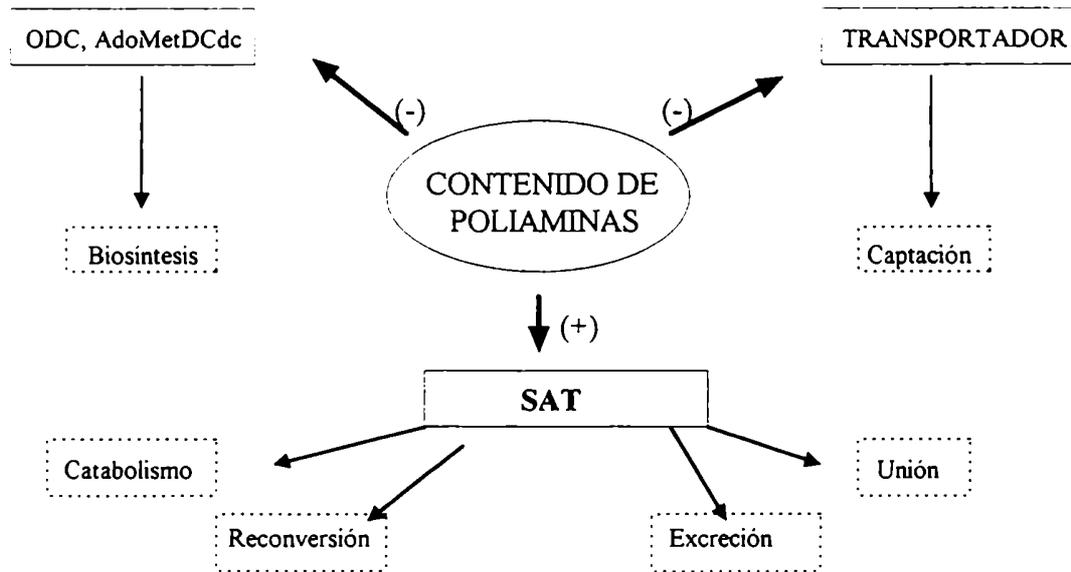
8.3 REGULACION DE SAT

La transformación de espermidina y espermina en putrescina, ocurre a través de dos reacciones irreversibles catalizadas por la SAT y la POA respectivamente (Pegg 1988).

En condiciones normales de cultivo, el contenido de poliaminas de un dado tipo celular, se mantiene dentro de un margen relativamente estrecho, cuyo límite superior estaría dado por la toxicidad de un exceso de poliaminas, y el inferior por los requerimientos de la célula para su crecimiento. Tanto la captación como la biosíntesis tienen la capacidad potencial de aumentar el contenido de poliaminas, mientras que la SAT actuaría como un paso limitante en el camino de reconversión de las poliaminas. Como la acetilación y la reconversión de las poliaminas facilitan la excreción y el catabolismo de las mismas respectivamente, la

SAT tiene la potencialidad de participar en la homeostasis de la célula disminuyendo el contenido de poliaminas (Shappell et al., 1993).

HOMEOSTASIS DE POLIAMINAS



La actividad de SAT es muy baja en células de mamíferos y se ve incrementada por diferentes estímulos, entre los que cabe mencionar la espermidina, el agregado de hormonas, hepatotoxinas, MGBG y ácido fólico. El aumento detectado en la actividad catalítica se debe a la conjunción de dos fenómenos: por un lado la disminución en la velocidad de degradación, y por otro lado a un incremento de la cantidad de proteína, que podría ser provocado por una mayor eficiencia de traducción del mensajero (Seiler 1989).

La extensa regulación de la SAT tiene una gran importancia fisiológica, ya que altos niveles intracelulares de espermidina ó espermina podrían ser tóxicos para las células. Se ha descrito en células de mamífero que sobreproducen ODC, que la acumulación excesiva de poliaminas intracelulares induce apoptosis (Poulin et al., 1995).

9- FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LAS POLIAMINAS

Las poliaminas se encuentran universalmente distribuidas en todas las células, en concentraciones finamente reguladas. Se sabe que son esenciales para el crecimiento y la división celular, pero es muy poco el conocimiento que se tiene acerca de sus funciones específicas y su mecanismo de acción, debido a que participan en gran parte en procesos sumamente complejos. Se deben considerar entonces numerosos factores como los mecanismos biosintéticos, la regulación de los niveles intracelulares, o la interconversión de una forma no acetilada polar, a una forma acetilada de menor polaridad (Marton et al., 1987).

A pH fisiológico, las poliaminas tienen carga positiva, y por ello sus funciones dentro de la célula son frecuentemente comparadas con las de los cationes inorgánicos. En este punto es importante destacar que la distribución de las cargas positivas a lo largo del esqueleto carbonado les confiere propiedades algo diferentes de las observadas en los cationes Ca^{++} y Mg^{++} . No se debe descartar la posibilidad de una participación conjunta de ambos cationes en procesos fisiológicos, que permiten mantener la estructura y funcionalidad de las células.

A nivel molecular se han realizado estudios muy diversos que involucran a las poliaminas en procesos básicos del metabolismo primario de cualquier célula, como:

- Interacción con ácidos nucleicos (DNA Y RNA).
- Efecto sobre el normal funcionamiento y estructura de ribosomas.
- Participación en diferentes aspectos de la síntesis proteica.

Se siguieron dos diferentes estrategias para avanzar en este terreno: la primera fue estudios en sistemas libres de células, que demostraron la participación de las poliaminas en distintos procesos biológicos (Heby et al., 1990, Kaiser et al., 1963), y la segunda fue la utilización de sistemas deficientes en la síntesis de poliaminas, o bien que directamente carecieran de ellas (mutantes auxótrofas para poliaminas). Estos organismos permitieron establecer qué funciones se ven alteradas por el ayuno de poliaminas.

9.1 ACIDOS NUCLEICOS Y POLIAMINAS

Existe un gran número de evidencias que indican que las poliaminas intervienen en la síntesis normal de DNA. Cuando se cultivan células en presencia de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas, existe una menor incorporación de [³H]-timidina. En *E.coli* sometida a un ayuno de poliaminas, la velocidad de replicación del DNA depende del agregado exógeno de estos cationes (Geiger et al., 1978). De la misma manera, en cultivos de linfocitos activados por mitógenos en presencia de DFMO, se vió que las células iniciaban la replicación de DNA al mismo tiempo que los controles, pero que la incorporación de [³H]-timidina era mucho menor (Fillingame et al., 1975; Seyfried et al., 1979). *In vitro*, la espermina protege al DNA contra la desnaturalización térmica y la ruptura mecánica, y puede producir condensación del mismo para formar estructuras compactas. La tendencia de la espermina a estabilizar dichas estructuras, deriva de la capacidad de esta poliamina de interactuar simultáneamente con diferentes hélices de DNA, lo cual es posible a partir de su longitud y flexibilidad, y a la posibilidad de ésta de establecer con el DNA uniones por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas (Egli et al., 1991).

También se ha descrito que las poliaminas promueven la transición del DNA de la forma B a la forma Z (Behe et al., 1981); asimismo estabilizan y producen torsiones del mismo.

9.2 POLIAMINAS Y t-RNA:

Las poliaminas estabilizarían estructuras secundarias como los "loops" de mRNA, tRNA y rRNA. Se demostró que el tRNA de bacterias y células animales está asociado a poliaminas en una relación 1:2-3 (Cohen 1971, Pochon et al., 1972). Empleando RMN de poliaminas enriquecidas con ¹³C, se encontró que tres moléculas de espermina permanecen fuertemente unidas a tRNA, y no pueden ser desplazadas por Mg²⁺, lo que indica que las poliaminas interactúan con estas moléculas con alta especificidad (Frydman et al., 1990). También existen evidencias de que las poliaminas son capaces de activar la aminoacilación de los tRNA (Peebles et al., 1983).

9.3 POLIAMINAS Y SINTESIS PROTEICA:

Se han realizado gran cantidad de estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, para determinar el rol que cumplen las poliaminas en la síntesis de proteínas.

Los estudios *in vivo* determinaron que los ribosomas tienen poliaminas unidas, y que éstas son esenciales para mantener la estructura de las partículas, además de asegurar la fidelidad de la traducción (Echandi et al., 1975; Garcia Patrone et al., 1977; Goldemberg et al., 1981).

Trabajando con una cepa de *E.coli* auxótrofa para poliaminas, sometida a un ayuno de estas sustancias, se vió que tanto la síntesis proteica como la velocidad de crecimiento se hallaban disminuídas (Morris et al., 1973) hecho que podía ser revertido a los niveles normales por el agregado de putrescina al medio de cultivo (Young et al., 1972). Por otro lado, trabajando con ribosomas aislados de esa misma cepa, y en ausencia de poliaminas, se vió que la síntesis de proteínas ocurría con un alto nivel de errores al reconocer ciertos codones específicos (Nastri 1991), además de iniciar la traducción en forma más ineficiente (Echandi et al., 1975) y presentar un perfil ribosomal alterado, con una alta proporción de subunidades defectuosas, con un coeficiente de sedimentación menor de 30S y una afinidad disminuída por las partículas 50S (Garcia Patrone et al., 1977).

10- TRANSPORTE DE POLIAMINAS:

El control del transporte de nutrientes e iones al interior y desde las células es importante para el mantenimiento de la homeostasis, los requerimientos metabólicos y fisiológicos y en el caso particular de los parásitos, para su adaptación al medio hostil que representan sus vectores y huéspedes (Zilberstein 1993).

Muchos organismos sintetizan sus propias poliaminas por acción de la ODC, y en el caso de las plantas y bacterias, a partir de arginina por acción de la ADC. Sin embargo, muchas células tienen sistemas de captación de poliaminas dependientes de energía (Seiler et al., 1990). Estos sistemas pueden ser utilizados para suplementar la síntesis *de novo* de poliaminas, en particular en aquellos casos en que por distintos factores se estimula el crecimiento, o en el caso particular en que la síntesis *de novo* se halle bloqueada, por ejemplo, por el agregado del inhibidor α -DFMO.

El crecimiento de promastigotes de *L.mexicana* en medios de cultivo ricos no se puede detener luego de sucesivos pasajes en presencia de DFMO, ya que en este caso se observa un considerable aumento de la captación de poliaminas hacia el interior de las células. Sin embargo, si el mismo experimento se realiza cultivando los parásitos en un medio definido carente de poliaminas, al cabo de varios pasajes, el crecimiento se detiene por completo (Gonzalez et al., 1991).

En contraste con esto, epimastigotes de *T.cruzi*, que no son capaces de sintetizar sus propias poliaminas, tienen un sistema de transporte cuya actividad se ajusta en respuesta a las condiciones de crecimiento (Hunter et al., 1994)

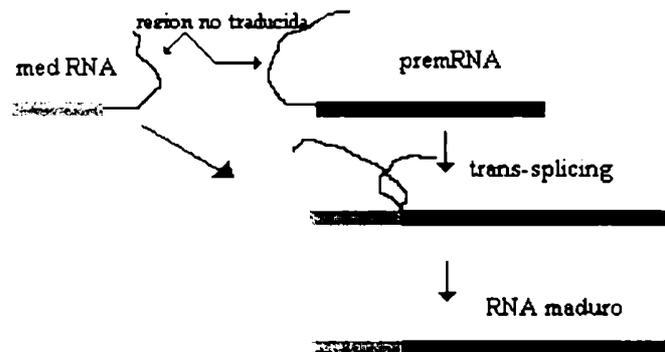
En células de mamífero, el sistema de captación es muy sensible al nivel de poliaminas. Se estableció que si las células se depletaban de poliaminas por el agregado del inhibidor de ODC, la tasa de incorporación de poliaminas aumentaba considerablemente (Alhonen- Hongisto et al., 1980). Esto ocurre por aumento de la $V_{m\acute{a}x.}$, sin alteración de la K_m , lo que sugiere que ante una disminución de las poliaminas intracelulares, aumenta el número de proteínas transportadoras de dichas moléculas (Mitchell et al., 1992) sin que se altere su afinidad por las mismas.

11- POLIAMINAS EN TRIPANOSOMATIDOS

GENERALIDADES DE TRIPANOSOMATIDOS:

Los tripanosomátidos son protozoos flagelados pertenecientes al orden Kinetoplastida, causantes de enfermedades en el hombre y animales domésticos en vastas regiones del planeta. Se caracterizan por tener una única mitocondria que contiene una red de maxi y minicírculos concatenados de DNA mitocondrial en la matriz adyacente al cuerpo basal del flagelo (Simpson 1986, 1987). Esta estructura se denomina **kinetoplasto**, y es la que le da el nombre al grupo. A su vez, el RNA mitocondrial, sufre una modificación post-transcripcional que consiste en el agregado ó delección de uridinas, denominada **edición** (Benne et al., 1986). Este proceso es esencial para que los genes mitocondriales, también denominados criptogenes, que producen transcritos no funcionales, se expresen correctamente. La información requerida para la edición está dada por los RNA guías (gRNA) que pueden estar codificados en los maxi ó minicírculos (Benne 1994).

Otra de las propiedades que hace de los tripanosomátidos un grupo tan particular, es la ausencia total de intrones en su DNA, y por último, el hallazgo de que todos los mensajeros se generan por el ligado de dos transcritos, proceso conocido como **trans-splicing**. Como resultado, todos los transcritos tienen una secuencia de 39 nucleótidos en común en el extremo 5'. Esta secuencia recibe el nombre de mini-exón, no es codificante, y deriva de un transcripto de 140 nucleótidos llamada *med RNA* (miniexon donador) (Gabriel et al., 1987).

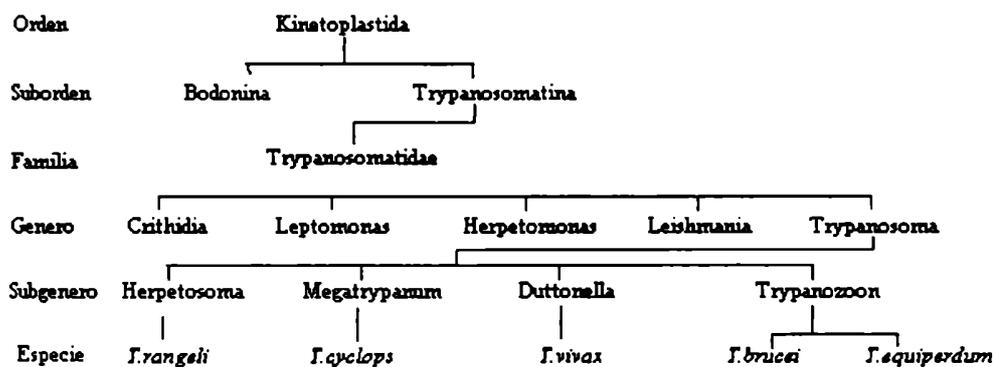


Se conocen dos tipos de relación protozoo-hospedador:

- i) kinetoplástidos monogénéticos que son parásitos de un único hospedador invertebrado.
- ii) kinetoplástidos digénéticos que son parásitos de dos hospedadores, generalmente un invertebrado y un vertebrado.

Dentro de este último grupo encontramos protozoos causantes de enfermedades en el hombre, entre ellos el *Trypanosoma brucei*, causante de la enfermedad del sueño (trpanosomiasis africana). También se encuentra el género *Leishmania*, que infecta al hombre causándole tres enfermedades: la leishmaniasis visceral o kala azar, causadas por *L. donovani* y *L. chagasi*; la leishmaniasis cutánea, enfermedad no tan agresiva como la anterior, causada por *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazoniensis* y *L. pifanoi*; y por último la leishmaniasis mucocutánea ó espundia, causada por *L. braziliensis*, que produce lesiones destructivas en la nariz, faringe, labios y cara (Jeronimo et al., 1992, Cox 1993). Además, se encuentra en este grupo el *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, que afecta a unos 20 millones de personas en toda Latinoamérica, de los cuales 2 millones viven en nuestro país (Carlomagno 1989).

Las 123 especies de parásitos monogenéticos estudiados hasta el momento, pertenecientes al primer grupo mencionado anteriormente, están comprendidas en los géneros *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia* y *Leptomonas* (McGhee et al., 1980). Son parásitos de artrópodos (principalmente Insecta, Diptera y Hemiptera, y también en Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera y Siphonoptera). Comúnmente se los llama “tripanosomátidos inferiores” porque el género *Leishmania* y *Trypanosoma* se piensa que surgieron a partir de un ancestro monogenético (Hoare 1972). La morfología del estadio en el insecto de los parásitos digenéticos es muy similar a las especies monogenéticas.

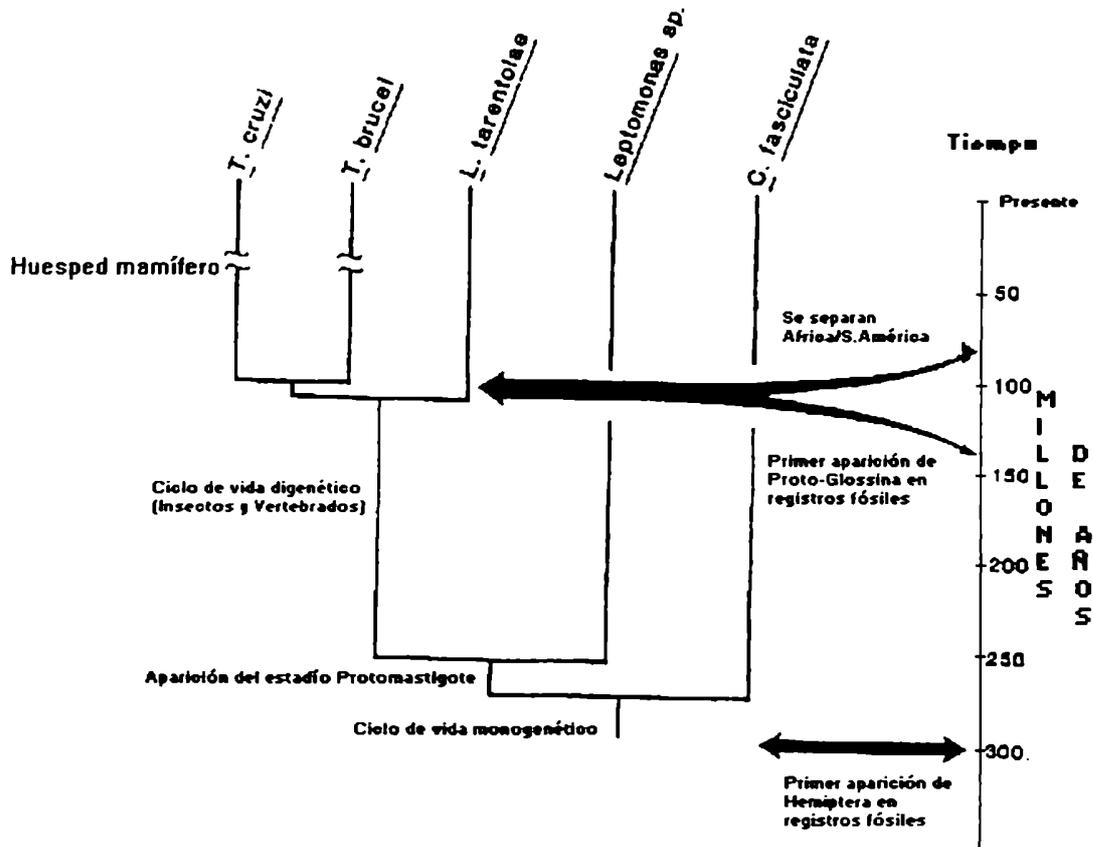


En particular *Crithidia fasciculata*, parásito sobre el cual se desarrolló este trabajo, es un protozoo no patógeno que habita el intestino de insectos, y que en algunos casos se lo ha descrito como hemo y endoparásito de anfibios (Al-Yaman et al., 1987).



Se ha podido reconstruir la historia evolutiva de cinco especies representativas de 4 géneros de protozoos Kinetoplástidos comparando la secuencia del rRNA mitocondrial 9S y 12S, que representan un grupo de secuencias conservadas que se prestan al análisis (Simpson et al., 1978; De la Cruz et al., 1985; De la Cruz et al., 1985).

Segun las escalas de tiempo tomadas por los autores, los kinetoplástidos ancestrales y el insecto hospedador aparecieron aproximadamente al mismo tiempo, sugiriendo una coevolución del parásito y el hospedador (Lake et al., 1988).



Los esfuerzos de los científicos por tratar de erradicar estas parasitemias, están dirigidos hacia el diseño de nuevas estrategias quimioterápicas (Bacchi et al., 1987). Los tratamientos con Pentostan, Glucantina y Anfotericina B no fueron demasiado exitosos dada la gran toxicidad de estos compuestos en los seres humanos. En el año 1980 apareció el primer trabajo que demostraba la importancia de las poliaminas en el metabolismo de los parásitos (Bacchi et al., 1980). Se demostró el bloqueo de la proliferación de los parásitos y la desaparición de la

enfermedad cuando se suministraba α -DFMO a ratas infectadas con *T.brucei*, causante de una enfermedad del ganado africano (“nagana”). Posteriormente, se vió que este compuesto disminuye el contenido endógeno de poliaminas y por ende inhibe la replicación de numerosos protozoos como *Giardia lamblia*, *Plasmodium falciparum*, *Pneumocystis carinii*, y de los tripanosomátidos *T.congolense*, *T.b. gambiense* y *T.b.rodhesiense*. El inhibidor fue efectivo en el tratamiento de humanos infectados con *T.b. gambiense* y *T.b. rodhesiense*, parásitos causantes de la enfermedad del sueño (Sjoerdsma et al., 1984).

MATERIALES Y METODOS

1-CEPA DE PARASITOS

Se utilizó la cepa de *Crithidia fasciculata* (ATCC 11745).

2-MEDIOS DE CULTIVO

2.1 Medio líquido para *Crithidia fasciculata* (Bacchi et al, 1974)

Infusión de hígado	5g/l
Proteosa peptona	7.5g/l
Infusión cerebro-corazón	7.5g/l
Extracto de levadura(*)	2g/l
NaCl	5g/l
KCl	5g/l
NaH ₂ PO ₄	0.5g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5g/l
Acido ascórbico	0.2g/l
Sacarosa	2.5g/l
Hemina	0.02g/l
MOPS	0.5g/l
pH final	6,7-7,2

Notas:

- Disolver las infusiones en agua caliente.
- Calentar la infusión de hígado 5 minutos a 60-70°C (precipitan gran parte de las proteínas), y filtrar por papel de filtro. Repetir.
- (*)Modificación de la receta original, Tesis Doctoral Margarita Bosch, (1990).
- Ajustar el pH con 2M Tris antes de esterilizar.
- Disolver la hemina en 0.05M NaOH, esterilizar por filtración, y guardar en stock (50mg/ml) a -20°C. Luego de esterilizar y llevar a pH, agregar al medio.

2.2 HOS-MEM II (Berens et al, 1975)

S-MEM	10.58g/l
NaHCO ₃	1g/l
MEM aminoácidos esenciales(50x)	10ml/l
MEM aminoácidos no esenciales(100x)	10ml/l
Piruvato de Sodio	110mg/l
MOPS(sal sódica)	6.28g/l
Glucosa	2g/l
Biotina	0.1mg/l
Acido p-aminobenzoico	1mg/l
Solución A	10ml/l

Notas:

•Disolver todos los componentes en agua bidestilada, y llevar a pH 7.2 con 5N NaOH. Esterilizar por filtración a través de Millipore de 0.22µm, y conservar a -20°C. Antes de usar, agregar 2.5ml de Solución B.

•Solución A (100ml)

Hipoxantina	150mg
Acido ascórbico	2mg
Vitamina B12	2mg
Albúmina bovina fracción IV- libre de ácidos grasos	150mg
Agua bidestilada	91ml
Acido tióctico*	4mg
Menadiona*	4mg
Acido retinoico*	4mg

* Disolver estos tres componentes en 1 ml de 95% etanol, y agregar a la solución anterior.

•Solución B

Disolver 250 mg de hemina y 500 mg de ácido fólico en 50ml 0.05N NaOH, llevar a volumen final 100ml, ajustar a pH 8 con 1N HCl, y esterilizar por filtración. Conservar a -20°C.

•Albúmina delipidada

Disolver 7g de albúmina en 70ml de agua destilada a temperatura ambiente. Agregar 3.5g de Darco, y llevar el pH a 3.0 por el agregado de 0.2N HCl. Colocar la solución en hielo, con agitación magnética, durante una hora. Centrifugar a 20.200 x g durante 20 minutos en centrífuga Sorvall con rotor SS34 a 2° C. Llevar el sobrenadante a pH 7.0 agregando 0.2N NaOH.

3- CULTIVO DE PROTOZOARIOS

Los parásitos se cultivaron a 28°C con agitación (200rpm). El crecimiento de los cultivos se siguió por contaje en cámara de Neubauer.

4 - DETERMINACION DE METABOLITOS DE POLIAMINAS

4.1 ELECTROFORESIS EN PAPEL

100×10^6 parásitos se resuspendieron en 0.5ml de PBS, y se incubaron con el sustrato radiactivo: ^{14}C -(U)-ornitina (20 $\mu\text{Ci/ml}$, 0.64mM), ^{14}C -putrescina (50 $\mu\text{Ci/ml}$, 0.45mM) durante los tiempos indicados en cada experimento. Después de centrifugar, los parásitos se resuspendieron en 100 μl de 0.2N ácido perclórico. Se neutralizó por agregado de 2M KOH. Se dejó durante una hora en hielo, se centrifugó, y se descartó el pellet. El sobrenadante se sembró en papel Whatman 3MM, y se realizó una electroforesis durante 3 horas a 600 volts, usando como buffer de corrida piridina: ácido acético: agua (10:100:890, pH 3.2). Los estándares se revelaron con reactivo de ninhidrina, y los compuestos radiactivos se detectaron directamente sobre el papel, monitoreando la tira en forma continua en un radiocromatógrafo Packard, Modelo 7201.

