

## Tesis de Posgrado

# Trypanosoma cruzi : transducción de señales y transporte endocítico en la interacción parásito-célula huésped

Wilkowsky, Silvina Elizabeth

1999

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Wilkowsky, Silvina Elizabeth. (1999). Trypanosoma cruzi : transducción de señales y transporte endocítico en la interacción parásito-célula huésped. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3250\\_Wilkowsky.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3250_Wilkowsky.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Wilkowsky, Silvina Elizabeth. "Trypanosoma cruzi : transducción de señales y transporte endocítico en la interacción parásito-célula huésped". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3250\\_Wilkowsky.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3250_Wilkowsky.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“TRYPANOSOMA CRUZI: TRANSDUCCIÓN DE  
SEÑALES Y TRANSPORTE ENDOCITICO EN LA  
INTERACCION PARASITO-CELULA HUESPED”**

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

Silvina Elizabeth Wilkowsky

Director: Dra. Elvira L. Durante de Isola



Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología  
Facultad de Medicina-UBA

1999

3250 3250



**A Marcelo, por su amor incondicional**  
**A mis padres y hermana por su apoyo y su ayuda**

## INDICE

Agradecimientos

Resumen en Español

Resumen en Inglés

Abreviaturas

### **INTRODUCCIÓN**

Enfermedad de Chagas	1
Etapa aguda	2
Etapa indeterminada	3
Etapa crónica	4
El parásito	5
Ubicación sistemática	5
Estructura y estadíos evolutivos	6
Ciclo de vida	7
El insecto vector	8
Adaptación del parásito al ecosistema, morfogénesis y características de los estadíos	12
Interacción parásito célula-huésped	14
Transducción de señales	19
Moléculas involucradas en la transducción de señales	20
Mecanismos de estimulación de las señales de Ca <sup>2+</sup>	20
Proteína quinasa C	21
Proteínas G	23

Proteínas G heterotriméricas	24
Proteínas G monoméricas	26
Segundos mensajeros lipídicos	30
Relación entre PI3K y otras proteínas celulares	33
Interacción con PKB	33
Interacción con Fosfolipasa C y Ca <sup>2+</sup>	34
Interacción con Rab 5	34

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Parásitos	36
Epimastigotes	36
Tripomastigotes	36
Tripomastigotes metacíclicos	36
Purificación	38
Tripomastigotes sanguíneos	38
Purificación	38
Tripomastigotes de cultivo	39
Células de mamífero	40
Macrófagos peritoneales	40
Macrófagos de la línea J774	41
Macrófagos humanos	41
Células Vero	41
Células NIH 3T3, L6E9, CHO	42
Células NIH 3T3 transfectadas con PKB	42
Infección de células de mamífero con <i>T. cruzi</i>	42
Fraccionamiento subcelular de <i>T. cruzi</i>	43

Tratamiento y posterior infección de macrófagos peritoneales con moduladores de segundos mensajeros	44
Moduladores del $[Ca^{2+}]_i$	44
Inhibidores de proteínas kinasas	45
Moduladores de proteínas G	45
Determinación de la $[Ca^{2+}]_i$ en macrófagos peritoneales	46
Tratamiento de los macrófagos peritoneales con Fura 2AM	46
Cálculo de la $[Ca^{2+}]_i$	48
Determinación de la $[Ca^{2+}]_i$ en macrófagos peritoneales infectados o estimulados con fracciones subcelulares parasitarias	49
Determinación de la $[Ca^{2+}]_i$ en macrófagos peritoneales en presencia de moduladores de proteínas G	50
Determinación de infectividad de metacíclicos pretratados con moduladores de proteínas G	51
Determinación de infectividad de tripomastigotes de cultivo pretratados con inhibidores de PI3K	51
Determinación de la actividad PI3K en células Vero estimuladas con fracciones subcelulares parasitarias	52
Determinación de la actividad PI3K en tripomastigotes de cultivo	55
Determinación de la actividad PKB en células Vero estimuladas con fracciones subcelulares parasitarias	55
Geles de poliacrilamida para proteína	56

Obtención de líneas celulares que sobreexpresan la proteína Rab 7	58
Subclonado de Rab 7 en el vector de expresión para mamíferos pcDNA 3.1/Hygro	58
Obtención de los fragmentos de Rab 7	58
Minipreparaciones de DNA plasmídico	59
Reacción en cadena de la polimerasa	60
Preparación de geles para DNA	61
Purificación del DNA amplificado	62
Extracción con fenol cloroformo	62
Precipitación con etanol	63
Digestión con enzimas de restricción	63
Purificación del inserto Rab 7	64
Obtención y linealización del vector pcDNA 3.1/Hygro	64
Minipreps	64
Digestión con enzimas de restricción	65
Purificación del vector pcDNA 3.1/Hygro	65
Ligado de los fragmentos Rab 7 en el vector pcDNA 3.1/Hygro	65
Transformación de bacterias con la construcción Rab7- pcDNA 3.1/Hygro	66
Preparación de bacterias competentes para congelar	66
Transformación de bacterias	67
Screening de colonias transformadas	68
Secuenciación de las construcciones pcDNA-Rab 7 (WT, S22N, Q67L y N125I)	69

Transfección de células de mamífero con la construcción pcDNA-Rab 7	70
Midipreps	70
Transfección de células CHO	71
Determinación de la expresión de Rab 7 en células transfectadas	71
Estudios de invasión del <i>T.cruzi</i> en células CHO que sobreexpresan Rab 7	74
Infección de células CHO transfectadas con <i>T.cruzi</i>	74
Inmunomarcación y microscopía confocal	75
Inmunomarcación para Rab 5 y Rab 7	75
Inmunomarcación para PKB	76
<b>RESULTADOS</b>	
Modelo de interacción <i>T.cruzi</i> -macrófago	78
Estandarización de las técnicas de cultivo de macrófagos peritoneales e infección de los mismos con tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos	78
Infección de MO J774 con tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos	80
Determinación de los niveles de infección en macrófagos peritoneales pretratados con moduladores de Ca <sup>2+</sup>	81
Determinación de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> en macrófagos peritoneales infectados con tripomastigotes metacíclicos	82
Determinación de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> en macrófagos peritoneales tratados con fracciones subcelulares parasitarias	84



Efecto de inhibidores de la proteína kinasa C en la infección de macrófagos peritoneales por tripomastigotes metacíclicos	87
Efecto de compuestos moduladores de proteínas G heterotriméricas en la infección de macrófagos peritoneales por tripomastigotes metacíclicos	88
Efecto de las toxinas colérica y pertussis sobre la capacidad infectiva de tripomastigotes metacíclicos en macrófagos peritoneales	90
Efecto del Mastoparán y la toxina pertussis sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de macrófagos peritoneales	91
Determinación de los niveles de infección en células de mamífero pretratadas con inhibidores de PI3K	92
Determinación de la actividad PI3K en células estimuladas con membranas parasitarias	96
Determinación de los niveles de infección en tripomastigotes de cultivo pretratados con inhibidores de PI3K	99
Determinación de la actividad PI3K del estadio tripomastigote	100
Determinación de la actividad PKB en células estimuladas con fracciones subcelulares parasitarias	101
Invasión en células NIH 3T3 que sobreexpresan PKB	103
Análisis por microscopía confocal de la invasión de tripomastigotes de cultivo en células NIH 3T3 que sobreexpresan mutantes de PKB	104
Obtención de líneas celulares que sobreexpresan la proteína Rab 7	106
Purificación de los fragmentos N125I y Q67L obtenidos por PCR	107
Obtención del vector pcDNA 3.1/Hygro linealizado	108

Screening de las colonias obtenidas por transformación con la construcción Rab 7-pcDNA 3.1/Hygro	109
Preparación de las células transfectadas	110
Determinación de la expresión de las proteínas Rab 7 en células CHO transfectadas	111
Participación de las proteínas Rab 5 y 7 en la invasión del <i>T.cruzi</i>	112

## **DISCUSIÓN**

Estandarización de las técnicas de cultivo de macrófagos peritoneales y J774 e infección de los mismos con tripomastigotes metacíclicos o sanguíneos	120
Participación del Ca <sup>2+</sup> en la interacción macrófago-parásito	121
Participación de la PKC en la interacción macrófago-parásito	124
Participación de proteínas G heterotriméricas de la célula-huésped en la interacción macrófago-parásito	126
Participación de proteínas G heterotriméricas del <i>T.cruzi</i> en la interacción del parásito-célula huésped	129
Participación de la PI3K y la PKB de la célula-huésped en la interacción parásito-célula	130
Participación de la PI3K del <i>T.cruzi</i> en la invasión a la célula huésped	133
Participación de Rab 5 y Rab 7 en la interacción parásito-célula huésped	134

0

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elvira L.D. de Isola, mi querida "Doc", quien no sólo me brindó un lugar en el laboratorio, sino que me enseñó todo cuanto pudo tanto en lo científico como en lo humano con muchísima paciencia y amor al trabajo. Le agradezco ser mi consejera, maestra, y compañera en esta etapa tan linda de mi vida.

A la Dra. Stella Maris González Cappa, por sus consejos oportunos y su confianza en mí al darme un lugar en el Departamento donde desarrollar mi actividad científica y docente.

A Estela Lammel, mi compañera en el laboratorio, de quien aprendí el trabajo con los parásitos y con quien compartí tantos momentos gratos de esta tesis.

A mi amiga y compañera de laboratorio Marisa Wainszelbaum, por ayudarme en todo cuanto pudo, por ser una amiga como pocas y por la energía contagiosa que transmite al trabajar.

A Alejandro Barbieri, con quien comencé a trabajar en el laboratorio en sus esporádicos viajes desde Mendoza y luego me recibió en su casa en St.Louis. Por ayudarme en el laboratorio brindándome su experiencia, enseñarme a vivir y trabajar en otro país y acompañarme a todas partes. A él y a María Luisa por los meses que compartieron conmigo estando sola y tan lejos.

A Lien Kuo, mi compañero desde los comienzos, por los momentos divertidos, por aportar una mirada distinta a nuestro trabajo y fundamentalmente por su amistad.

A los técnicos que me ayudaron a desarrollar mi trabajo, sin su ayuda hubiese sido mucho más difícil. A Luis, Lucía, Damián y a Julia en el recuerdo.

A mis compañeros del piso 13, a quien miles de veces pregunté como hacer las cosas en un comienzo y quienes me enseñaron a trabajar en el laboratorio. Con ellos compartí las extensas jornadas docentes donde aprendí tanto de sus

clases y los "ruidosos" pero divertidos almuerzos . A Anette, Gerardo, María Elisa, Susana y Valeria.

A los que llegaron hace poco pero igual transmitieron muchas ganas y nuevas fuerzas para el trabajo. A los que "dieron vuelta" el piso 14: Linus, Lucas y Rafael.

Al personal no docente del piso 13. A Aidé, Alicia, Reina, Jorge, Raquel, Graciela por su ayuda en los materiales para el trabajo y los animales. Por su colaboración con los trámites administrativos a Leonor quien siempre estuvo dispuesta a ayudarme en todo.

A los Dres. Philip Stahl de la Washington University en St. Louis y Roberto Docampo y Silvia Moreno de la University of Illinois at Urbana-Champaign de los Estados Unidos, quienes me aceptaron para una estadía en sus laboratorios, me trataron con muchísima hospitalidad y se encargaron de hacerme sentir muy acompañada.

A mis compañeros de laboratorio en Washington University, especialmente a Rita, Carmen, Libby, Moges y Aysel, por ayudarme y enseñarme.

A la Universidad de Buenos Aires, por haberme posibilitado a través de sus becas, mi formación científica de grado y posgrado y también docente. A la Organización Mundial de la Salud, a través del TDR, por brindarme la posibilidad de viajar al exterior y aprender nuevas técnicas de laboratorio.

## RESUMEN

Durante la invasión del *Trypanosoma cruzi* se producen alteraciones tanto en la célula huésped como en el parásito para facilitar el éxito de dicha invasión y el establecimiento del mismo en esa célula. En el análisis de estos temas se ha arribado a las siguientes conclusiones:

El aumento citosólico del  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula huésped es necesario para la invasión. La señal disparadora se encuentra en membranas parasitarias sólo del estadio infectivo. Se determinó la participación de una proteína G heterotrimérica del tipo  $G_{\alpha i}$  de la célula huésped que estimula la invasión.

El contacto de la célula huésped con membranas del estadio infectivo produce un aumento de la actividad de la fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) necesaria para la invasión.

Existe también una activación temprana de la proteína blanco de la PI3K, la proteína kinasa B (PKB), que se confirma por el aumento de la invasión en células PKB+ y la disminución en PKB-.

La participación de las proteínas Rab 5 y Rab 7 (marcadoras de endosomas tempranos y tardíos respectivamente) en la invasión se confirmó por microscopía confocal y experimentos en células transfectadas. Además, la PI3K y las proteínas  $G_{\alpha i}$  y  $G_{\alpha s}$ , también presentes en el parásito, tienen influencia definitoria sobre su capacidad invasiva.

## SUMMARY

Several modifications are induced in the host cell and the parasite during *Trypanosoma cruzi* invasion that facilitate this process and further parasite establishment. The analysis of these issues led to the following conclusions :

A cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  increase in the host cell is necessary for parasite invasion. The triggering signal is present in the parasite membrane of the infective stage only.

The participation of a host heterotrimeric G protein,  $G_{\alpha i}$ , that is involved in parasite invasion was determined.

The contact between host cells and membranes of the infective stage induce a host phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) activation that was necessary for successful invasion. There is also an early activation of protein kinase B (PKB) which is a target of PI3K. This fact is confirmed by increased infection percentages in transfected PKB + cells and decreased values in PKB- cells.

The host proteins Rab 5 y 7 (early and late endosome markers respectively), are involved in parasite invasion. This fact was confirmed by confocal microscopy and infection experiments with Rab 5 and Rab 7-transfected cells.

Besides, *T. cruzi's* PI3K,  $G_{\alpha i}$  and  $G_{\alpha s}$  have a definitive role on its infective capacity.

## ABREVIATURAS Y ACLARACIONES

ADP: adenosina difosfato

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ATP: adenosina trifosfato

ATPasa: adenosina trifosfatasa

BAPTA: ácido *bis*Aminofenoxi tetraacético

°C: grados centígrados

Ca<sup>2+</sup>: Calcio

cm: centímetros

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP's: deoxinucleótido trifosfato

EDTA: ácido Etiléndiaminotetraacético

EGTA: ácido Etilénglicoltetraacético

Fc: fracción constante de las inmunoglobulinas

GDP: guanosina difosfato

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

GTP: guanosina trifosfato

GTPasa: guanosina trifosfatasa

H7: [1-(5-Isoquinolinsulfonil)-2metilpiperazina]

Hepes: N-[2-Hidroxietyl]piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico]

hs.: horas

Ig: inmunoglobulina

IL-1: interleuquina 1

kDa: kiloDaltones

K-DNA: DNA kinetoplástico

Ki: constante de inhibición

MeOH: metanol

mg: miligramo

min.: minutos

ml: mililitro

mm: milímetros



mM: milimolar  
mRNA: ácido ribonucleico mensajero  
μg: microgramo  
μl: microlitro  
μm: micrometro  
μM: micromolar  
NF-κB: factor nuclear-κB  
nm: nanometro  
nM: nanomolar  
NP-40: nonidet P-40 (octilfenoxi-polietoxietanol)  
pb: pares de bases  
PI: fosfatidilinositol  
PIP: fosfatidil inositol fosfato  
PKA: proteína kinasa A  
PKG: proteína kinasa G  
PM: peso molecular  
PSA: persulfato de amonio  
RNAsa: ribonucleasa  
rpm: revoluciones por minuto  
SDS: dodecilsulfato de sodio  
seg.: segundos  
SFB: suero fetal bovino  
TAE: Tris/Acetato/EDTA  
TEMED: N,N,N',N',- tetrametiletilendiamina  
TGF: transforming growth factor  
Tris: 2-amino-2-hidroximetil-1-3propanodiol  
TrMP: péptido transmembrana  
UV: ultravioleta  
V: voltios

# **INTRODUCCION**

### INTRODUCCION

La Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una afección parasitaria hística y hemática que afecta al hombre y a los mamíferos exclusivamente en el continente americano y es producida por un protozoario flagelado denominado *Trypanosoma cruzi* (1).

El parásito fue descubierto en 1908 por Carlos Chagas en Minas Gerais, Brasil quien lo denominó así en homenaje a su maestro Oswaldo Cruz. Chagas encontró el parásito en las heces de un insecto hematófago, el *Pastrongylus megistus*, y lo relacionó con una enfermedad que padecían los pobladores de la zona, especialmente los niños. Esta enfermedad se conoce con su nombre.

El descubrimiento hace poco más de 80 años de la infección humana por *T.cruzi*, su vector y la enfermedad que este protozoario produce, significó la introducción en el mundo científico de un nuevo campo de interés dentro de lo que actualmente se consideran como Enfermedades Tropicales.

### ENFERMEDAD DE CHAGAS

El *T. cruzi*, es un parásito que se multiplica en el huésped mamífero de manera intracelular. Este aspecto fundamental de su biología, provoca una íntima relación huésped-parásito, la cual, a lo largo del tiempo de infección que puede ser muy prolongado, genera reacciones complejas. La inflamación es el proceso patológico básico de la Enfermedad de Chagas y ocurre básicamente de dos formas: una reacción focal, parásito dependiente

que surge alrededor de la célula parasitada o rota y una reacción difusa que ocurre a nivel del miocardio u otras visceras.

En la Enfermedad de Chagas se pueden definir 3 etapas: aguda, indeterminada y crónica

### **Etapas aguda:**

Comprende los fenómenos clínicos que se establecen en los primeros 2-4 meses de infección. El período de incubación varía entre 4-10 días que es el tiempo necesario para que se desarrollen 1 o 2 generaciones de parásitos. La mayoría de las veces este período agudo no presenta manifestaciones clínicas importantes y sobre todo en los adultos se presenta como un cuadro oligosintomático.

El sitio de entrada de la infección, cuando es aparente puede ser ocular (Signo de Romaña) el cual consiste en un edema bpalpebral unilateral, con coloración violácea y congestión conjuntival. Si el sitio de entrada de la infección ocurrió a nivel cutáneo, se denomina chagoma de inoculación y se presenta como una formación cutánea ligeramente dura e indolora, semejante a un forúnculo que no llega a supurar. Se localiza en cualquier parte del cuerpo pero especialmente en las áreas expuestas.

Como manifestaciones generales, se destaca principalmente la fiebre, malestar general, cefalea y astenia. Entre las manifestaciones sistémicas, se destacan el edema subcutáneo, linfadenopatías, hepato y esplenomegalia. Como manifestación de compromiso cardíaco se observa una miocarditis difusa que puede detectarse en el electrocardiograma y en la radiografía. En los niños y sobre todo en los de corta edad puede presentarse un síndrome meningoencefálico.

El diagnóstico diferencial de esta fase se basa en el hallazgo de los tripomastigotes en la sangre del paciente por métodos directos: frotis, gota gruesa, gota fresca, microhematocrito y Strout. El tratamiento etiológico indicado son los fármacos Nifurtimox y Benznidazol como agentes antiparasitarios.

### **Etapa indeterminada**

Ya en el año 1916, Carlos Chagas utilizó el término “forma crónica indeterminada” para designar la infección por *T. cruzi* en “ausencia de cualquiera de los síndromes clínicos predominantes” (2). Hoy en día, se entiende por etapa indeterminada de la Enfermedad de Chagas a la presencia comprobada de la infección chagásica en ausencia de manifestaciones clínicas, electrocardiográficas o radiológicas de compromiso cardíaco o digestivo. Los pacientes que cursan esta etapa, presentan en general buen estado de salud, desconociendo muchas veces la presencia de la infección chagásica.