SOLUCIONES

PBS: $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ 81mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 19mM, ClK 3mM, ClNa 140mM, pH 7.4.

REACTIVO DE NINHIDRINA: Ninhidrina 1g, Acetato de cadmio 0.1g, Agua destilada 10ml, Acido acético 5ml, Acetona 85ml.

5 - CONTENIDO DE POLIAMINAS

5.1 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA

El contenido endógeno de poliaminas se determinó en un analizador automático de aminoácidos (Biotronik LC 1500), utilizando orto-oftaldialdehído como reactivo. Para ello, se resuspendieron 100×10^6 parásitos en 1ml de una solución de 4% ácido sulfosalicílico, 0.4mM EDTA.

6- CAPTACION DE POLIAMINAS

Como ya se describió en la Introducción, se determinó que la captación de poliaminas aumentaba considerablemente si el cultivo se desarrollaba por lo menos durante 7 horas en presencia de 10mM DFMO. Por lo tanto todos los ensayos de captación fueron realizados con cultivos desarrollados durante toda la noche en presencia de la droga, salvo en los casos en que se indique lo contrario.

6.1.1 CAPTACION DE PUTRESCINA

Cultivos en fase logarítmica de crecimiento se resuspendieron en 5-10ml de medio HOS-MEM II a una concentración de 20×10^6 parásitos/ml. Se agregó ^{14}C -putrescina (0.05 mCi/ml, $3.6 \mu\text{M}$), y a los tiempos indicados para cada experimento se tomaron alícuotas de 1 ml por duplicado, que se recibieron en 2.5 volúmenes de PBS-1mM putrescina a 0°C . Las suspensiones resultantes se filtraron a través de un filtro Millipore de $0.45 \mu\text{m}$, que se lavó dos veces con PBS-1mM putrescina, y después de secar, se determinó la radiactividad incorporada por las células retenidas en el filtro, en un contador de centelleo líquido (Rackbeta-1214, Pharmacia LKB).

6.1.2 CAPTACION DE ESPERMIDINA:

Se siguió el mismo protocolo, pero se incubaron los parásitos en presencia de ^3H -espermidina (1mCi/ml, 2.8 μM), recogiendo las fracciones en 2.5 volúmenes de PBS- 1mM espermidina y lavando los filtros con PBS-1mM espermidina.

6.1.3 CAPTACION DE ORNITINA:

En este caso los parásitos se incubaron en presencia de ^{14}C -ornitina (140 μM , 0.1mCi/ml). Se repitió el protocolo anterior, y los filtros se lavaron con PBS-1mM ornitina.

6.2- EFECTO DE INHIBIDORES DE LA RESPIRACION.

Para determinar los requerimientos energéticos del proceso, se hicieron ensayos de captación de putrescina incubando las células en presencia de inhibidores de la respiración como 2,4 dinitrofenol (2,4 DNP), cianuro de potasio (KCN) y arsenito de potasio (AsO_3K).

6.3 EFECTO DE UN INHIBIDOR DE SINTESIS PROTEICA.

Para determinar si para el proceso de captación se requería síntesis de nueva proteína transportadora, se hicieron ensayos de captación de putrescina en presencia de un inhibidor de la síntesis proteica en eucariontes como cicloheximida. Los cultivos se incubaron en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ del inhibidor, y se midió la captación de putrescina a tiempos que iban desde cero a cuatro horas.

6.4 ENSAYOS DE COMPETENCIA EN LA CAPTACION DE POLIAMINAS.

Se hicieron ensayos de captación de putrescina y espermidina en presencia de otras poliaminas ó sustancias análogas que podrían actuar como posibles competidores. En todos los casos, los competidores se utilizaron en concentración 0.5mM preincubando las células en presencia de los mismos durante una hora antes de realizar el experimento.

6.5 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS :

Mediante el gráfico de Lineweaver-Burk se midió la velocidad de entrada de putrescina en presencia ó ausencia de DFMO y se determinó la constante de afinidad (K_m) para el transporte de la misma . Para ello se hicieron ensayos de captación de cantidades crecientes de putrescina (en un rango de 2 a $40\mu\text{M}$) en cultivos que habían sido desarrollados durante 18 horas en presencia ó no de 10mM DFMO.

7-ESTUDIOS BIOQUÍMICOS DE LA ORNITINA DECARBOXILASA

7.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO:

El cultivo de parásitos se centrifugó 10 min a 5.000rpm.El pellet se lavó con 50mM Hepes, y se resuspendió en buffer de lisis (50mM Hepes pH 7.3, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 1mM PLP, 0.05% NP-40) a una concentración final de 10^9 parásitos/ml. Se dejó 30 minutos en hielo, agitando suavemente a intervalos regulares. Se sonicó 3 veces durante 15 segundos. Se centrifugó 20 minutos a 10.000 rpm, descartándose el pellet.

Todas las operaciones se llevaron a cabo en frío. Los extractos enzimáticos se guardaron a -70°C .

7.2 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ODC:

La actividad de ODC se cuantificó por la liberación de CO_2 a partir de ornitina radiactiva. La mezcla de reacción consistió en $1\text{-}^{14}\text{C}$ L-ornitina, (0.69mM, 55mCi/mmol), buffer de reacción (50mM Hepes pH 7.3, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PLP) y extracto enzimático, en un volumen final de 50 μl . La reacción se llevó a cabo en un tubo plástico con su tapa abierta, colocado dentro de un vial de vidrio herméticamente cerrado, que a su vez contenía en su interior un papel Whatman 3MM de 2x2cm, empapado en 2M KOH. Se incubó esta mezcla durante 30 minutos a 37°C con agitación. La reacción se detuvo por el agregado rápido de 50 μl de ácido perclórico 0.5M. Se dejó incubando durante media hora más, para permitir que se libere todo el $^{14}\text{CO}_2$ producido, y posteriormente la radiactividad unida al papel de filtro se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

7.3 PREPARACIÓN DE LA APOENZIMA:

Se preparó el extracto enzimático como se describe anteriormente, y se dializó una hora en frío contra 200 volúmenes de 50mM Tris pH 7.3, 0.5mM EDTA, 1mM DTT, 0.02% Brij 35, 10mM hidroxilamina. Se sabe que esta sustancia reacciona con el PLP, liberando a la enzima de su contenido de cofactor endógeno (Balasundaram et al., 1989). Luego se dializó durante 12 horas contra el mismo volumen de buffer, pero sin hidroxilamina. Al cabo de este tiempo, los extractos dializados se centrifugaron a 20.000 xg, a 4°C durante 15 minutos. Los extractos obtenidos eran inactivos y se determinó la recuperación de la actividad de ODC por el agregado de cantidades crecientes de PLP al ensayo “in vitro”.

7.4 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE ODC

La cicloheximida es un conocido inhibidor de la síntesis de proteínas en eucariontes, actuando a nivel de la peptidil transferasa.

Con el objeto de determinar la estabilidad “in vivo” de la enzima, los cultivos se incubaron en presencia de 50µg/ml de cicloheximida, se recogieron alícuotas a los tiempos indicados y se determinó la actividad de ODC de cada fracción.

7.5 MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR POLIAMINAS.

Para determinar si el agregado de los productos finales de la reacción catalizada por ODC ejercía algún efecto sobre su actividad, a cultivos desarrollados en medio definido (HOS MEM II) se les agregó 10mM putrescina ó 1mM espermidina durante 8 horas, recogiendo alícuotas a diferentes tiempos. Los extractos enzimáticos se prepararon de la forma usual, y se midió actividad de ODC de los mismos.

7.6 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ADC:

La reacción se llevó a cabo de igual manera que en el caso de la determinación de actividad de ODC, midiéndose la cantidad de CO₂ liberado, siguiendo el mismo procedimiento experimental. La única diferencia es que se utilizó como sustrato L-(U-¹⁴C)-Arg (0.1mCi/ml, 0.53mM).

7.7 INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR ANÁLOGOS DE POLIAMINAS

7.7.1 INHIBICIÓN POR DIAMINOBTANONA (DAB)

Diaminobutanona es un análogo de putrescina, que en algunos casos ya descritos inhibe la actividad de ODC. Se hicieron ensayos "in vitro" para determinar qué tipo de inhibidor era, y su constante de inhibición. En primer lugar, se incubaron los extractos enzimáticos en presencia de cantidades crecientes de DAB (0 a 10 mM) para determinar si efectivamente era inhibidor de ODC. En un experimento posterior, se hizo un ensayo de competencia con las mismas concentraciones de inhibidor, pero en presencia de dos concentraciones diferentes de ornitina radiactiva (0.35 y 0.69mM). Los valores obtenidos se representaron según el gráfico de Dixon, que permite determinar el tipo de inhibición y la correspondiente constante.

7.7.2 INHIBICIÓN POR α -DFMO

Como se mencionó anteriormente, el compuesto DFMO es un análogo de ornitina que se comporta como un inhibidor irreversible de la ODC. Se cultivaron parásitos en medio definido HOS-MEM II en presencia de cantidades crecientes del inhibidor, en un rango de 5 a 50mM. Los extractos enzimáticos se prepararon de la manera ya descrita, pero lavando previamente los parásitos dos veces con 50mM Hepes. Luego se midió actividad de ODC.

Por otro lado, se hicieron ensayos de competencia "in vitro" con el inhibidor, con extractos enzimáticos obtenidos a partir de cultivos normales, para determinar la constante de inhibición del mismo.

7.7.2.1 RECUPERACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ODC LUEGO DE LA REMOCIÓN DEL DFMO

Los parásitos se cultivaron 24 horas en medio definido HOS MEM II, en ausencia ó presencia de 10mM DFMO. Los cultivos se centrifugaron, se lavaron 2 veces con 50mM Hepes, y se resuspendieron en medio fresco, sin DFMO, reiniciando la incubación. Se tomaron muestras a distintos tiempos,

y se midió actividad de ODC. A una alícuota del cultivo ya lavado, se le agregó ^{35}S -metionina ($5\mu\text{Ci/ml}$, $0.2\mu\text{M}$) y se midió la incorporación del aminoácido radioactivo en el material insoluble en ácido tricloroacético (TCA) a los mismos tiempos indicados anteriormente.

8 - INMUNOPRECIPITACION

Se dispuso de un antisuero policlonal antiODC de mamíferos, gentilmente cedido por el Dr. Lo Persson (Universidad de Lund, Suecia).

Se incubaron alícuotas de $50\mu\text{l}$ de extracto enzimático (preparado de la forma usual) de *C. fasciculata* y de $100\mu\text{l}$ de extracto obtenido a partir de células de hígado de rata, en presencia de dos volúmenes distintos de antisuero antiODC de mamífero (2 y $5\mu\text{l}$ respectivamente), durante 1 hora a 0°C . Al cabo de ese tiempo, se agregaron $20\mu\text{l}$ de proteína A, (IgG, 10mg/ml) a cada tubo, y se siguió incubando durante 1 hora más a la misma temperatura para permitir que precipitara el complejo antígeno-anticuerpo. Las suspensiones se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 minutos, y se midió la actividad de ODC de los sobrenadantes.

9- DETERMINACIÓN DEL PM DE LA ODC DE CRITHIDIA FASCICULATA EN GELES DE SDS-PAGE

9.1 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA ODC :

9.1.1 EXTRACCIÓN CON SOLVENTES ORGÁNICOS:

Se preparó un extracto enzimático como se describió anteriormente, pero en el momento de la ruptura, se agregó al buffer un "coctel" de inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 0.1mM Leupeptina, $10\mu\text{M}$ E-64). Los parásitos se resuspendieron a una concentración final de $3 \times 10^9/\text{ml}$. Se centrifugó el extracto obtenido a 100.000g durante 1 hora descartándose el precipitado. El extracto así preparado se colocó en un baño de hielo y sal (temperatura aproximada -10°C) y se le agregó lentamente medio volumen de acetona, previamente enfriada a la misma temperatura (concentración final 35%), agitando en forma constante. Se dejó agitando la suspensión por 15 minutos, y luego se centrifugó a 20.000g durante 15 minutos a -10°C , descartándose el precipitado.

9.1.2 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO:

La fracción soluble obtenida del paso anterior se sembró en una columna de DEAE Sepharose (Pharmacia/LKB Biotechnology, Inc., Piscataway, N.J.) en un aparato de FPLC, en el mismo buffer de ruptura, pero con el agregado de 0.02% Brij 35 y 0.1M NaCl. La columna se lavó con el mismo buffer, y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl desde 0.1 a 0.5M. Se recogieron fracciones de 2ml. Se midió actividad de ODC de las fracciones obtenidas, se juntaron las fracciones más activas, y se dializaron 2 horas contra el mismo buffer para eliminar la sal.

9.2 UNIÓN A ³H-DFMO:

Se preincubó el extracto enzimático parcialmente purificado (eluido de la DEAE) en presencia de DL α -[3,4-³H] DFMO (1 mCi/ml, 27.12Ci/mmol), buffer Hepes 50mM, 1mM DTT, 0.5mM EDTA pH 7, con 1mM PLP e inhibidores de proteasas. Al cabo de 1 hora de incubación a 37°C, se agregó DFMO concentración final 0.125mM, 20 μ g de citocromo C y 1ml de cloroformo:metanol (1:2). Se dejó precipitar a -20°C durante 1 hora, se centrifugó a 10.000x g durante 15 min, se descartó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en el buffer de ruptura utilizado para preparar las muestras para SDS-PAGE.

9.3 GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS:

Se sembraron las muestras, previamente calentadas 3 minutos a 100°C, resuspendidas en buffer de ruptura que contenía:

Urea	6M
Glicerol	10%
Tris-HCl, pH6.8	0.025M
SDS	2%
β -Mercaptoetanol	0.13M
Azul de Bromofenol	0.01%

El gel se preparó con 12.5% poliacrilamida-0.1%SDS, y el gel concentrador con 5% acrilamida, ambos con 6M urea (Laemmli, 1970). Se corrió durante 16 horas a 6mA, y posteriormente se tiñó con una solución de Coomassie Blue R 250 (0.1%).

Una vez que el gel se decoloró, se sumergió en dimetilsulfóxido (DMSO) puro, durante 30 minutos, repitiendo una vez este procedimiento. Luego el gel se colocó durante 3 horas en una solución 22% (P/V) de PPO (2,5-difeniloxazol) disuelto en DMSO, y finalmente se sumergió en agua bidestilada, lavando repetidas veces. Se secó en un secador de geles (Bio Rad) y expuso sobre una placa radiográfica sensible a -70°C durante varias semanas.

10- CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas se cuantificaron según el método de Bradford (Bradford, 1976) ó según el método de Lowry (Lowry et al., 1951), previa precipitación de las mismas con deoxicolato de sodio (DOC) y ácido tricloroacético (TCA).

11-CLONADO Y SECUENCIA DE LA ORNITINA DECARBOXILASA DE *CRITHIDIA FASCICULATA*.

11.1 PREPARACIÓN DE DNA:

5×10^9 parásitos, se lavaron con PBS, y se resuspendieron en 5ml de "buffer de digestión" (10mM Tris-HCl pH7.9, 25mM EDTA pH8, 100mM NaCl, 0.5% SDS). Se agregó 1.5mg de proteinasa K, se incubó 15 minutos a 65°C, y luego 18 horas a 50°C, con agitación suave.

El lisado proteico se extrajo varias veces con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1) hasta la desaparición de proteínas en la interfase. Posteriormente la capa acuosa se centrifugó 2hs a 20.000xg en rotor SS34 para eliminar el DNA del kinetoplasto.

El DNA nuclear se precipitó con 0.5 volúmenes de 7.5M Acetato de amonio y 2 volúmenes de etanol 100% a -20°C durante una hora. Se centrifugó por 5 minutos a 4.000rpm. El pellet se lavó con etanol 70%. Se

resuspendió en buffer TE (10mM Tris pH 8, 1mM EDTA pH 8) y se dejó durante la noche a 37°C para facilitar la disolución.

A la solución de DNA se le agregó SDS hasta concentración final 0.1% y 5µl de RNAsa mg/ml (previamente calentada 10 minutos a 90°C para eliminar DNAsa) y se incubó una hora a 37°C.

Se agregó Acetato de amonio hasta concentración final 0.3M.

Se extrajo una vez con un volumen de fenol:cloroformo (1:1), y la capa acuosa nuevamente con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). A la fase acuosa se le agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó precipitar a -20°C. Se centrifugó 10 minutos a 10.000rpm. El precipitado obtenido se lavó con etanol 80%, y se resuspendió en un volumen pequeño de buffer TE (10-15µl).

El DNA obtenido se cuantificó midiendo su absorbancia a 260nm.

11.2 SÍNTESIS DE UNA SONDA ESPECIFICA PARA ODC:

Las regiones de la enzima que se unen al PLP y al sustrato están altamente conservadas entre muchas de las ODC estudiadas hasta el momento.

Se sintetizaron oligonucleótidos (“primers”) correspondientes a esas zonas ó a otras también conservadas, tomando como modelo la secuencia de la enzima de *Leishmania donovani*, y se utilizaron para fabricar una sonda homóloga mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello se utilizó como templado el DNA de *C. fasciculata* obtenido en el paso anterior.

Los primers sintéticos tenían en cada uno de sus extremos secuencias de restricción para Eco RI.

Sitio EcoRI

Primer 1: 5' CCG GAA TTC CCT TAC TTT GCC GTG AAA AGC AAC 3'

Primer 6: 5' CCG GAA TTC CGT GCC CGG GAA GCC GCC GCC GAT GTC 3'

Ciclos: 5 minutos 95°C

30x: 1 minuto 95°C

1 minuto 50°C

1 minuto 72°C

1x: 10 minutos 72°C, y luego a 4°C.

Se obtuvo un segmento amplificado de 540 pares de bases.

11.3 CLONADO DE LA SONDA

Luego de la reacción de PCR, se corrió un gel de agarosa 1% de bajo punto de fusión con los productos obtenidos, y se cortó del mismo la única banda amplificada obtenida. El trozo de gel cortado se diluyó con 3 volúmenes de agua. Se cuantificó el contenido de DNA por comparación con cantidades conocidas, y aproximadamente 25 ng del mismo se digirieron durante 2 horas con Eco RI. El segmento tratado se ligó con el vector pBluescript, previamente digerido con la misma enzima, en presencia de T4 ligasa, durante 18 horas a temperatura ambiente.

Se transformaron bacterias de *E.coli* cepa JM83 por electroporación, y se sembraron distintas diluciones en cajas de Petri con medio LB-ampicilina (100µg/ml). Al día siguiente se tomaron 12 colonias al azar, se sembraron en medio líquido LB-ampicilina, y se dejaron desarrollar durante la noche a 37°C con agitación vigorosa.

11.4 MINIPREPARACIÓN DE PLÁSMIDO:

Los cultivos (2ml) se centrifugaron 5 minutos a 10.000 rpm, y las bacterias se resuspendieron en 300 µl de buffer P1 (RNasa A 100µg/ml en 50mM Tris HCl, 10mM EDTA, pH8).

Se agregó igual volumen de buffer P2 (200mM NaOH, 1% SDS), agitando suavemente. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó igual volumen de buffer P3 frío (2.55M Kac, pH4.8), y se dejó en hielo durante 10 minutos, agitando a intervalos cortos. Se centrifugó 30 minutos a 10.000rpm a 4°C. Se separó el sobrenadante rápidamente, y se precipitó con 0.5 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó nuevamente durante 30 minutos a 10.000rpm. El precipitado se lavó con 70% etanol, se secó al vacío, y se resuspendió en un volumen apropiado de agua. El rendimiento aproximado fue de 3-4µg de plásmido por minipreparación.

Alicuotas del plásmido obtenido se digirieron con Eco RI, y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa 1%. Como resultado 4 de las colonias analizadas mostraron contener el fragmento insertado.

El fragmento subclonado se secuenció utilizando el kit de Amersham, Sequenase Version 2.0, Product No. 70770 y se comparó la secuencia obtenida con la de *Leishmania donovani*, utilizando el programa para comparación de secuencias Mac Vector 3.5.

11.5 DETECCIÓN DEL GEN DE ODC POR ANÁLISIS DE SOUTHERN BLOT:

Se hizo una digestión total de 10 μ g de DNA genómico con distintas enzimas de restricción y los productos se corrieron en gel de agarosa 0.8%. El gel se desnaturalizó, y se transfirió a membrana de nylon Hybond-N+, por el método de capilaridad. El DNA se fijó a las membranas por “cross-linking” bajo luz UV (LKB). La membrana se prehibridizó 4-5 horas a 65°C. Pasadas las cuatro horas, se agregó la sonda marcada y hervida para su desnaturalización, y se dejó durante la noche a la misma temperatura.

La membrana se lavó dos veces en varios volúmenes de 2xSSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente, y luego 2 veces de 1 hora cada una en varios volúmenes de 0.1xSSC, 0.1%SDS a 65°C.

La membrana se enjuagó con 2xSSC antes de exponer a una placa radiográfica que se reveló al día siguiente.

Solución de prehibridización:

20x SSC	7.5ml
0.5M EDTA pH8	0.1ml
DNA esperma de salmón	1mg
Denhardt 50x	5ml
Agua bidestilada	37.4ml

11.6 PREPARACION DE LA SONDA RADIOACTIVA:

La sonda se marcó por PCR, utilizando como primers los mismos que se habían utilizado para su síntesis.

Brevemente, el protocolo que se siguió fue el siguiente:

primer 1 (5pmoles/ μ l)	5 μ l
primer 6 (5pmoles/ μ l)	5 μ l
10xTaq buffer	10 μ l
50mM Mg ⁺⁺	3 μ l
3dNTP(-dCTP) 10mM cada uno	6 μ l
dCTP 10 μ M	4 μ l
α - ³² P dCTP (10 μ Ci/ μ l)	5 μ l
agua	Vf100 μ l
templado(plásmido con sonda clonada)	500ng
Taq polimerasa	1 μ l

Ciclos: 5 minutos 95°C
 40x: 1 minuto 94°C
 1 minuto 40°C
 1 minuto 72°C
 1x: 10 minutos 72°C, y luego a 4°C.

El producto de la reacción de PCR se sembró en una columna de Sephadex G-50 de 8x0.5cm, y se eluyó con buffer TE. Se recogieron las fracciones correspondientes al primer pico de radiactividad y se utilizaron como sonda.

11.7 "SCREENING" DE LA BIBLIOTECA GENÓMICA:

Se dispuso de una biblioteca genómica de *Crithidia fasciculata* en λ GEM-11, gentilmente cedida por el Dr. D. Ray, UCLA, Los Angeles, California.

El DNA genómico de *C.fasciculata* fue digerido con la enzima Sau 3A1, tratado con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I en presencia de dATP y dGTP, y luego ligado a los brazos del fago. El DNA ligado se empaquetó con Packagene (Promega Corp.) y se amplificó en la cepa lisogénica LE392(Pasion et al., 1992).

Se inocularon 0.3ml de bacterias LE392 con 50 μ l de la biblioteca genómica (título 182.000 pfu/ μ l).

Se hizo una primera hibridización en condiciones de astringencia muy altas (temperatura de prehibridización e hibridización 65°C, 0.1%SDS, 0.1x SSC). Se obtuvieron 13 placas positivas. Se seleccionaron las dos que daban la señal más intensa para seguir adelante con el análisis.

Se hicieron 4 pasos de selección sucesivos, hasta lograr que el 100% de las placas diera positivo en la hibridización.

11.8 PURIFICACIÓN DEL FAGO:

Se utilizó el kit “Magic Lambda Preps DNA Purification System” (Promega). El DNA del fago se eluyó en forma pura siguiendo el protocolo de Promega, y se resuspendió en buffer TE.

El DNA obtenido se digirió con 2 enzimas de restricción: *SacI* y *SfiI*, y se corrió en un gel de agarosa 0.8%. En vista de los resultados obtenidos, se digirió más fago, y se corrió un gel de agarosa preparativo de bajo punto de fusión. Se eluyeron los fragmentos de la agarosa, y se ligaron al vector pBluescript, previamente defosforilado. Se transformaron bacterias de *E.coli* JM83 por electroporación. Se hicieron minipreparaciones de plásmido de las colonias obtenidas, utilizando en este caso el kit “Magic DNA minipreparation System” (Promega). Los plásmidos se digirieron con la misma enzima que se usó para subclonarlos (*SacI*) y se corrieron en un gel de agarosa 1%. Después de transferir a una membrana de nylon, se hibridizó con la misma sonda que se utilizó para hacer la búsqueda del gen. Además se hizo PCR sobre los plásmidos obtenidos, con primers que amplificaban regiones más extensas del gen de ODC, utilizando nuevamente para el diseño de los mismos la secuencia del gen de ODC de *L. donovani*.

Sitio *EcoRI*

primer 1: 5' CCG GAA TTC CGT GCC CGG GAA GCC GCC GCC GAT GTC 3'

primer 8: 5' CCG GAA TTC TCC ATC GAA TCG CAG GTG GGG CCG AAG AT 3'

11.9 SECUENCIACIÓN DEL GEN:

Sólo uno de los fragmentos subclonados dió positivo en la hibridización, y el mismo clon dió una banda de 1200 pares de bases en la PCR, cuyo tamaño coincidía con el esperado para el gen de *L. donovani*. Se comenzó a secuenciar desde los extremos del plásmido hacia el interior del fragmento subclonado. Al cabo de dos ciclos de secuencia, se encontró que todo el gen estaba contenido en ese fragmento. Se hicieron reacciones de secuencia sucesivas, sintetizando cada vez nuevos primers utilizando como templado la secuencia obtenida en el paso anterior.

Brevemente, el protocolo que se utilizó para secuenciar fue el siguiente: el plásmido obtenido luego de una minipreparación (resuspendido en 18µl de agua) se desnaturalizó en presencia de 2µl de solución desnaturalizante (2M NaOH, 2mM EDTA) durante 30 minutos a 37°C. Se agregó 3µl de NaAcO (pH 4.5-5.5, 3M) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó precipitar a -20°C. Se centrifugó, y se lavó con etanol 70%. El plásmido desnaturalizado y evaporado se resuspendió en la solución de primer con el que se iba a secuenciar (a una concentración de 12 pmoles), agua y buffer de reacción (provisto por el kit). Se llevó a cabo el “annealing” durante 30 minutos a 37°C.

Entretanto se preparó la mezcla de marcado ó “labelling mix” que consistió en 0.1M DTT, “labelling mix” (diluída 1:5) provista por el kit, ³⁵S-dATP y la polimerasa Sequenase (diluída 1:8). Esta mezcla se agregó a cada tubo conteniendo el plásmido, y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. 3.5µl de esta solución se agregaron a cada tubo que contenía el dideoxinucleótido correspondiente (ddA, ddT, ddC, ddG) y se siguió incubando durante 5 minutos a 37°C. La reacción se detuvo por agregado de solución “Stop” (provista por el kit).

Preparación del gel 5% (para 80ml):

acrilamida:bis (39:1)	10.53ml
urea	36g
TBE10x	8ml
TEMED	48µl
Persulfato Amonio 10%	480µl
Agua bidestilada	cantidad necesaria

Se preparó la solución del gel sin agregar los reactivos polimerizantes y se filtró por Whatman 1M. Una vez armado, el gel se precorrió durante 45 minutos a 70 watts, se sembraron las muestras, y se hicieron dos descargas sucesivas de cada una de ellas. Al cabo de unas 3-4 horas de corrida, el gel se pegó a un papel Whatman 3MM, se secó durante 2 horas y se expuso a una placa radiográfica. Se reveló al día siguiente.

SOLUCIONES:

TBE (10x): Trizma 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA 20mM, pH 8.3.

SSC (20x): NaCl 3M, Na₂Citrato 0.3M, pH7.

12 - RNA MENSAJERO

12.1 PREPARACIÓN DE RNA

Se cosecharon 2×10^9 parásitos, y a partir de ellos se preparó RNA utilizando el reactivo de TRIzol (Life Technologies).

Los parásitos se resuspendieron en 1ml de TRIzol. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, y se agregaron 0.2ml de cloroformo. Se agitó vigorosamente durante 15 segundos, y se dejó descansar la suspensión otros 3 minutos. Se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 15 minutos a $4^\circ C$. Se separó la fase acuosa y se agregó 0.5 ml de isopropanol. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó 10 minutos a $12.000 \times g$ a $4^\circ C$. El precipitado de RNA se lavó con 1 ml de etanol 75%, y se secó al aire. Se resuspendió en agua. El RNA se cuantificó por absorbancia a 260nm.

12.2 DETECCIÓN DEL MENSAJERO DE ODC POR ANÁLISIS DE HIBRIDIZACIÓN “NORTHERN BLOT”:

Se preparó un gel de agarosa 1% en 1x buffer MOPS y 2.2M formaldehído. A 15-20 μg de RNA en 2.2M formaldehído, 1xMOPS, 0.5M formamida, se les agregaron 2.5 μl de “loading buffer”. Se incubó durante 15 minutos a $55^\circ C$, y se puso en hielo hasta el momento de sembrar el gel. El gel se corrió durante 5 horas a 80 voltios, utilizando como buffer de corrida 1X MOPS. Se lavó varias veces con agua deionizada, y se transfirió durante 18 horas por capilaridad a una membrana Hybond N⁺. Se utilizó 20xSSC como buffer de transferencia.

El RNA se fijó a la membrana calentando en estufa a $80^\circ C$ durante 2 horas, se prehibridizó durante 5 horas, y se hibridizó durante 18 horas, a $42^\circ C$ con la sonda marcada.

Solución de prehibridización:	Solución de hibridización:	
(10 ml)		
20x SSC	3ml	3ml
formamida	5ml	5ml
100xDenhardt	0.5ml	0.5ml
10%SDS	0.5ml	0.5ml
agua	1ml	dextran sulfato 1g
DNA esperma	500mg	500mg
		sonda desnaturalizada

La membrana se lavó 2 veces a temperatura ambiente en 2x SSC, 0.1%SDS, y luego dos lavados de 30 minutos cada uno en 0.1xSSC, 0.1%SDS a 65°C. Se expuso, y se reveló al día siguiente.

SOLUCIONES:

MOPS (10x): MOPS 0.2M pH7, Acetato de sodio 0.05M, EDTA 0.01M.
 "Loading buffer": EDTA 1mM pH8, azul de bromofenol 0.25%, glicerol 50%.

12.3 MARCADORES DE PESO MOLECULAR:

Se utilizó un marcador de peso molecular comercial para RNA (Gibco) o bien RNA ribosomales de células eucarióticas, que se corrieron en forma paralela a las muestras. Se tiñó el gel con bromuro de etidio, ó bien se coloreó la membrana de nylon luego de la transferencia con azul de bromofenol.

Los resultados obtenidos fueron similares con cualquiera de los dos métodos.

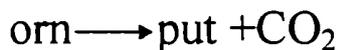
RESULTADOS:

1-DETERMINACION DE LA DECARBOXILACION DE ORNITINA POR EXTRACTOS ENZIMATICOS DE *CRITHIDIA FASCICULATA*.

1.1 ESTEQUIOMETRIA DE LA REACCION.

Todos los estudios de actividad de ODC se basan en la cuantificación del CO₂ liberado a partir de ornitina por acción de la enzima. Con el objeto de determinar la estequiometría de la reacción, extractos enzimáticos de *C.fasciculata* obtenidos como se indica en Materiales y Métodos se incubaron en presencia de ornitina uniformemente marcada durante 1 hora. La mezcla de reacción se analizó por electroforesis en papel, y los productos radioactivos se detectaron pasando las tiras de papel por un “scanner”; para determinar la posición de los compuestos radioactivos se eluyeron los picos correspondientes, que se cuantificaron en contador de centelleo líquido. En forma simultánea, se midió la liberación de ¹⁴CO₂.

La tabla resume los datos obtenidos. La disminución en la cantidad de ornitina es equivalente a la formación de putrescina (ó liberación de CO₂). El resultado obtenido estaría indicando que la estequiometría de la reacción catalizada por los extractos enzimáticos de *C.fasciculata* es:



ornitina desaparecida $\text{orn}_i - \text{orn}_f$	CO ₂ formado	putrescina formada
(5.95 - 5.38)nmoles 0.57 nmoles	0.49 nmoles	0.46nmoles

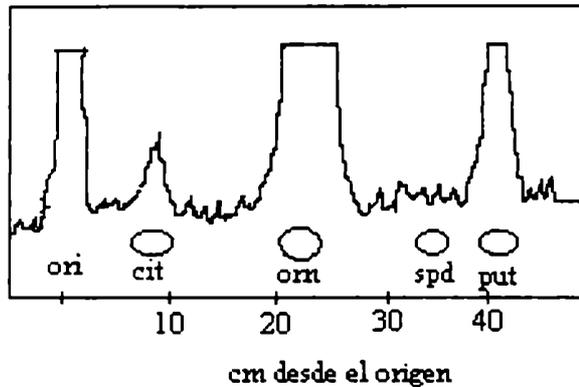


Fig.1: Los parásitos se incubaron durante 1 hora en presencia de ornitina uniformemente marcada. Los extractos se analizaron por electroforesis en papel, los picos radioactivos observados se eluyeron y se cuantificaron en contador de centelleo líquido.

1.2 SINTESIS DE ESPERMIDINA.

La decarboxilación de ornitina produce putrescina. A partir de ella se originan las demás poliaminas, siguiendo una ruta metabólica bastante estricta, donde espermidina es el segundo compuesto en aparecer. Para demostrarlo, se hicieron incubaciones de parásitos en presencia de putrescina radiactiva durante 1 y 6 horas, y los extractos se trataron de la misma forma que en el caso anterior.

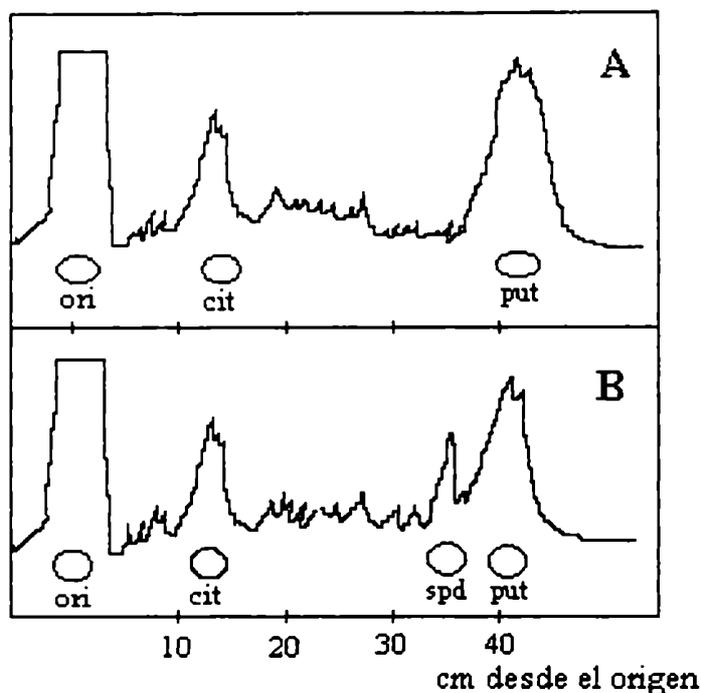


Fig.2: Los parásitos se incubaron durante 1 hora (A) ó 6 horas (B) en presencia de putrescina radioactiva (0.45 mM). Los extractos se analizaron por electroforesis en papel.

Como se ve en la figura, la reacción de conversión es bastante lenta, ya que al cabo de 1 hora de incubación no se detecta la formación de espermidina, mientras que luego de 6 horas, se visualizan dos picos, uno correspondiente a espermidina (alrededor de un 15 % de conversión) mientras que el otro corresponde a la putrescina sin utilizar.

1.2.1 INHIBICION DE LA SINTESIS DE ESPERMIDINA.

La ciclohexilamina (CHA) es uno de los inhibidores más conocidos de la espermidina sintasa. Como una aproximación más para dilucidar el camino biosintético de las poliaminas en *C.fasciculata*, se obtuvieron cultivos desarrollados durante 18 horas en presencia de 2mM CHA, en medio definido, HOS-MEM II. Al cabo de ese tiempo, se incubaron durante 6 horas en presencia de putrescina radioactiva, y los extractos se analizaron por cromatografía en papel.

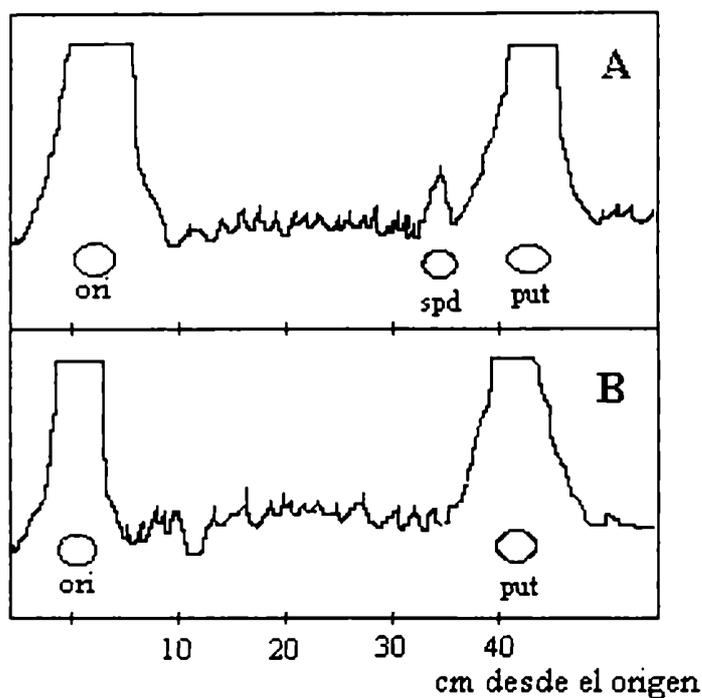


Fig.3: Los parásitos en ausencia (A) ó presencia (B) de inhibidor se incubaron durante 6 horas con putrescina radioactiva (0.45mM).

Como se ve en la figura, cuando el cultivo se desarrolló en presencia de CHA, desaparece completamente el pico correspondiente a espermidina, lo que estaría indicando que en presencia de la droga, la vía que conduce a la formación de éste compuesto está inhibida.

2- CONTENIDO ENDOGENO DE POLIAMINAS

Las poliaminas son compuestos esenciales presentes en todos los seres vivos. En células superiores, hongos y levaduras, están presentes tanto putrescina como espermidina y espermina, mientras que en organismos inferiores como bacterias y protozoos, solo se encuentran en cantidades apreciables putrescina y espermidina. Dentro del grupo de protozoos, *T. cruzi* es una de las excepciones, ya que tiene una concentración endógena más ó menos elevada de espermina, y niveles detectables de cadaverina. Esto no es debido a su capacidad biosintética, sino a que los capta del medio externo.

El contenido endógeno de poliaminas en *C.fasciculata* se determinó en un analizador automático de aminoácidos, obteniéndose el siguiente resultado:

	nmol/10 ⁸ células
Putrescina	166.99
Espermidina	76.55
Espermina	nd
Cadaverina	nd

3- CAPTACION DE POLIAMINAS

El medio de cultivo que se utilizó en la mayor parte de los experimentos de captación, HOS-MEM II, es un medio completamente definido, carente de poliaminas. Los parásitos desarrollados en éste medio, deben valerse de su capacidad biosintética para sintetizar las poliaminas necesarias para su crecimiento.

Algunos parásitos pertenecientes a la misma familia que *C. fasciculata*, por ejemplo *T. cruzi*, no son capaces de proliferar en este medio, crecen en medios más ó menos ricos suplementados con suero fetal bovino, probablemente porque necesiten captar del medio de cultivo una determinada cantidad de poliaminas, lo que estaría indicando que su capacidad biosintética no es suficiente para mantener los niveles endógenos necesarios para su desarrollo. En el caso de *T. cruzi*, que ha sido ampliamente estudiado, se sabe que la mayor parte de las poliaminas endógenas son captadas del medio. En este parásito no se ha podido detectar actividad de ODC, lo que explicaría su necesidad de tomar las poliaminas del medio.

3.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LA CAPTACION

3.1.1 EFECTO DE DFMO EN LA CAPTACION DE PUTRESCINA

Se ha descrito en varios sistemas que el transporte de poliaminas se ve muy aumentado cuando se inhibe la síntesis de poliaminas por el agregado de DFMO al medio de cultivo. Como se verá más adelante, el

DFMO tiene un efecto muy importante sobre la actividad de ODC en *C.fasciculata*, por lo tanto se esperaba que también provocara alteraciones en el sistema de transporte de poliaminas.

Se hicieron ensayos de captación de putrescina, en presencia ó ausencia de DFMO. Es importante hacer notar aquí, que en condiciones normales de cultivo, la captación de putrescina es muy baja, comparada con los valores obtenidos en las mismas condiciones en otros parásitos.

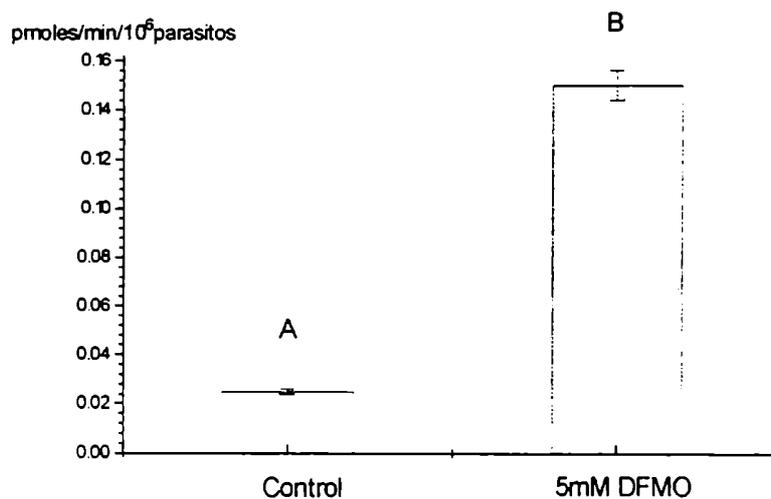


Fig. 4: Los parásitos se cultivaron durante 18 horas en ausencia A) ó en presencia B) de 5mM DFMO. Al cabo de ese tiempo se recogieron alícuotas, se resuspendieron en PBS, y se midió la captación de putrescina radioactiva.

La captación de putrescina se ve aumentada en un orden de magnitud con respecto al control cuando el experimento se hace manteniendo al cultivo en presencia de 5mM DFMO.

3.1.2 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE DFMO PARA LOGRAR MAXIMO EFECTO EN LA CAPTACION.

Se probaron cantidades crecientes de DFMO para determinar cual era la concentración con la cual se lograba el mayor efecto en el aumento de la captación de putrescina.

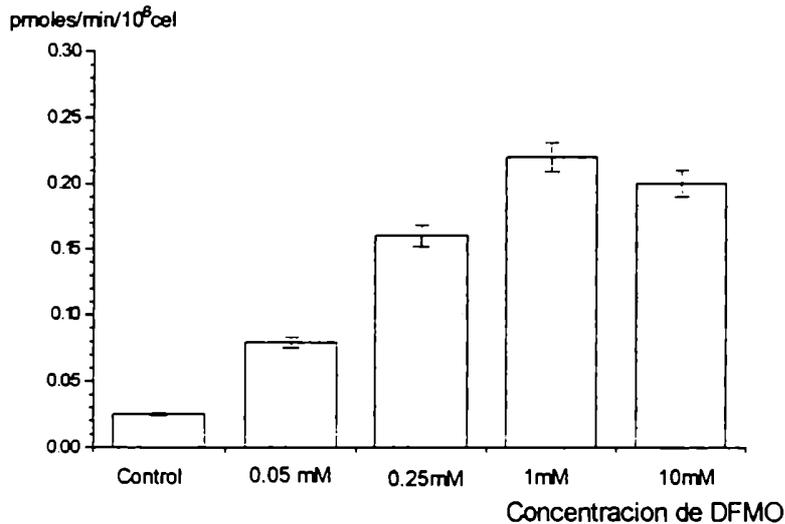


Fig.5: Los parásitos se cultivaron durante 18 horas en presencia de cantidades crecientes de DFMO. Al cabo de ese tiempo se recogieron alícuotas, se resuspendieron en PBS, y se midió la captación de putrescina radioactiva.

La captación de putrescina alcanza su máximo valor cuando el cultivo se desarrolla con 1 a 10mM DFMO.

3.1.3 DETERMINACION DEL TIEMPO DE CULTIVO OPTIMO EN PRESENCIA DE DFMO PARA LOGRAR MAXIMO EFECTO EN LA CAPTACION.

Los parásitos se desarrollaron en presencia de 10mM DFMO, y se recogieron alícuotas a distintos tiempos, con el objeto de determinar cual era el período necesario para que la droga produzca la activación máxima del transporte.

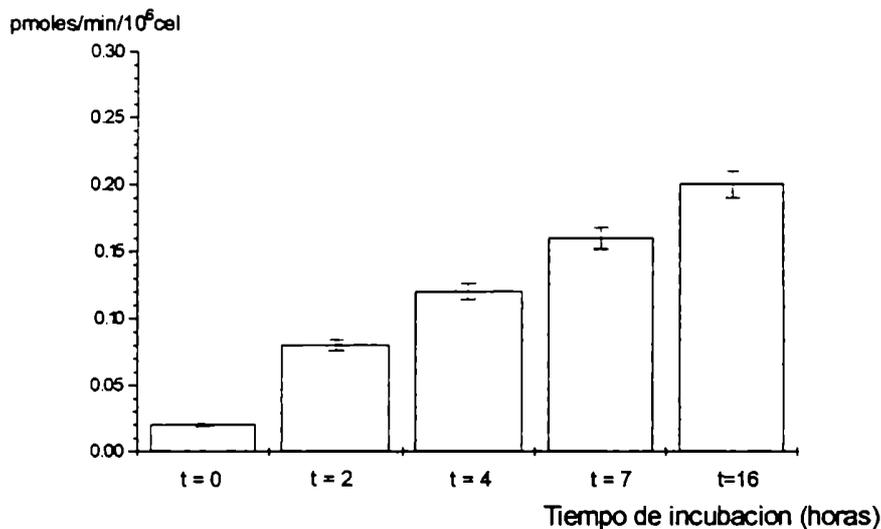


Fig.6: Los parásitos se desarrollaron en presencia de 10mM DFMO y a los tiempos indicados, se recogieron alícuotas que se resuspendieron en PBS. Se midió la captación de putrescina radioactiva en todas las fracciones recogidas. El tiempo cero equivale a un control sin DFMO.

A partir de los resultados obtenidos, se tomó como condición standard para los experimentos posteriores, desarrollar los cultivos durante la noche (16-18hs) en presencia de 10mM DFMO.

3.1.4 ESPECIFICIDAD DE LA CAPTACION

Ornitina es un aminoácido básico que, por acción de la enzima ODC, se decarboxila para dar putrescina. Este compuesto es, por lo tanto, el primer metabolito implicado en la síntesis de poliaminas. Como se verá más adelante, este paso de decarboxilación de un sustrato para dar la primera de las poliaminas es uno de los más regulados de todo el camino biosintético.

Putrescina, por acción de la enzima espermidina sintasa, y de un dador de grupos aminopropilo como es S-adenosilmetionina decarboxilada, es capaz de formar espermidina, el segundo de los metabolitos de la vía.

Se quiso determinar si *C.fasciculata* era capaz de captar del medio otros metabolitos relacionados, además de putrescina, y si la captación era afectada por la acción del DFMO.

Se hicieron experimentos de captación de espermidina y ornitina radioactivas, incubando ó no los cultivos durante 16 horas en presencia de 10mM DFMO.

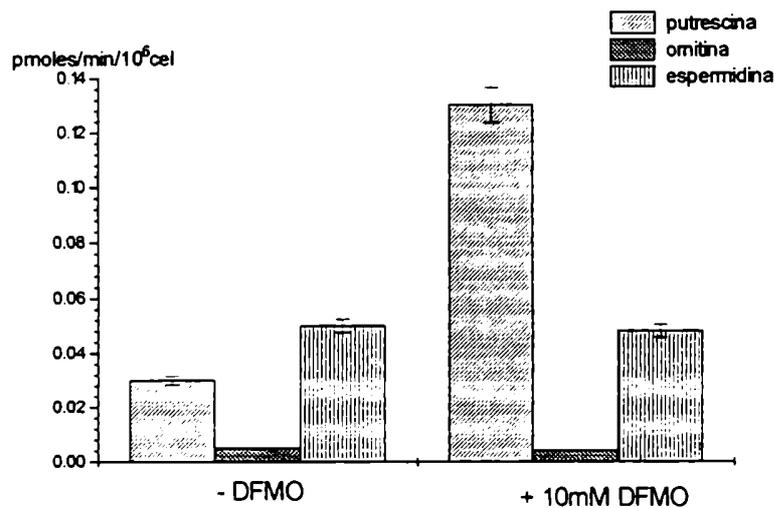


Fig.7: Los parásitos se cultivaron durante la noche en presencia ó ausencia de 10mM DFMO; se recogieron alícuotas, se resuspendieron en PBS, y se midió la captación de putrescina, ornitina y espermidina radioactivas.

Como se ve en el gráfico, únicamente la captación de putrescina se ve aumentada en presencia de 10mM DFMO. Esto indica que la captación de las otras poliaminas estaría regulada por un mecanismo diferente, que no se ve afectado por el agregado de este inhibidor. También es importante destacar que la captación de ornitina tiene valores muy bajos, indicando que la maquinaria biosintética del parásito es lo suficientemente eficaz como para que éste no necesite tomar compuestos del medio.

3.1.5 CURVA DE TEMPERATURA DE CAPTACION DE PUTRESCINA

Se hizo una curva de captación en un rango que iba desde 0°C hasta 45°C, con el objeto de determinar si la captación de putrescina se veía afectada por la temperatura. En los experimentos anteriores se vió que la captación de putrescina en condiciones normales de cultivo es muy baja; por lo tanto el experimento se hizo con un cultivo desarrollado durante la noche en presencia de 10mM DFMO.

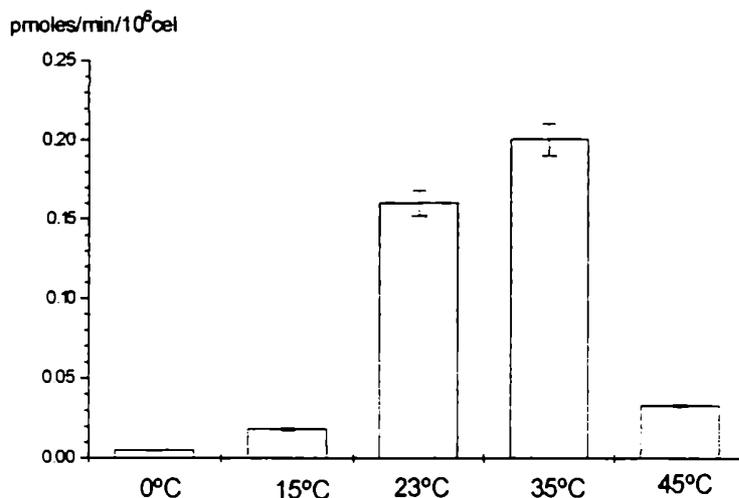


Fig.8: Los parásitos se cultivaron 16 horas en presencia de 10mM DFMO, se recogieron alícuotas que se resuspendieron en PBS, y se midió la captación de putrescina radioactiva a las diferentes temperaturas especificadas en la figura.