La clasificación de un paciente en esta etapa de la enfermedad (3) depende sólo de su positividad serológica o parasitológica, ausencia de síntomas y signos de la enfermedad y un electrocardiograma y estudios radiológicos normales.

El buen pronóstico, a mediano plazo, de los pacientes con forma indeterminada crónica de la enfermedad de Chagas, fue demostrado por un gran número de estudios longitudinales, que confirmaron que las tasas de mortalidad son similares entre pacientes con forma crónica indeterminada e individuos no chagásicos de la misma franja etaria (4) sin cardiopatía y con electrocardiograma normal.

Sin embargo en 5 a 10 años de evolución, cerca de un tercio de los pacientes con forma crónica indeterminada podrá desarrollar cardiopatía (5), lo cual no permite concluir que el pronóstico global para todos estos pacientes sea favorable, siendo la muerte súbita una complicación rara pero existente en los pacientes que cursan esta etapa de la enfermedad.

En cuanto al tratamiento, los criterios son controvertidos y nuevos estudios deberían redefinir la indicación de tratamiento etiológico en esta forma indeterminada.

### **Etapa crónica**

La cardiopatía chagásica crónica constituye la forma clínica tardía de la infección por el *T. cruzi*, caracterizada por un daño miocárdico progresivo y una incesante miocarditis fibrosante. Aproximadamente un 30% de los individuos seropositivos desarrollan alguna forma de cardiopatía crónica.

La expresión clínica de esta etapa se caracteriza por la presencia de síntomas y signos físicos, alteraciones electrocardiográficas y de la radiografía de tórax. El proceso patogénico se caracteriza por miocarditis crónica focal o difusa, con destrucción de fibras miocárdicas y consecuente fibrosis reparativa y remodelamiento ventricular. Este cuadro se manifiesta a través de alteraciones de generación y conducción del estímulo eléctrico cardíaco, alteraciones de la movilidad ventricular y tromboembolismo.

Como tratamiento de esta etapa se postula el tratamiento farmacológico de los síndromes arrítmicos y más actualmente el tratamiento empírico con inhibidores de la enzima convertora de angiotensina (6). El tratamiento con los antiparasitarios convencionales en esta etapa de la enfermedad es actualmente objeto de discusión entre los investigadores.

## EL PARÁSITO

El *Trypanosoma cruzi* es un protozoario digenético, que alterna durante su ciclo de vida natural entre un huésped vertebrado mamífero y otro invertebrado.

Los tripanosomas de los mamíferos han sido clasificados en 2 secciones según la vía de eliminación a partir del vector: Salivaria y Estercoraria (7). A la segunda pertenece el *T.cruzi* y es el único patógeno dentro de esta Sección.

La principal característica de los Estercoraria es que son transmitidos por un insecto vector que elimina con sus deyecciones la forma infectante del parásito (tripomastigote metacíclico). Estos parásitos se parecen a los tripanosomas inferiores ya que quedan restringidos al tubo digestivo del vector.

### Ubicación sistemática

La ubicación sistemática del *Trypanosoma cruzi* es la siguiente:

Reino: Protista  
Subreino: Protozoa  
Phylum: Sarcomastigophora  
Clase: Zoomastigophora  
Orden: Kinetoplastida  
Familia: Trypanosomatidae  
Género: Trypanosoma  
Subgénero: Schizotrypanum  
Especie: cruzi

### ESTRUCTURA Y ESTADÍOS EVOLUTIVOS

El *T. cruzi* posee un mitocondrion único que recorre todo su cuerpo y una región especializada donde alberga una porción de DNA (K-DNA). Este K-DNA más la doble membrana mitocondrial que lo envuelve constituyen el kinetoplasto, característica del Orden Kinetoplastida. El K-DNA es la porción de material genético extranuclear más grande que se conoce pueda poseer una célula y está constituido casi exclusivamente por DNA. Se dispone en círculos en forma de 8 y representa el 20% del DNA celular (8).

El parásito posee un flagelo único que nace del cuerpo basal o kinetosoma, situado cerca de la envoltura mitocondrial del kinetoplasto y que surge por el bolsillo flagelar (característica de la Familia Trypanosomatidae). El kinetosoma tiene una estructura cilíndrica constituida por 9 tripletes de microtúbulos que se proyectan hacia el bolsillo flagelar: una parte es totalmente citoplasmática y la otra es una zona de transición hacia el flagelo; entre ambas existe un septum. El flagelo por su parte presenta una vaina que lo envuelve y que es una extensión de la membrana celular. El conjunto de flagelo más kinetosoma constituye el órgano de locomoción del parásito (8).

El aparato de Golgi está cerca del bolsillo flagelar sin conectarse con el cuerpo basal ni con el flagelo. El núcleo del parásito es fibrilar y cuando comienza a duplicarse se presenta en acúmulos de material genético próximos a la membrana nuclear. El cuerpo del parásito está limitado por la membrana citoplasmática que tiene 8-10 nm de espesor y por debajo de ella se encuentra el sistema de microtúbulos.



## CICLO DE VIDA

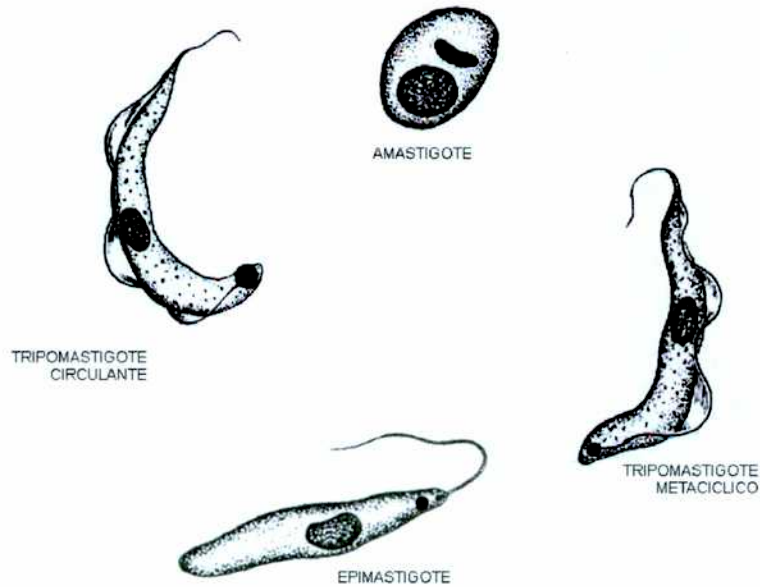
El *T. cruzi* tiene un ciclo de vida complejo con varios estadios evolutivos en los cuales adopta diferentes morfologías y características funcionales, las cuales reflejan su adaptación a los distintos hábitats por los que debe pasar durante su ciclo de vida (**Fig. 1**). Estos estadios se denominan siguiendo la nomenclatura adoptada por Hoare (9) y se describen a continuación:

epimastigote: (20-40x2  $\mu\text{m}$ ) forma elongada en la que el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo, emerge por un costado del cuerpo del parásito, arrastra la membrana citoplasmática en un corto trayecto, dando la imagen de una membrana ondulante corta y se libera por el extremo anterior del parásito; este estadio no infectivo para el mamífero, se desarrolla en el vector y en cultivos axénicos constituye una de las formas proliferativas del *T. cruzi* (**Fig. 1**).

amastigote: (2-4  $\mu\text{m}$ ) forma esférica u ovalada que carece de flagelo libre; estadio de localización intracelular y replicativo en el mamífero. Se lo puede obtener también en cultivos celulares (**Fig. 1**).

esferomastigote: (2-4  $\mu\text{m}$ ) forma esférica con flagelo extracelular que bordea el cuerpo del parásito; estadio replicativo presente en el estómago del insecto vector.

tripomastigote: (20-32x2  $\mu\text{m}$ ) forma elongada con el kinetoplasto situado por detrás del núcleo; el flagelo nace en su proximidad, emerge por un costado del cuerpo del parásito y se libera por el extremo anterior creando la imagen de una membrana ondulante de importante extensión; este estadio es infectivo para el huésped mamífero y está presente en la circulación del mamífero (tripomastigote circulante) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico) y carece de capacidad replicativa (**Fig. 1**).

**Fig. 1** Estadíos del *Trypanosoma cruzi*

## EL INSECTO VECTOR

El primer registro sobre triatomíneos en América data del año 1590, cuando el religioso Lizarraga los describe durante su viaje a la Argentina, en la provincia de Tucumán; también Carlos Darwin se refiere a ellos cuando narra su pasaje por América del Sur, en su viaje alrededor del mundo.

Estos insectos, alados o ápteros dependiendo del estadio, aplanados dorsoventralmente, con aparato bucal succionador, tienen patas caminadoras, son ovíparos, y su metamorfosis es incompleta o gradual. Presentan una cabeza pequeña con ojos compuestos y ocelos, una trompa y antenas.

Las antenas se presentan por delante de los ojos y su modalidad de implantación permite la caracterización de los géneros de triatomíneos.

El insecto, visto por su cara dorsal, presenta un tórax trapezoidal, el pronoto, que también se utiliza para su ubicación sistemática, y se continúa con un escutelo triangular (**Fig. 2**).

**Fig. 2** Adulto de *Triatoma infestans*



En el estadio adulto posee un par de alas anteriores diferenciadas en una parte basal oscura (corio) y otra distal (membrana) que se pliegan sobre el abdomen. Este está constituido por segmentos que presentan un borde saliente que se denomina conexivo; en el conexivo las diferentes especies presentan manchas de color, que son de valor taxonómico (10). Se pueden clasificar de la siguiente manera:

<u>Reino:</u>	Animalia
<u>Phylum:</u>	Artropoda
<u>Clase:</u>	Insecta
<u>Orden:</u>	Hemíptera
<u>Familia:</u>	Reduviidae
<u>Subfamilia:</u>	Triatomonae
<u>Géneros:</u>	Pastrongylus, Triatoma, Rhodnius, etc.

La mayoría de los hemípteros son fitófagos. Sin embargo, la familia Reduviidae agrupa dos tipos de insectos, un segundo estrictamente hematófago. La toma de sangre de huéspedes móviles que pueden protegerse a sí mismos está asociada con la evolución fisiológica y morfológica que facilita la precisa ubicación del huésped, la rápida alimentación nocturna u ocasional; para esto poseen termorreceptores eficientes.

Los insectos hematófagos, en el momento de alimentarse, excretan saliva lubricante y con efecto anestésico. Esta es vertida en la piel y tejido subcutáneo del huésped por el canal salival, ubicado en la trompa por debajo del canal donde pasa la sangre (canal alimenticio). Ambos canales constituyen las piezas bucales que se encuentran ubicadas dentro de un tubo articulado.

El aparato digestivo de este insecto, lugar donde el *T. cruzi* cumple parte de su ciclo evolutivo, está constituido por 3 secciones: intestino anterior, medio y posterior. El primero comprende a su vez el ducto faríngeo que une el canal alimenticio con la faringe y el esófago. Este último desemboca en el proventrículo, primera porción del intestino medio que se continúa con el estómago. Cuando el insecto se alimenta su estómago se dilata y ocupa gran parte de la cavidad general del triatomíneo. Finalmente, la porción terminal del intestino posterior presenta la ampolla rectal, lugar donde

desembocan los túbulos de Malpighi cuya función es absorber diversas sustancias y eliminar metabolitos (11). Es a este nivel donde se postula que los epimastigotes de *T. cruzi* se diferencian a metacíclicos (12).

La metamorfosis de los triatomíneos es un caso de polimorfismo controlado genéticamente y estimulado por factores químicos u hormonales. En su evolución pasan por el estadio del huevo, 5 estadios ninfales y el de adulto. Las mudas están en relación con la temperatura. La oviposición se realiza generalmente en las grietas de las viviendas o de los gallineros. Los huevos son blancos, operculados, elípticos (1,5x1 mm). El corión o cáscara presenta dibujos que varían según las especies. A medida que se desarrolla el embrión van adquiriendo una coloración rosada. El período requerido para su maduración varía entre 12 y 15 días dependiendo de la temperatura y la humedad.

Desde el punto de vista biológico estos triatomíneos no pueden considerarse los vectores ideales; para serlo necesitarían que el parásito fuera inyectado en el vertebrado sin estar expuesto a una serie de factores externos adversos como por ejemplo, la desecación. Por eso, se podría deducir que la adaptación del parásito a este insecto sería reciente y que ese proceso todavía está en desarrollo (11).

Desde el primer estadio ninfal necesitan sangre para su alimentación, lo que se asocia a su capacidad de transmitir el parásito desde este estadio. El insecto depende de la ingesta de hemoglobina para cumplir su evolución, tanto para pasar de un estadio ninfal al siguiente, como, en el caso de la hembra, para la maduración ovárica y oviposición. Puede alimentarse en diferentes huéspedes y es común la alimentación mixta, pero puede tener huéspedes preferenciales. Los triatomíneos subsisten a través de alimentaciones abundantes y pueden permanecer largos períodos de ayuno sin sufrir daños funcionales.

**ADAPTACIÓN DEL PARÁSITO AL ECOSISTEMA,  
MORFOGÉNESIS Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTADÍOS**

El *T. cruzi* se desarrolla a través de un complejo ciclo de vida el cual transcurre en vertebrados mamíferos y en invertebrados (**Fig. 3**). Estos diferentes ecosistemas se correlacionan funcionalmente con las diferenciaciones cíclicas del parásito a diversos estadios, los que responden así a las características particulares de cada uno de esos ecosistemas.

**Fig. 3** Estadios del *Trypanosoma cruzi*





A-Epimastigotes en roseta. La flecha indica la presencia de un tripomastigote metacíclico. B-Macrófago con amastigotes en su interior. C-Tripomastigotes metacíclicos (flecha delgada) con persistencia de algunos epimastigotes (flecha gruesa). D-Epimastigote

En el tubo digestivo del insecto, el *T. cruzi* sufre un proceso de diferenciación desde el tripomastigote circulante ingerido a epimastigote y amastigote y posteriormente a tripomastigote metacíclico. Experimentalmente se ha demostrado que la diferenciación de epimastigote a metacíclico puede lograrse por varios caminos: presionando al parásito metabólicamente al cultivarlo en medios empobrecidos, o con pasajes a pH ácido (estrés), o induciéndolo a la etapa estacionaria tardía con un inóculo masivo (13, 14), o bien estimulando activamente la morfogénesis en un medio que asemeje al ecosistema donde habitualmente se produce (15, 16, 17).

Según estas hipótesis algunos autores lograron metaciclogénesis en medios de cultivo empobrecidos cuya concentración salina y contenido en monosacáridos es semejante a la presentada por la orina del insecto (18, 19). Otros, trabajando en cultivos de células de embrión de *Triatoma* (20) o en cultivos enriquecidos con diversos extractos del insecto vector, también pudieron reproducir el proceso; con este modelo se estableció que tanto en extractos solubles de intestino (ES) como en la hemolinfa del insecto vector existen factores capaces de desencadenar la diferenciación y que la fracción inductora está constituida por varias proteínas de bajo peso molecular (17 a 75 kD) (21).

En cuanto a la fracción proteica del ES se ha aislado, purificado y secuenciado un péptido capaz de estimular la actividad de la adenilil ciclasa de membrana del estadio epimastigote y de inducir la diferenciación de epimastigote a tripomastigote metacíclico (22). Este péptido de 40 aminoácidos posee una secuencia idéntica al extremo N-terminal de la globina de gallina (ingerida por alimentación del insecto con sangre de este animal) y extensa homología con las globinas humana y de ratón. El efecto

estimulador de la morfogénesis es significativamente mayor en epimastigotes de hasta 48 hs. de cultivo y esto concuerda con trabajos anteriores en los que se demostró que la estimulación de los parásitos por el ES es más eficiente en las primeras 48 hs después de su repique (17).

La diferenciación a metacíclicos prepara al parásito para que sobreviva, una vez ingresado en el huésped mamífero, en el medio hostil que el suero de los mamíferos (a través del complemento) le ofrece. La resistencia al complemento que presentan las formas tripomastigotes, tanto metacíclicas como circulantes es un proceso que se conoce como "preadaptación". En ese sentido se ha comunicado el clonado del dominio funcional de un factor T-DAF (Trypomastigote Decay-Accelerating Factor), glicoproteína de 87-93 kDa con capacidad inhibitoria de la C3 convertasa que está presente en los tripomastigotes (23). El tripomastigote metacíclico o circulante proseguirá el ciclo invadiendo células nucleadas del huésped.

### INTERACCIÓN PARÁSITO-CÉLULA HUÉSPED

En la infección por *T.cruzi*, generalmente las primeras células invadidas son los macrófagos tisulares residentes, aunque el parásito puede infectar cualquier célula nucleada. Si bien tanto los epimastigotes como los tripomastigotes son eficientemente internalizados por los macrófagos, sólo los tripomastigotes son capaces de multiplicarse en el citosol, mientras que los epimastigotes son destruidos (24,25) El mecanismo por el cual los tripomastigotes invaden los macrófagos ha sido objeto de controversia.

Mientras que varios grupos de investigadores han reportado que la entrada de los parásitos es bloqueada por inhibidores de la polimerización de actina como la citocalasina B (25,26), otros autores no encontraron dicha inhibición



y concluyeron que la invasión era un mecanismo activo por parte de los parásitos (27). El reciente hallazgo de un mecanismo de entrada citocalasina-independiente por parte de los tripomastigotes en células no fagocíticas (28) ha clarificado este punto. En macrófagos, ambos mecanismos-entrada activa y fagocitosis pasiva-pueden ocurrir simultáneamente, lo cual explicaría los resultados aparentemente contradictorios (29).

El contacto inicial entre el tripomastigote (metacíclico o circulante) y la célula del hospedador es mediado por mecanismos de reconocimiento específicos. Las evidencias, en general indirectas, sugieren que el parásito presenta receptores que facilitan su internalización celular.

El proceso de invasión involucra múltiples señales de reconocimiento que se conoce que modifican varios caminos de transducción de señales de la célula huésped. Estos incluyen activación de los receptores para la porción  $F_c$  de los anticuerpos, receptor de manosa, TGF- $\beta$  I y II y producción de inositol 1,4,5-trifosfato con la consiguiente movilización del calcio intracelular (30,31,32).

Por otra parte, Ortega Barria y Pereira (33) identificaron una proteína de 60 kDa ubicada en la superficie del tripomastigote, la que fue denominada penetrina; esta proteína promueve la invasión celular, induce la adhesión selectiva de tripomastigotes a heparina, heparán sulfato y colágeno (componentes de la matriz extracelular) y promueve la adhesión y expansión de fibroblastos. Los mismos efectos se obtuvieron cuando se empleó la proteína recombinante expresada en *E. coli*. Más aún, las bacterias que expresaban la proteína en su superficie adquirirían capacidad de invadir células no fagocíticas.

Pereira (34) postula que el parásito sería el verdadero regulador de la infección, ejerciendo tanto un mecanismo facilitador o positivo, así como,

mecanismos negativos. Este autor identificó además una sialidasa regulada durante el desarrollo del tripomastigote (35).

Más tarde Previato y col. (36) encontraron que los epimastigotes incorporan ácido siálico en su superficie a partir de sialoconjugados del medio externo y sugirieron la existencia de una transialidasa en este estadio. Esto fue confirmado por Zingales y col. (37) quienes además demostraron una gran actividad de esta enzima en tripomastigotes. Schenkman y col. (38) identificaron y caracterizaron la transialidasa de formas infectivas del parásito y otros autores demostraron que ese ácido siálico está involucrado en la invasión celular (39) y en el escape del parásito de la vacuola al citoplasma a través de una proteína formadora de poros (40, 41).

La transialidasa está unida a membrana por un anclaje de glicosil fosfatidilinositol y su clivaje por fosfolipasa C explica su liberación al medio. Esto es lo que aparentemente ocurre en el huésped infectado, es por esta razón que la transialidasa fue identificada independientemente como "shed acute phase antigen", (SAPA) (42,43) el cual genera una fuerte respuesta inmune en la etapa aguda de los pacientes infectados. La parte antigénica de la transialidasa reside en los 12 aminoácidos repetitivos.

La transialidasa no está presente en amastigotes y se comienza a sintetizar en tripomastigotes. También se expresa en los estadios parasitarios presentes en el vector, por ej. en epimastigotes, pero no está anclada a membrana, dado que no es reconocida por los anticuerpos contra el dominio carboxiterminal de la transialidasa de tripomastigotes. Se encuentra en vacuolas intracelulares y no se libera al medio de cultivo.

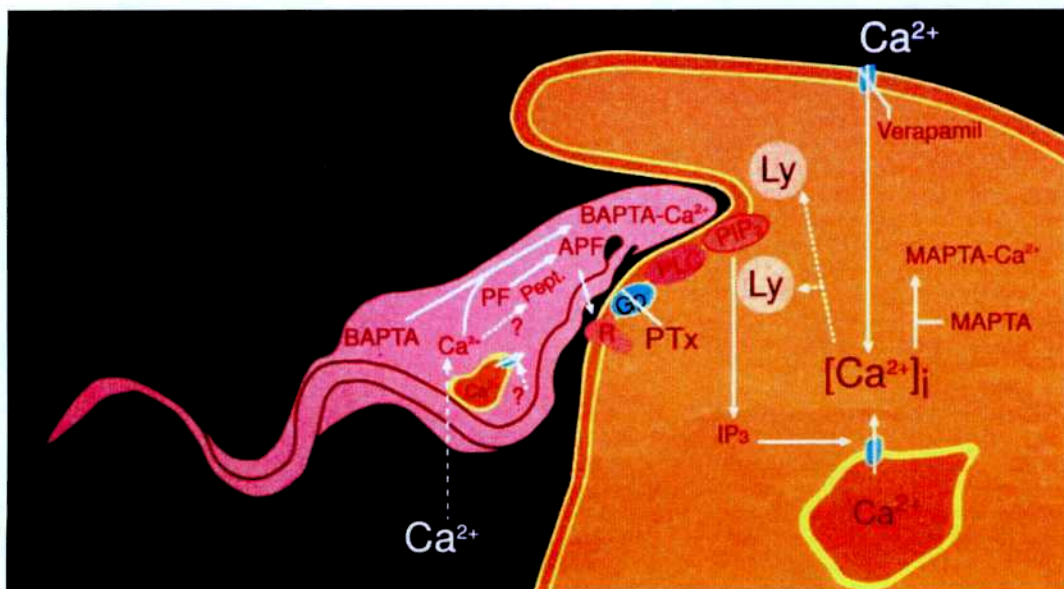
Cuando los tripomastigotes salen de la célula, expresan un alto nivel de transialidasa pero muy bajo nivel de ácido siálico en superficie y luego de pocos segundos de contacto de la célula con el medio que la rodea lo adquiere y lo une a oligosacáridos ligados a glicoproteínas identificadas

como antígeno específico de estadio 3 (Ssp3), el metacíclico lo incorpora a un antígeno de 35-50 kD. Si este antígeno es purificado y unido a células de mamífero, inhibe la invasión por formas metacíclicas (44).

La sialidación de superficies del parásito se sabe que evita la activación del complemento, incrementando la afinidad de inhibidores de C3 convertasa cuando esta enzima está depositada en la superficie celular. El tratamiento de los tripomastigotes con neuroaminidasa promueve la lisis por complemento.

Finalmente, el hallazgo de una peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerasa secretada por el parásito (45), una serin-endopeptidasa requerida para la formación de un factor involucrado en señales de  $Ca^{2+}$  en la célula huésped (46) y varias proteínas presentes en el tripomastigote metacíclico con la misma función (47) indican la existencia de múltiples moléculas parasitarias involucradas en los primeros eventos de invasión a la célula huésped.

**Fig 4. Eventos de señalización intra e intercelular en la interacción tripomastigote-célula huésped**



Ca<sup>2+</sup>: ión Calcio; PF: factor proteolítico; Pept.: peptidasa; APF: factor proteolítico activo; R:receptor; Go: proteína G heterotrimérica con subunidad  $\alpha_o$ ; PLC: fosfolipasa C; PIP: fosfatidilinositol bifosfato; PTx: toxina pertussis; Ly: lisosomas; IP<sub>3</sub>: inositoltrifosfato; BAPTA/MAPTA: compuestos quelantes del Calcio intracelular; Verapamil: antagonista de canales de calcio

Después de la invasión de los tripomastigotes a cualquier célula nucleada, se forma un fagosoma alrededor del parásito. Luego de algunos minutos, se produce la disrupción de este fagosoma y el parásito escapa al citoplasma (48).

Se ha demostrado que el amastigote secreta una proteína hemolítica con actividad óptima a pH 5.5 e indetectable a pH neutro sugiriendo que sus funciones líticas se ejercen en el compartimiento intracelular ácido (49).

Ley y col. (49) utilizando el compuesto DAMP que es ácido-trópico demostraron que el *T. cruzi* después de entrar está encerrado en vacuolas internas. con pH menor que 6.0. Luego de 2 h. de infección el 70% de los parásitos están ya fuera del fagosoma y libres en el citosol.

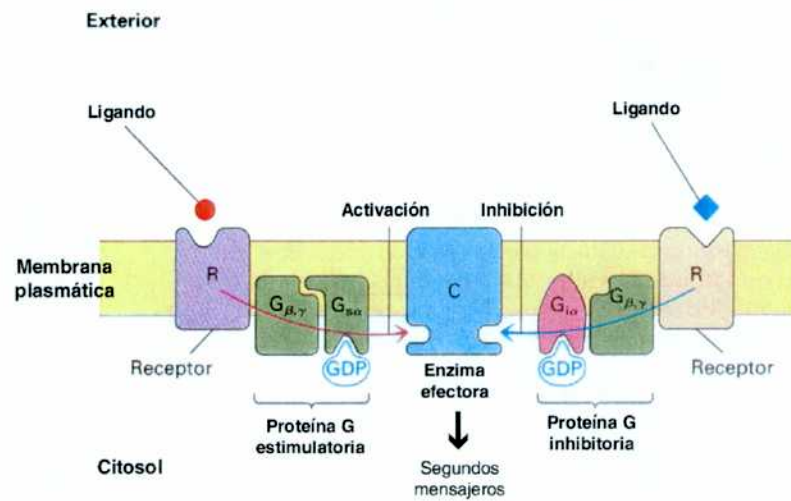
El tratamiento de las células infectadas con drogas que elevan el pH de los compartimientos intracelulares (cloruro de amonio, metilamina y cloroquina) inhiben significativamente el escape del parásito al citosol (49). Esto refuerza la observación de que una hemolisina ácido activa interviene en este proceso.

Esta proteína forma canales transmembrana de aproximadamente 10 nm de diámetro y sería semejante en tamaño y funcionalidad al C9 (ataque a la membrana celular) y a la perforina de los linfocitos citotóxicos (40).

ruptura celular, son aún desconocidos. Este proceso puede realizarse en cualquier célula nucleada; intracelularmente el parásito puede establecerse debido a su capacidad para escapar del fagosoma a la matriz citoplasmática (50).

### **TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES**

La comunicación intercelular es un proceso necesario para controlar el crecimiento, diferenciación y metabolismo celular. Para desarrollar estas funciones, las células participan en una intrincada red de interacciones moleculares que involucran desde el contacto físico directo (a través de canales de unión que comunican las membranas de células vecinas) hasta la secreción al medio extracelular de moléculas señaladoras que permite enviar información a otras células blanco. Dicha información es captada por estas células a través de receptores específicos, lo cual puede dar lugar a la activación de una ruta interna de transmisión, que en última instancia regula procesos celulares. En términos moleculares, el proceso depende de la presencia de receptores en la membrana celular, que ante la unión con su ligando específico cambian su conformación y a su vez transmiten información, induciendo un cambio conformacional en proteínas adyacentes. Como consecuencia se produce en la célula la transducción de señales externas en otras internas. Este último proceso es llevado a cabo por moléculas de pequeño tamaño, incluso iones del citoplasma celular, que constituyen los llamados "segundos mensajeros" (51).

**Fig. 5 Sistema de transducción de señales en células eucariotas**

El número de segundos mensajeros conocidos hasta ahora era muy pequeño, indicando que las rutas internas de transmisión son notablemente universales. Los 2<sup>dos</sup> mensajeros conocidos en estos últimos años eran: AMP<sub>C</sub>, GMP<sub>C</sub>, Diacilglicerol (DAG), Inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y <sup>2+</sup> a los que se han agregado recientemente la esfingosina, la esfingosina fosfato (SPP), las ceramidas, el ácido fosfatídico y lisofosfatídico y posiblemente los ácidos grasos (52).

## MOLECULAS INVOLUCRADAS EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES

### MECANISMOS DE ESTIMULACIÓN DE LAS SEÑALES DE CALCIO

La mayoría de los iones Ca<sup>2+</sup> se encuentran secuestrados en la mitocondria, el retículo endoplasmático u otras organelas citosólicas. La concentración de

iones  $\text{Ca}^{2+}$  libres en el citosol usualmente se mantiene por debajo de  $0.2\mu\text{M}$ . Las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas bombean los iones  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol a través de la membrana plasmática al exterior celular o al lumen del retículo endoplasmático u otras vesículas intracelulares que almacenan iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Los aumentos localizados de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol son críticos para sus funciones como mensajero y pueden ser detectados con colorantes fluorescentes (53).

Los incrementos leves en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, los cuales son usualmente mediados por un aumento de  $\text{IP}_3$ , disparan variadas respuestas celulares como secreción de enzimas, contracción muscular, síntesis de DNA y división celular y fertilización ovular (54, 55)

Una proteína citosólica de pequeño tamaño, la Calmodulina, de expresión ubicua en todas las células eucariotas, media varios efectos celulares de los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Cada molécula de Calmodulina une 4 iones  $\text{Ca}^{2+}$  en un mecanismo cooperativo. La unión del  $\text{Ca}^{2+}$  induce en la Calmodulina un cambio conformacional que permite al complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina unirse y activar diferentes enzimas. Un ejemplo bien estudiado es la fosfodiesterasa de AMPc, la cual degrada el AMPc, terminando su efecto. Este proceso une a dos segundos mensajeros como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el AMPc siendo un ejemplo de los múltiples mecanismos de regulación los procesos celulares (51).

### **PROTEÍNA KINASA C**

La activación de receptores de membrana acoplados a proteínas  $G_q$ , trae como consecuencia la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC). Esta enzima hidroliza el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) presente en la membrana a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ).

El  $IP_3$  es soluble e induce la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico, como ya fue descrito mientras que el DAG permanece asociado a membrana y su función principal es junto con el  $Ca^{2+}$  activar a una familia de proteínas kinasas C (PKC) asociadas a membrana cuyo rol consiste en fosforilar a otras proteínas específicamente en residuos serina y treonina. En ausencia de estimulación la PKC está presente soluble en el citosol en forma catalíticamente inactiva. Un aumento en el  $Ca^{2+}$  citoplásmico induce una traslocación de esta enzima a la cara interna de la membrana donde es activada por DAG. Así la activación de PKC depende de ambos  $Ca^{2+}$  y DAG (56,57,58).

La PKC es mediadora de diversas acciones, según el tipo de célula, entre las cuales puede incluirse la fosforilación de algunos factores de transcripción que pueden inducir o reprimir la síntesis de ciertos mRNAs. Por ejemplo, fosforila a una proteína que se une e inhibe al factor de transcripción NF- $\kappa$ B en el citoplasma, la fosforilación de este inhibidor por la PKC, causa la liberación de NF- $\kappa$ B que entonces migra al núcleo donde induce la transcripción de determinados genes. Además se ha propuesto que una isoforma de PKC (PKC $\alpha$ ), directamente fosforila y activa a la proto-oncoproteína Raf 1 para iniciar la vía de señales de la cascada de kinasas activadas por mitógenos (MAPK). Otros blancos de la PKC han sido descritos incluyendo MARCKS, miogenina, laminina B y P-glicoproteínas (58).

Existe más de una especie de PKC, ya sea porque son codificadas a partir de distintos genes o porque son producto de procesamientos alternativos de un mismo mRNA. Hasta el momento han sido identificadas 10 subespecies de PKC en distintos tejidos que pueden ser divididas en tres grupos. El grupo PKCc está compuesto por las cuatro PKC clásicas o convencionales ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\gamma$ ); el grupo PKCn está formado por las recientemente clonadas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ); y el PKCa está formado por dos PKC atípicas ( $\lambda$  y  $\zeta$ ) (58).



Actualmente es cada vez más aceptada la teoría según la cual varios fosfolípidos de membrana podrían estar involucrados en la transmisión de señales extracelulares a través de la membrana. En este sentido, recientemente lisofosfatidilcolina y ácidos grasos libres, productos de la hidrólisis de fosfatidilcolina por otra fosfolipasa, la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) han mostrado un aumento de la activación de PKC inducida por DAG (52).

Está demostrado que diversos patógenos intracelulares incluyendo *Leishmania*, *HIV* y *Yersinia* promueven la disfunción de fagocitos mononucleares y que esto contribuiría a la infección crónica. La infección de macrófagos con *Leishmania donovani* resulta en una respuesta disminuída a los lipopolisacáridos para inducción de IL-1 y a los ésteres de forbol en su acción de inducir la expresión de genes c-fos. Estas respuestas del macrófago a estímulos extracelulares requerirían la activación de la PKC. Esto sugiere que la respuesta defectiva a estímulos en macrófagos infectados con *Leishmania* estaría dada por una respuesta disminuída al DAG por parte de una PKC alterada (59).

### PROTEÍNAS G

Las proteínas G pertenecen a un grupo muy amplio de proteínas con las que comparten un diseño estructural común. Este grupo ha sido denominado la superfamilia de las GTPasas (60). Cada una de estas proteínas posee la capacidad de cambiar su afinidad por distintas macromoléculas. Debido a esto actúan como transmisores de información entre las entidades con las cuales interaccionan.

Todas ellas son activadas por la unión de GTP y desactivadas por su hidrólisis, produciendo modificaciones conformacionales que cambian su

afinidad por las distintas proteínas. Un determinado estímulo externo provoca el reemplazo del GDP resultante de dicha hidrólisis por una nueva molécula de GTP con lo cual recomienza el ciclo.

Existen 3 grupos principales de proteínas dentro de la superfamilia de las GTPasas (60):

- Los productos de los oncogenes y proto-oncogenes Ras, proteínas de peso molecular aproximado de 21 kDa. Dentro de este grupo se encuentran las proteínas Rab.
- GTPasas que participan en la síntesis de proteínas como el factor bacteriano EF-Tu
- Las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas. Este último grupo es el que está asociado al sistema de señales clásico vía receptor-transductor-efector.

### PROTEINAS G HETEROTRIMÉRICAS

Las proteínas G heterotriméricas transducen señales desde los receptores con siete dominios transmembrana al interior celular. Están constituidas por 3 subunidades designadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . En ausencia de ligando unido al receptor, la subunidad  $\alpha$  (llamada  $G_\alpha$ ) se encuentra unida a GDP y formando un complejo con las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ . La unión del ligando al receptor, cambia la conformación de este último, el cual se une a  $G_\alpha$  en forma tal que el GDP es disociado y el GTP se une a  $G_\alpha$ . El complejo  $G_\alpha$ -GTP se disocia del complejo  $\beta$ - $\gamma$  y se une y activa diferentes proteínas efectoras como la adenilil ciclasa o PLC. Esta activación es de corta duración dado que el GTP

unido a  $G_{\alpha}$  se hidroliza a GDP en segundos, llevando a la asociación de  $G_{\alpha}$  con  $G\beta\gamma$  e inactivación de la proteína efectora. La proteína  $G_{\alpha}$  entonces alterna entre dos proteínas de membrana: el receptor transmembrana y las proteínas efectoras (adenilil ciclasa, canales iónicos, PLC y fosfodiesterasas) (51).

Entre los diferentes métodos que se emplean para estudiar el rol de proteínas G está el uso de péptidos que interaccionan y activan a estas proteínas específicamente. Experimentos realizados utilizando un sistema "in vitro" de fusión de endosomas mostraron que el Mastoparán, un péptido que se obtiene del veneno de avispa, y simula ciertas regiones citoplasmáticas de receptores que interaccionan con proteínas  $G_{\alpha i}$ , activándolas, es capaz de inhibir la fusión "in vitro" (61)

También se ha demostrado que péptidos correspondientes a dominios citoplasmáticos de receptores pueden regular el funcionamiento de proteínas G (62). Se ha descrito un pequeño segmento en la porción capaz de activar  $G_{i2}$  (la proteína G que inhibe adenililciclasa); este segmento es un péptido de 14 aminoácidos (TrMP14) correspondiente al receptor a Manosa 6-fosfato capaz de activar  $G_{i2}$ . La acción de este péptido se potencia cuando se conecta a un pequeño fragmento de la porción transmembrana del mismo receptor.

Otro reactivo que permite estudiar el rol de las proteínas G en células intactas es el complejo fluoruro de aluminio (AIF). Una característica importante de este reactivo es que simula el fosfato gama del GTP de manera tal que activa solamente proteínas G triméricas pero no monoméricas, por lo tanto es muy útil para discriminar que GTP-proteína está involucrada en un determinado proceso. Se ha demostrado que el AIF es capaz de inhibir la fusión de endosomas tanto "in vivo" como "in vitro" (63)

Otra forma de estudiar la participación de proteínas G in vivo es el uso de toxinas bacterianas. Las subunidades alfa de ciertas proteínas G son ADP ribosiladas por toxinas bacterianas.  $G_{\alpha s}$  puede ser ADP ribosilada por la toxina colérica, mientras que  $G_{\alpha i}$  y  $G_{\alpha o}$  son ADP ribosiladas por la toxina pertussis desacoplando estas proteínas G de sus receptores y así bloqueando la transducción de señales. De manera tal que el uso de las toxinas también permite determinar qué G-proteína participa específicamente en un proceso determinado (51).

### PROTEINAS G MONOMÉRICAS

En general la entrada de microorganismos en las células por fagocitosis involucra su rápida y selectiva internalización en el llamado fagosoma. Este fagosoma, luego se transformará en fagolisosoma, donde el material ingerido será degradado.

La destrucción de patógenos fagocitados por parte de las células involucra varios mecanismos como acidificación del fagosoma (64), fusión fagosoma-endosoma (65), fusión fagosoma lisosoma con subsecuente exposición a enzimas lisosomales (66) y generación de sustancias microbicidas difusibles como metabolitos del  $O_2$  (67,68) u óxido nítrico.