Pese a que se obtiene una eficiencia máxima de captación a 35°C, se eligió seguir trabajando a 28°C, que es la temperatura a la cual se cultivan los parásitos.

3.1.6 CAPTACION EN DISTINTOS PUNTOS DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DEL PARASITO.

Se determinó la captación de putrescina en dos puntos distintos de la curva de crecimiento. En fase logarítmica (30×10^6 parásitos/ml) y luego en el mismo cultivo cuando alcanzó la fase estacionaria (90×10^6 parásitos/ml).

Simultáneamente, se quiso determinar si el efecto de DFMO en la captación era dependiente de la fase de crecimiento del cultivo. Por lo tanto, el experimento se hizo fraccionando el cultivo, y exponiéndolo ó no a la droga.

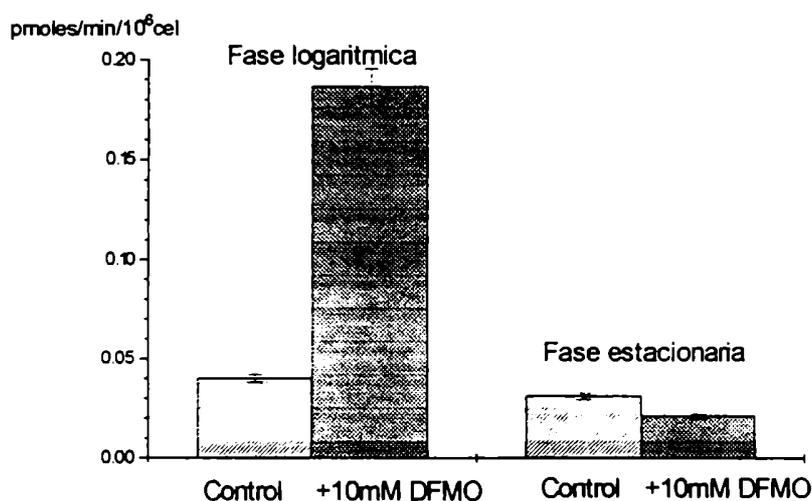


Fig.9: Los parásitos se cultivaron durante la noche en presencia ó ausencia de 10mM DFMO. Cuando alcanzaron la fase logarítmica, se resuspendieron en PBS, y se midió la captación de putrescina. Fracciones de los mismos cultivos desarrollados en el mismo medio hasta alcanzar la fase estacionaria, se usaron para repetir el ensayo de captación.

La captación de putrescina en el estado estacionario es muy baja, y no se ve afectada por la presencia de 10mM DFMO en el medio de cultivo, a diferencia de lo que sucede en un cultivo en fase logarítmica, donde la captación se incrementa sensiblemente por efecto de la droga.

3.2 REQUERIMIENTOS ENERGETICOS Y DE SINTESIS DE PROTEINAS PARA LA CAPTACION DE PUTRESCINA.

3.2.1 EFECTO DE INHIBIDORES DE LA RESPIRACION.

La captación de poliaminas en *C.fasciculata* sería un proceso dependiente de energía, ya que como se vió anteriormente, es muy sensible a los cambios de temperatura. Para determinarlo en forma concluyente, se midió la captación de poliaminas en presencia de inhibidores conocidos de la respiración: un desacoplante de la cadena respiratoria como el 2,4 DNP (2,4 dinitrofenol), un inhibidor de la citocromo oxidasa KCN (cianuro de potasio), y un reductor muy fuerte como el AsO_3K_3 (arsenito de potasio).

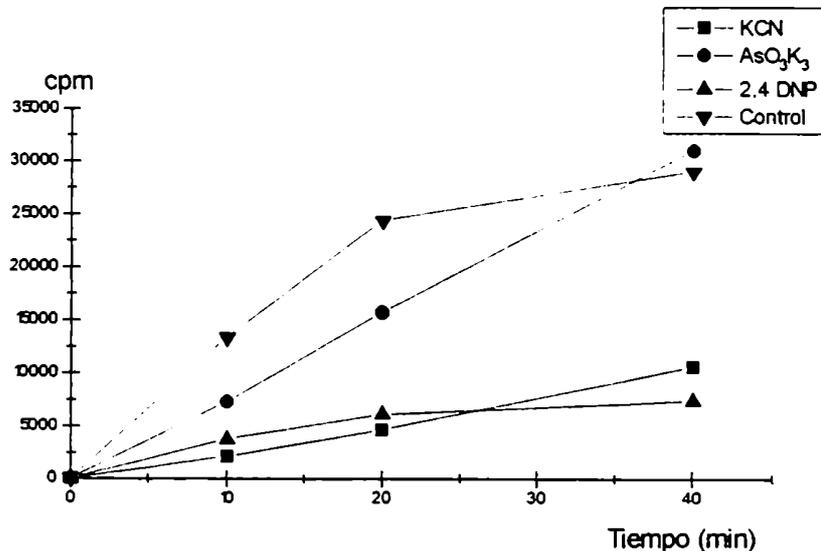


Fig.10: Los parásitos se incubaron en presencia de 10mM DFMO durante la noche; al día siguiente el cultivo se fraccionó, y a cada fracción se le agregó KCN, 2,4DNP ó AsO_3K_3 respectivamente, en concentración 1mM, y se midió la captación de putrescina a los tiempos indicados.

Los compuestos KCN y 2,4DNP, que actúan directamente sobre la cadena respiratoria, resultaron ser inhibidores muy fuertes del proceso de captación de poliaminas, mientras que el arsenito de

potasio, que tiene un efecto más general, no la afecta, obteniéndose valores comparables al control. Estos resultados indican que al igual que en otros sistemas estudiados anteriormente, el transporte es un proceso dependiente de energía.

3.2.2 EFECTO DE CICLOHEXIMIDA

La cicloheximida es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas en eucariontes. Con el objeto de determinar si el aumento de la captación de putrescina en cultivos desarrollados en presencia de DFMO era mediado por la síntesis de nueva proteína transportadora, se agregó cicloheximida a los cultivos, y se midió el transporte de la poliamina al interior de la célula.

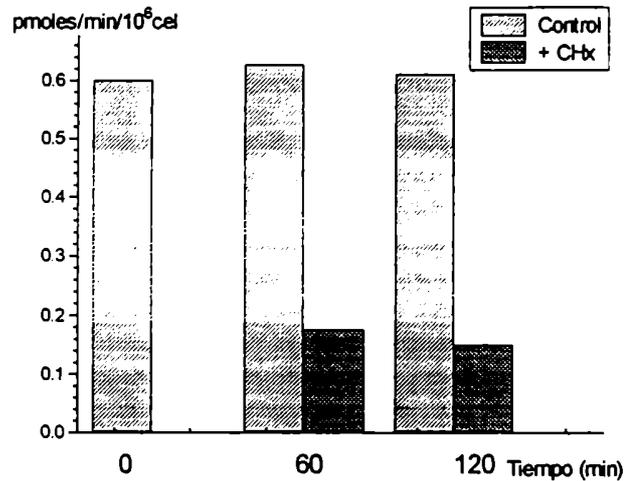


Fig.11: Los parásitos se incubaron durante la noche en presencia de 10mM DFMO. Al día siguiente se les agregó 50 μ g/ml de cicloheximida, y se midió la captación de putrescina radioactiva a los tiempos indicados en la figura..

Como se ve en la figura la captación de putrescina requiere la síntesis continuada de nueva proteína transportadora, ya que en presencia de un inhibidor como es la cicloheximida, disminuye con el tiempo. El hecho de que los valores de captación no lleguen a niveles cercanos a cero en el transcurso de este experimento en presencia de cicloheximida, estaría hablando de la existencia de dos tipos de transportadores, uno inestable, y otro de mayor estabilidad.

3.3 ENSAYOS DE COMPETENCIA

Para determinar si existe un transportador específico para cada poliamina, ó un sólo sistema de transporte común a todas ellas se midió la captación de putrescina ó espermidina en presencia y ausencia de otras poliaminas ó sustancias análogas que podrían actuar como posibles competidores.

3.3.1 COMPETENCIA PARA LA CAPTACION DE PUTRESCINA

Se hizo un ensayo de competencia para la captación de putrescina, preincubando los cultivos durante 1 hora en presencia ó ausencia de otras poliaminas (putrescina P, espermidina Spd, espermina Sm, cadaverina Cad) y de análogos de poliaminas (diaminopropano) DAP, dibencilputrescina (DBP) todos en concentraciones 0.5mM.

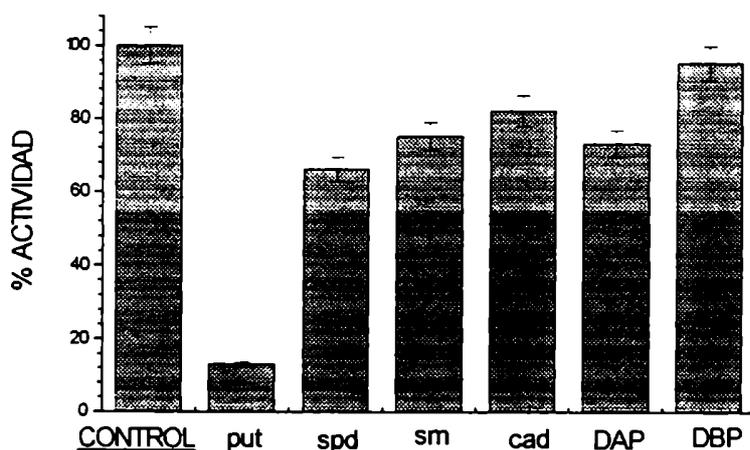


Fig.12: Los parásitos se incubaron ON en presencia de 10mM DFMO, al día siguiente se lavaron y resuspendieron en medio fresco, se les agregó 0.5mM del competidor indicado y al cabo de una hora se midió la captación de putrescina radioactiva. Los valores están expresados como porcentaje de actividad con respecto al control.

De los resultados obtenidos, se ve que en estos tripanosomátidos la captación de putrescina es poco afectada por el agregado de altas concentraciones de otras poliaminas, como tampoco por el agregado de análogos sintéticos como DAP y DBP. Este resultado indicaría la existencia de un transportador específico para putrescina.

3.3.2 COMPETENCIA PARA LA CAPTACION DE ESPERMIDINA

Se repitió el experimento anterior, con los mismos competidores, aunque en éste caso se midió la captación de espermidina radioactiva.

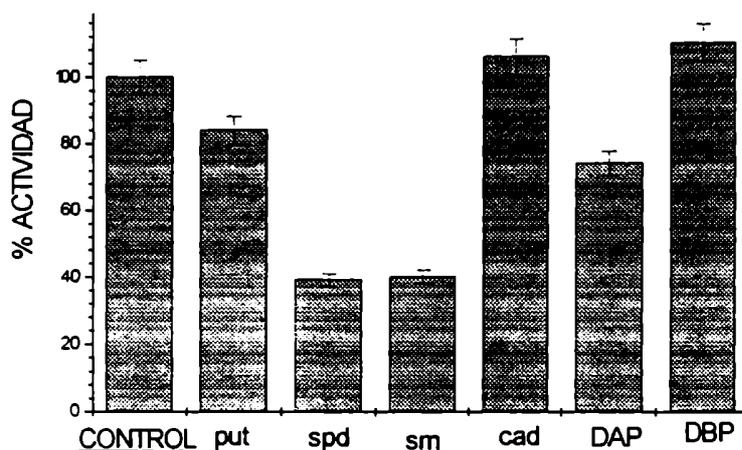


Fig.13: Los parásitos se incubaron durante la noche en presencia de 10mM DFMO, al día siguiente se lavaron, resuspendieron en medio fresco y se les agregó 0.5mM del competidor indicado, y la cabo de una hora se midió la captación de espermidina radioactiva. Los valores están expresados como porcentaje de actividad con respecto al control.

De la figura se deduce que el transporte de espermidina se ve afectado en gran medida por el agregado de espermina, aunque no así por cadaverina y DBP. Este resultado, indicaría la existencia de un segundo sistema de transporte, más inespecífico que el anterior, y que no solo permitiría el flujo de espermidina, sino también de espermina, y en menor medida del análogo sintético diaminopropano. Los resultados expresados anteriormente estarían indicando la presencia de dos sistemas de transporte, uno específico para

putrescina, y otro más general que permite la entrada no solo de espermidina sino también de espermina. Hay que hacer la salvedad de que éstos son todos sistemas “in vitro”, ya que “in vivo” los niveles de espermina en éste parásito no son detectables.

3.4 PARAMETROS CINÉTICOS DE LA CAPTACION DE PUTRESCINA.

3.4.1 DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD (K_m)

Como se ha visto hasta aquí, el transporte de putrescina hacia el interior de la célula aumenta significativamente cuando el cultivo se desarrolla en presencia de DFMO, que inhibe en forma irreversible a la ODC, y por lo tanto frena la síntesis de putrescina. Este incremento nos llevó a pensar que probablemente hubiera algún cambio en la afinidad del transportador, que hiciera que ante una disminución del nivel de poliaminas intracelulares, captara las del medio externo con mayor avidez.

Se determinó la constante de afinidad aparente (K_m) para la captación de putrescina en un cultivo control, y en forma simultánea, en otro que se desarrolló durante la noche en presencia de 10mM DFMO.

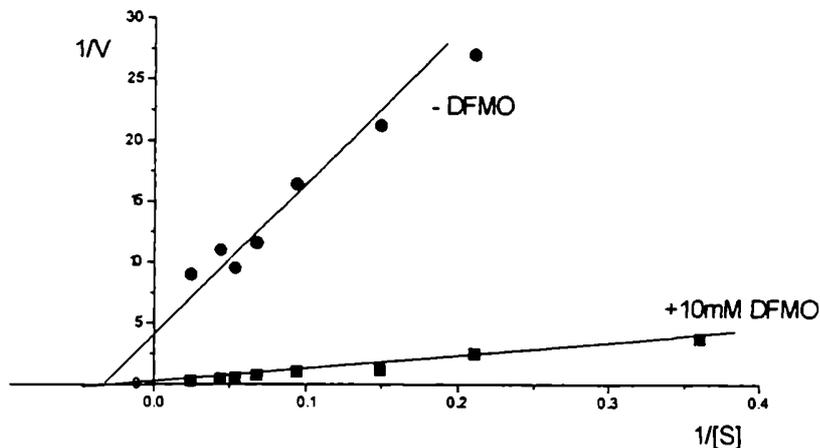


Fig.14: Los parásitos fueron incubados durante 16 horas en presencia ó ausencia de 10mM DFMO. Al día siguiente se lavaron y resuspendieron en PBS, y se agregaron cantidades crecientes de putrescina. La K_m y la velocidad máxima se determinaron a partir del correspondiente gráfico de Lineweaver-Burk.

	- DFMO	+10mM DFMO
K_m ($\times 10^{-6}$ M)	28	31
V_{\max} (pmoles \times min $^{-1}$ /10 6 cél)	0.22	6.7

Tabla 1: K_m y V_{\max} para la captación de putrescina.

De los valores obtenidos a partir del gráfico, se deduce que no hay variación en la K_m para la captación de putrescina, en cultivos desarrollados en presencia ó ausencia de 10mM DFMO, mientras que la velocidad máxima es más de un orden de magnitud mayor. Esto indica que el aumento en la captación se puede atribuir únicamente a un aumento de la velocidad máxima del proceso, y no a un cambio de la afinidad del transportador por la putrescina, como se había pensado inicialmente. Los resultados indicarían por lo tanto que la presencia de DFMO induce marcadamente la síntesis del transportador de putrescina.

4- CARACTERIZACION DE LA ORNITINA DECARBOXILASA DE *CRITHIDIA FASCICULATA*.

4.1 OPTIMIZACION DEL ENSAYO.

4.1.1 CURVA DE TEMPERATURA

Se midió la actividad de ODC de un extracto enzimático a varias temperaturas entre 0°C y 45°C, para determinar la temperatura óptima de la reacción.

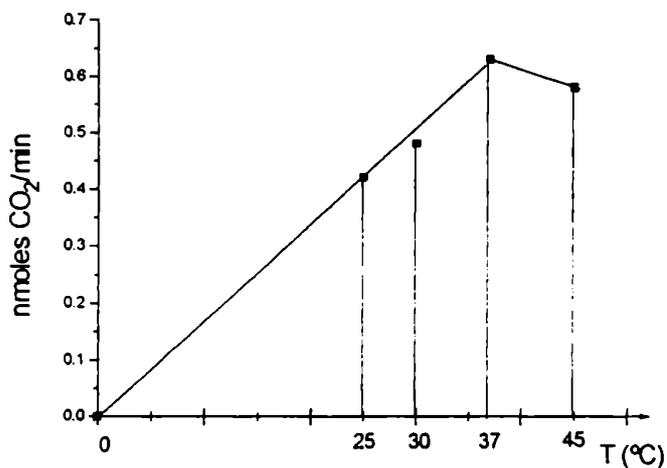


Fig.15: Se midió actividad de ODC durante 1 hora, a las temperaturas indicadas en el gráfico, utilizando como sustrato ornitina radioactiva.

A partir de este experimento se eligió realizar todos los ensayos de ODC a 37°C.

4.1.2 CURVA DE pH

De la misma manera que en el caso anterior, se determinó el pH óptimo de la reacción de decarboxilación de ornitina.

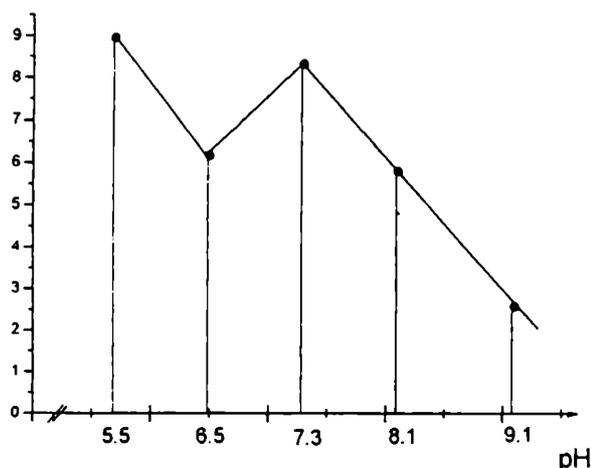


Fig.16: Se midió actividad de ODC durante 1 hora a 37°C, a los distintos pH que se indican en la figura, utilizando como sustrato ornitina radioactiva.

Se obtienen dos picos de actividad a diferentes pH, 5.7 (ó menor) y 7.3. Se elige seguir trabajando a pH 7.3 por considerársele más fisiológico en los cultivos "in vitro".

4.1.3 REQUERIMIENTOS DE COFACTOR.

RECUPERACION DE LA ACTIVIDAD POR AGREGADO DE PLP A LA APOENZIMA.

Como se describió en la Introducción, todas las decarboxilasas estudiadas utilizan como cofactor piridoxal 5'fosfato (PLP). El cofactor debe ser agregado al extracto enzimático desde un primer momento, de otra manera, por lo menos en el caso de la ODC de *C. fasciculata*, es muy susceptible a la pérdida de actividad.

Se preparó el extracto enzimático sin agregar el cofactor en el buffer de ruptura, además de dializarse contra hidroxilamina como se explicó en detalle en Materiales y Métodos. Una vez obtenida la apoenzima, se hizo un

ensayo de actividad de ODC agregando cantidades crecientes de PLP en cada tubo.

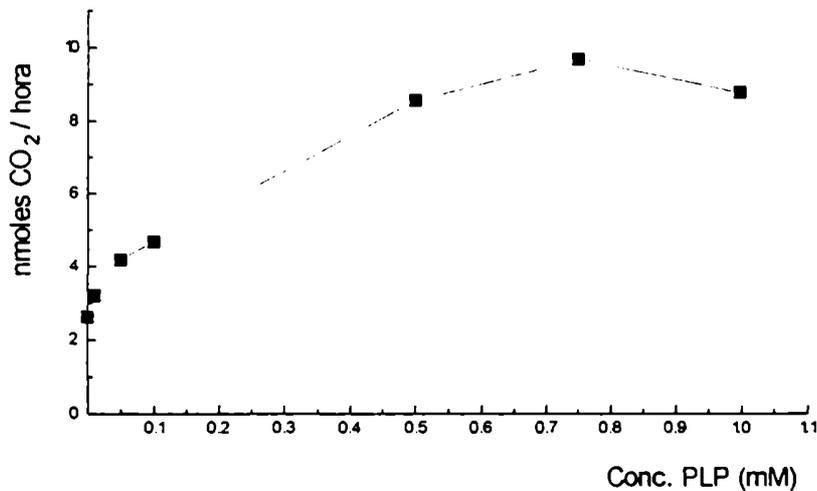


Fig.17: Se midió actividad de ODC, agregando en cada tubo la concentración de PLP indicada en cada caso. Se utilizó como sustrato ornitina radioactiva.

La dependencia del extracto por el cofactor es muy importante, y se alcanza un máximo de actividad a concentraciones saturantes del mismo. A partir de los valores obtenidos, se pudo calcular la K_m para el cofactor, mediante el gráfico de Lineweaver-Burk.

K_m piridoxal 5'fosfato = 0.09mM

Por otro lado, se hizo un ensayo utilizando como cofactor piridoxamina fosfato (PAP), que se sabe compite por el sitio activo de la enzima, pero es incapaz de activarla. Para ello, se preparó un extracto enzimático sin PLP (control), y en el momento de medir actividad se agregó PLP, PAP ó ambos.

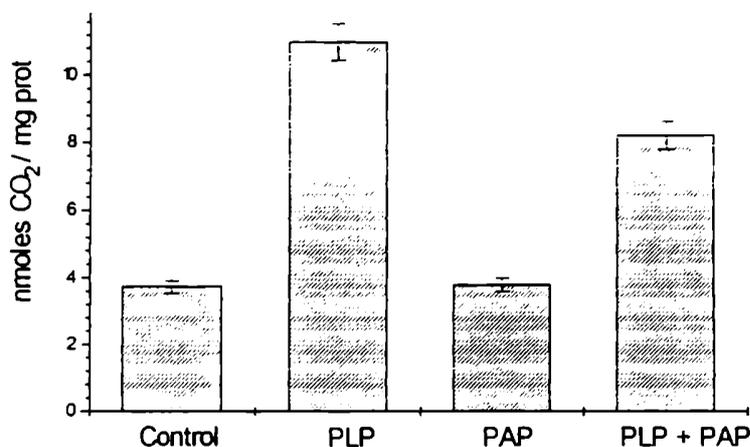


Fig.18: Se midió actividad de ODC agregando en el ensayo 0.5mM PLP, 0.5mM PAP, ó bien los dos en forma simultánea. Se utilizó como sustrato para la reacción ornitina radiactiva.

Los resultados demuestran que PAP es incapaz de activar el extracto, como lo hace el PLP. Además, cuando se ponen los dos juntos hay una disminución de la actividad, lo que estaría indicando que compiten por el sitio de unión.

4.1.4 ACTIVIDAD DE ADC.

La arginina decarboxilasa (ADC), cataliza la decarboxilación de arginina para dar agmatina, que a su vez es sustrato de la agmatina ureohidrolasa, para producir putrescina. Se ha descrito en varios organismos la existencia de esta enzima; por lo tanto se intentó determinar si en *C.fasciculata* parte de las poliaminas endógenas se originan a partir de arginina.

Para determinar si la síntesis de putrescina en *C.fasciculata* se debe a una verdadera ODC, y no está originada en las reacciones sucesivas de la ADC y la agmatina ureohidrolasa, se hizo un ensayo de actividad utilizando como sustrato para la reacción arginina radiactiva (305mCi/mmol, 1.7mM). Por otra parte se investigó si el agregado de difluormetilarginina (DFMA) podía inhibir la reacción catalizada por ODC, lo que indicaría la transformación vía arginasa de DFMA en DFMO.

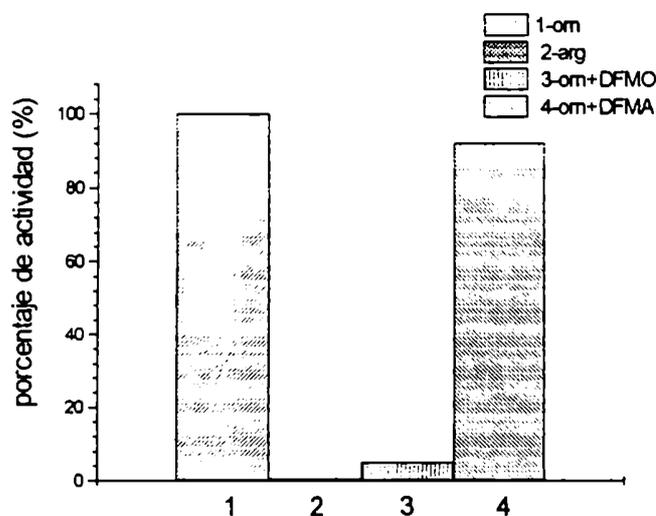


Fig.19: Los extractos enzimáticos se incubaron en presencia de 0.69mM (final) de ornitina radiactiva, 0.5mM (final) de arginina radiactiva, y 10mM DFMO ó DFMA, como se indica en el gráfico. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 1 hora a 37°C.

Como se ve en la figura, la actividad de ADC es prácticamente nula, 0.5% de la actividad total de decarboxilación. De la misma manera, cuando se utiliza DFMA como inhibidor, en reemplazo de DFMO (que inhibe en un 95%), la reacción se altera muy poco (menos del 10%). Ambos datos estarían indicando que en *C. fasciculata* no existe actividad de arginina decarboxilasa ni de arginasa.

4.1.5 EFECTO DE ACIDO OXIACETICO

Se ha descrito en algunos sistemas animales que bajas concentraciones de ácido oxiacético inhiben la liberación de CO₂ producido a partir de la decarboxilación oxidativa de la ornitina catalizada por la enzima mitocondrial ornitina-2-oxo-ácidoaminotransferasa (Murphy et al. 1976).