Existe bastante evidencia que parte o todos estos procesos pueden ser circunvectos por patógenos microbianos. Por ejemplo, la acidificación del fagosoma puede ser inhibida por *Legionella pneumophila* (69), o *Toxoplasma gondii* (70) mientras que la fusión fagosoma-lisosoma se encuentra inhibida en células infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* (71), *Listeria monocytogenes* (72), *Chlamydia psitacci* (73), *T. gondii* (74) o *L. pneumophila* (75).

En el caso de *Shigella flexneri* y *T. cruzi*, estos organismos son capaces de escapar al citoplasma de la célula huésped para evadir su destrucción. Dadas las alteraciones de la fagocitosis causadas por diversos microorganismos patogénicos en la célula huésped, es importante estudiar los mecanismos que regulan el tráfico vesicular en estas situaciones.

La fusión del fagosoma con endosomas o lisosomas ha sido extensamente estudiada usando sistemas libres de células y utilizando ligandos específicos (76). Esta reconstitución del tráfico vesicular ha permitido determinar que componentes citosólicos son necesarios para el reconocimiento y fusión de las vesículas.

Evidencias obtenidas de diversos trabajos sugieren que las proteínas G heterotriméricas participan en la fusión fagosoma-endosoma (76).  $G_{\alpha s}$  y otras subunidades  $G_{\alpha}$  están presentes en la membrana fagosomal. Además, varias GTPasas han sido también localizadas en fagosomas purificados, en particular, una clase de GTPasas pequeñas, las llamadas proteínas Rab (51).

Si bien todas estas proteínas contienen alrededor de 200 aminoácidos y una estructura similar, cada una está localizada en una organela diferente. Las proteínas Rab purificadas unen e hidrolizan GTP y este ciclo de unión e hidrólisis sería el responsable de la fusión correcta de las distintas vesículas.

Específicamente una proteína Rab citosólica intercambia su GDP unido por un GTP y sufre un cambio conformacional. Al mismo tiempo se une a una proteína de superficie en una vesícula de transporte, mientras ésta está brotando de la vesícula dadora. El complejo Rab GTP entonces facilitaría la unión de la vesícula de transporte a la organela receptora adecuada e iniciaría el proceso de fusión de vesículas. Una vez que esta fusión ocurre, el GTP unido a la proteína Rab se hidroliza a GDP, liberando a la proteína Rab de la membrana vesicular. Esta proteína Rab ahora libre, se unirá a una proteína citosólica llamada GDI, intercambiando su GDP por GTP solo

cuando se une a otra vesícula de transporte dadora que se esté formando, completando el ciclo.

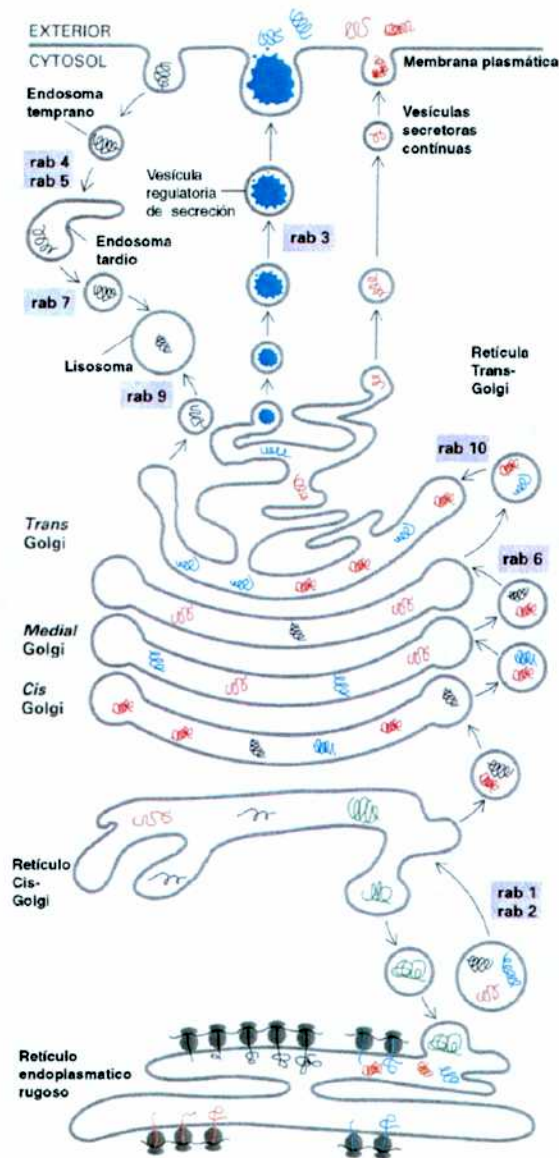
Diferentes evidencias implican a proteínas Rab específicas en eventos de fusión de vesículas específicas (77). Por ejemplo, Rab 5 se localiza en endosomas tempranos (organelas que se forman a partir de vesículas cubiertas por clatrina apenas brotan de la membrana plasmática). La fusión entre endosomas tempranos en sistemas libres de células, refleja el proceso normal que naturalmente ocurre luego de la endocitosis mediada por receptor y requiere la presencia de Rab 5 y de ninguna otra proteína Rab (78).

Recientes trabajos han demostrado un efecto directo de Rab 5 tanto en las vías fagocíticas como endocíticas específicamente en la fusión fagosoma-endosoma (78).

De manera similar Rab 1 es esencial para el transporte del retículo endoplasmático al aparato de Golgi, mientras que otras proteínas Rab como Rab 7 o 5 no lo son. Por su parte Rab 7 es un importante regulador del transporte hacia el endosoma tardío. El endosoma tardío está implicado en actividades de procesamiento antigénico y en la fagocitosis.

La existencia de mutantes de estas GTPasas pequeñas como Rab 5 y Rab 7 proporcionan las herramientas para estudiar las diferentes etapas en el proceso de transporte vesicular (79,80) y especificar la importancia de cada compartimiento intracelular.

**Fig. 6** Eventos secuenciales del transporte endocítico y exocítico en la célula eucariota



En conclusión las proteínas Rab son claramente esenciales para que las reacciones específicas de fusión ocurran, pero hasta el momento no se sabe aún porqué determinadas proteínas Rab se unen a membranas de determinadas vesículas. Actualmente se acepta que las proteínas Rab están

involucradas en la etapa de anclado/fusión de vesículas aunque también se las ha relacionado con el proceso de brotación de vesículas (77).

Se ha demostrado además que en la adhesión y entrada de bacterias, la fusión entre endosomas tempranos requiere la actividad de una fosfolipasa  $A_2$  y del incremento del  $Ca^{2+}$  (81,82). Los incrementos del  $Ca^{2+}$  intracelular durante la fagocitosis son necesarios para la fusión de fagosomas con lisosomas primarios.

### SEGUNDOS MENSAJEROS LIPÍDICOS

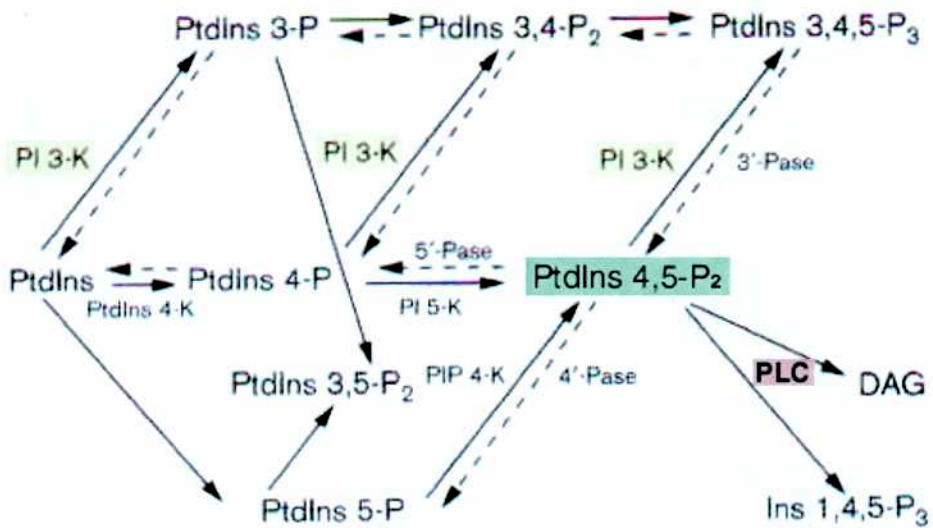
Los fosfatidilinositoles tienen un rol especial entre los fosfolípidos de membranas de las células eucariotas. Las moléculas de inositol pueden ser fosforiladas en sitios únicos o múltiples para dar una variedad de fosfoinosítidos. Estas moléculas están localizadas en la cara citoplasmática de las membranas celulares donde pueden ser sustrato de numerosas enzimas, incluyendo las fosfatidilinositol kinasas, fosfatasas, fosfolipasa C y la recientemente reportada fosfolipasa D. Estas enzimas pueden producir inositol polifosfatos solubles, los cuales pueden ser segundos mensajeros poderosos. Además esas reacciones, alteran rápida y efectivamente los niveles de algunos fosfoinosítidos en particular, en regiones específicas de la membrana. Como los fosfoinosítidos de la membrana pueden interactuar directamente con moléculas presentes en vesículas en brotación, moléculas de anclado y de la maquinaria de fusión. Estas reacciones celulares que alteran los niveles de fosfoinosítidos pueden proveer la matriz fundamental para una regulación eficiente, en el espacio y en el tiempo, del tráfico vesicular (83,84).



En los últimos años ha habido un interés creciente en el estudio de señales mediadas por lípidos, determinándose que las concentraciones de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) y fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) están fuertemente acopladas a la activación de determinados receptores, regulando la activación de kinasas lipídicas (84). Aunque el PIP<sub>2</sub> sirve como sustrato de la fosfolipasa C para generar DAG y IP<sub>3</sub>, ambos PIP<sub>2</sub> y PIP<sub>3</sub> también tienen roles de señalización por sí mismos: el PIP<sub>2</sub> interactúa con proteínas de unión a actina y puede regular la actina del citoesqueleto, mientras que el PIP<sub>3</sub> interactúa con dominios de homología a las oncoproteínas Src2, regulando la interacción de estas proteínas con proteínas fosforiladas en tirosina. Los niveles de ambos lípidos aumentan rápidamente en la célula luego de la unión de hormonas o factores de crecimiento a receptores presentes en la membrana plasmática a través de la acción de kinasas específicas de fosfoinosítidos (52).

Las fosfoinosítido 3-kinasas (PI3Ks) son una gran familia de proteínas que funcionan como transductoras de señales intracelulares que han atraído mucha atención en los últimos 10 años. Se encuentran expresadas en forma ubicua en todas las células y catalizan la fosforilación de fosfoinosítidos en el hidroxilo D3 del anillo del *mio*-inositol.

**Fig. 7 Metabolismo de los fosfatidilinositoles**



PtdIns: fosfatidilinositol; P: fosfato; P<sub>2</sub>: bifosfato; P<sub>3</sub>: trifosfato; PI 3K: fosfatidilinositol 3 kinasa; PI 4K fosfatidilinositol 4 kinasa; PI 5K fosfatidilinositol 5 kinasa; -Pase: fosfatasa; PLC: fosfolipasa C; DAG: diacilglicerol; Ins 1,4,5P<sub>3</sub>: inositol trifosfato.

Han sido definidas 3 clases de PI3Ks sobre la base de su estructura primaria, su regulación y su especificidad de sustrato. La clase I genera fosfatidilinositol 3 fosfato (PI<sub>3</sub>P), PI<sub>3,4</sub>P<sub>2</sub> y PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub> y son activadas por receptores de tipo tirosina kinasa y receptores acoplados a proteínas G. La clase II de PI3K generan PI<sub>3</sub>P y PI<sub>3,4</sub>P<sub>2</sub> y poseen un dominio C2 implicado en la unión a lípidos en su carboxilo terminal.

La clase III de PI3K produce PI<sub>3</sub>P solamente. Numerosos estudios usando inhibidores de PI3K y células que sobreexpresan esta enzima han implicado a la misma en la regulación de la proliferación celular, en la supervivencia, en la reorganización del citoesqueleto y en el tráfico de membranas. La forma de PI3K involucrada en la transducción de señales a través de receptores

tirosina kinasa está constituida por una subunidad regulatoria de 85 kDa y una subunidad catalítica de 110 kDa. (85).

### RELACIÓN ENTRE PI3K Y OTRAS PROTEÍNAS CELULARES

#### INTERACCION CON PKB

Un blanco bien establecido de la activación de PI3K es la proteína kinasa AKT también llamada proteína kinasa B (PKB) o RAC. Se piensa que la PKB tiene un rol importante en la protección celular de la apoptosis y en promover la sobrevivencia celular. El mecanismo preciso en el cual la producción de los 3-fosfoinosítidos induce activación de PKB no está completamente aclarado a pesar de los recientes hallazgos en esta área (86).

La PKB contiene dominios con homología con pleckstrina (PH) y de unión a  $PIP_2$  y  $PIP_3$  en sus aminos terminales. La asociación de esos lípidos con PKB no conduce a su activación *in vitro*. Sin embargo, la activación de PKB requiere la fosforilación de una treonina 308 y de una serina 473. Estas observaciones llevaron a dos grupos a investigar kinasas que podrían fosforilar PKB en esos sitios en presencia de 3-fosfoinosítidos, lo que condujo a la purificación y clonado de una kinasa de PKB llamada PDK1.

Como la PKB, la PDK1 posee un dominio PH que puede unirse a  $PIP_2$  o  $PIP_3$ . A diferencia de la PKB, la PDK1 parece existir en una conformación activa y a pesar de que es fosforilada *in vivo*, esos eventos de fosforilación no afectan su actividad de kinasa *in vitro* (86).

### INTERACCION CON FOSFOLIPASA C y $Ca^{2+}$

Mientras que la PI3K fosforila al  $PI_{4,5}P_2$ , la fosfolipasa C gama ( $PLC\gamma$ ), hidroliza este lípido para producir DAG e  $IP_3$  (Fig. 7). Este último entonces media la liberación de  $Ca^{2+}$  de las reservas intracelulares y la activación de la PKC. Recientes trabajos han revelado la existencia de una interrelación entre la PI3K y la  $PLC\gamma$  (87,88). Mientras que está bien establecido que la fosforilación en tirosina de la  $PLC\gamma$  es necesaria para su activación, también se demostró que la  $PLC\gamma$  está regulada adicionalmente por los productos lipídicos de la PI3K. El dominio PH de la  $PLC\gamma$  se une al PIP3 y es traslocada a la membrana en respuesta a factores estimulantes (87).

Por otra parte, se ha demostrado que en mastocitos estimulados, la inhibición de PI3K con un inhibidor específico de PI3K como el Wortmannin, conduce a una disminución en los niveles de  $IP_3$  y que los productos lipídicos de la PI3K estimulan la producción de  $IP_3$ . Por otra parte, las señales de  $Ca^{2+}$  luego de la estimulación con el antígeno están disminuídas. Ambos resultados indican indirectamente la relación existente entre PI3K y los productos de la  $PLC\gamma$  (88).

### INTERACCION CON RAB 5

Desde hace bastante tiempo se conoce el rol de los lípidos como responsables del mantenimiento de la integridad estructural de las membranas biológicas. Sin embargo, frecuentemente se los considera como componentes pasivos de la membrana, más allá de su función más conocida actualmente como segundos mensajeros en los caminos de transducción de señales. Actualmente existe evidencia que los lípidos son distribuídos a través de los distintos pasos del tráfico vesicular y que están directamente

asociados en la regulación del transporte de proteínas y del flujo de membranas (84).

Diversos trabajos han demostrado la relación entre los lípidos, la PI3K y el transporte vesicular (89,90). En particular se ha demostrado que la PI3K actúa como reguladora de la endocitosis mediada por receptor a través de la activación de Rab 5 (91) ya que inhibidores específicos de PI3K como el Wortmannin inhiben la fusión de endosomas tempranos mediada por Rab 5, así como las formas constitutivamente activas de PI3K estimulan la fusión.

Se ha descrito también la existencia de un autoantígeno de endosomas tempranos (EEA1) (92) el cual se une al PI<sub>3</sub>P. La asociación de EEA1 con la membrana endosomal requiere la presencia de Rab 5 en su estado activo y la actividad de PI3K. Si bien el mecanismo exacto de la activación de Rab 5 por PI3K aún es desconocido, la identificación del EEA1 como un efector directo de Rab 5 constituye un nexo molecular entre ambas proteínas. Rab 5-GTP y el PI<sub>3</sub>P pueden proveer un código combinatorio cuya función es localizar EEA1 en la membrana endosomal. Una vez allí, EEA1 puede interactuar con las proteínas de anclaje SNAREs u otras moléculas para llevar a cabo la fusión endosomal (92).

# **MATERIALES Y METODOS**

## **PARÁSITOS**

Los diferentes estadios parasitarios se obtuvieron en el laboratorio según la metodología que se detalla a continuación

### **Epimastigotes (Epi)**

Se utilizaron epimastigotes de la cepa RA (93). La cepa RA fue aislada de un paciente en la etapa aguda de la enfermedad de Chagas. Los parásitos fueron mantenidos por pasajes semanales en medio bifásico.

A las 48 hs. de cultivo (fase exponencial) en estufa de 28<sup>0</sup>C los parásitos fueron cosechados por centrifugación a 600 g y su cuantificación se realizó por microscopía en cámara de Neubauer. Los parásitos en esta fase contienen un porcentaje menor al 1% de formas metacíclicas.

### **Tripomastigotes**

#### Tripomastigotes metacíclicos (Mtc)

Para la obtención de este estadio infeccioso se utilizó el método descrito por Isola y col. (17). El método consiste en la inducción de epimastigotes a diferenciarse a tripomastigotes metacíclicos en un medio para células de insecto suplementado con un extracto soluble del intestino posterior del insecto vector. Este método permite la obtención de un porcentaje muy alto de Mtc.

Los epimastigotes ( $5 \times 10^6$ /ml) se lavaron dos veces con solución buffer fosfato (PBS) conteniendo 1% seroalbúmina bovina (BSA) (PBS-Alb) por centrifugación a 600g a temperatura ambiente. Luego los parásitos fueron estimulados durante 15-20 min. a  $28^{\circ}$  C con medio de Grace (94) suplementado con ES en una concentración de 1mg/ml durante 15 min a  $28^{\circ}$ C. Luego de la estimulación los parásitos fueron centrifugados a 600g a temperatura ambiente y resuspendidos en medio de Grace modificado. La modificación del medio Grace consiste en la adición al medio de SFB 7%, BSA1 % y ultrafiltrado de huevo 10 %. Este ultrafiltrado consiste en una solución de 1 parte de huevo de gallina entero y dos partes de NaCl 0.9%, incubado con agitación durante la noche a  $4^{\circ}$ C y pasado a través de una membrana de ultrafiltración de 10 kDa de peso molecular.

Los cultivos se sembraron en tubos tipo Leighton (0.5ml/tubo) y se mantuvieron en posición horizontal a  $28^{\circ}$ C.

Cada 24-48 hs se realizó la observación microscópica de los cultivos, observándose entre los 6 y 8 días pos estimulación una diferenciación que alcanza el 60-70% de Mtc. La morfogénesis se evaluó teniendo en cuenta la movilidad, la forma y la posición relativa núcleo-kinetoplasto de los parásitos. El porcentaje de Mtc se determinó en preparaciones húmedas y en preparaciones teñidas con Giemsa.