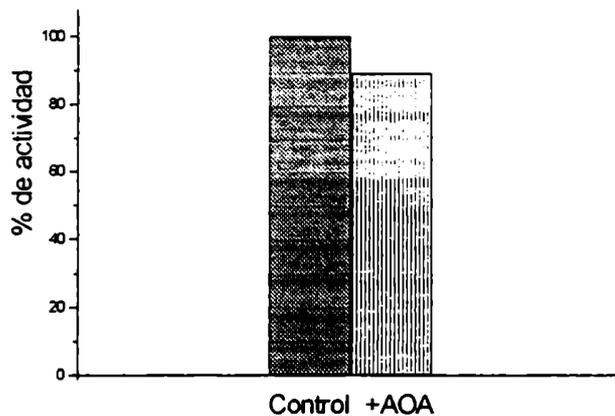


Fig.20: Los extractos enzimáticos se incubaron en ausencia ó presencia de $10\mu\text{M}$ de AOA durante 1 hora a 37°C utilizando ornitina radioactiva como sustrato de la reacción.

El ensayo de actividad se realizó en presencia de $10\mu\text{M}$ de AOA, y como se puede ver, la inhibición de la actividad decarboxilante es de sólo el 10%.

4.2 PARAMETROS CINETICOS

4.2.1 ACTIVIDAD DE ODC EN DISTINTOS PUNTOS DE LA CURVA DE CRECIMIENTO

Se determinó la actividad de ODC a lo largo de la curva de crecimiento del parásito. Se sacaron alícuotas del cultivo en distintos puntos de la curva, siguiendo su crecimiento por conteo en cámara de Neubauer.

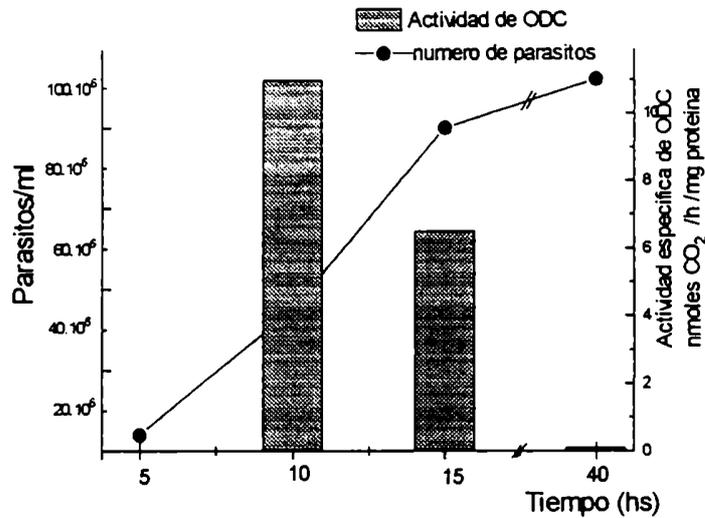


Fig.21: Se midió actividad de ODC en distintos puntos de la curva de crecimiento. Alícuotas del cultivo se cosecharon a los tiempos indicados. En todos los casos se incubó el extracto durante 1 hora a 37°C en presencia de ornitina radiactiva.

4.2.2 RECUPERACION DE LA ACTIVIDAD DE ODC AL REINICIAR EL CRECIMIENTO.

Como se vió en el punto anterior, la actividad de ODC va disminuyendo a medida que el cultivo va envejeciendo. En este experimento se quiso evaluar la capacidad de recuperación de la actividad de la enzima por el agregado de medio fresco al cultivo.

Se desarrolló un cultivo hasta que alcanzó el estado estacionario, se centrifugó suavemente, y se resuspendió en medio fresco, a una concentración de parásitos de 1×10^7 /ml de cultivo. Se fueron sacando alícuotas a los tiempos indicados, y se midió actividad de todas ellas. Simultáneamente, se separó una fracción del mismo cultivo, y se desarrolló en presencia de metionina-³⁵S, sacando alícuotas a los mismos tiempos, para poder evaluar la incorporación de radiactividad a la fracción TCA-insoluble.

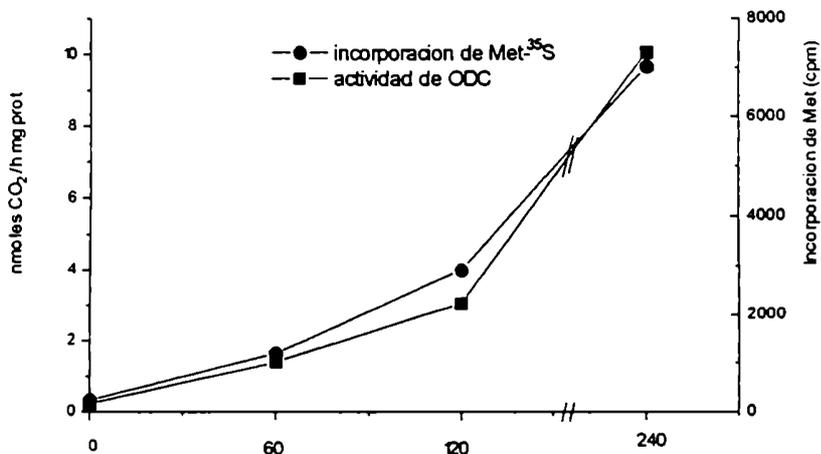


Fig.22: Un cultivo en estado estacionario se centrifugó suavemente, y se resuspendió en medio fresco reiniciando el cultivo. Se cosecharon alícuotas a los tiempos indicados luego del agregado del medio fresco, y se midió actividad de ODC en presencia de ornitina radioactiva e incorporación de metionina radioactiva..

Los resultados muestran que la recuperación de la actividad de ODC hasta alcanzar valores normales es muy rápida, de aproximadamente cuatro horas, y va paralela a una activa incorporación de metionina-³⁵S, lo que indica que la recuperación es vía síntesis “de novo” de proteínas.

4.2.3 DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD PARA ORNITINA (K_m).

Se determinó la constante de afinidad aparente (K_m) para ornitina, sustrato de la reacción catalizada por la ODC. El cultivo se desarrolló en medio definido HOS-MEM II, se cosechó, se preparó el extracto y se midió actividad enzimática en presencia de concentraciones crecientes de ornitina.

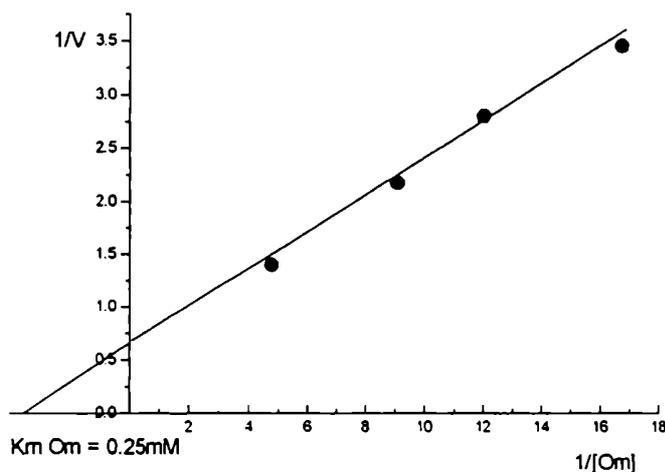


Fig.23: Gráfico de Lineweaver-Burk para determinar la K_m aparente por el sustrato y la velocidad máxima de la reacción catalizada por la ODC.

A partir del gráfico se obtiene una K_m aparente para ornitina de 0.25mM, y una velocidad máxima de 0.09nmoles/min. Estos resultados difieren bastante de los obtenidos en nuestro laboratorio para *L. mexicana*, que tiene una K_m aparente de 0.75mM (Sanchez et al., 1995) aunque son comparables a los obtenidos para la enzima aislada de *T. brucei*($K_m=0.28mM$) (Phillips, M. et al. 1988).

$$K_m = 0.25mM$$
$$V_{max} = 0.09 \text{ nmoles/min}$$

4.2.4 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA

Todas las ODC de parásitos tripanosomátidos estudiadas hasta el momento son muy estables, con una vida media de alrededor de 8 horas. Para saber si la ODC de *C.fasciculata* compartía ésta característica, se hizo una incubación en presencia de cicloheximida. Para ello, se incubó un cultivo en presencia de 50µg/ml de cicloheximida (CHx), y se sacaron alícuotas a distintos tiempos para medir actividad.

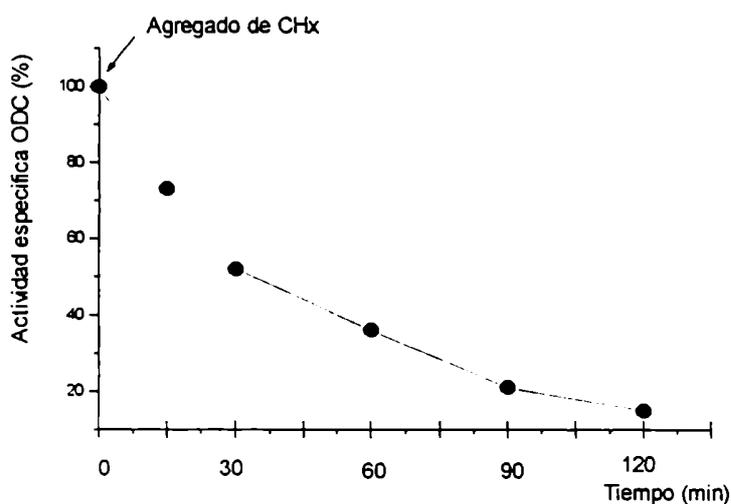


Fig.24: Un cultivo de parásitos desarrollado en medio HOS-MEM se incubó en presencia de 50µg/ml Chx. Las alícuotas se recogieron a los tiempos indicados en la figura, y se midió actividad de ODC utilizando como sustrato de la reacción ornitina radioactiva.

A partir de los resultados obtenidos, es evidente que la ODC de *C. fasciculata* es muy inestable “in vivo”, con una **vida media de 30 minutos**, comparable sólo a la de mamíferos.

4.2.5 REGULACION POR POLIAMINAS

4.2.5.1 ENSAYO “IN VIVO”

Como se mencionó anteriormente, la ODC es una enzima que está muy regulada a todo nivel. Las enzimas de diferentes organismos comparten el mismo mecanismo catalítico de formación de putrescina utilizando PLP como cofactor, y, como se verá más adelante, la inhibición irreversible por α -difluorometilornitina (DFMO). En cuanto a la regulación

por la presencia de poliaminas en el medio, los efectos son diferentes en la mayoría de las enzimas estudiadas. Para determinar cual era el efecto del agregado de poliaminas al medio de cultivo, se prepararon cultivos en medio definido a los que se les agregó 10mM putrescina ó 1mM espermidina, recogiendo alicuotas a diferentes tiempos para medir actividad de la enzima.

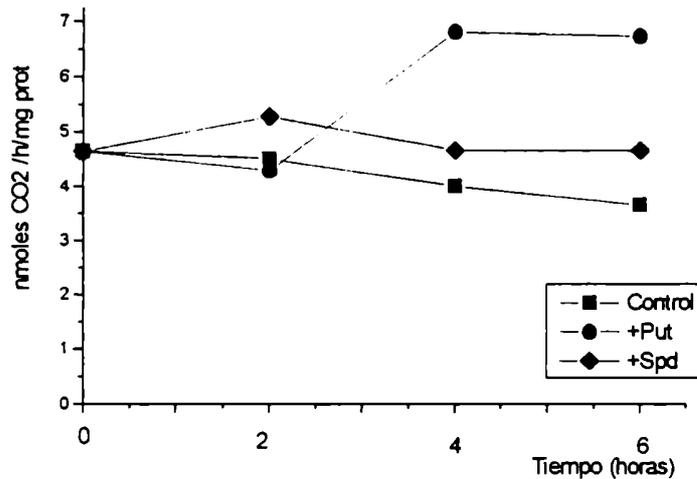


Fig.25: Los parásitos se desarrollaron en medio definido, con el agregado ó no de 10mM putrescina ó 1mM espermidina. A los tiempos indicados se recogieron alicuotas y se midió actividad de ODC utilizando ornitina radioactiva como sustrato.

Los resultados demuestran que el agregado de putrescina al medio de cultivo provoca un leve aumento en la actividad de la enzima, comparado con los valores del control, en vez de la esperada regulación negativa. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que la ODC de *L. mexicana*, un parásito perteneciente a la misma familia, tampoco es regulable por poliaminas; en cambio la ODC de mamíferos es muy sensible al agregado de poliaminas al medio de cultivo, a traves de un mecanismo que se halla ausente en tripanosomátidos.

4.2.5.2 ENSAYO "IN VITRO"

En el ensayo anterior se demostró que la ODC de *C.fasciculata* no es regulable por la presencia de poliaminas en el medio de cultivo. Se quiso ver entonces si la reacción "in vitro" se modificaba por el agregado de poliaminas al medio de reacción. El extracto enzimático se preparó como se detalla en Materiales y Métodos, y se agregaron putrescina ó espermidina en la mezcla de reacción a las concentraciones indicadas,

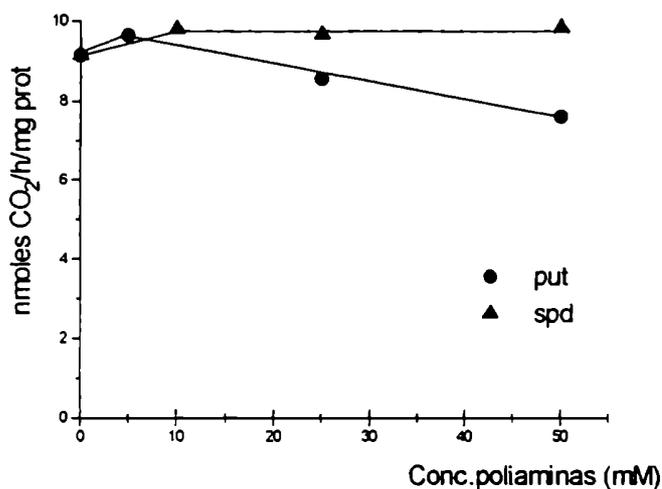


Fig.26: Los extractos enzimáticos se incubaron durante una hora en presencia de cantidades crecientes de putrescina y espermidina, utilizando como sustrato para la reacción ornitina radiactiva.

De la figura se concluye que la ODC de *C.fasciculata* tampoco es regulable por el agregado de poliaminas al ensayo de actividad, salvo a altas concentraciones de putrescina (50mM), donde se ve una inhibición de aproximadamente el 20%.

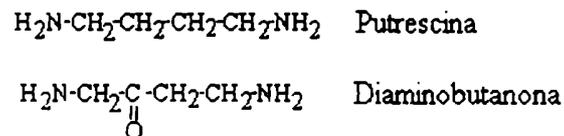
5- EFECTO DE INHIBIDORES

Dada la importancia de las poliaminas para el crecimiento de los parásitos, se ha tratado de desarrollar inhibidores de la enzima ODC. Si se detiene la síntesis de putrescina, la vía metabólica de síntesis de poliaminas se bloquea, y por lo tanto se esperaría que se detuviera el crecimiento de los cultivos.

5.1 EFECTO DE DIAMINOBUTANONA

5.1.1 ENSAYOS "IN VITRO"

La diaminobutanona es un compuesto análogo a la putrescina, que se une a la ODC y la inhibe.



Se hicieron ensayos de inhibición agregando cantidades crecientes de diaminobutanona a la mezcla de reacción.

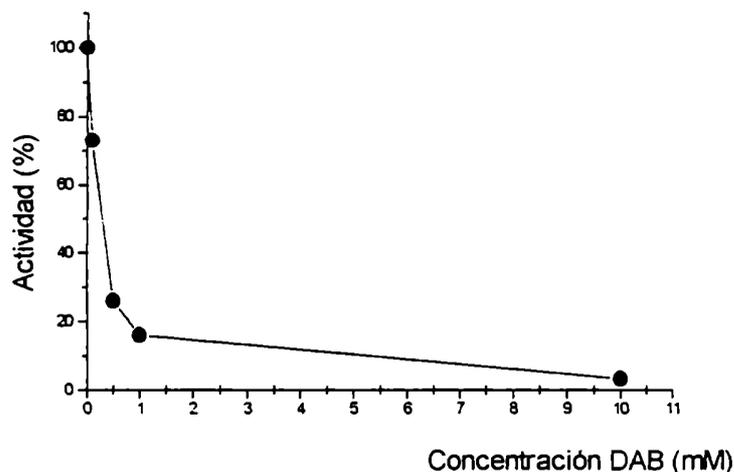


Fig.27: Se incubó un extracto enzimático en presencia de concentraciones crecientes de DAB. Se utilizó como sustrato de la reacción ornitina radioactiva en concentración 0.69mM.

La DAB tiene un efecto muy inhibitorio sobre la actividad de ODC, aún a bajas concentraciones, ya que a 0.5mM queda una actividad residual del 25%. Para determinar el tipo de inhibición se hicieron curvas de competencia a dos concentraciones de sustrato diferentes. Se trabajó a dos concentraciones de ornitina radioactiva: 0.69mM (la que se usa normalmente para los ensayos) y 0.354 mM. Las concentraciones se eligieron teniendo en cuenta la K_m para ornitina, que es de 0.25mM.

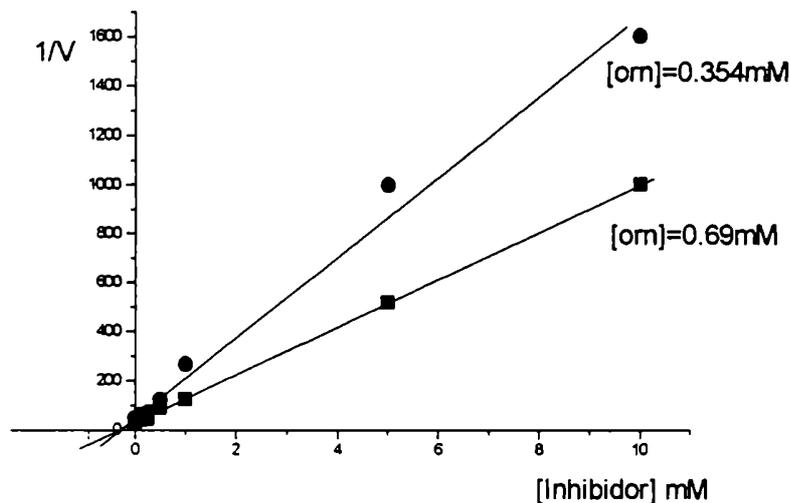


Fig.28: Análisis de Dixon (Dixon plot) para la caracterización del inhibidor. Se utilizaron dos concentraciones de sustrato, una saturante (0.69mM) y otra no saturante (0.354mM), cercana a la K_m para ornitina.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el gráfico de Dixon (Dixon, 1964), y se vió que la DAB era un inhibidor competitivo, con una $K_i \cong 0.15mM$.

5.1.2 ENSAYOS "IN VIVO"

Anteriormente se demostró que DAB es un inhibidor competitivo de la ODC. Se hicieron ensayos "in vivo" para ver si con esta droga se podía detener el crecimiento de los parásitos.

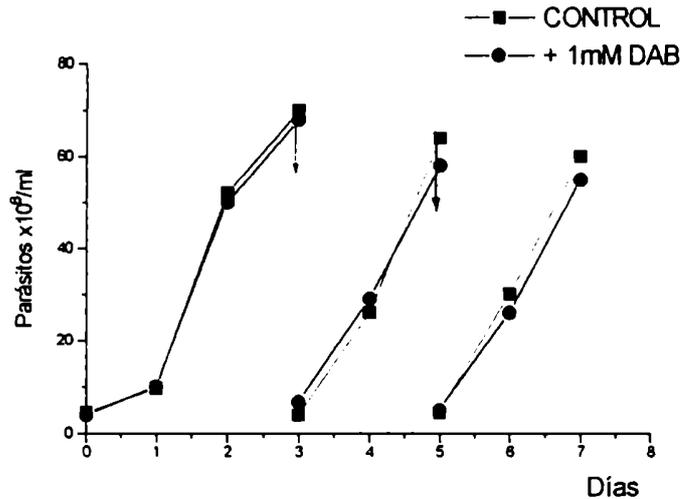


Fig.29: Los cultivos se desarrollaron en medio HOS-MEM II, en ausencia (control) ó presencia de 1mM DAB. Todos los cultivos se diluyeron a medida que alcanzaban la fase logarítmica tardía (indicado por la flecha) reiniciando luego la incubación. El crecimiento se siguió por conteo en cámara de Neubauer.

Como se ve en la figura, aún luego de sucesivos pasajes en presencia de 1mM DAB, la velocidad de crecimiento de los cultivos es comparable a la del control.

5.2 EFECTO DE α -DFMO.

Como se ha mencionado varias veces, el DFMO es un análogo sintético de ornitina. Se une al sitio activo de la enzima, y se decarboxila dando un compuesto intermedio que permanece unido en forma covalente, inactivando la enzima en forma irreversible. La unión del DFMO a la ODC es altamente específica, y tiene una relación estequiométrica subunidad proteica: inhibidor de 1:1. Esta propiedad del compuesto ha sido de gran utilidad entre otras cosas para la determinación del peso molecular de la enzima en geles desnaturalizantes, para la localización subcelular y la

cuantificación de la enzima y para estudios sobre los mecanismos de degradación de la ODC.

5.2.1 EFECTO DE DFMO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA

Se probaron distintas concentraciones de DFMO en un ensayo “in vitro” de actividad enzimática, para determinar el porcentaje de inhibición.

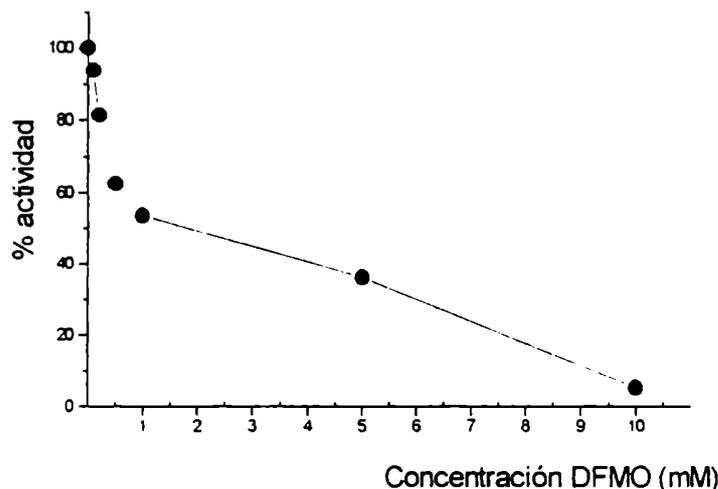


Fig.30: Se midió actividad de ODC en presencia de cantidades crecientes de DFMO en la mezcla de reacción, en un rango de 0 a 10mM, utilizando como sustrato de la reacción ornitina radioactiva.

Como se ve en la figura, la inhibición de la actividad de ODC en los extractos enzimáticos aumenta con la concentración de DFMO, lograndose una inhibición practicamente del 100% a 10mM. A partir de estos valores se pudo calcular la constante de inhibición (K_i) del DFMO que resultó

$$K_i = 0.2\text{mM}$$

5.2.2 EFECTO DE DFMO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ODC "IN VIVO".

Cuando se agrega DFMO a los medios de cultivo y la droga se une en forma irreversible a la enzima, los organismos dejan de producir poliaminas, y por lo tanto se produce la inhibición del crecimiento

En la literatura se ha descrito este fenómeno en otras especies de parásitos, en hongos, células animales y plantas. Unicamente la ODC de *E. coli* es insensible al compuesto. La mayoría de los casos descritos de "resistencia" a la droga son aquellos en que por efecto de la misma, se produce una amplificación del gen de ODC, y por lo tanto siempre quedaría una actividad residual de la enzima que permitiría la proliferación normal.

Para determinar el efecto del agregado de la droga a cultivos de *C. fasciculata*, éstos se desarrollaron en medio definido (HOS MEM II) en presencia de cantidades crecientes de DFMO, en un rango de 5 a 50mM, durante sucesivos pasajes. El crecimiento se siguió día a día por contaje del número de parásitos en cámara de Neubauer, y a medida que alcanzaban la fase estacionaria temprana se diluyeron con medio fresco reiniciando un nuevo ciclo de crecimiento. En todos los casos se utilizó cultivos control sin DFMO.

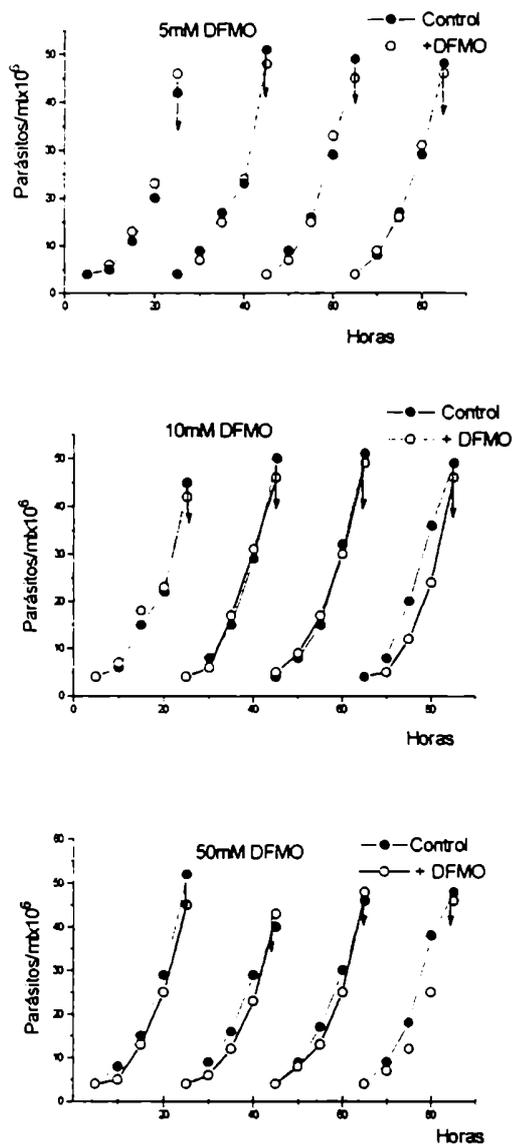


Fig.31: Los cultivos se desarrollaron en ausencia ó presencia de 5mM, 10mM y 50mM DFMO, en medio HOS-MEM II, diluyendo con medio fresco a medida que alcanzaban la fase logarítmica tardía. El crecimiento se siguió por conteo en cámara de Neubauer.