### Solución buffer fosfato (PBS)

CINa	10g
KCl	0.25g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.88g
Volumen final:	1000ml



## Purificación

La suspensión de parásitos conteniendo la mezcla de Epi y Mtc ( $2-4 \times 10^7$ /ml) se centrifugó a 1500g a temperatura ambiente y el pellet se resuspendió en 1-2 ml de suero humano normal. Los parásitos se incubaron 1h en baño de  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación permanente. Este tratamiento resulta en la lisis por complemento de los Epi (95) mientras que los Mtc se mantienen intactos. Los Mtc remanentes se centrifugaron a 1500g a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces por centrifugación con medio de cultivo para células de mamífero (199 o medio mínimo esencial (MEM)+ 10% suero fetal bovino (SFB), buffer Hepes 20mM, Penicilina 200U/ml y Estreptomicina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (199/MEM +10%SFB). Los parásitos se resuspenden a la concentración deseada en el mismo medio, previo recuento en cámara de Neubauer.

## Tripomastigotes sanguíneos (Trip-sang.)

Se utilizaron tripomastigotes sanguíneos, cepa RA, provenientes de ratones Rockland infectados de 21 días. En el modelo murino esta cepa se comporta como una cepa letal. La sangre se obtuvo estérilmente por punción intracardiaca utilizando heparina (5U/ml) con una concentración aproximada de  $1-2 \times 10^7$  Trip./ml a los 7 días pos infección (pico de parasitemia).

## Purificación

Su purificación se realizó según la técnica descrita por Mortatti y col. (96), utilizando una solución conteniendo Ficoll y meglumina iothalamato (MI) (Ficoll-MI). El Ficoll se utilizó al 9% p/v en NaCl 0.85p/v y la MI se utilizó 60%

p/v. La relación Ficoll:MI es de 6:1 con una densidad de  $1,078 \pm 0,001$  g/ml medida por picnometría. La sangre se diluyó 1:3 en medio 199 +10% SFB, se colocó sobre la solución de Ficoll-MI y se centrifugó a 300 g, 15 min a temperatura ambiente.

Luego de la centrifugación se obtuvo un pellet de glóbulos rojos y una interfase blanquecina que contiene a los parásitos. Esta interfase se aspiró suavemente con pipeta Pasteur, los parásitos se lavaron 2 veces con 199+10%SFB a 1500g y previo recuento en cámara de Neubauer se resuspendieron a la concentración deseada.

### Tripomastigotes de cultivo (Trip-cult.)

Se obtuvieron tripomastigotes del sobrenadante de células Vero según el método descrito por Docampo y col. (97). Las células Vero de 24hs. de cultivo en medio 199+10%SFB a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$  se despegaron por tripsinización y se irradiaron con 2000 rads en una bomba de Cesio 125. La irradiación de las células resulta en una detención en el crecimiento celular y permite obtener cultivos sincrónicos de Trip-cult. y Ama. Además este método aumenta significativamente el rendimiento y pureza de los tripomastigotes y permite obtener cultivos sincrónicos de tripomastigotes y amastigotes. Se obtuvieron Trip-cult. y Ama puros con una contaminación de formas intermedias menor al 5%.

Las células irradiadas se contaron en cámara de Neubauer utilizando Trypan blue para determinar su viabilidad y se sembraron en botellas de  $75\text{cm}^2$  a razón de  $6-8 \times 10^6$  células/botella. A las 24hs de la irradiación las botellas se infectaron con Trip-sang o Mtc en una relación parásito célula 10:1, dejando los parásitos en contacto con las células durante 24hs a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% $\text{CO}_2$ . Luego de 2 lavados con PBS para retirar los parásitos no adheridos, las células se lavaron nuevamente a las 24h de la misma forma.

A los 5 días pos-infección se obtienen los tripomastigotes del sobrenadante de cultivo. Los parásitos se centrifugaron por 20 min. a 10000rpm en una centrífuga Sorvall a temperatura ambiente y se contaron utilizando cámara de Neubauer obteniéndose aproximadamente entre  $1-2 \times 10^8$  trip-cult por botella. A los 7-8 días pos infección se puede cosechar de las botellas los amastigotes puros. El rendimiento de amastigotes es de aproximadamente  $3-5 \times 10^8$ /botella.

### **CÉLULAS DE MAMÍFERO**

#### Macrófagos peritoneales (MOp)

Se utilizaron macrófagos peritoneales provenientes de ratones Rockland hembra de 3 meses de edad. Para su obtención se inyectaron en el peritoneo 5 ml de medio 199+10%SFB y luego de un suave masaje abdominal se aspiró el fluido con jeringa manteniéndolo a 4°C hasta su uso. El total de células viables extraídas se determinó previa tinción con Trypan blue (diluído 1:10 en medio de cultivo), en cámara de Neubauer. Para establecer los porcentajes de macrófagos por células totales se utilizó naranja de acridina (98).

Los MOp obtenidos se centrifugaron a 1500g por 10 min. a 4°C y se resuspendieron en el mismo medio. Las células (en un volumen de 0.5 ml) se sembraron sobre laminillas de vidrio estériles ( $1 \times 10^5$  MOp/laminilla) en placas de plástico de 24 pocillos y se incubaron 1h a 37°C en atmósfera de 5%CO<sub>2</sub> para permitir su adhesión. Luego de lavados cuidadosos para eliminar las células no adheridas las placas se incubaron a 37° C 5%CO<sub>2</sub> por 24 h.

### Macrófagos de la línea J774 E-clone (MO J774)

Esta línea tumoral de macrófagos murinos fue obtenida por gentileza del Dr. Luis Mayorga de la Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza. Las células fueron mantenidas en monocapa por pasajes semanales en medio  $\alpha$ -MEM+10% SFB, buffer Hepes 20mM, Penicilina 200U/ml y Estreptomina 100mg/ml a una temperatura de 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Los macrófagos fueron cultivados en botellas de 25cm<sup>2</sup> a razón de 3x10<sup>5</sup> células por botella. El pasaje se realiza despegando las células con golpes suaves a la botella, diluyendo y sembrando las células en botellas conteniendo medio fresco.

### Macrófagos humanos (MOh)

Los macrófagos humanos fueron provistos por el laboratorio del Dr. Philip Stahl y cultivados en placas de Petri de 10 mm en medio RPMI +10% SFB a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>. Se obtuvieron a partir de monocitos de sangre periférica de dadores normales luego de 7 días de cultivo según el método descrito por Blystone y col. (99).

### Células Vero

Esta línea celular derivada de células de riñón de mono verde africano fue obtenida por gentileza del Dr. Campos, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA. Las células se mantuvieron por pasajes semanales en 199+5%SFB para el mantenimiento de la línea y en 199+10% SFB para crecimiento a una temperatura de 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>.

### Células NIH 3T3, L6E9 y CHO

Las líneas de fibroblastos NIH 3T3 y CHO (Chinese hamster ovary) y de mioblastos L6E9 fueron obtenidas por gentileza del Dr. Philip Stahl (Washington University, St. Louis, USA) y del Dr. Roberto Docampo (University of Illinois, Urbana-Champaign, USA) respectivamente. Ambas líneas celulares fueron mantenidas por pasajes semanales en medio D-MEM +10%SFB a una temperatura de 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>.

### Células NIH 3T3 transfectadas con PKB

La línea celular NIH 3T3 transfectada con genes de las proteínas PKB + (constitutivamente activada) y PKB – (mutante inactiva) unidos a una secuencia marcadora HA (hemaglutinina) fueron gentilmente cedidas por el Dr. Alejandro Barbieri, Washington University, St. Louis, USA. Las proteínas PKB están clonadas en un vector pcDNA 3 el cual posee un gen de resistencia a Geneticina. Se mantienen en cultivo en medio DMEM-10%SFB y 50µg/ml de Geneticina a una temperatura de 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> con pasajes semanales.

## **INFECCIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO CON *T. CRUZI***

Los experimentos de infección se realizaron utilizando células fagocíticas (macrófagos murinos, humanos o J774) o células no fagocíticas (Vero, NIH 3T3 normales o transfectadas, CHO o L6E9,). Las células cultivadas 24hs antes en D-MEM, 199 o  $\alpha$ -MEM+10% SFB a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> sobre laminillas de vidrio estériles en placas de plástico de 24 pocillos (4-6x10<sup>4</sup>

células por pocillo) se infectaron con los Mtc, Trip-sang o Trip-cult. en una relación parásito célula 10:1 (100). Los parásitos se dejaron en contacto con las células durante 1-2 hs a 37<sup>0</sup>C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego se retiró el sobrenadante conteniendo los parásitos no adheridos, se lavaron cuidadosamente las células con medio de cultivo, se agregó medio fresco y se incubaron durante 24h a 37<sup>0</sup>C y 5%CO<sub>2</sub>. Este tiempo permitió la observación microscópica posterior de los amastigotes intracelulares.

Las infecciones en los MOp se realizaron a una relación parásito: macrófago 10: 1 (100). Por su parte las infecciones en las distintas líneas celulares debieron estandarizarse y se realizaron a distintas relaciones de parásito-célula: 10:1 y 20:1 y a diferentes tiempos de interacción (1-3hs) a 37<sup>0</sup>C y 5%CO<sub>2</sub>. La técnica de coloración con Giemsa fue adaptada a estas células, probándose diferentes tiempos (3-5-10 y 15 min.) y concentraciones del colorante (1:80, 1:40, 1:20, 1:10).

Para cuantificar la internalización de los parásitos, las laminillas se colorearon con Giemsa diluído 1:10 en PBS pH 7.4 durante 5 min. para las líneas celulares y 15 min para los macrófagos peritoneales, previo lavado con PBS y fijado con metanol durante 2 min. Las laminillas, se lavaron con agua para retirar el colorante excedente, se dejaron secar y se montaron sobre portaobjetos de vidrio. Los preparados se observaron al microscopio óptico determinándose el porcentaje de células infectadas y/o la relación amastigotes/célula, contando no menos de 500 células al azar.

### **FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE *T. CRUZI***

Para obtener un lisado parasitario completo y las respectivas fracciones de membranas y citosol, los parásitos (1-3x10<sup>8</sup> Epi, Trip-cult., Mtc.)

provenientes de los respectivos medios de cultivo se lavaron 3 veces por centrifugación a 1500g por 15 min a 4<sup>0</sup>C.

La ruptura se realizó con 4 ciclos de congelamiento en N<sub>2</sub> líquido y descongelamiento a 37<sup>0</sup>C, seguido de una centrifugación a 13000g a 4<sup>0</sup>C. El pellet conteniendo flagelos y núcleos fue descartado y se utilizó como lisado total (L) el sobrenadante conteniendo la fracción citosólica y microsomal. A partir de este lisado se realizó una nueva centrifugación a 105000g, 1h a 4<sup>0</sup>C en una ultracentrífuga Beckman para obtener por separado la fracción citosólica (CIT) y la de membranas (MEM). Todas las fracciones fueron fraccionadas y mantenidas a -70<sup>0</sup>C hasta su uso.

### **TRATAMIENTO Y POSTERIOR INFECCIÓN DE MACROFAGOS PERITONEALES CON MODULADORES DE SEGUNDOS MENSAJEROS**

Los ensayos de infección se realizaron previa incubación de los MOP durante 1 o 2 h a 37<sup>0</sup>C y 5%CO<sub>2</sub> con las siguientes drogas:

#### **a)Moduladores del [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**

-Bay K 8644 1 μM: agonista de canales de Ca<sup>2+</sup>

-Metoxiverapamil 0.3 μM: bloqueante de canales de Ca<sup>2+</sup>

-BAPTA-AM 50 μM: quelante intracelular del ion Ca<sup>2+</sup>

-Ionomicina 10μM: ionóforo de Ca<sup>2+</sup>

### **b) Inhibidores de proteínas kinasas**

-Staurosporina 50 nM: inhibidor de proteína kinasa C, A y G

-H-7 20  $\mu$ M: inhibidor de PKC y kinasas dependientes de nucleótidos cíclicos.

### **c) Moduladores de proteínas G**

-Fluoruro de Aluminio (AlF) 10 $\mu$ M: activador potente de proteínas G heterotriméricas que imita el fosfato  $\gamma$  del GTP (nucleótido que al unirse a la enzima produce su activación).

-Mastoparán 10  $\mu$ M: toxina peptídica anfifílica de veneno de avispa que acelera el intercambio de nucleótidos en subunidades  $\alpha_0$  y  $\alpha_i$  de proteínas G.

-Toxina colérica (CTx) 1 $\mu$ g/ml: media la ADP-ribosilación de subunidades  $G_{\alpha s}$  de proteínas G, activándolas irreversiblemente.

-Toxina pertussis (PTx) 1 $\mu$ g/ml: media la ADP-ribosilación de subunidades  $G_{\alpha i}$  de proteínas G, desacoplándolas del receptor e inactivándolas.

-TrMP14 40  $\mu$ M: péptido correspondiente a un dominio citoplasmático del receptor a manosa 6-fosfato que es capaz de activar a la proteína  $G_{\alpha i}$

-TrMP 14-A2 40  $\mu$ M: péptido TrMP 14 con una sustitución Lis $\rightarrow$ Ala que lo hace 5 veces menos potente en su activación a  $G_{\alpha i}$ .

Todas las drogas utilizadas en estos ensayos fueron probadas previamente a diferentes concentraciones en los cultivos celulares para determinar



toxicidad de las mismas o del solvente utilizado (dimetilsulfóxido). La evaluación se realizó por microscopía óptica y por tinción con Trypan blue. Luego de retirar el medio conteniendo las drogas y lavar cuidadosamente la monocapa, la infección se realizó incubando los MOp con los Mtc purificados (relación parásito célula 10:1) (100). Los parásitos se dejaron en contacto con los MOp durante 1h a 37<sup>0</sup>C 5%CO<sub>2</sub> en 199+10% SFB. Luego se retiró el sobrenadante conteniendo los parásitos no adheridos y se lavaron cuidadosamente las células. Finalmente se agregó medio fresco y se incubó durante 24hs a 37<sup>0</sup>C 5%CO<sub>2</sub>.

### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) EN MACROFAGOS PERITONEALES

Para realizar la cuantificación del Ca<sup>2+</sup> intracelular se utilizó el compuesto Fura 2AM. Este compuesto es un éster capaz de atravesar la membrana plasmática de las células. Una vez en el citosol, es clivado por las esterasas celulares a la forma Fura 2, la cual ya no puede salir de la célula. De esta manera, el Fura 2 forma un complejo con el Ca<sup>2+</sup> intracelular que fluoresce a una longitud de onda de 500 nm. La intensidad de la fluorescencia es entonces directamente proporcional a la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> citosólica y se registra en un espectrofluorómetro.

#### Tratamiento de los macrófagos peritoneales con Fura 2AM

Para realizar las mediciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> los MOp se cultivaron por 24 hs en 199+10%SFB a 37<sup>0</sup>C y 5%CO<sub>2</sub> sobre laminillas rectangulares dentro de

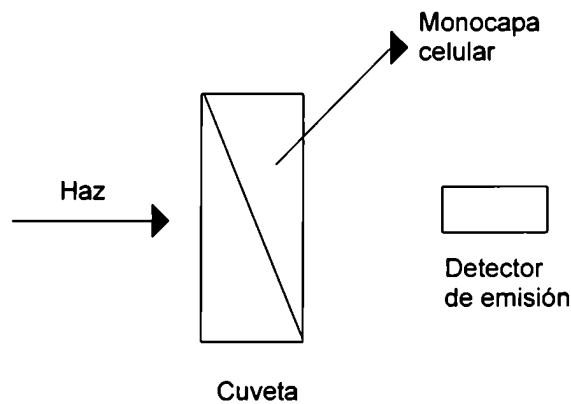
tubos Leighton. Todo el tratamiento subsiguiente se realizó en oscuridad. Las células se incubaron en medio 199 más Fura-2AM 4 $\mu$ M a 37 $^{\circ}$  C durante 30-40 min. Luego se cambió el medio con Fura-2AM por medio fresco y las células se incubaron a 37 $^{\circ}$  C por 20 min más. Las laminillas se lavaron 3 veces con solución salina balanceada de Hank (SSBH)pH 7.4 más Hepes 10 mM y se mantuvieron en este buffer a temperatura ambiente hasta su uso (101) en los siguientes experimentos.

### Solución salina balanceada de Hank (SSBH)

<u>Solución A</u>		<u>Solución B</u>	
CINa	8g	PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O	0.075g
ClK	0.4g	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	0.06g
SO <sub>4</sub> Mg.7H <sub>2</sub> O	0.1g	Volumen final	200ml
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.1g		
CaCl <sub>2</sub>	0.14g		
Glucosa	1g		
Volumen final:	800ml.		

Se preparan las dos soluciones por separado y se esterilizan por autoclave 15 min. Una vez frías, se mezclan el volumen total de las dos soluciones y se ajusta el pH a 7.4.

En cada experimento se colocó la laminilla diagonalmente en una cubeta standard de cuarzo conteniendo SSBH +Hepes10mM, con la monocapa celular orientada hacia el detector de emisión del espectrofluorómetro, dado que en esta posición se obtiene la señal más alta (101).



### Cálculo de la $[Ca^{2+}]_i$

El calcio intracelular se calcula a partir de la emisión de fluorescencia a 500 nm a longitudes de onda de excitación de 340 y 380 nm medida en un espectrofluorómetro JASCO PF-770. La  $[Ca^{2+}]_i$  se determina usando la siguiente fórmula (102,53).

$$[Ca^{2+}]_i = 224 [(F - F_{min}) / (F_{máx} - F)] S$$

donde:

-224 es la constante de disociación ( $K_d$ ) para la asociación de la molécula de Fura-2 de-esterificada con el Calcio ionizado

-F es el cociente de fluorescencia 340:380 para la muestra a tiempo t

- $F_{\text{máx}}$  es el cociente de fluorescencia 340:380 máximo que se obtiene luego de la adición de digitonina (100  $\mu\text{l}$  de una solución 1.5 mg/ml). La digitonina permeabiliza las membranas celulares permitiendo la salida del  $\text{Ca}^{2+}$  de las organelas.

$F_{\text{mín}}$  es el cociente de fluorescencia 340:380 mínimo que se obtiene luego de registrar el  $F_{\text{máx}}$  y agregando 100  $\mu\text{l}$  de EGTA 0.5 mM a las células tratadas con digitonina.

-S es el cociente de fluorescencia a 380nm en las muestras tratadas con EGTA sobre las muestras tratadas con digitonina.

### **DETERMINACIÓN DE $[\text{Ca}^{2+}]_i$ EN MACROFAGOS PERITONEALES INFECTADOS O ESTIMULADOS CON FRACCIONES SUBCELULARES PARASITARIAS**

La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se determinó en:

- a) MOp normales
- b) MOp infectados con Mtc, 2h pos infección (relación parásito-célula 10:1)
- c) MOp estimulados con lisado de Trip-sang.
- d) MOp estimulados con membranas de Trip-sang.
- e) MOp estimulados con citosol de Trip-sang.
- f) MOp estimulados con membranas de Epi.

En los puntos c), d), e) y f) las mediciones se realizaron a diferentes tiempos luego del agregado de las distintas fracciones y manteniendo la relación de

equivalencia entre las fracciones subcelulares y la relación parásito-MOp usada en los experimentos de infección.

## **DETERMINACIÓN DE $[Ca^{2+}]_i$ EN MACROFAGOS PERITONEALES EN PRESENCIA DE MODULADORES DE PROTEÍNAS G**

La  $[Ca^{2+}]_i$  se determinó en:

- a) MOp normales
- b) MOp tratados con Mastoparán  $10\mu M$  y luego con PTx  $1\mu g/ml$
- c) MOp tratados con PTx  $1\mu g/ml$  y luego con Mastoparán  $10\mu M$

La intensidad de la fluorescencia se registró a los 30 seg, 3, 5, 7, 9 y 11 min. luego de la adición de las diferentes drogas a la cubeta conteniendo la monocapa de células.

**DETERMINACIÓN DE INFECTIVIDAD DE METACICLICOS PRETRATADOS CON MODULADORES DE PROTEÍNAS G**

Los Mtc purificados se incubaron durante 30' con las toxinas colérica o pertussis (1µg/ml) y luego de 2 lavados por centrifugación a 1500g a temperatura ambiente con medio 199+10%SFB, se incubaron durante 2h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> con los MOp. Luego de la infección, los macrófagos se lavaron para retirar los parásitos no adheridos y se determinó el porcentaje de macrófagos infectados según lo ya descrito.

**DETERMINACIÓN DE INFECTIVIDAD DE TRIPOMASTIGOTES DE CULTIVO PRETRATADOS CON INHIBIDORES DE PI3K**

Tripomastigotes provenientes del sobrenadante de cultivos de células Vero infectadas se lavaron 2 veces por centrifugación a 10000rpm por 20 min a temperatura ambiente en una centrífuga Sorvall. Los parásitos se resuspendieron en medio 199+10%SFB conteniendo Wortmannin 100 y 500 µM y se incubaron a 37<sup>0</sup>C por 1h.

Luego del tratamiento, los parásitos se lavaron nuevamente por centrifugación y se resuspendieron en medio fresco. La infección y cuantificación de la misma se realizó según lo ya descrito.

### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PI3K EN CELULAS VERO ESTIMULADAS CON FRACCIONES SUBCELULARES PARASITARIAS

Se determinó la actividad de la enzima PI3K según el método de Shigematsu y col. (103). Las células Vero (aproximadamente  $1-2 \times 10^6$  células/punto, 80% confluencia) se cultivaron en placas de Petri de 10 cm por 4-5hs. a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5%CO<sub>2</sub> en 199+10%SFB. Posteriormente se cambió el medio por medio libre de factores de crecimiento presentes en el SFB (199+BSA 0.2%) y se incubaron en las mismas condiciones durante 18 hs.

Las células fueron estimuladas con membranas de Trip-cult. y de Epi ( $1-2 \times 10^7$  equivalentes de parásitos) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Luego de la estimulación, la monocapa se lavó 2 veces con PBS a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los controles fueron células no estimuladas que tuvieron el mismo tratamiento en los siguientes pasos. Todos los procedimientos posteriores se realizaron a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se realizó un último lavado con 2 ml/placa con Buffer A. Las células se solubilizaron en 1 ml de buffer de lisis helado y se incubaron con un agitador a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 1h.

#### Buffer A

Tris 20mM pH 7.5,  
 NaCl 137 mM  
 MgCl<sub>2</sub> 1mM  
 CaCl<sub>2</sub> 1mM  
 Ortovanadato de Na 0.1mM

#### Buffer de lisis

Buffer A  
 NP-40 1%

Glicerol 10 %

Cóctel de inhibidores de proteasas (0.01 % leupeptina; 2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo; 25 U/ml aprotinina, 1mM benzamidina y 0.2 mg/ml de inhibidor de tripsina de soja)

### TNE

Tris 10 mM

NaCl 150mM

EDTA1mM

Ortovanadato de Na 0.1mM

Las células se levantaron de la placa con un rastrillo plano (cell scraper), la suspensión se transfirió a tubos de microcentrífuga y se centrifugó a 12000g durante 20 min a 4<sup>0</sup>C. Una alícuota del sobrenadante (10µl) se utilizó para determinar la concentración de proteínas según el método de Lowry (104). El sobrenadante (1-2 mg/ml de proteína) se transfirió a nuevos tubos y se le agregó 5 µl de anticuerpo anti PI3K por tubo. Las muestras se incubaron en un agitador por 16hs a 4<sup>0</sup>C, luego de lo cual se agregó 60µl de Proteína A-agarosa (50% en PBS) por tubo y se volvió a incubar en el agitador a 4<sup>0</sup>C durante 1-2hs.

El inmunoprecipitado se recuperó por centrifugación a 12000g durante 5 seg a 4<sup>0</sup>C y se lavó secuencialmente de la siguiente manera:

2 veces con buffer de lisis

2 veces con Tris-HCl pH 7.5 100 mM, LiCl 500mM, Ortovanadato de Na 0.1mM

1 vez con TNE



Luego del último lavado se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en las siguientes soluciones de acuerdo al siguiente orden:

1<sup>o</sup>) 50  $\mu$ l de TNE

2<sup>o</sup>) 20  $\mu$ g del sustrato PI (stock 2 mg/ml; al que, previa evaporación del solvente con N<sub>2</sub> gaseoso, se resuspendió en 10  $\mu$ l de Tris-HCl 10mM pH 7.4, EGTA 1mM. La solución de PI se sonicó inmediatamente durante 10 min. en baño de hielo

3<sup>o</sup>) 10  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 100 mM

4<sup>o</sup>) 10  $\mu$ l de MnCl<sub>2</sub> 100 mM.

La reacción de fosforilación comienza con el agregado de 10 $\mu$ Ci /muestra de [ $\gamma$  <sup>32</sup> P] ATP y 0.88 mM de ATP frío. A partir de este momento los tubos se incubaron 20 min a temperatura ambiente con agitación ocasional. La reacción se detuvo agregando 20 $\mu$ l de HCl 6N y los lípidos se extrajeron con 160  $\mu$ l de CHCl<sub>3</sub>: MeOH 1:1. Luego de agitar 10 seg en un vortex para extraer el lípido, los tubos se centrifugaron 10 seg. a 1500g a temperatura ambiente para separar las fases. La fase orgánica (inferior) se sembró en placas de sílica para cromatografía en capa delgada (TLC) previamente tratadas por inmersión con oxalato de K 1% y secadas a 80<sup>o</sup>C en estufa.

La placa se corrió en el siguiente solvente CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH [60:47:11,3:2] donde la separación de los lípidos se logró con placas de 10 cm. Luego de la corrida, las placas de TLC se dejaron secar y se expusieron a una película radiográfica por 24-48hs a -70<sup>o</sup>C. La identificación de los lípidos marcados se realizó por comparación con estándares comerciales de PIP. La cuantificación del PIP marcado se realizó por densitometría utilizando el programa de computación NIH Image para Windows 95. Se utilizó este método dado que los aumentos relativos de unidades de densidad se correlacionaban con los aumentos en las cuentas por minuto, que se obtenían luego de recortar las manchas correspondientes al PIP de la placa de TLC y realizar la medición en un contador de centelleo líquido.

## **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PI3K EN TRIPOMASTIGOTES DE CULTIVO DE *T. CRUZI***

La actividad PI3K se determinó con el mismo método que para las células Vero. Como primer paso  $5 \times 10^7$  Trip-cult./punto, se lavaron 2 veces por centrifugación con PBS y una vez más con el buffer A. El pellet se resuspendió en el buffer de lisis. A partir de este paso se realizó el mismo procedimiento que para las células Vero.

## **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PKB EN CELULAS VERO ESTIMULADAS CON FRACCIONES SUBCELULARES PARASITARIAS**

La actividad de la enzima PKB fue determinada según el método de Kohn y col. (105). Las células Vero fueron cultivadas, estimuladas, lavadas y solubilizadas exactamente como lo descrito para la determinación de actividad PI3K. El lisado celular (0.5-1 mg proteína) fue incubado durante 3h a 4°C con 5 µl de anticuerpo anti AKT1/ PKB seguido de una incubación con agitación a 4°C durante la noche con 20µl de Proteína A-agarosa (50% en PBS) por tubo.

El inmunoprecipitado se recuperó por centrifugación a 12000g durante 5 seg a 4°C y se lavó secuencialmente de la siguiente manera:

2 veces con buffer de lisis

2 veces con buffer kinasa

### Buffer de lisis

Hepes 25mM pH 7,9  
Cóctel de inhibidores de proteasas  
0.01% leupeptina; 2 mM fluoruro  
de fenilmetilsulfonilo; 25 U/ml  
aprotinina, 1mM benzamidina  
0.2 mg/ml de inhibidor de tripsina  
de soja  
Tritón X-100 1%  
NaCl 150mM  
 $\beta$ -glicerofosfato 10  $\mu$ M  
Ortovanadato de Na 10 mM

### Buffer kinasa

Hepes 25mM pH 7,9  
MgCl<sub>2</sub> 10 mM  
MnCl<sub>2</sub> 10 mM

El pellet se resuspendió en 25 $\mu$ l de buffer kinasa al que se adicionó 1  $\mu$ l del sustrato Histona H2B (1 mg/ml) y 1  $\mu$ l de ATP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] (10mCi/ml). La reacción se incubó a 30<sup>0</sup>C durante 20 minutos y la misma fue detenida con 10  $\mu$ l de buffer muestra 3X. Posteriormente las muestras fueron calentadas a 100<sup>0</sup>C durante 4 minutos. Luego de un pulso de centrifugación en una centrífuga para microtubos, los sobrenadantes fueron corridos en un gel de poliacrilamida 10%. con SDS El gel obtenido fue secado y expuesto a una placa radiográfica por 24-48h a -70<sup>0</sup>C. Los aumentos relativos en la banda correspondiente a la histona H2B fosforilada se determinaron por densitometría al igual que lo descrito para la determinación de PI3K.

### **GELES DE POLIACRILAMIDA PARA PROTEÍNAS**

La separación de las proteínas se realizó según el método de Laemmli y col. (106) modificado posteriormente por Studier y col. (107).

### Fórmula para un gel de poliacrilamida 10%

	<b>Gel separador (10ml)</b>	<b>Gel concentrador (5 ml)</b>
Acrilamida 30:1	3.3ml	0.83ml
Tris HCl 1.5M pH 8.8	2.5 ml	
Tris HCl 1M pH 6.8	-	0.63 ml
SDS 10%	0.1ml	0.05ml
PSA 10%	0.1ml	0.05ml
TEMED	4 $\mu$ l	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	4ml	3.4ml

Se prepara primero el gel separador y luego de la polimerización del mismo, se deposita sobre éste el gel concentrador. En éste último se siembran las muestras resuspendidas en buffer muestra 3X y hervidas. El gel se corre en buffer de corrida a 25mA y 200 V hasta que colorante azul de bromofenol (BMB) sale del gel.

#### **Buffer muestra (1X)**

Tris-HCl 0.5M pH6.8	50mM
SDS	2%p/v
Glicerol	10%v/V
BPB	0.1%(p/v)

#### **Buffer de corrida (1X)**

Tris base	25mM
SDS	0.1%
Glicina	250mM

Adicionar 50 $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol a 950  $\mu$ l de buffer muestra antes de usar.

### **OBTENCIÓN DE LÍNEAS CELULARES QUE SOBREENPRESAN LA PROTEÍNA RAB 7**

Las técnicas que se describen a continuación fueron desarrolladas en el laboratorio del Dr. Philip Stahl en el Departamento de Biología Celular y Fisiología de la Washington University, St. Louis, USA, bajo la dirección del Dr. Alejandro Barbieri.

#### **SUBCLONADO DE RAB 7 EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN PARA MAMÍFEROS pcDNA3.1/HYGRO**

Con el fin de construir líneas celulares que sobreexpresen de manera estable la proteína Rab 7 en su estado nativo, activo o inactivo se decidió subclonar los genes para dichas proteínas en un vector de expresión para células de mamífero para luego poder incorporar dicho vector en las células. Los genes correspondientes a Rab 7 wt (proteína nativa), S22N (mutante negativa que expresa una proteína que solo une GDP), Q67L (mutante positiva que expresa una proteína que une solo GTP) y N125I (mutante doble negativa que no une GDP ni GTP) estaban previamente clonados en el vector bacteriano pGEX. Se decidió entonces obtener los fragmentos de dichos genes por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y posteriormente ligarlos al vector para mamíferos. A continuación se describen las técnicas empleadas:

##### **1.1 OBTENCIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE RAB 7**

Se diseñó un protocolo de PCR utilizando primers 3' y 5' específicos para estas proteínas Rab 7. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

### 1.1.1 Minipreparaciones de DNA plasmídico (minipreps)

A partir de un cultivo de 18hs. en medio LB-ampicilina 0.5 mg/ml de bacterias *E. coli* conteniendo los insertos de las diferentes proteínas Rab en el vector pGEX se realizó la preparación de DNA plasmídico por lisis alcalina de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook y col. (108).

Los cultivos bacterianos (2ml) se centrifugaron a 10000 rpm en una microcentrífuga y el pellet se resuspendió en 100  $\mu$ l de solución I (glucosa 50mM, Tris 25 mM pH 8.8, EDTA 10 mM pH 8.0, RNAsa 20  $\mu$ g/ml). Luego se adicionaron 200  $\mu$ l de solución II (SDS 1%, NaOH 0.2N) y 150  $\mu$ l de solución III helada (acetato de K 5M 60 ml, ácido acético glacial 11.5 ml y H<sub>2</sub>O 28.5 ml (ésta última solución precipita proteínas y DNA mitocondrial). Luego de una centrifugación a 10000rpm en la microcentrífuga a 4<sup>o</sup>C, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo al que se le agregó un volumen igual de una solución fenol: cloroformo 1:1. Los tubos se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones anteriores y se retiró la fase acuosa superior. A esta fase se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se dejó 2 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 10000rpm en la microcentrífuga a 4<sup>o</sup>C, se aspiró el sobrenadante y el pellet se lavó una vez con 70  $\mu$ l de etanol 70%. Luego de una centrifugación 10000rpm en la microcentrífuga a 4<sup>o</sup>C, se retiró la mayor parte del sobrenadante, dejándose sólo 20  $\mu$ l de etanol junto con el pellet que se evaporaron al vacío en un desecador Speed Vac. El pellet (DNA purificado) se disolvió en 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada pasada por una resina Milli Q.

### Medio LB (por litro)

Bacto-triptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
Ajustar pH a 7.0 con NaOH 10N	
Para LB-agar agregar 15g de agar (1.5%)	

### 1.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó la amplificación de los fragmentos correspondientes a las distintas mutantes de Rab 7 utilizando primers específicos: 3' Rab 7 con un sitio de restricción para la enzima Xba I y 5' Rab 7 con un sitio Hind III. La reacción se realizó en un ciclador Cetus 9600 en las siguientes condiciones:

Buffer de amplificación 10X,	5µl
Primer 5' (50 pmol/ µl)	1µl
Primer 3' (50 pmol/ µl)	1µl
dNTP's (1.25mM c/u)	2 µl
DNA	1 µl
H <sub>2</sub> O	39 µl
Amplitaq Polimerasa	0.25 µl

Primer 3': Rab 7 con sitio Xba I: GCTCTAGATCAGCAACTGCAGCT

Primer 5': Rab 7 con sitio Hind III:  
CCCAAGCTTATGACCTCTAGGAAGAAAGTGTTGC

La reacción se desarrolla de acuerdo a los siguientes ciclos

Ciclo 1: 4min 94<sup>0</sup>C (Desnaturalización)  
1min 55<sup>0</sup>C (Pegado de oligonucleótidos)  
3 min 72<sup>0</sup>C (Polimerización)

Ciclos 2-26: 30 seg 94<sup>0</sup>C  
15 seg 55<sup>0</sup>C  
45 seg 72<sup>0</sup>C

Ciclo 27: 10 min 72<sup>0</sup>C

### Buffer de Amplificación

KCl	500 mM
Tris pH 8.4	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	15mM
Gelatina	1mg/ml

### Preparación de geles para DNA

Se prepararon geles de agarosa 0.8 y 1.5 % (0.8 g y 1.5 g de agarosa por cada 100 ml de buffer TAE 1X). Los geles de menor porcentaje de agarosa se utilizan para ver fragmentos de mayor peso molecular.



### Buffer TAE(10X)

Tris base	242 g
Acido acético glacial	51.1 g
EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.2 g
Volumen final:	1 litro

Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa 1.5% a 100V durante 30 min y se confirmó la presencia de la banda de PM correspondiente a Rab 7 (660 pb) por tinción con Bromuro de Etidio (2 µl de una solución 10 mg/ml en 50 ml de H<sub>2</sub>O destilada se incuban con el gel durante 15 min a temperatura ambiente). El gel se destiñe posteriormente en agua destilada por 15 min y las bandas de DNA se visualizan por exposición del gel a la luz ultravioleta en un transiluminador. Se corrió también un control de amplificación al cual no se le adicionó DNA (control negativo) (**Fig. 18**).

## **1.2 PURIFICACIÓN DEL DNA AMPLIFICADO**

### 1.2.1 Extracción con fenol- cloroformo

Los productos amplificados fueron purificados por extracción con fenol:cloroformo (1:1) y precipitación con etanol. Se adicionó un volumen de fenol:cloroformo (1:1) igual al de la muestra obtenida luego de la PCR, se mezcló por inversión y se centrifugó en una microcentrífuga 10-15 seg a 12000g a temperatura ambiente. La capa acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo y se adicionó un volumen igual de fenol:cloroformo, repitiendo el paso anterior. La capa acuosa superior se superior se transfirió a un tubo

nuevo y se le adicionó ahora un volumen igual de cloroformo, se agitó y se centrifugó nuevamente. La capa acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo

### 1.2.2 Precipitación con etanol

Al volumen de la muestra anterior se le adicionó 1/10 del volumen de acetato de Na 3M, pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto. La muestra se incubó a  $-70^{\circ}\text{C}$  por lo menos durante 30 min. Luego se centrifugó en microcentrífuga 20 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante, se agregó al pellet 300  $\mu\text{l}$  de etanol 70% y se volvió a centrifugar 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Este procedimiento se repitió una vez más, luego de lo cual el DNA se concentró en un SpeedVac hasta la evaporación del solvente (10 min). El DNA se resuspendió en 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$

### 1.2.3 Digestión con enzimas de restricción

Los productos de amplificación de Rab 7 y sus mutantes ya purificados se sometieron a una digestión enzimática utilizando las mismas enzimas que los sitios de restricción de los primers con la finalidad de obtener sitios de restricción que permitan el ligado con los sitios del vector. El DNA de cada mutante fue incubado con 1  $\mu\text{l}$  de Hind III, 1  $\mu\text{l}$  de Xba I, 2  $\mu\text{l}$  de buffer 2 (buffer Gibco compatible con ambas enzimas) y 16  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . La reacción se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 4 hs.

#### 1.2.4 Purificación del inserto Rab 7

Los productos de amplificación de cada mutante de Rab 7 se corrieron en un gel de agarosa 1.5% en un solo pocillo a 100V durante 30 min. **(Fig. 9)** Luego de teñir con EtBr para identificar las bandas correspondientes a las distintas Rab 7, se cortó la porción de gel y se purificaron los fragmentos utilizando un kit comercial basado en una resina de intercambio iónico (GlasPac, Nat. Sci. Supp. Comp., Inc., USA). Luego de la purificación se corrió nuevamente una alícuota de cada preparación en un gel de agarosa 1.5% a fin de verificar la presencia de los productos luego de la purificación.