Como se puede ver, la velocidad de crecimiento no se ve afectada en cultivos en presencia de 5mM, 10mM y hasta 50mM DFMO. Una de las explicaciones más razonables para justificar estos resultados es que el DFMO no puede entrar a las células, y de ahí su insensibilidad. Para investigar ésta posibilidad se prepararon extractos enzimáticos de cada

cultivo, se midió actividad de ODC, y se vió que todos ellos tenían valores de actividad específica que iban desde el 3 al 7 % de los valores normales (ver más adelante), es decir, que la droga entraba e inhibía a la enzima ODC.

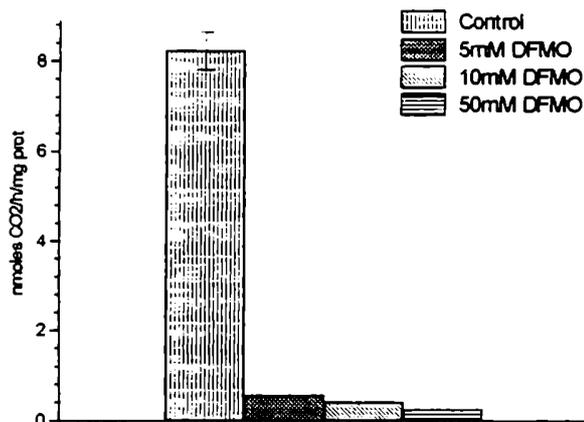


Fig.32: Los cultivos se desarrollaron en ausencia (control) ó presencia de 5, 10 y 50mM. Luego de varias diluciones en medio fresco HOS-MEMII al alcanzar la fase logarítmica tardía, se cosecharon, se lavaron 2 veces en PBS, y se midió actividad de ODC para cada extracto enzimático obtenido.

5.2.3 RECUPERACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA AL REMOVER EL DFMO DE LOS CULTIVOS.

Ya se demostró que el extracto enzimático preparado a partir de cultivos desarrollados en presencia del inhibidor, carece prácticamente de actividad. Se quiso ver la velocidad de recuperación de la actividad enzimática una vez que se saca el inhibidor del medio.

Un cultivo desarrollado durante más de un mes en presencia de 10mM DFMO se lavó con PBS, se resuspendió en medio fresco, y se reinició la incubación recogiendo alícuotas a distintos tiempos. Se midió también la síntesis proteica por incorporación de metionina-³⁵S a la fracción precipitable por TCA.

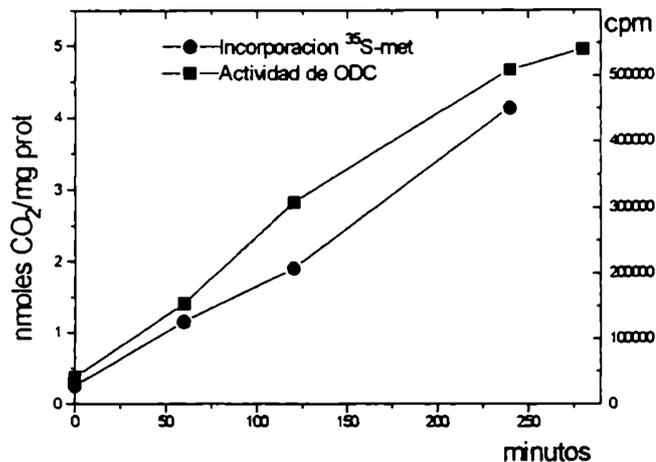


Fig.33: El cultivo desarrollado en presencia de 10mM DFMO se lavó con PBS, se resuspendió en medio fresco, y a los tiempos indicados en la figura se recogieron alícuotas para medir actividad de ODC. A una fracción del mismo, se midió incorporación de metionina radioactiva como patrón de síntesis de proteínas.

Como se puede ver en la figura, una vez que se lava el DFMO del medio, la recuperación de la actividad de ODC comienza inmediatamente, y alcanza sus valores normales al cabo de 4 horas. La tasa de recuperación de la actividad es similar a la de síntesis de proteínas totales, lo que indicaría que la recuperación de la actividad sucede vía síntesis de nueva proteína.

5.2.4 ENSAYO DE UNA POSIBLE AMPLIFICACION GENICA.

La resistencia de los cultivos de *C.fasciculata* a altos niveles de DFMO podría explicarse por amplificación génica, como se ha descrito en la literatura para otros organismos (Hanson et al., 1992). Para evaluar esta posibilidad, se tomó un cultivo que se había desarrollado en presencia de 50mM DFMO durante un período prolongado de tiempo (1-2 meses), se lo lavó con PBS para eliminar todo el DFMO, y se lo dejó recuperar durante 24 horas en medio fresco, sin el inhibidor. Si la enzima estuviera amplificada, se esperarían valores de actividad de ODC muy superiores a los normales.

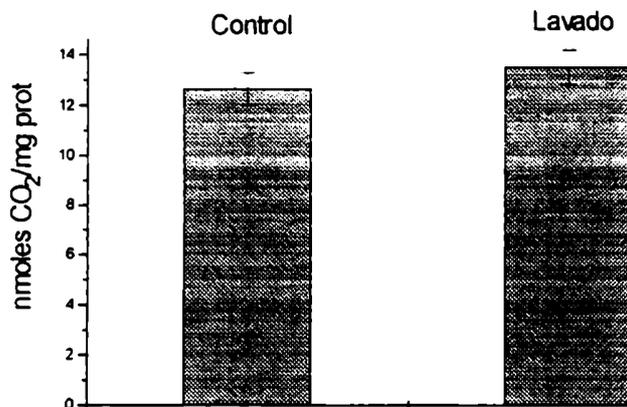


Fig.34: Los cultivos se desarrollaron ó no en presencia de 50mM DFMO durante un período prolongado de tiempo (varias semanas). Se lavaron, resuspendieron en medio fresco y despues de 24 horas se prepararon los extractos enzimáticos. Se midió actividad de ODC en presencia de ornitina radioactiva.

Los valores de actividad específica fueron los mismos en un cultivo “resistente” a 50mM DFMO y en cultivos normales; estos resultados indicarían que posiblemente no se produjo amplificación del gen de ODC.

5.2.5 REVERSIBILIDAD DE LA UNION.

Otra posibilidad para explicar la resistencia al inhibidor de los cultivos de *C.fasciculata* era que la unión de DFMO al sitio activo de la enzima fuera reversible ó estuviera alterada. En todos los casos de organismos sensibles a la droga, ésta unión es irreversible, y la enzima al no poder liberarse, no está disponible para el acceso de nuevas moléculas de sustrato.

Un cultivo desarrollado en presencia de 50mM DFMO se dividió en dos. Una fracción se lavó, resuspendió en medio fresco y despues de reiniciar la incubación se recogieron alicuotas a dos tiempos diferentes. La otra fracción se trató en forma similar, pero se agregó Chx despues de la resuspensión de los parásitos.

Como anteriormente se demostró que la recuperación de la actividad de ODC sucedía a traves de síntesis de nueva proteína, con el agregado de

un inhibidor de dicha síntesis como Chx, se quiso probar si de alguna manera la actividad enzimática se podía recuperar por liberación de moléculas de ODC que estuvieran unidas a DFMO.

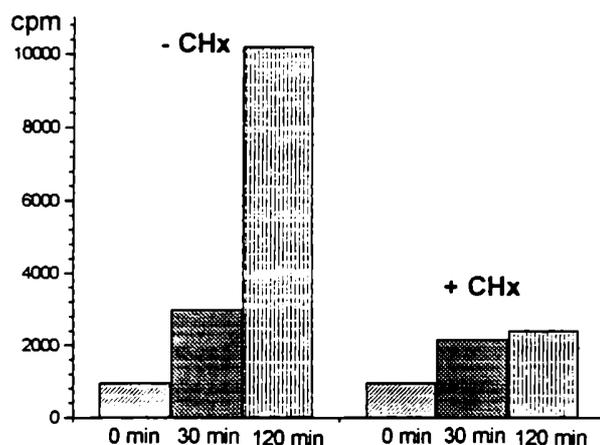


Fig.35: Los cultivos se incubaron en ausencia ó presencia de 50 μ g/ml de CHx, y se recogieron alícuotas a los tiempos indicados en el gráfico. Se preparó el extracto enzimático en la forma usual, y se midió actividad de ODC de las fracciones recogidas en presencia de ornitina radioactiva.

De la figura se concluye que la unión a DFMO es irreversible; no hay “liberación” de moléculas de ODC una vez unidas al inhibidor. La recuperación de la actividad cuando se elimina el DFMO del medio sucede exclusivamente vía síntesis de nueva proteína. El pequeño aumento que se nota con CHx puede deberse al tiempo que ésta demora en entrar a la célula e inhibir la síntesis proteica.

5.2.6 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA

De la misma manera como se determinó la estabilidad de la ODC en el caso de un cultivo normal, se midió la estabilidad de la misma en un cultivo resistente a DFMO. En este caso, al cultivo desarrollado en presencia de 50mM DFMO por más de un mes, se lo lavó y se dejó recuperar durante 48 horas en medio fresco para permitir la síntesis de nueva enzima. A partir

de ese momento, se procedió en forma análoga con las muestras tomadas de ambos cultivos después del agregado de CHx.

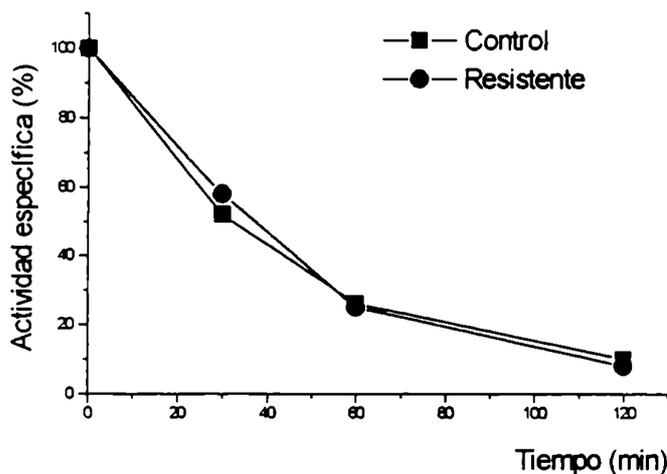


Fig.36: Los cultivos control y resistente a DFMO se incubaron en presencia de 50µg/ml de Chx. Se recogieron alícuotas a los tiempos indicados en la figura, y se midió actividad enzimática de los mismos en presencia de ornitina radioactiva.

En la figura se ve que la estabilidad de la enzima ODC es la misma ya sea que el extracto se prepare a partir de un cultivo normal, ó a partir de un cultivo que se ha desarrollado en presencia de 50mM DFMO durante varias semanas.

5.2.7 ENTRADA DE DFMO.

Para demostrar que los parásitos resistentes a 50mM DFMO seguían captando la droga en forma comparable a los de un cultivo normal, se diseñó el siguiente experimento: se tomó un cultivo control, se agregó 10mM DFMO al medio, y se recogieron alícuotas a distintos tiempos. Por otro lado, se lavó dos veces con PBS un cultivo que se había desarrollado en presencia de 50mM DFMO, se resuspendió en medio fresco y se lo dejó recuperar durante cuatro horas, agregando luego DFMO a la misma concentración que en el cultivo control, y se recogieron alícuotas a los mismos tiempos. Lo que se quiso medir con este experimento era si la disminución de la actividad por agregado de DFMO al medio de cultivo era

aproximadamente la misma en un cultivo normal y otro "resistente", acostumbrado a la presencia de la droga.

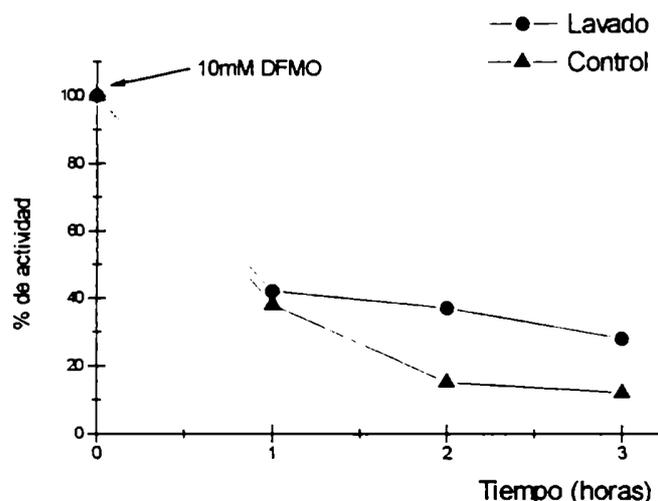


Fig.37: A ambos cultivos se les agregó 10mM DFMO en el medio. Se recogieron alícuotas a los tiempos indicados en la figura, y se midió actividad enzimática de cada fracción en presencia de ornitina radioactiva. Los valores están expresados en porcentaje con respecto a la actividad de ODC al tiempo cero del experimento.

Con éste experimento se demuestra que los cultivos resistentes siguen captando DFMO del medio en forma comparable a un cultivo normal, ya que la disminución de la actividad de ODC, que es nuestra medida indirecta de que el DFMO está entrando, no es significativamente diferente en ambos casos. La medida directa de la captación del DFMO es prácticamente imposible por la extremada lentitud de este proceso.

5.3 CULTIVOS RESISTENTES A DFMO.

Como se describió anteriormente, la enzima ODC preparada a partir de cultivos desarrollados en presencia de 50mM DFMO después de su recuperación, aparentemente no sufriría ningún cambio en sus propiedades bioquímicas comparada con la enzima obtenida a partir de un cultivo que nunca fue expuesto a la droga. Por lo tanto, se hizo un seguimiento a través del tiempo de ciertos parámetros medibles de los cultivos como son las curvas de crecimiento, su actividad enzimática, el transporte de putrescina y el contenido endógeno de poliaminas, para ver si alguno de ellos variaba con el transcurso del mismo.

5.3.1 CURVA DE CRECIMIENTO.

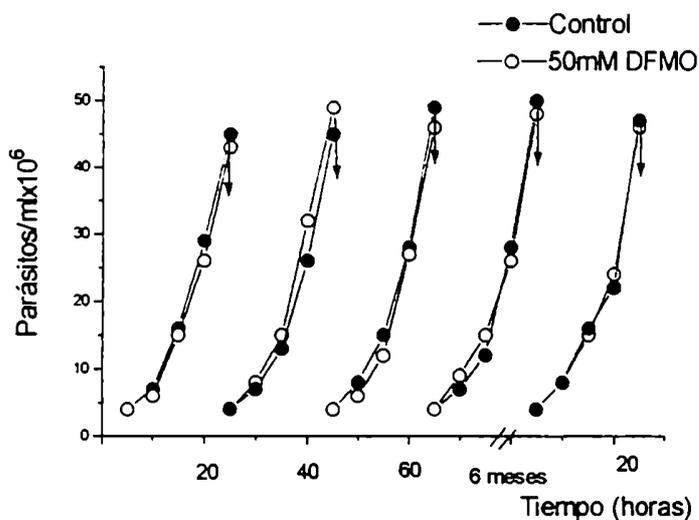


Fig.38: El cultivo se desarrolló en ausencia ó presencia de 50mM DFMO, y se diluyó a medida que alcanzaba la fase logarítmica tardía. El crecimiento se siguió por conteo del número de parásitos en cámara de Neubauer.

5.3.2 ACTIVIDAD DE ODC

A partir de los mismos cultivos anteriores se preparó extracto enzimático en el momento previo a cada dilución, después de haber lavado los parásitos y se midió la actividad de ODC de todos ellos.

	1 pasaje	2 pasajes	3 pasajes	4 pasajes	6 meses
CONTROL	6.71	7.74	9.55	8.32	8.25
50mM DFMO	0.64	1.09	0.8	0.5	0.42

Tabla 2: Los valores están expresados en nmoles CO₂/h/mg proteína.

La actividad de ODC de los extractos de cultivos desarrollados en presencia de 50mM DFMO es muy baja con respecto al control a lo largo de todo el experimento.

5.3.3 TRANSPORTE DE PUTRESCINA

A alicuotas de los mismos cultivos se les midió la captación de putrescina, para determinar si existía alguna variación en el transcurso del experimento.

	1 pasaje	2 pasajes	3 pasajes	4 pasajes	6 meses
CONTROL	0.034	0.039	0.093	0.078	0.051
50Mm DFMO	0.27	0.42	0.49	0.43	0.38

Tabla 3: Los valores están expresados en pmoles putrescina x $\text{min}^{-1}/10^6$ células.

Como se puede ver en el cuadro, la captación de putrescina no sufre ninguna variación respecto de lo que se considera "normal" para un cultivo desarrollado en presencia de 50mM DFMO. En todos los casos, es aproximadamente 5 a 10 veces mayor que el de un cultivo control.

5.3.4 CONTENIDO ENDOGENO DE POLIAMINAS.

Se determinó el contenido de poliaminas de cada uno de los cultivos anteriores, con un analizador automático de aminoácidos. Los pasajes se refieren a cultivos en presencia de DFMO.

	Putrescina	Espermidina
CONTROL	166.99	76.55
1 pasaje	2.09	63.51
2 pasajes	1.8	112.58
3 pasajes	0.28	34.05
4 pasajes	0.62	35.28
6 meses	0.54	39.07

Tabla 4: Los valores están expresados en $\text{nmol}/10^8$ células.

El contenido endógeno de putrescina baja considerablemente a partir del primer pasaje en presencia de 50mM DFMO, mientras que el de espermidina baja un poco con respecto del control, hasta alcanzar un nivel que es aproximadamente la mitad de la concentración que tiene en condiciones normales de cultivo.

Los resultados anteriores parecen indicar que *C.fasciculata* muestra una resistencia “natural” a DFMO. Podemos decir que este fenotipo no se debe a impermeabilidad a la droga, ni a la inducción de algún tipo de enzima insensible. Por otro lado, como se demostró anteriormente, tampoco se produce amplificación del gen de ODC en presencia de altas concentraciones de DFMO. Podemos especular que la resistencia de *C. fasciculata* a altas concentraciones de DFMO es debido al rápido recambio de la proteína, que es continuamente sintetizada. La ODC residual podría ser suficiente para producir cantidades muy pequeñas de putrescina, que es convertida rápidamente a espermidina, y permite la supervivencia del parásito.

6- INMUNOPRECIPITACION.

Para determinar si existe alguna homología estructural entre la ODC de *C.fasciculata* y la de células de mamíferos (que son igualmente inestables “in vivo”) se hizo un ensayo de inmunoprecipitación de la ODC de *C.fasciculata* con antisuero policlonal antiODC de mamífero. Se probaron dos concentraciones de antisuero distintas, y se utilizó como control un extracto enzimático preparado a partir de hígado de rata.

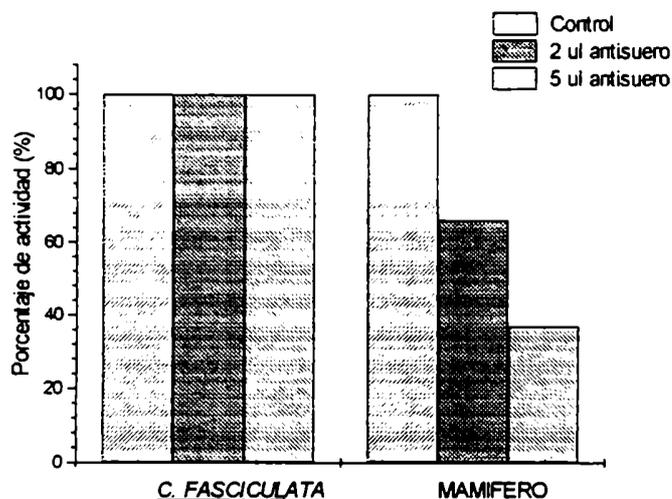


Fig.39: Ensayo de inmunoprecipitación de ODC de *C.fasciculata* con antisuero antiODC de mamífero. Se llevó a cabo en las condiciones que se indican en Materiales y Métodos. Luego de centrifugar, se midió actividad de ODC de todos los sobrenadantes. Se utilizaron 2 y 5 µl de antisuero en cada caso.

Como se observa en la figura, el antisuero antiODC de mamífero precipita la actividad de las células de hígado de rata, mientras que no reacciona con la ODC de *C.fasciculata*, lo que indicaría que al menos no existe homología entre los epítopos hacia los cuales están dirigidos los anticuerpos.

7 - DETERMINACION DEL PM DE ODC DE *C.FASCICULATA* EN GELES DE SDS-PAGE.

7.1 PURIFICACION PARCIAL DE LA ODC

Para determinar el peso molecular de la ODC de *C. fasciculata* en geles de poliacrilamida-SDS, se decidió purificarla parcialmente.

	Proteína total (mg)	Actividad total (µmoles)	Act. específica (nmoles CO ₂ /h/mg prot)	Purificación
Original	118.1	8.5	72	1
Sbte. acetónico	74.3	9.6	128	1.7
DEAE	2	0.686	343	4.76

Tabla 5: Purificación parcial de la ODC de *C. fasciculata*.

7.1.1 TRATAMIENTO CON SOLVENTES ORGANICOS.

El agregado de medio volumen de acetona a los extractos eliminó aproximadamente el 50% de las proteínas, sin pérdida de ODC que permaneció en el sobrenadante acetónico, lo que indicaría que se trata de una proteína hidrofóbica.

7.1.2 COLUMNA DE INTERCAMBIO ANIONICO

La fracción soluble obtenida en el paso anterior, se sembró en una columna de DEAE-Sepharose, y se eluyó con un gradiente de ClNa de 0.1 a 0.5M. Antes de medir actividad de las fracciones recogidas, se dializaron durante 2 horas contra buffer para eliminar la sal. La fracción activa eluyó en el rango de 0.3 a 0.4M ClNa.

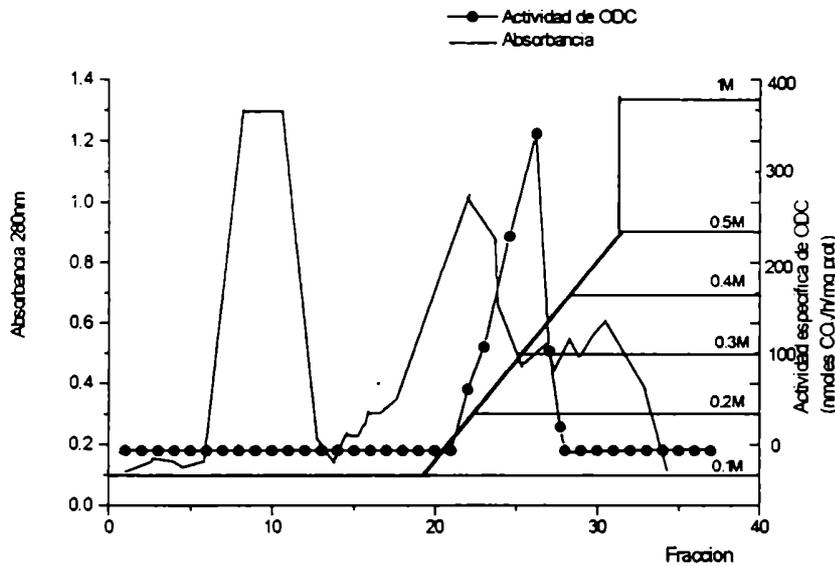


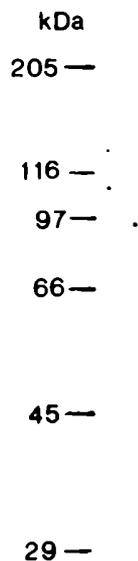
Fig.40: Perfil de elución de la columna de DEAE. De cada fracción recogida (2ml) se midió actividad de ODC. Los valores están expresados en actividad específica.

7.2 INCUBACION CON ^3H -DFMO.

La fracción de ODC parcialmente purificada se incubó durante una hora a 37°C en presencia de ^3H -DFMO (27.12 Ci/mmol). Después de la reacción se agregó 0.1mM DFMO, $20\mu\text{g}$ de citocromo C, y 4 volúmenes de cloroformo:metanol (1:2), dejando precipitar a -20°C . Luego de dos horas, se centrifugó, y el precipitado se resuspendió en "cracking buffer" para someterlo a electroforesis en gel.

7.3 GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

La muestra obtenida se sembró en un gel de 12.5% poliacrilamida - 0.1% SDS, y se corrió durante 16 horas a 6mA. Se coloreó con Coomassie-Blue, se decoloró, se trató con DMSO y PPO, se secó y se expuso sobre una placa radiográfica de alta sensibilidad a -70°C .



kDa
205 —
116 —
97 —
66 —
45 —
29 —

Fig.41: Peso molecular de la enzima parcialmente purificada. El gel se expuso a una placa radiográfica de alta sensibilidad durante varias semanas.

8- CLONADO Y SECUENCIACION DE LA ENZIMA ODC.

En vista de los resultados anteriores, que indican que la enzima ODC de *C. fasciculata* es muy diferente en el aspecto regulatorio a otras enzimas estudiadas, se decidió clonarla y secuenciarla para tratar de establecer alguna correlación entre su secuencia aminoacídica y sus propiedades.

8.1 DETECCION DEL GEN POR HIBRIDIZACION.

Se diseñó un par de oligonucleótidos “primers”, basandose su secuencia en regiones altamente conservadas entre las ODC estudiadas, correspondientes a la zona central del gen de ODC de *L. donovani*. Se hizo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como templado DNA de *C. fasciculata*, y se amplificó una banda única de 540 pares de bases. Esta banda se ligó al vector pBluescript y se secuenció en forma parcial, mostrando una homología del 70% con la secuencia de *L. donovani*. En vista de que se trataba de un fragmento de ODC, se utilizó éste fragmento subclonado como sonda homóloga para los siguientes pasos.

	pBluescript	5'	C	TAA	AGG	GAA	GAA	AAG	CTG		
Cf	CCG	CAC	TTT	GCC	GTG	AAG	TGC	AAC	CCG	AAC	CTC
Ld	CCT	TAC	TTT	GCC	GTG	AAA	AGC	AAC	CCG	CAA	CCG
Cf	GCC	ATC	ATG	GAA	GTC	TTG	GGT	GCC	CTC	GGC	GCG
Ld	CAA	CCG	GCT	GTT	TTG	GAG	GTG	CTC	AGC	GCC	CTC
Cf	GGC	TTC	GAC	TGC	GCC	TCC	AAG	GAC	GAA	ATC	CAC
Ld	GGC	GCC	GGT	TTC	GAC	TGC	GCG	TCC	AAG	GAA	GAA
Cf	CTT	GTG	CTG	GAC	AAC	CAC	CTC	GTG	GAC	TCC	CCA
Ld	ATA	CAT	ATG	GTG	CTA	GGT	CGC	CAG	CTC	GTG	GCG
Cf	GAC	GAT	ATC	GTC	TTC	GCG	AAC	CCG	TGT	AAG	CAG
Ld	TCG	CCG	GAC	GAC	ATC	ATC	TTC	GCC	AAC	CCG	TGC
Cf	CTC	GGT	GAC	CTG	CGC	GAG	GCC	CGC	GCC	TGC	GGC
Ld	AAG	CAG	CTC	GGC	GAC	CTG	CGT	GAG	GCG	CAG	GCG 3'

Se preparó DNA genómico de *C. fasciculata*. Se digirió con distintas enzimas de restricción, y se corrió en geles de agarosa 0.8%. Se transfirieron por capilaridad (Southern blot) a membranas de nylon, y se hibridizaron durante 18 horas utilizando como sonda el plásmido que

llevaba el fragmento de 540 pares de bases, marcado con ATP- γ - 32 P. Las hibridaciones se llevaron a cabo en condiciones de astringencia muy altas, teniendo en cuenta que se trabajaba con una sonda homóloga. Las membranas se lavaron, se expusieron, y se revelaron al día siguiente. En todos los casos se obtuvieron una ó más bandas dependiendo de la enzima de restricción que se utilizara para la digestión.

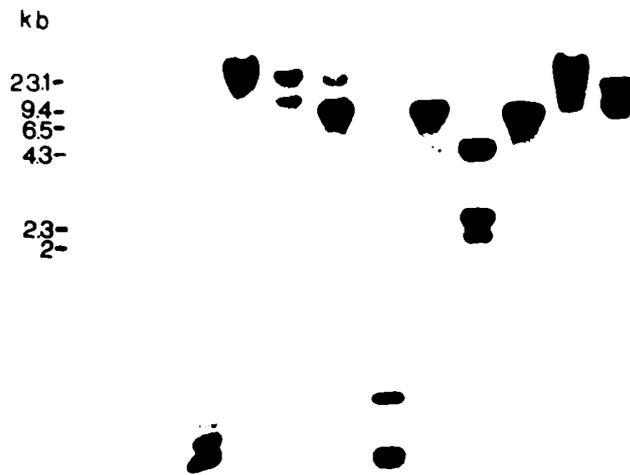


Fig.42: El DNA genómico se digirió con las siguientes enzimas de restricción: Hinf I, Bam HI, Eco RI, Hind III, Ava I, Bgl I, Pst I, Sac I, Xba I, Sst II. Se utilizó λ Hind III como marcador de peso molecular.

8.2 AISLAMIENTO DEL GEN A PARTIR DE UNA BIBLIOTECA GENOMICA.

Se dispuso de una biblioteca genómica de *C.fasciculata* gentilmente cedida por el Dr. Dan Ray, UCLA, Los Angeles, California. Los fragmentos habían sido empaquetados en λ Gem-11 y amplificados en la cepa lisogénica LE392 (Pasion et al., 1992).

Se hicieron cuatro series de selección sucesivas, hasta lograr que luego de la hibridización el 100% de las placas de lisis fueran positivas.

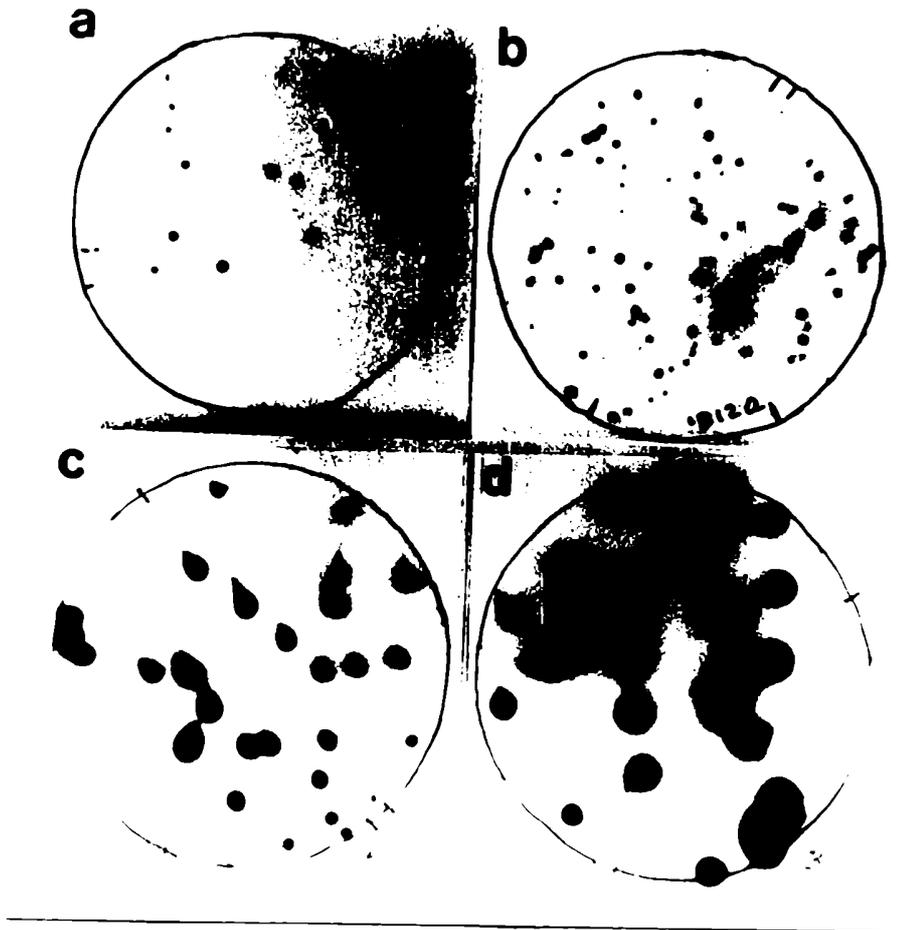


Fig. 43: Autorradiografías de las cuatro series de selección sucesivas que se hicieron para subclonar el gen. Nótese el cambio en la intensidad de hibridización de las placas de lisis a medida que se iba haciendo la búsqueda. Todas los filtros fueron expuestas durante 24 horas. A) "screening" primario B) "screening" secundario C) "screening" terciario D) "screening" cuaternario.

Se purificó el fragmento insertado entre los brazos del fago como se explica en Materiales y Métodos, y se lo cortó con dos enzimas de restricción : Sfi I y SacI. Los productos de digestión se corrieron en un gel de agarosa 1%, obteniendose el siguiente resultado:



Fig.44: Los fragmentos digeridos se corrieron en un gel de agarosa 1%. Línea 1: marcador de peso molecular. Línea 2: Fago digerido con la enzima Sfi I. Línea 3: Fago digerido con la enzima SacI.

Con la enzima Sfi I se obtienen tres bandas: la superior y la inferior corresponden a los brazos del fago: una de 20Kb y otra de 9Kb, mientras que la banda del centro corresponde al fragmento insertado que no se digirió con ésta enzima; con la enzima Sac I, se obtienen las dos bandas correspondientes a los brazos del fago (de 20 y 9 Kb respectivamente), y otras 3 bandas: una de 2Kb y otras dos de tamaño muy similar, aproximadamente 4.5Kb cada una, que corresponden al fragmento ligado que contiene en su secuencia sitios de restricción para ésta enzima.

Se subclonaron las tres bandas obtenidas a partir de la digestión con la enzima de restricción *SacI* en el plásmido pBluescript, utilizando como cepa hospedadora *E.coli* JM83. Las bacterias se transformaron por electroporación, y se hicieron minipreparaciones del plásmido de las bacterias transformadas. Los plásmidos obtenidos se digirieron con la misma enzima para liberar los fragmentos ligados, y se corrieron en un gel de agarosa 1%. Ese mismo gel se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon, y se hibridizó con la misma sonda marcada radiactivamente que se utilizó para hacer la búsqueda en la biblioteca genómica. Solo uno de los clones dió positivo en la hibridización. A su vez, se hizo PCR sobre los plásmidos obtenidos, y solamente el plásmido que había dado positivo en la hibridización dió la banda esperada. De ésta manera se confirmó que al menos una de las colonias bacterianas obtenidas era portadora de un plásmido que tenía una región del gen insertada, que correspondía a la zona de la sonda.

8.3 SECUENCIACION DEL PLASMIDO.

El plásmido recombinante se secuenció, utilizando el “kit” de secuenciación de Amersham “Sequenase Version 2.0”. Se comenzó a secuenciar utilizando los primers comerciales que correspondían a los brazos del plásmido, a ambos lados del sitio de multiclonado. La secuencia que se obtuvo luego de ese primer ciclo no era homóloga con ninguna secuencia de ODC conocida. En base a las secuencias obtenidas se sintetizaron nuevos primers para seguir secuenciando hacia el interior del plásmido, y se pudo determinar la orientación del gen:

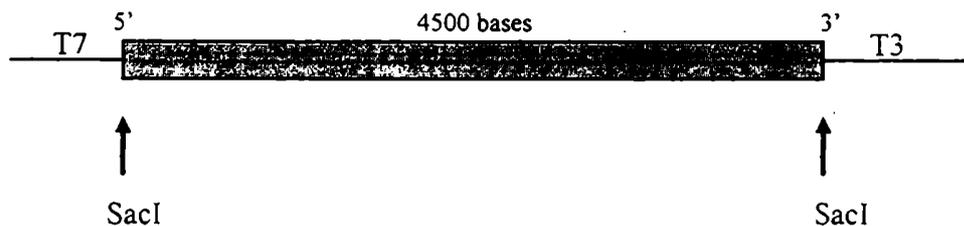


Fig.45: Esquema de la orientación del fragmento que contiene al gen de ODC dentro del plásmido.

Una vez determinada la orientación del gen dentro del plásmido, se siguió secuenciando hasta completar la totalidad del mismo. Se secuenció toda la región río arriba del sitio de iniciación de la traducción, y sólo 163 bases río abajo del codón de terminación. La secuenciación completa se realizó en colaboración con el Dr.F.Svensson (Univ. de Lund, Suecia).

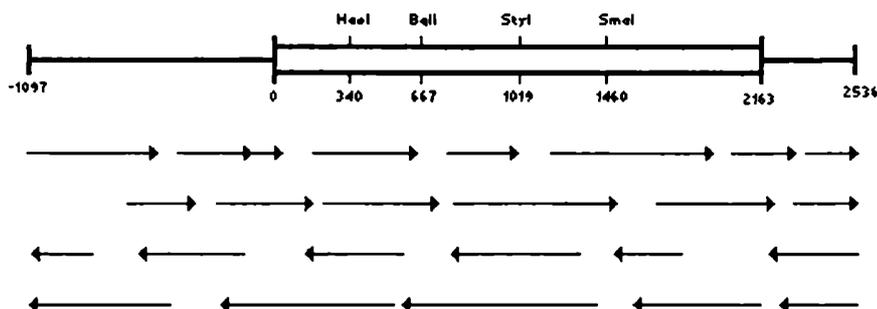


Fig.46: Detalle de la estrategia de secuenciación. La región en oscuro indica la zona codificante, mientras que las flechas indican el sentido de los primers, y el tamaño de los fragmentos secuenciados en cada ciclo.

8.4 SECUENCIA DE LA PROTEINA.

Una vez determinada la secuencia del gen, se tradujo a aminoácidos utilizando el programa Mac Vector versión 3.5 para Machintosh.

1	MSNHVLSLN	ASHYNHANYT	ELVPLPTIAQ	TPTHHFAHDE	NHVTITENGV	TMTTVSAAA
61	MMTATAPLPV	SPVHAFDEAA	QRLLARKTA	LLEQYRMYPQ	SADRLAQRR	HHEASHLRDA
121	EDSDGAALSP	SLLSPTDCNK	TTAA YAQTVA	MSPNEKGGAD	RHTPVAASQD	LVDLFFLEGS
181	DAVNGMSFSA	YPIYGERTAA	ERRAAVRAVF	EKYGVDMQLP	ASPAVLAAAP	AHRQRRFRTV
241	LPRDSVETRE	QYWRRLSNVY	IQKGVKATMA	AAANPTGSNK	PAYEADPFY	MIDLGRVVEQ
301	MARWRHELPM	VRPHFAVKCN	PNLAIMEVLG	ALGAGFDCAS	KDEIHLVLDN	HLVDSPPDIV
421	FGAGMDDVES	LLQAARQHNV	EVYGVSFHVG	SGNGDQSA YV	SALRDSYRVF	QLAAGYGFNC
481	TVLDIGGGYP	GTEPIPGSGE	TSFETIARAM	RPVLEELFGG	GDVTIIEPG	RYFTAATHAL
541	AMNVFATRTL	RLSDVEKENC	QAFQNVVNMD	EPEEYQYYVN	DGLYHSFNCI	VFDHAHPTLL
601	LLNDGDGADD	TAEGVANAAV	DDVDSEEEGE	PTVDGAPTND	SLFVSAWDRR	RNLTRRPLRI
661	TTIFGPTCDS	MDCILKKQPF	PEMKLGDWLL	APDMGSYTTA	AGCPFNGFAT	RRREWSSVA
721	L*DKEDA*ER					

La proteína completa consta de 721 aminoácidos, lo que la hace en tamaño muy similar a la de *L.donovani*, que tiene 707 aminoácidos, pero mucho más grande que la de *T.brucei* (445 aminoácidos) ó la de mamífero (461 aminoácidos).

Las regiones en negrita son las teóricas regiones PEST, que ya se mencionaron en la Introducción. Tiene una región en la zona del extremo N-terminal (aminoácidos 118-140), y otra muy fuerte más cerca del extremo C-terminal, que estaría comprendida entre los aminoácidos 596 y 650.

8.5 COMPARACION DE LA SECUENCIA AMINOACIDICA DE ODC DE *C.FASCICULATA*, *T.BRUCI*, *L.DONOVANI* Y MAMIFERO.

Las secuencias de aminoácidos correspondientes a las diferentes ODCs fueron comparadas utilizando el programa de alineación múltiple de secuencia PILEUP “Wisconsin package, Genetics Computer Group”.

Fig.47: Comparación de la secuencia de ODC de *C.fasciculata* con la secuencias de ODC de *T. brucei*, *L.donovani* y ratón. Los aminoácidos que son idénticos entre todas las especies, aparecen en rojo. Los aminoácidos que son idénticos sólo entre *C.fasciculata* y *L.donovani* aparecen en azul. En la figura también están indicadas las regiones de unión del cofactor piridoxal 5'fosfato y del inhibidor irreversible DFMO. Las teóricas regiones PEST en la ODC de *C.fasciculata* están indicadas por líneas verdes.

9-DETECCION DEL MENSAJERO DE ODC.

Se preparó RNA total como se indica en Materiales y Metodos. El mismo se corrió en un gel de agarosa 1%, en presencia de 2.2M formaldehído, se transfirió a una membrana de nylon (Northern blot), y se hibridizó con la sonda de *C.fasciculata* marcada con ATP- γ - 32 P.

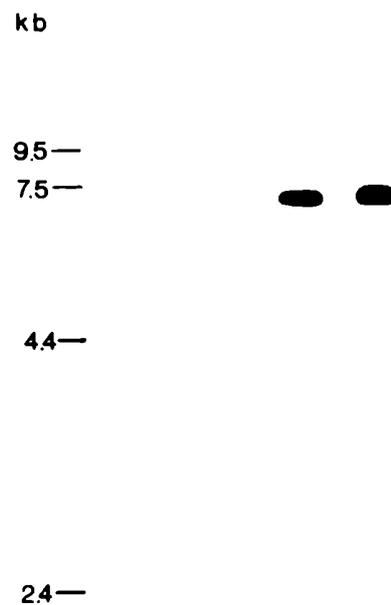


Fig.48: Análisis de northern blot del mensajero de ODC. Se utilizó RNA ribosomal de mamífero y un RNA comercial como marcadores de PM.

El análisis de Northern blot del RNA total de *C.fasciculata* revela un único transcripto de aproximadamente 6.5kb.

10- ANALISIS MOLECULAR DEL GEN DE ODC DE *C.FASCICULATA* CULTIVADA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE DFMO.

En vista de los resultados anteriores, que demostraron que desde el punto de vista bioquímico no había ninguna diferencia entre la ODC obtenida a partir de un cultivo normal, y la obtenida a partir de un cultivo “naturalmente” resistente a DFMO, se quiso determinar si existía alguna diferencia a nivel génico, ó a nivel de mensajero.

Se preparó DNA y RNA de cultivos normales, y cultivos expuestos durante un período superior a los 6 meses a 50mM DFMO. Se corrieron en geles de agarosa, se transfirieron a membranas de nylon, y se hibridizaron con la sonda de *C.fasciculata* marcada con ATP- γ - 32 P.

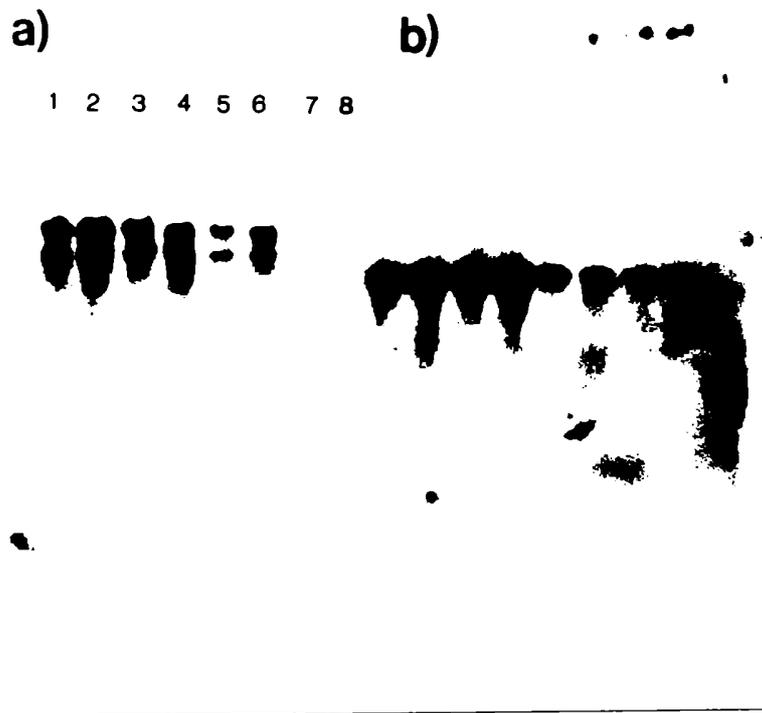


Fig.49: Southern blot del DNA genómico digerido con a)EcoRI ó b)Sacl. Las muestras se sembraron en el siguiente orden: líneas 1 y 2: 10µg deDNA cultivo normal y 10 µg DNA cultivo “resistente”; 3 y 4: 5µg; 5 y 6: 2.5µg y 7 y 8: 1µg. En el panel b) las muestras fueron sembradas en el mismo orden que en el panel anterior.

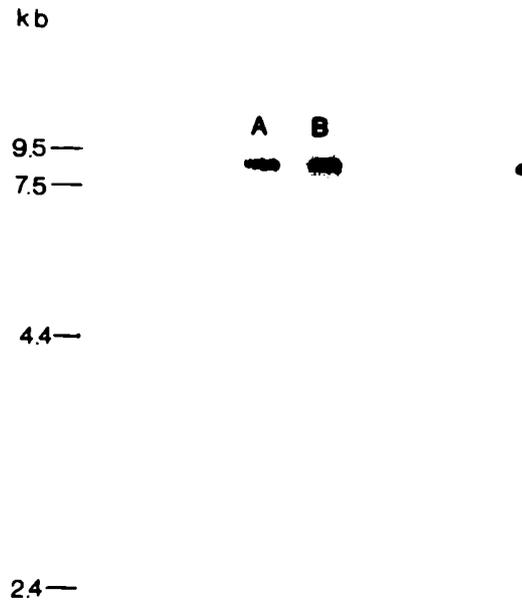


Fig.50: Northern blot de RNA preparado a partir de a) un cultivo normal y b) un cultivo “naturalmente” resistente a DFMO .

De ambas figuras, se deduce que no hay ninguna diferencia en la intensidad de las bandas, ya sea que se trate del gen ó del mensajero de ODC, lo que demuestra que en los parásitos resistentes a DFMO no se ha producido amplificación del gen de ODC ni una estimulación de la transcripción del mismo.

DISCUSION

Todos los organismos eucarióticos estudiados hasta el momento contienen poliaminas. Pese a que su rol definitivo no ha sido esclarecido completamente, se sabe que desempeñan un papel fundamental en una serie de procesos, que ya han sido descritos ampliamente en la Introducción. Brevemente, están involucradas en la síntesis de RNA, DNA y proteínas, y por consiguiente en el crecimiento y la diferenciación celular. De esto se concluye que la biosíntesis y la captación de las mismas tienen que ser procesos altamente regulados.

Estudios previos en protozoos y eucariontes superiores han demostrado que la enzima clave en el proceso biosintético de las poliaminas es la ornitina decarboxilasa (ODC), que cataliza la decarboxilación de la ornitina para dar putrescina, la primera de las poliaminas. Se encontró que en presencia de α -DFMO, análogo estructural de la ornitina, se podía inhibir a la enzima, disminuir drásticamente el contenido endógeno de poliaminas de las células, y por lo tanto detener su crecimiento.

En vista de esto, se decidió estudiar en mayor detalle la regulación de los niveles de poliaminas en el parásito tripanosomátido *C. fasciculata*, poniendo el mayor énfasis en la enzima ODC.

Para estos experimentos se utilizó ornitina uniformemente marcada como sustrato. En estas condiciones, se caracterizaron putrescina y CO_2 radiactivos como los productos formados, y la estequiometría de la reacción indicó que la disminución en la cantidad de ornitina era equivalente a la aparición de putrescina en una relación 1:1. Por otro lado, mientras que el DFMO era capaz de inhibir la reacción casi completamente (90-95%), el ácido oxiacético (AOA) solo provocó un pequeño efecto. Este compuesto a bajas concentraciones es un inhibidor de la ornitina 2-oxo aminoácido transferasa, y las subsiguientes decarboxilaciones oxidativas. Todos estos resultados nos permitieron descartar otras actividades liberadoras de CO_2 , y concluir que la enzima detectada en *C. fasciculata* era una verdadera ODC.

En *C. fasciculata* se detectaron putrescina y espermidina, no así espermina ó cadaverina. Los niveles de putrescina eran aproximadamente el doble que los niveles de espermidina. Por otro lado, incubando los parásitos en presencia de precursores radiactivos, y analizando luego los productos formados por cromatografía en papel, se pudo demostrar el camino biosintético que seguían esos compuestos. De la misma manera, por el

agregado de inhibidores específicos de las enzimas involucradas (CHA para la espermidina sintasa y DFMO para la ornitina decarboxilasa), se pudo ver la desaparición de los productos. Cuando se agregó 2mM CHA durante 18 horas al medio de cultivo, se observó la desaparición del pico correspondiente a espermidina, lo que indicaba que el pasaje de putrescina a espermidina estaba inhibido. De la misma manera, al agregar 50mM DFMO al medio de cultivo, por el mismo lapso de tiempo, se observó que los niveles de putrescina bajaban notablemente, indicando también la inhibición de la vía de transformación de ornitina a putrescina.

Los extractos enzimáticos provenientes de *C.fasciculata* no tienen actividad de arginina decarboxilasa. Tampoco se detectó actividad de ADC cuando se utilizó arginina radioactiva "in vivo". Además, mientras que el DFMO inhibía considerablemente la actividad de ODC de los extractos, estos no eran inhibidos por DFMA, lo que indicaba también que eran incapaces de transformar al DFMA en DFMO.

Dado que el transporte de poliaminas al interior de las células puede modificar los niveles endógenos de estas sustancias, también se estudió en detalle dicho proceso. En condiciones normales, aún desarrollando al cultivo en un medio carente de poliaminas como es el HOS-MEM II, la captación de las mismas es muy baja, indicando que probablemente la capacidad biosintética del parásito sea suficiente para satisfacer sus requerimientos. El agregado de DFMO al medio de cultivo produce un aumento de la captación de putrescina de un orden de magnitud con respecto al control, mientras que la captación de ornitina y espermidina no se ven afectadas en modo alguno. Esto indicaría que estos dos últimos compuestos tienen un mecanismo de regulación de su captación diferente al de putrescina, y que además es insensible al DFMO.

A partir de estos resultados, se decidió trabajar con cultivos desarrollados en presencia de 10mM DFMO, para obtener valores más significativos en los experimentos de transporte subsiguientes.