### **1.3 OBTENCIÓN Y LINEALIZACIÓN DEL VECTOR pcDNA 3.1/HYGRO**

Con el fin de ligar los fragmentos de Rab 7 en el vector, este último debe ser purificado de las bacterias correspondientes y cortado con las mismas enzimas de restricción que se utilizaron en la obtención de los fragmentos de Rab 7

#### 1.3.1 Minipreps

Se realizaron según la técnica ya descrita en el punto 1.1.1 a partir de bacterias *E. coli* conteniendo el vector pcDNA 3.1/Hygro

### 1.3.2 Digestión con enzimas de restricción

Aproximadamente 2 µg del DNA correspondiente al pcDNA 3.1/Hygro se digirieron con 1 µl de Hind III, 1 µl de Xba I, 2 µl de buffer 2 (Gibco, USA) y 14 µl de H<sub>2</sub>O. La reacción se incubó durante 4hs. a 37°C y luego se adicionó 1µl de fosfatasa intestinal bovina, para evitar el re-ligado del vector. Una alícuota de la reacción se corrió en un gel de agarosa 0.8% para comprobar la digestión (**Fig. 10**)

### 1.3.3 Purificación del vector pcDNA 3.1/Hygro

Se realizó según lo descrito en el punto 1.2.1 y 1.2.2

## **1.4 LIGADO DE LOS FRAGMENTOS RAB 7 EN EL VECTOR pcDNA 3.1/HYGRO**

Los diferentes insertos correspondientes a Rab 7 wt y sus 3 mutantes, ya purificados se ligaron al vector pcDNA 3.1/Hygro de acuerdo a las proporciones establecidas por los geles analíticos de ambas purificaciones (relación inserto:vector 7:1) utilizando un kit comercial que contiene la enzima DNA ligasa (Boehringer Mannheim 5 min. ligation kit). La reacción se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.

## Reacción de ligado

DNA insertos Rab 7	7µl
DNA pcDNA3.1/Hygro	1µl
Buffer dilución DNA 5X	2µl (Buffer provisto por el kit)
Buffer ligado 2X	10µl (Buffer provisto por el kit)
T4 ligasa	1µl
H <sub>2</sub> O	4µl

## **1.5 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON LA CONSTRUCCIÓN RAB 7- pcDNA 3.1/HYGRO**

### **1.5.1 Preparación de bacterias competentes para congelar**

A partir de 5 ml de *E.coli* XLB1B cultivadas durante 18 hs a 37<sup>0</sup>C en LB, se transfirió 1 ml de este cultivo a 100 ml de medio LB fresco y se mantuvo en cultivo durante 2-3 hs más hasta determinar una densidad óptica por espectrofotometría de 0.5. Las bacterias se transfirieron a tubos enfriados y se dejaron en hielo durante 10 min. Luego de centrifugar a máxima velocidad en una centrifuga de mesa durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 30 ml de buffer de transformación helado. Las bacterias se dejaron 10 min en hielo, luego de lo cual se centrifugó igual que en el paso anterior. El pellet se resuspendió en 4 ml de buffer de transformación, y se adicionaron 280µl de dimetilsulfóxido. La suspensión se mantuvo en hielo durante 15 min, luego de lo cual se fraccionó en criotubos. Los tubos se congelaron en N<sub>2</sub> líquido durante 24 hs y luego se mantuvieron a -70<sup>0</sup>C.

### Buffer de transformación

Acetato de K 1M	0.2ml
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.178g
CaCl <sub>2</sub>	0.029g
KCl	0.149g
Cloruro de Co hexamino	0.16g
Glicerol 50%	4ml

Ajustar el pH con HCl 0.1N. Diluir a 20ml y esterilizar por filtración.

### **1.5.2 Transformación de bacterias**

Se transformaron 50 µl de bacterias congeladas Ca<sup>2+</sup> competentes *E. coli* XLB1B a las que se le adicionaron 7 µl de la mezcla de ligado de cada una de las 4 construcciones. Las bacterias se incubaron a 42°C por 90 seg. y luego se les agrego 800 µl de medio SOC. Luego de una centrifugación de 5 seg. a máxima velocidad en la microcentrífuga, las bacterias se resuspendieron en 200 µl del mismo medio y se sembraron en placas en agar LB-ampicilina. Un lote de bacterias sin transformar se utilizó como control. Las placas se incubaron a 37°C por una noche.

### Medio SOC

Triptona 2%  
Extracto de levadura 0.5%  
NaCl 10 mM  
KCl 2.5 mM

MgCl<sub>2</sub> 10 mM  
MgSO<sub>4</sub> 10 mM  
Glucosa 20 mM

## 1.6 SCREENING DE COLONIAS TRANSFORMADAS

Se realizó un screening por PCR de las colonias crecidas luego de la transformación utilizando un primer 5' correspondiente al vector y el primer 3' correspondiente a Rab7 ya utilizado, a fin de determinar que las colonias crecidas efectivamente contuvieran la inserción y que el inserto tuviera la orientación correcta. Se tomaron entre 5-10 colonias de cada construcción con un palillo estéril y se transfirieron a tubos de PCR de 0.2 ml a los que se agregó:

H <sub>2</sub> O	10µl
Buffer de amplificación	2.5µl
Primer 5' pcDNA3.1/Hygro	0.5µl
Primer 3' Rab7	0.5µl
dNTP's (1.25mM c/u)	2 µl
Amplitaq polimerasa	0.25 µl

Primer 5' pcDNA3.1/Hygro: CCCATCGCTTACTGGC

La reacción se desarrolló de acuerdo a los siguientes ciclos

Ciclo 1: 5min 95<sup>0</sup>C  
1min 55<sup>0</sup>C

Ciclos 2-25: 30 seg 95<sup>0</sup>C  
15 seg 55<sup>0</sup>C

45 seg 72°C

Ciclo 26: 10 min 72°C

Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa 1.5% a 100V durante 30 min y se confirmó la presencia de las bandas de PM correspondiente a la construcción Rab 7-pcDNA por tinción con Bromuro de Etidio (EtBr) y exposición a la luz UV. Se corrió también un control del screening conteniendo el vector sin inserto (control negativo) (**Fig. 11**).

### **1.7 SECUENCIACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES PCDNA-RAB 7 (WT, S22N, Q67L Y N125I)**

Dado que la obtención de los fragmentos de Rab 7 se realizó por PCR y que existe la posibilidad de que la enzima Taq polimerasa pudiera incorporar nucleótidos incorrectos, se realizó la secuenciación de todas las construcciones a fin de verificar la secuencia correcta de todo el gen de Rab 7 así como ubicación de las mutaciones puntuales. La secuenciación se realizó por PCR en un ciclador Cetus 9600 en las siguientes condiciones:

A partir de DNA obtenido por minipreps según punto 1.1.1

H <sub>2</sub> O	13.2µl
Primers Rab 7 3' y 5' (3.2 pmol)	1.6 µl
DNA	1µg
FS Redi Mix	8 µl



FS Redi Mix: mezcla de reacción que contiene los 4 nucleótidos marcados con conjugados fluorescentes para secuenciación automática.

La reacción se desarrolló de acuerdo a los siguientes ciclos

Ciclo 1: 10 seg 96<sup>0</sup>C

Ciclo 2: 5 seg 50<sup>0</sup>C

Ciclo 3: 4 min 60<sup>0</sup>C

Se realizaron 30 ciclos 1,2 y 3, secuencialmente.

Una vez terminada la reacción, las muestras se precipitaron con etanol y se secuenciaron en un secuenciador automático provisto por un servicio propio de la Washington University.

## **2.TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO CON LA CONSTRUCCIÓN RAB 7- pcDNA 3.1**

### 2.1Midipreps

A partir de las colonias positivas de cada construcción (WT, S22N, Q67L, N125I en pcDNA3.1/Hygro) se obtuvieron cultivos de 24 hs. crecidos en LB-ampicilina. Se realizó una purificación de DNA plasmídico (midiprep) utilizando un kit comercial (Wizard Midiprep Kit (Qiagen Inc. USA)) el cual permite obtener un DNA de mejor calidad y cantidad para transfección. El DNA purificado se precipitó con etanol y se resuspendió en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

La cuantificación se realizó por espectrofotometría a 260nm (108).

### 2.2 Transfección de células CHO

La transfección de cultivos subconfluentes de esta línea celular se realizó utilizando lipofectina (reactivo que produce poros a nivel de la membrana plasmática de la célula permitiendo la incorporación del DNA foráneo).

Las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron durante 10-15 min. a temp. ambiente con el DNA de las 4 construcciones de Rab 7 en una solución de lipofectina (1 $\mu$ g/ml) en PBS. La viabilidad de las células fue verificada permanentemente por microscopía. Después de la incubación, la solución de DNA-lipofectina fue removida y las células se lavaron en medio D-MEM+10%SFB.

La selección de las transfectantes positivas se realizó creciendo las células en D-MEM+10%SFB comenzando con una concentración inicial de Hygromicina de 25 $\mu$ g/ml hasta llegar a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml después de 10 días de cultivo.

Las células se mantienen en este medio. La expresión de la proteína Rab 7 por parte de las líneas celulares se determinó por Western-blot utilizando un anticuerpo policlonal anti Rab 7.

### **DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RAB 7 EN CÉLULAS TRANSFECTADAS**

Para determinar la expresión de las proteínas Rab 7 en las células CHO transfectadas, se realizó un ensayo de Western blot partir de un gel de poliacrilamida-SDS 12% en donde se corrieron lisados de las diferentes mutantes, resuspendidos en buffer muestra (50 $\mu$ g proteína/pocillo).

Luego de la corrida, el gel se sumergió en solución de transferencia, se colocó sobre un papel Whatmann 3MM y sobre el gel una membrana de nitrocelulosa. Por encima de la membrana, se colocó otro papel Whatmann. Todo el conjunto se rodea de 2 esponjas y se coloca en el cassette de transferencia, el cual se coloca en la cuba de manera tal que la membrana mire hacia el polo positivo.. La cuba se llena con buffer de transferencia y se transfiere a 100 V durante 1h

### Buffer de transferencia

Tris-HCl	25mM
Glicina	200mM
Metanol	20%V/V

Luego de la transferencia, la membrana se tiñó con Rojo Ponceau (0.5g en 1 ml de ácido acético glacial y llevado a 100 ml con agua) para verificar la transferencia de las proteínas a la nitrocelulosa. Este colorante se lava fácilmente con agua. Posteriormente se lavó la membrana 2 veces en PBS durante 10 min con agitación a temperatura ambiente. La membrana se bloqueó en PBS-leche descremada 3% durante 1-2h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4<sup>0</sup>C. Luego la membrana se lavó una vez con PBS-Tween 20 0.1% durante 5-10min a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (suero policlonal de conejo anti Rab 7 nativa) se diluyó 1:500 en PBS-Tween 20 0.1%-leche descremada 1% y se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 2h. Se realizaron luego 3 lavados con PBS-Tween 20 0.1% durante 5-10min en las mismas condiciones, luego de lo cual se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (anti IgG de conejo hecho en cabra conjugado con fosfatasa alcalina) diluido 1:100 en PBS-Tween 20 0.1%-leche descremada 1% durante 2h a temperatura ambiente con agitación. Finalmente se lavó la

membrana en las mismas condiciones anteriores y se descartó el líquido dejando la membrana húmeda.

Para la detección de las bandas correspondientes a Rab 7 se utilizó el kit Immun Star Chemiluminescence Protein Detection System de Bio Rad, USA. La solución de sustrato (500 $\mu$ l de aumentador+10 ml de sustrato provistos por el kit) se colocó sobre la membrana y ésta se envolvió en un film transparente, incubándose por 5 min a temperatura ambiente. Luego de remover el exceso de líquido, la membrana se expuso durante 30 seg a 1 min a una placa de radiografía. La placa se reveló manualmente utilizando revelador y fijador Kodak (**Fig. 23**).

## **ESTUDIOS DE INVASION DEL *T. CRUZI* EN CELULAS CHO QUE SOBREENPRESAN RAB 7**

Para estudiar el efecto que tenía la sobreexpresión de Rab 7 wt y las mutantes positivas y negativas de esta proteína en la infección por *T. cruzi* se desarrollaron experimentos de infección en estas células transfectadas. Además para determinar la colocalización del parásito en diferentes organelas del transporte endocítico como endosomas tempranos o tardíos, se realizaron experimentos de infección en las células transfectadas, marcación de los parásitos intracelulares y de las proteínas Rab con anticuerpos fluorescentes y estudios posteriores de microscopía confocal.

### **Infección de células CHO transfectadas con *T. cruzi***

Los experimentos de infección se realizaron utilizando las células CHO transfectadas con Rab 7 wt, S22N y Q67L. Las células transfectadas con N125I no pudieron ser mantenidas en cultivo. Además se ensayaron células CHO transfectadas con Rab 5 wt, S34N (mutante negativa) y Q79L (mutante positiva) provistas por gentileza de Carmen Alvarez Domínguez, Washington University, St. Louis, USA). Las células, cultivadas 24hs antes en DMEM10%SFB (con adición de 50 µg/ml de Geneticina para las Rab 5 y 100 µg/ml de Hygromicina para las Rab 7) a 37<sup>0</sup>C y 5%CO<sub>2</sub> sobre laminillas de vidrio estériles en placas de plástico de 24 pocillos (4x10<sup>4</sup> células por pocillo) se infectaron con Trip-cult. en una relación parásito célula 10:1) (100). Los parásitos se dejaron en contacto con las células durante 1-2 hs a 37<sup>0</sup>C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego se retiró el sobrenadante conteniendo los parásitos no adheridos y se lavaron cuidadosamente las células con medio de cultivo. Luego de 24 hs de cultivo la infección se cuantificó exactamente como lo descrito para las otras líneas celulares.

### **INMUNOMARCACIÓN Y MICROSCOPIA CONFOCAL**

Estas técnicas se llevaron a cabo para células CHO transfectadas con Rab 5 y Rab 7 y también para células NIH 3T3 transfectadas con PKB. En todos los casos, las laminillas conteniendo las células infectadas según lo descrito anteriormente fueron lavadas con PBS y fijadas con p-formaldehído 1% durante 30 min a temperatura ambiente. Para permitir la marcación de las distintas organelas y de los parásitos intracelulares, las células se permeabilizaron con PBS-Tritón 0.1 % durante 10-20 min a temperatura ambiente.

#### **Inmunomarcación para Rab 5 y Rab 7**

Luego de 2 lavados con PBS, se bloqueó el preparado con PBS-suero normal de oveja 20% durante 10 min a temperatura ambiente con agitación. Luego de otros 2 lavados con PBS se bloqueó con PBS-suero normal de cabra 20% en las mismas condiciones anteriores, seguido por 2 lavados con PBS. Estos tratamientos se realizaron para evitar el pegado inespecífico de los conjugados

La marcación de las proteínas Rab 5 o Rab 7 se realizó con anticuerpos policlonales hechos en ratón en una dilución 1: 200 para Rab 5 y 1: 500 para Rab 7 cedidos por gentileza del Dr. A. Barbieri, Washington University, St. Louis, USA. Para la detección de los parásitos intracelulares se utilizó un suero policlonal anti *T.cruzi* hecho en conejo en una dilución 1:200 que fue cedido gentilmente por la Dra A.M Celentano, Dto. de Microbiología, Fac. de Medicina, UBA.

Las células se incubaron 2h con los anticuerpos anti Rab 5 o Rab 7 en agitación a temperatura ambiente y se lavaron posteriormente 2 veces con PBS-suero normal de cabra 20% durante 10 min.

Los parásitos intracelulares se marcaron con el suero anti *T. cruzi* durante 2h a temperatura ambiente con agitación y se lavaron posteriormente con PBS-suero normal de conejo 20%.

Los anticuerpos secundarios (anti IgG de ratón hecho en cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína para Rab 5 o 7 y anti IgG de conejo hecho en oveja conjugado con Texas red) se utilizaron en una dilución 1:1000 en PBS. Se incubó primero durante 30 min el conjugado anti ratón a temperatura ambiente con agitación y luego de 2 lavados con PBS, se incubó y se lavó el conjugado anti oveja en las mismas condiciones.

### **Inmunomarcación para PKB**

Luego de 2 lavados con PBS, se bloqueó el preparado con PBS-suero normal de cabra 20% durante 10 min a temperatura ambiente con agitación. La marcación de la proteína PKB se realizó con un anticuerpo monoclonal anti HA hecho en ratón en una dilución 1: 2000 cedido por gentileza del Dr. A. Barbieri, Washington University, St. Louis, USA. Para la detección de los parásitos intracelulares se utilizó el mismo suero que para las células transfectadas con Rab 5 y 7.

Los anticuerpos secundarios (anti IgG de ratón hecho en cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína y anti IgG de conejo hecho en oveja conjugado con Texas red) se utilizaron en una dilución 1:1000 en PBS. Se incubó primero durante 30 min el conjugado anti ratón a temperatura ambiente con agitación y luego de 2 lavados con PBS, se incubó y se lavó el conjugado anti conejo en las mismas condiciones.

Finalmente, las laminillas con las células CHO Rab 5 y 7 y NIH 3T3 PKB se montaron sobre portaobjetos utilizando PBS-50% glicerol y sellando los bordes con esmalte de uñas. La microscopía confocal se realizó en un

microscopio Bio-Rad MRC 1024 con un láser de Argón con banda de 488nm para fluoresceína y uno de Helio-Neon con una banda de 543nm para Texas Red y los preparados se observaron con un objetivo 63X. EL microscopio utilizado pertenece al Dpto. Biol. Cel. y Fisiol. de la Washington University, St. Louis, USA. Las imágenes fueron obtenidas como archivos Bio-Rad.pic y convertidas posteriormente a mapas de bits para ser visualizadas con el programa Photoshop 3.0 para Windows.



# RESULTADOS

## MODELO DE INTERACCIÓN *T. CRUZI*- MACRÓFAGO

La primer etapa del trabajo consistió en la puesta a punto del sistema de infección del parásito por el macrófago. Para ello se estudió dicha interacción utilizando cultivos primarios de células de ratón (macrófagos peritoneales murinos) y una línea celular también murina pero de origen tumoral (J774). Por otra parte se ensayaron las infecciones "in vitro" con dos formas de estadio infectivo del *Trypanosoma cruzi*: tripomastigotes circulantes provenientes de animales infectados y tripomastigotes metacíclicos de cultivo axénico.

### ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO DE MACRÓFAGOS PERITONEALES E INFECCIÓN DE LOS MISMOS CON TRIPOMASTIGOTES METACÍCLICOS Y SANGUÍNEOS

#### Obtención de MOp

El número de MOp obtenidos por ratón fue de  $1 \times 10^6$  MO/ml siendo el volumen final de la suspensión de 2ml. El porcentaje de MO por células totales fue de 16,6%. En cada laminilla se sembraron 600.000 células por lo tanto el número de MO por laminilla fue de 100.000.

#### Infección de los MOp

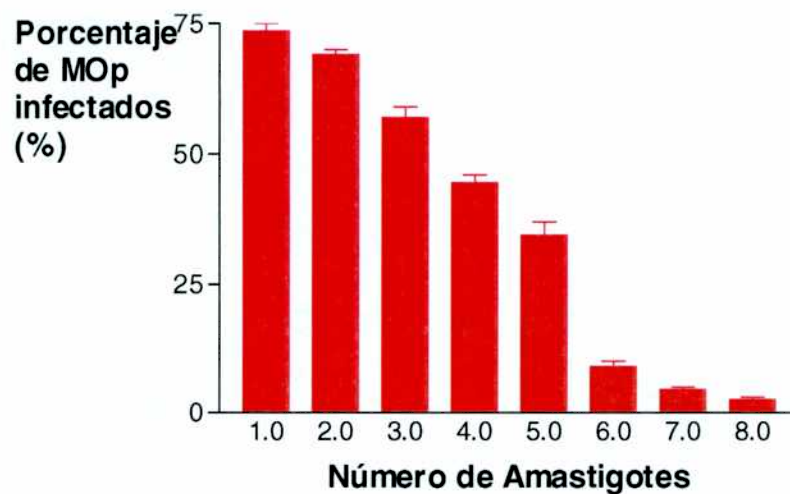
- a) Infección con tripomastigotes sanguíneos: el porcentaje de infección obtenido con tripomastigotes sanguíneos en relación 10:1 fue de

10,3±1.4% mientras que el número promedio de amastigotes/MOp fue de 1,0 ± 0,2%.