El proceso de captación es dependiente de energía, inhibiéndose en presencia de compuestos que actúan directamente sobre la cadena respiratoria, como el 2,4-DNP y el KCN. Además varía con la temperatura. A medida que se va bajando la temperatura, el proceso se hace cada vez más ineficiente, hasta que a 0°C, se detiene completamente.

Existen en este parásito al menos dos transportadores con distinta especificidad. Uno sirve únicamente para putrescina, y otro de menor especificidad, es capaz de transportar hacia el interior de la célula tanto

espermidina como espermina, y en menor medida un compuesto análogo sintético como es la dibencilputrescina.

Se determinó también la existencia de dos tipos de proteínas transportadoras para putrescina, una muy inestable, que desaparece al cabo de una hora del agregado de un inhibidor de la síntesis de proteínas como la cicloheximida, y otra más estable, que permanece activa aun después de varias horas del agregado de dicho inhibidor.

También se determinaron algunos parámetros cinéticos del transporte. En primer lugar, se vio que la captación de putrescina es muy activa cuando el cultivo se halla en fase logarítmica, mientras que va disminuyendo a medida que el cultivo va envejeciendo. Por otro lado, se calculó la constante de afinidad para la captación de esa poliamina, que dió un valor de $28 \times 10^{-6} \text{M}$ para un cultivo normal, y de $31 \times 10^{-6} \text{M}$ para un cultivo desarrollado en presencia de 10mM DFMO. Del mismo experimento se dedujo que el aumento en un orden de magnitud de la captación de putrescina está dado por un cambio de la velocidad máxima, que pasa de 0.22 a $6.7 \text{ pmoles}/\text{min}^{-1}/10^6 \text{ células}$.

La ODC es una enzima que ha sido ampliamente estudiada en una gran variedad de organismos. Las enzimas provenientes de diferentes tipos de células comparten mecanismos catalíticos para la formación de putrescina, utilizando piridoxal fosfato como cofactor, y son irreversiblemente inhibidas por DFMO. Sin embargo, difieren ampliamente en sus propiedades, tales como la estabilidad "in vivo" y su sensibilidad a la regulación por poliaminas.

En primer lugar en *C.fasciculata* también se demostró que la enzima requiere el cofactor. Cuando se dializa el extracto enzimático contra 10mM hidroxilamina, la enzima libera todo el PLP endógeno sin desnaturalizarse. En estas condiciones la actividad enzimática se reduce considerablemente, pero puede recuperarse por agregado del cofactor. Esta preparación enzimática libre de cofactor, nos permitió calcular la constante de afinidad del mismo, que dió un valor de 0.09mM, considerablemente más alta que la obtenida en nuestro laboratorio para la ODC de *L.mexicana*, con una K_m para PLP de 0.025mM. La acción del PLP es muy específica, ya que no pudo ser reemplazado por un análogo como piridoxamina 5'-fosfato. Este compuesto no fue eficiente como coenzima, aunque puede competir con el PLP por el sitio activo de la enzima.

Mientras que la Km para el PLP es mucho mayor que en otros casos descriptos, la Km para ornitina, que dió un valor de 0.25mM, es del mismo orden que para las enzimas de otros organismos.

La enzima presentó una actividad máxima en el estadio exponencial temprano, disminuyendo luego a medida que el cultivo envejecía hasta desaparecer prácticamente durante la fase estacionaria. Si los parásitos se lavaban y resuspendían en medio fresco, al cabo de 4 horas la enzima alcanzaba nuevamente niveles normales. La tasa de recuperación de la actividad enzimática era similar a la de síntesis de proteína total. El mismo resultado se obtuvo cuando se investigó la recuperación de la actividad enzimática de cultivos que habían sido incubados durante 24 horas en presencia de DFMO. En ambos casos la recuperación de la actividad enzimática ocurrió a través de síntesis de nueva ODC.

El agregado de putrescina o espermidina a los cultivos por diferentes períodos de tiempo, no causó inhibición de la actividad enzimática; por el contrario, se detectó un leve aumento en los niveles de ODC. Estos datos indican que la ODC de *C.fasciculata* no puede ser regulada por el mecanismo de retroalimentación negativa observado en otros tipos celulares. Cuando se agregaron poliaminas a la reacción "in vitro", tampoco se vió inhibición, salvo a muy altas concentraciones de putrescina (50mM).

La ODC de mamíferos es una de las enzimas más inestables conocidas hasta el momento, con una vida media de alrededor de 30 minutos. Todas las ODC de mamíferos tienen dos secuencias denominadas PEST (ricas en los aminoácidos prolina, ácido glutámico, serina y treonina), ubicadas una de ellas entre los residuos 298-333, y la otra en el extremo carboxílico. Cuando se determinó la estabilidad de la ODC de *C.fasciculata*, fue sorprendente encontrar que también es muy inestable, con una vida media de alrededor de 30 minutos, mientras que las enzimas de otros tripanosomátidos son estables.

En el caso de los parásitos, el uso de inhibidores específicos que disminuyen los niveles intracelulares de poliaminas, han permitido el diseño de algunas estrategias terapéuticas para bloquear la proliferación. En el caso de *T.b.gambiense* y *T.b. rodhesiense*, parásitos de humanos, se demostró que con la aplicación de DFMO, se lograba erradicar la parasitemia. Nosotros encontramos que la DAB, que es un inhibidor análogo de putrescina comúnmente utilizado, compite con la ornitina por la unión a la

ODC, con una K_i de 0.15mM. Pese a que la actividad de ODC disminuye notablemente cuando este inhibidor se agrega al cultivo, el crecimiento de *C.fasciculata* no se ve afectado en modo alguno.

Cuando se agregó DFMO al medio de cultivo sintético, se esperaba detener el crecimiento, como había sido descrito en todos los sistemas estudiados hasta el momento. En cambio, los cultivos de *C.fasciculata* seguían creciendo a la misma velocidad, aún cuando se trabajara a muy altas concentraciones de DFMO, mientras que los niveles de putrescina bajaban drásticamente al cabo de unos pocos pasajes en presencia de la droga, y los de espermidina disminuían a la mitad con respecto al control. Para investigar las posibles causas de esta resistencia de *C.fasciculata* a la acción de DFMO, se midieron una serie de parámetros como el transporte de putrescina, la actividad de ODC, el contenido de poliaminas, y la velocidad de crecimiento de los cultivos. En el lapso de los seis meses que duró el experimento, ninguno de los parámetros mencionados varió respecto de lo que se consideraba normal para un cultivo desarrollado en presencia de DFMO: el transporte de putrescina era un orden de magnitud mayor que en el control sin inhibidor, los niveles de putrescina eran muy bajos y la actividad de ODC era prácticamente inexistente. Lo llamativo era que la velocidad de crecimiento de los cultivos era similar a la del control sin DFMO. Nuestros experimentos descartaron la posibilidad de que se tratara de un caso de amplificación génica como se ha encontrado en otros casos. Por otra parte, se demostró que los parásitos seguían siendo permeables a la droga, como así también que la unión entre la enzima y el inhibidor era irreversible, y que la estabilidad de la enzima en estos cultivos que llamamos “resistentes” no variaba respecto del control. Una posible explicación al fenómeno de resistencia de *C.fasciculata* al DFMO es que la tasa de recambio de la proteína ODC sea tan rápida, que siempre queda una pequeña fracción de enzima activa, capaz de sintetizar putrescina. Esta poliamina sería rápidamente convertida en espermidina, que aun a bajas concentraciones podría garantizar la supervivencia del parásito.

La unión de ODC a DFMO radioactivo permitió marcar selectivamente las moléculas de enzima y determinar su peso molecular en geles de SDS-PAGE. Se obtuvo un PM de alrededor de 100 kD, que es mayor que el calculado a partir de la secuencia de aminoácidos. Esta diferencia todavía no ha sido aclarada.

Con la idea de determinar si existía algún tipo de homología estructural entre la ODC de *C.fasciculata* y la de mamíferos, se intentó precipitar la enzima del parásito con antisuero anti-ODC de ratón. Los resultados indicaron que no existen determinantes antigénicos comunes entre ambas enzimas, ya que la ODC de *C.fasciculata* no precipita aún utilizando altas concentraciones del antisuero.

Para preparar una sonda de DNA específica para ODC apta para la detección del gen, se sintetizaron un par de primers correspondientes a zonas de secuencia conservadas en distintas ODC, y mediante la reacción de PCR, utilizando DNA de *C.fasciculata* como templado, se amplificó un fragmento de 540 pares de bases.

Posteriormente se obtuvo DNA de los parásitos, y se hizo análisis de Southern blot. Se detectaron una ó más bandas dependiendo de la enzima de restricción utilizada. Por otra parte, se preparó DNA a partir de cultivos normales y de otros que por haberse desarrollado en presencia de altos niveles de DFMO denominamos “resistentes”. En ambos casos se digirieron con dos enzimas de restricción. Al sembrar en el gel cantidades crecientes de ambos DNA, e hibridizar con la sonda radiactiva, no se encontró ninguna diferencia en la intensidad de las bandas. Del mismo modo, se preparó RNA a partir de ambos cultivos, y mediante el análisis de Northern blot, tampoco se encontró diferencias en la intensidad de las bandas resultantes. Este análisis reveló un RNA mensajero de 6.5kb. Los resultados descriptos implican que desde el punto de vista molecular no existen diferencias entre los parásitos considerados normales y “resistentes” al DFMO, ya sea a nivel del gen de ODC ó bien del mensajero,

Trabajando sobre de una biblioteca genómica de *C.fasciculata*, al cabo de cuatro series de selección sucesivas, se subclonó un fragmento de DNA de 4.500 pares de bases. Este fragmento contenía el gen completo de ODC. Se secuenció aproximadamente 3.500 bases, que comprendían el gen, toda la región río arriba del primer ATG, y unos cientos de bases después del extremo 3’.

El análisis reveló un marco abierto de lectura de 2.163 pares de bases, que codifica para una proteína de 721 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 78,91kD. Esta secuencia mostró una gran homología con la ODC de *L.donovani*, con una identidad superior al 70%. Las mayores diferencias aparecieron en las regiones amino y carboxi-terminal.

La ODC de *C.fasciculata*, al igual que la de *L.donovani*, tiene 256 aminoácidos extra en la región amino terminal, comparada con la de mamíferos. La secuencia aminoacídica también reveló que faltaba la región correspondiente al dominio de degradación (región PEST) correspondiente a la zona carboxílica. Sin embargo, cuando la ODC de *C.fasciculata* se expresó en células de mamíferos, se encontró que conservaba su inestabilidad (Svensson et al., 1997). Es evidente entonces que el rol del dominio de degradación en *C.fasciculata* es ejercido por alguna otra parte de la molécula, no relacionada al extremo C-terminal. A pesar de que la ODC no tiene la región PEST en el extremo carboxilo terminal, tiene otras dos regiones que cumplen todos los requisitos para ser consideradas como tales. Están localizadas entre los residuos 118-140 y 596-649. Especialmente la segunda puede ser considerada una región PEST muy fuerte, de acuerdo al algoritmo de Rodgers (Rodgers et al., 1986). Más llamativo aún resulta que estas dos regiones no están presentes en la ODC de mamíferos, y que la ODC de *L.donovani*, que es una enzima estable, carece de la primera región PEST, mientras que la segunda es mucho más débil que la de *C.fasciculata*. La ODC de mamíferos es degradada por el complejo de proteosoma 26S, en un proceso no dependiente de ubiquitina. En este sistema se postula que la antizima cumpliría el rol de la ubiquitina. La región de unión a antizima en la ODC de mamíferos ha sido "mapeada" entre los residuos 117-140, que corresponden a los residuos 368-391 de la ODC de *C.fasciculata*. Estas dos regiones guardan entre sí muy poca homología, por lo que se podría pensar que la antizima es incapaz de unirse a la ODC de *C.fasciculata*. Esto indicaría que el rápido recambio de la ODC aún en células de mamíferos debe estar controlado por otro mecanismo cuyo análisis puede ser de gran interés para estudios futuros.



BIBLIOGRAFIA:

- Algranati, I.D., Goldemberg, S.H. (1977) *Trends Biochem. Sci.* **2**, 272-274.
- Alhonen-Hongisto, L., S  ppanen, P., J  nne, J. (1980) *Biochem.J.* **192**, 941-945.
- Al-Yaman, F., Ingram, G.A. (1987) *Microbiology and Immunology* **31**, 571-582.
- Bacchi, C., Lambros, C., Goldberg, B., Hutner, S. y de Carvalho, G. (1974) *Antimicrob. Agents Chemoter.* **6**, 785-790.
- Bacchi, C., Nathan, H.C., Hutnar, S.H., Mc Cann, P.P., Sjoerdsma, A. (1980) *Science* **210**, 332-334.
- Bacchi, C., Mc Cann, P.P. (1987) *Inhibition of Polyamine Metabolism. Biological significance and basis for new therapies* (Mc Cann, P.P., Pegg, A.E., Sjoerdsma, A. eds) Academic Press, Orlando, Fl. pp317-344.
- Bachrach, U. (1973) *Function of Naturally Occurring Polyamines*, pp 29-35. Academic Press, Inc.
- Balasundaram, D., Tyagi, A.K. (1989) *Eur.J.Biochem.* **183**, 339-344.
- Behe, M., Felsenfeld, G. (1981) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **78**:1618-1623.
- Benne, R., Van der Burg, J., Brakenhoff, J.P., Sloof, P., Van Boom, J.H., Tromp, M.C. (1986) *Cell* **46**, 819-826.
- Benne, R. (1994) *Eur. J. Biochem.* **221**, 9-23.
- Berens, R. y Marr, J. (1978) *J. Parasitol.* **64**, 160-166.
- Canellakis, E.S., Kyriakidis, D., Rinehart, C.A., Huang, S.C. Panagiotidis, C., Fong, W.F. (1985) *Biosci. Rep.*, **5**, 189.
- Carlomagno, M., Cura, E., Perez, A.C., Segura, E. (1989) *Ciencia Hoy*, **1**, 37-44.
- Casara, P., Marchal, P., Wagner, J. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**:9111-9113.
- Coffino, P. (1989) En *ODC: Biology, Enzimology and Molecular Genetics* (Hayashi, S. ed.) pp.135-144. Pergamon Press, N.Y.
- Coffino, P., Mc Colongue, L. (1986). *The Physiology of Polyamines*, Vol.I, pp.297-392.

Cohen, S.S. (1971). *Introduction to the polyamines*. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.

Cox, F.E.G.(1993) *Modern Parasitology. A textbook of Parasitology*. Blackwell Scientific Publications, 2nd.edition.

De la Cruz, V.F., Lake, J.A., Simpson, A.M., Simpson, L. (1985) *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* **82** 1401-1405.

De la Cruz, V.F., Simpson, A., Lake, J.A., Simpson, A.M. (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**, 2337-2356.

Dixon, M. y Webb, E.C. (1964) *Enzymes*, pp. 54-165. Longmans Press, London.

Dudley, H.; Rosenheim,O.;Starling,W.(1927) *Biochem. J.***21**, 97-103.

Echandi, G., Algranati, I.D. (1975) *Biochem. Biophys.Res.Commun.* **62**:131.

Egli, M., Williams, M.D., Gao, Q., Rich, A. (1991) *Biochemistry* **30**, 11388-11395.

Fairlamb, A.H., Henderson,G.B., Cerami,A. (1986) *Mol.and Biochem. Parasitol.* **21**. 247-257.

Fairlamb. A.H., Cerami, A. (1992). *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 695-729.

Fillingame, R.H., Jorstad, C., Morris, D.R. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4042-4049.

Fonzi, W.A., Sypherd P.S. (1987) *J.Biol.Chem.* **262**:10127-10133.

Frydman, B., De los Santos, C., Frydman, R.B. (1990) *J.Biol. Chem.* **256**, 6729-6735.

Gabriel, A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W. (1987) *J.Biol. Chem.* **262**, 16192- 16199.

Gamarnik, A., Frydman, R.B. (1991) *Plant Physiol.* **97**, 778-785.

Garcia Patrone, M., Gonzalez, N.S., Algranati, I.D. (1977) *Biochem. Biophys. Acta* **395**: 373.

Geiger, L.E., Morris, D.R. (1978) *Nature* **272**, 730-732.

Ghoda, L., van Daalen Wetters, T., Macrae, M., Ascherman, D., Coffino, P. (1989) *Science* **243**:1493-1495.

- Ghoda, I., Phillips, M., Bass, K., Wang, C.C., Coffino, P. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**:11823-11826. Goldemberg, S.H., Algranati, I.D. (1981) *Eur.J.Biochem.* **117**:251.
- Gonzalez, N.S., Sanchez, C.P., Sferco, L. Algranati, I.D. (1991). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 797-804.
- Grens, A., Scheffler, I.E.(1990) *J.Biol. Chem.* **265**:11810-11817.
- Gupta, M. y Coffino, P. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 2941-2949.
- Hanson, S., Adelman, J., Ullman B. (1992) *J.Biol.Chem.***267**,4, 2350-2359.
- Hayashi, S. (1989) En *ODC: Biology, Enzimology and Molecular Genetics* (Hayashi, S. ed.) pp.35-35. Pergamon Press, N.Y.
- Heby, O., Persson,L. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**:153-157.
- Heller, J.S., Fong, W.F., Canellakis, E.S. (1976) *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.*, **73**, 1858.
- Hickok, N.J., Seppänen, P.J., Gunsalus, G.L. (1987) *DNA* **6**:179-187.
- Hoare, C. (1972) En "*The trypanosomes of mammals*" Blackwell, Oxford.
- Hunter, K.J., Le Quesne, S.A., Fairlamb, A.H. (1994) *Eur. J. Biochem.* **226**, 1019-1027.
- Jacob, S.T., Rose, K.M., Canellakis, Z.N. (1983) *Advances in Polyamine Research* (Bachrach, U., Kaye, A., Chayen, R. eds) vol.4, pp 615-629. Raven Press, New York.
- Jeronimo, S.M., Peanson R.D. (1992) In *Subcellular Biochemistry*, vol.18, Intracellular Parasites, Cap.1 "The Leishmania Protozoans adapted for extracellular and intracellular survival". pp.1-37. Plenum Press, New York & London. Edited by Avila J. and Harris J.
- Kahana C., Nathans, D. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **81**, 731-735.
- Kahana, C. (1989) En *ODC: Biology, Enzimology and Molecular Genetics* (Hayashi, S. ed.) pp.127-133. Pergamon Press, N.Y.
- Kaiser,D., Tabor, H., Tabor, C.W. (1963) *J.Mol. Biol.* **6**, 141-147.
- Kuehn, G.D., Atmar, V. (1983) *Advances in Polyamine Research* (Bachrach, U., Kaye, A., Chayen, R. eds) vol.4, pp 615-629. Raven Press, New York.
- Laemnli, U.K. (1970). *Nature* **227**, 680-685.

Lake, J.A., De la Cruz, V.F., Ferreira, P.C.G., Morel, C., Simpson, L. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4779-4783.

Landerburg, A., Abel, J. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* (1888) **21**, 758-766.

Leeuwenhoek, van A. Observations D. Antonii Lewen hoek, de natis e' semine genitali animalculis. *Philos. Trans. Roy. Soc.* (1678) **12**: 1040-1043.

Li, X., Coffino, P. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2377-2383.

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

Macrae, M., Plasterk, R.H.A. Coffino, P. (1995) *Genetics* **140**: 517-525.

Mamont, P.S., Bey, P., Koch-Weser, J. *Polyamines in Biomedical Research*, Gaugas, J.M., Eds., John Wiley & Sons, New York, 1980, 147.

Maric, S.C., Crozat, A. Jänne, O.A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 18915-18923.

Marton, L.J., Morris, D.R. (1987) *Inhibition of Polyamine Metabolism. Biological significance and basis for new therapies.* (Mc Cann, P.P., Pegg, A.E., Sjoerdsma, A. eds.) pp. 79-105. Academic Press, Orlando, Fl.

Mc Conlogue, L.; Gupta, M.; Wu, L. y Coffino, P. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 540-544.

McGhee, B., Cosgrove, B. (1980) *Microbiol. Rev.* **44**, 140-165.

Metcalf, B.W., Bey, P., Danzin, C., Jung, M. Vevert, J.P. (1978). *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 2551-2553.

Mitchell, J. L.A., Diveley, R. R., Bareyal-Leyser, A. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 81-88.

Mogh, H. (1959) *Biochem. Biophys. Acta* **36**, 529-531.

Morris, D.R., Pardee, A. B. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 3129-3135.

Morris, D.R., Jorstad, C.M. (1973) *J. Bacteriol.* **113**: 271.

Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., Ichihara, A. (1992) *Nature* **360**, 597- 599.

Murphy, B.J., Brosnan, M.E. (1976) *Biochem. J.* **157**, 33-38.

Nastri, H.G. (1991) Tesis doctoral.

- Oshima, T. (1983) *Methods in Enzymology* **94**, 401-445
- Oshima, T. (1983) *Advances in Polyamine Research*, Vol.4 (Bachrach, U.; Kaye, A. y Chayen, R. eds.) pp 479-484. Raven Press, N. Y.
- Oshima, T., Hamasaki, N., Usawa, T. y Friedman, S.M. (1990) *The Biology and Chemistry of Polyamines* (Goldemberg, S.H. y Algranati, I.D eds.) pp1-10. IRL Press, Oxford.
- Pasion, S.G., Hines, J.C., Aebersold, R. y Ray, D. S. (1992) *Mol. Biochem. Parasitol.* **50**, 57-68.
- Peebles, C.L., Gegenheimer, P., Abelson, J. (1983) *Cell* **32**:525-529.
- Pegg, A. E. (1977) *FEBS Letters* **84**:33-36.
- Pegg, A.E. y Mc Cann, P.P. (1982) *Am.J.Physiol.* **243**, 212-235.
- Pegg, A. E. (1984) *Cell Biochem. Func.* **2**:11-15.
- Pegg, A.E. (1988) *Cancer Res.* **48**, 159-164.
- Phillips, M., Coffino, P. y Wang, C.C. (1987) *J.Biol.Chem.* **262**:8721-8727.
- Phillips, M., Coffino, P. y Wang, C.C. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 17933-17941.
- Pochon, F., Cohen, S.S. (1972) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **47**:720-724.
- Porter, C.W. , Bergeron, R.I. (1987) *Advances in Enzyme regulation* (Weber, G. ed) **27**:57. Pergamon Press, N.Y.
- Poulin, R., Lu, L., Ackerman, B., Bey, P., Pegg, A.E. (1992) *J.Biol. Chem.* **267**:150-158.
- Poulin, R., Pelletier, G., Pegg, A. E. (1995) *Biochem. J.* **331**, 723-727.
- Regenass, U., Mett, H., Stanek, J., Mueller, M., Kramer, D., Porter, C. (1994) *Cancer Research* **54**, 3210-3217.
- Rodgers, S., Wells, R., Rechsteiner, M. (1986) *Science* **234**:364-368.
- Rom, E., Kahana, C. (1993) *DNA Cell Biol.* **12**: 499-508.
- Rosenheim O. (1924) *Biochem. J.* **18**:1253-1263.

Sanchez, C.P., Sidrauski, C., Menenzes Freire, S., Gonzalez, N.S. y Algranati, I.D. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**, 396-403.

Seiler, N. (1989) *The physiology of polyamines* (Bachrach, U., Heimer, Y. M., eds.) 1: 160-176, CRC Press, Inc. Boca Ratón, Fl.

Seiler, N., Dezeure, F. (1990) *Int. J. Biochem.* **22**, 211-218.

Seyfried, C.E., Morris, D.R. (1979) *Cancer Res.* **39**, 4861-4870.

Shantz, L.M., Stanley, B.A., Secrist, J.A. (1992) *Biochemistry* **31**:6848-6855.

Shappell, N.W., Fogel-Petrovic, M.F., Porter, C.W. (1993). *FEBS Lett.* Vol. **321**, 2,3, 179-183.

Smith, T.A. (1975) *Phytochemistry*, **14**, 865-871.

Smith, T.A. (1985) *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 117-156.

Simpson, L., Simpson, A. (1978) *Cell* **14**, 169-178.

Simpson, L. (1986) *Int. Rev. Cytol.* **99**, 119-179.

Simpson, L. (1987) *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 363-382.

Sjoerdsma, A., Schechter, P. (1984) *Clin. Pharmacol. Ther.* **35**, 287-294

Stanley, B.A., Pegg, A. E., Holm, I. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 21073-21079.

Stevens, E. Stevens, E. *Polyamines in Biomedical Research*, Gaugas, J.M., Eds., John Wiley&Sons, New York, 1980, 167.

Stevens, L., McKinnon, I.M., Winther, M. (1977) *FEBS Lett.* **75**, 180-182.

Svensson, F., Ceriani, C., Lovkvist-Wallstrom, E., Kockum, I., Algranati, I., Heby, O., Persson, L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 397-402.

Tabor, C.W., Tabor, H. (1976) *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 285-302.

Tabor, C.W. and Tabor, H. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 749-768.

van Kranen, H.J., van de Zande, L., van Kreijl, C.F. (1987) *Gene* **60**:145-155.

Von Besser, H., Niemann, G., Domdey, B., Walters F. (1995) *Biochem. J.* **308**: 635-640.

Williams-Ashman, H.G., Schenone, A. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 288-291.

Williams, L.J., Barnett, G.R. Ristow, J.L. (1992) *Mol.Cell. Biol.* **12**:347-359

Xiao, L., Casero, R.A. (1995) En: Casero R.A. ed. *Polyamines: Regulations and Molecular Interactions*. Georgetown, Texas, USA: R.G. Landes Company, pp. 77-100.

Yao, J., Zadworny, D. Kuhnlein U. (1995) *Genome* **38**: 325-331.

Zilberstein, D. (1993) *Adv. Parasitol.* **32**, 261-291.

NOTAS