- b) Infección con tripomastigotes metacíclicos: el porcentaje de infección obtenido con tripomastigotes metacíclicos en relación 10:1 fue de 30,0±1.8% mientras que el número promedio de amastigotes/MO fue de 2,44 ± 0,5%.

La distribución de MO infectados con tripomastigotes metacíclicos según el número de amastigotes presentes en su interior se muestra en la **Fig. 8** y son el promedio de al menos 5 experimentos independientes

**Fig. 8.** Distribución del número de amastigotes por MOp infectado



Como se observa en la **Fig. 8** la mayor proporción de células está infectada con 1-3 Ama por célula. Proporciones similares fueron halladas cuando se utilizaron tripomastigotes circulantes pero al ser menor el número de células infectadas, disminuyeron proporcionalmente los porcentajes respectivos.

**INFECCIÓN DE MO J774 CON TRIPOMASTIGOTES METACICLICOS Y SANGUINEOS.**

Los MO J774 pudieron ser exitosamente infectados con ambos estadios parasitarios. Los resultados de infección de la línea J774 con Mtc y Trip-sang se muestran en la **Tabla 1** son el promedio de al menos 3 experimentos.

**Tabla 1 Infección de MO J774 con Mtc**

RELACION PARASITO-CELULA	% DE INFECCIÓN*
10:1	14.2±1.98
20:1	23.8±5.83

\*Porcentaje de macrófagos J774 infectados con Mtc a las 24 hs. pos infección. Los porcentajes corresponden al recuento de por lo menos 500 células por laminilla.

**Tabla 2 Infección de MO J774 con Trip-sang.**

RELACION PARASITO-CELULA	% DE INFECCIÓN*
10:1	5.26±0.68
20:1	8.74±0.41

\*Porcentaje de macrófagos J774 infectados con Trip-sang. a las 24 hs. pos infección. Los porcentajes corresponden al recuento de por lo menos 500 células por laminilla.

En cuanto la metodología para cuantificar la infección, la coloración utilizada (Giemsa) resultó efectiva para la observación al microscopio de las formas intracelulares en ambos tipos de células. Sin embargo los MO J774 resultaron ser más sensibles al colorante ya que el tiempo de tinción para los MOp fue óptimo luego de 15-20 min mientras que para los J774 fue de 4-5 min.

La dilución de Giemsa utilizada para ambos tipos de células fue 1:10 en PBS pH 7.4

En base a los resultados de que los tripomastigotes metacíclicos producían porcentajes de infección significativamente mayores en ambos tipos de macrófagos, se decidió proseguir los experimentos de infección posteriores con este estadio parasitario.

### **DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE INFECCIÓN EN MACROFAGOS PERITONEALES PRETRATADOS CON MODULADORES DE $Ca^{2+}$**

En la **Tabla 3** se observan los resultados del tratamiento de los MO peritoneales con distintos agonistas, antagonistas, quelantes e ionóforos de  $Ca^{2+}$ , previo a la infección. En ninguna de las concentraciones utilizadas los compuestos mostraron ser tóxicos para las células, según lo determinado por microscopía óptica y por tinción con Trypan blue. Por otra parte en todos los experimentos se realizaron controles utilizando la misma concentración de solvente que se empleó para disolver los compuestos (dimetilsulfóxido o etanol) sin que ninguno de ellos mostrara algún efecto tóxico sobre las células.

Los resultados de la **Tabla 3** muestran una inhibición significativa de la infección en los MOp tratados con los antagonistas y quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  Metoxiverapamil y BAPTA-AM respectivamente, mientras que el tratamiento de las células con el agonista de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  Bay K8644 tuvo un efecto estimulador de la infección.

**Tabla 3** Efecto de moduladores del  $\text{Ca}^{2+}$  en la infección de MOp por Mtc

TRATAMIENTO DE LOS MOp	% DE INFECCION*
----	35.5±9.36
Bay K8644 1 $\mu\text{M}$	63.0±7.25*
Metoxiverapamil 0.3 $\mu\text{M}$	29.6±10.3*
BAPTA-AM 5 $\mu\text{M}$	18.8±2.5*
Ionicina 10 $\mu\text{M}$	33.6±7.03

\* Porcentaje de macrófagos infectados con Mtc en relación 10:1 a las 48 hs pos infección. Los porcentajes corresponden al recuento de por lo menos 500 células por laminilla. \*Valores significativamente diferentes al control ( $p \leq 0.05$ )

#### DETERMINACIÓN DE LA $[\text{Ca}^{2+}]_i$ EN MACROFAGOS PERITONEALES INFECTADOS CON TRIPOMASTIGOTES METACICLICOS

En base a los resultados observados en cuanto a que el tratamiento de los MOp con los compuestos moduladores de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular producía un efecto inhibitorio o estimulador de la infección

según el caso, se decidió analizar si la infección de los MOp producía algún tipo de alteración en la  $[Ca^{2+}]_i$  de estas células que pudiera favorecer la invasión parasitaria.

En la **Tabla 4** se muestra la determinación por espectrofluorometría de la  $[Ca^{2+}]_i$  de MOp normales e infectados. Los datos representan el promedio de por lo menos 5 mediciones realizadas con monocapas celulares distintas.

**Tabla 4** Concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular de MOp infectados con *Trypanosoma cruzi*

MOp	$[Ca^{2+}]_i$
Normales	105±14 nM
Infectados*	200±19 nM

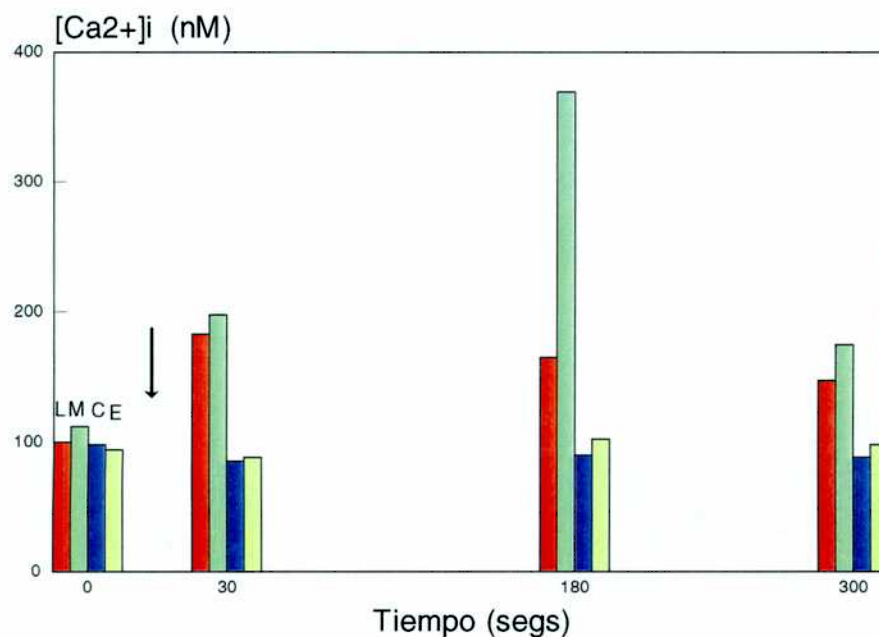
\*Los MOp fueron infectados con Mtc durante 2 hs. a 37°C con una relación parásito-MOp 10:1 y la determinación de la  $[Ca^{2+}]_i$  se realizó inmediatamente.

### DETERMINACIÓN DE $[Ca^{2+}]_i$ EN MACROFAGOS PERITONEALES TRATADOS CON FRACCIONES SUBCELULARES PARASITARIAS

Los resultados de aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en MOp producida por la infección por Mtc llevaron a pensar si este aumento se producía una vez que el parásito se encontraba internalizado (como sucede al cabo de las 2 hs. de infección) o si el incremento detectado se podía dar en una etapa más temprana del proceso de interacción parásito célula huésped como por ejemplo el contacto de membranas parasitarias con la membrana del MOp.

Para ello se llevaron a cabo experimentos utilizando fracciones subcelulares de los parásitos como: a) lisado completo, b) fracción de membranas y c) fracción citosólica. Se utilizaron tanto fracciones del estadio infectivo (Trip-sang.) como del no infectivo (Epi) para determinar si el efecto era también estadio-dependiente.

**Fig. 9** Concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular de MOp tratados con fracciones subcelulares parasitarias

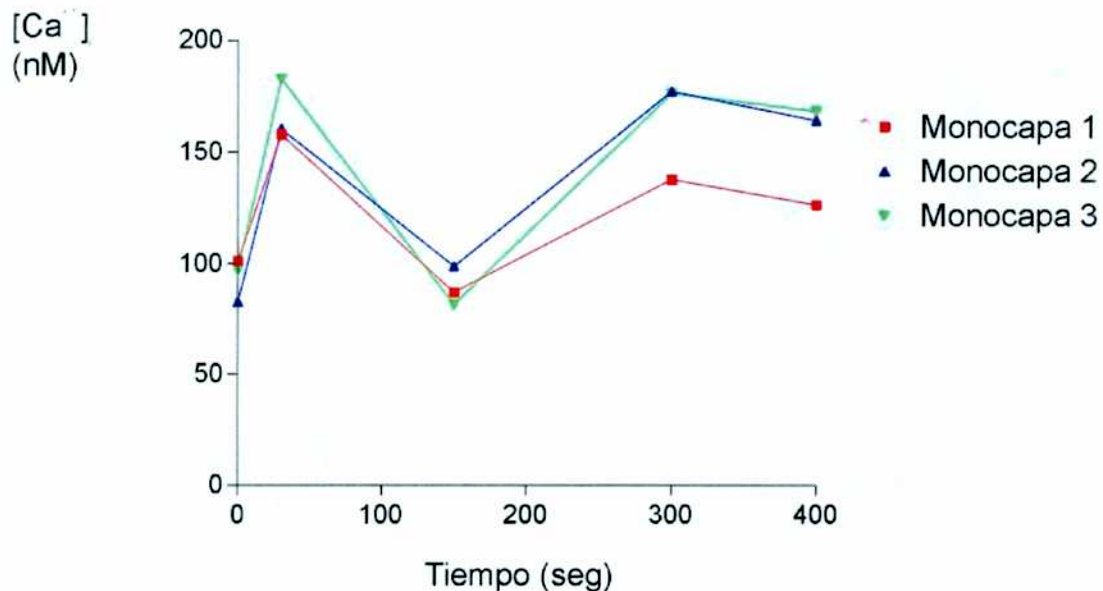




L:lisado de Trip-sang.; M: membrana de Trip-sang.; C: citosol de Trip-sang; E: membrana de Epi. La flecha indica la adición de cada fracción parasitaria a la monocapa de MOp

Los resultados de la medición de la  $[Ca^{2+}]_i$  en MOp luego de la adición del lisado de Trip-sang. se muestran en la **Fig. 9**. En ella se observa que el lisado parasitario provoca al cabo de 30 seg. un aumento del  $Ca^{2+}$  citosólico del MOp de casi 2 veces el valor basal. En cuanto a la fracción de membranas, ésta también induce en el mismo tiempo un aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  pero de mucha mayor magnitud. La fracción citosólica de los Trip-sang. fue incapaz de dar aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Por otra parte, la adición de las membranas de los Epi tampoco tuvo un efecto estimulador de la  $[Ca^{2+}]_i$  en ninguno de los tiempos ensayados.

**Fig. 10** Concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular de diferentes monocapas de MOp tratados con membranas de Trip-sang.



Cada curva representa la medición realizada con una monocapa celular diferente

En la **Fig. 10** se observan las curvas referentes a las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en los MOp luego de la adición de fracciones de membrana de Trip- sang. Las curvas reflejan variaciones cíclicas de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol de diferentes monocapas de MOp. La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  producida por las membranas de Trip-sang en las distintas monocapas no mostró diferencias significativas.

## EFFECTO DE INHIBIDORES DE LA PROTEÍNA KINASA C EN LA INFECCIÓN DE MACROFAGOS PERITONEALES POR TRIPOMASTIGOTES METACICLICOS

Además del  $\text{Ca}^{2+}$ , otras moléculas están involucradas en la transducción de señales en los procesos de invasión de células eucariotas por patógenos intracelulares, como son las proteínas kinasas. Una manera de estudiar la participación de estas proteínas en dicho proceso es mediante el uso de inhibidores específicos. En el caso de PKC los inhibidores utilizados fueron el H-7 ( $K_i=6\mu\text{M}$ ) y la Staurosporina (concentración inhibitoria del 50% de actividad ( $\text{IC}_{50}$ )=0.7nM).

**Tabla 5** Determinación de los niveles de infección en MOp pretratados con inhibidores de proteína kinasa C

TRATAMIENTO DE LOS MOp	% DE INFECCION*
----	25.5±9.36
H-7 20 $\mu\text{M}$	42.5±7.7 <sup>#</sup>
Staurosporina 50 nM	52.8±25.38 <sup>#</sup>

\* Porcentaje de MOp infectados con Mtc en relación 10:1 a las 24 hs pos infección. Los porcentajes corresponden al recuento de por lo menos 500 células por laminilla.

#Valores significativamente diferentes al control ( $p\leq 0.05$ )

En la **Tabla 5** se observan los resultados del tratamiento de los MOp con los distintos inhibidores, previo a la infección. Los resultados muestran un

aumento significativo de los porcentajes de infección en los MOp pretratados con H-7 y Staurosporina.

### EFFECTO DE COMPUESTOS MODULADORES DE PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS EN LA INFECCIÓN DE MACROFAGOS PERITONEALES POR TRIPOMASTIGOTES METACICLICOS

También en el caso de las proteínas G, se decidió utilizar compuestos que activen o inhiban a dichas proteínas heterotriméricas a fin de determinar su posible participación en el proceso de invasión de los tripomastigotes de *T.cruzi* en macrófagos.

**Tabla 6** Determinación de los niveles de infección en MOp pretratados con toxinas y moduladores de proteínas G heterotriméricas

TRATAMIENTO DE LOS MOp	% DE INFECCION
CONTROL	26.5±2.5%
MASTOPARAN 40µM	39.48±5.9% <sup>#</sup>
FLUORURO DE ALUMINIO 10 µM	6.89±0.84% <sup>#</sup>
PTx 1µg/ml	12.19±2.4% <sup>#</sup>
CTx 1µg/ml	25.7±3.8%
TrMP <sub>14</sub> 40 µM	19.34±1.63% <sup>#</sup>
TrMP <sub>14</sub> A <sub>2</sub> 40 µM	22.7±3.0%

\* Porcentaje de MOp infectados con Mtc en relación 10:1 a las 24 hs pos infección. Los porcentajes corresponden al recuento de por lo menos 500 células por laminilla.  
#Valores significativamente diferentes al control ( $p \leq 0.05$ )

En las concentraciones utilizadas ninguno de los compuestos utilizados resultó tóxico para las células. Dichas concentraciones fueron tomadas de bibliografía relacionada con el tema y de trabajos publicados. Los resultados de la **Tabla 6** son el promedio de 3 experimentos y muestran una inhibición significativa de los porcentajes de infección en los MOp tratados con AIF, PTx y TrMP<sub>14</sub> (éstas 2 últimas drogas son moduladoras de G<sub>αi</sub>). Por otra parte, el tratamiento con Mastoparán (activador de G<sub>αi</sub>) aumentó significativamente los niveles de infección.

Los resultados mostraron que la activación de G<sub>αi</sub> está directamente relacionada con el aumento de la invasión parasitaria, mientras que su inhibición produce una disminución significativa de la invasión.

**EFFECTO DE LAS TOXINAS COLÉRICA Y PERTUSSIS SOBRE LA  
CAPACIDAD INFECTIVA DE TRIPOMASTIGOTES METACICLICOS  
EN MACROFAGOS PERITONEALES**

**Tabla 7** Determinación de los niveles de infección en parásitos pretratados con toxinas moduladoras de proteínas G

TRATAMIENTO DE LOS MTC	% DE INFECCION *
----	28.1±1.89%
PTx (1µg/ml)	20.2±3.1% <sup>#</sup>
CTx (1µg/ml)	22.8±1.6% <sup>#</sup>

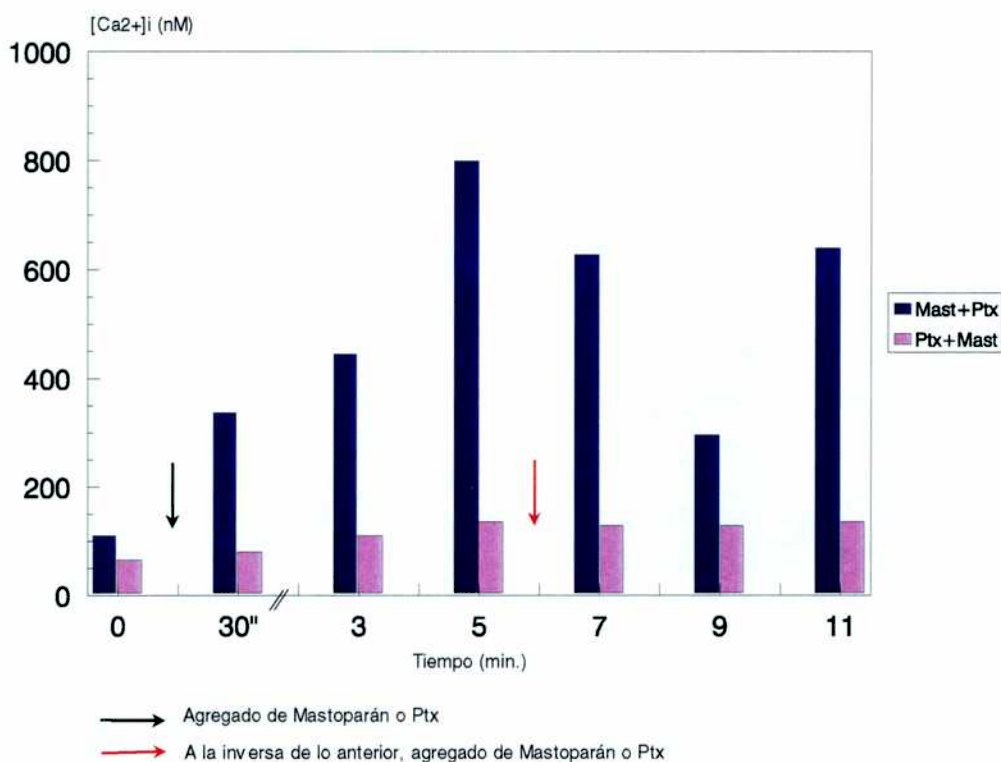
\* Porcentaje de MOp infectados con Trip-sang. en relación 10:1 a las 24 hs pos infección. Los porcentajes corresponden al recuento de por lo menos 500 células por laminilla.

<sup>#</sup>Valores significativamente diferentes al control ( $p \leq 0.05$ )

En la **Tabla 7** se observan los resultados del tratamiento de los Mtc con las PTx y CTx. Los resultados muestran inhibiciones significativas en los niveles de infección de los parásitos tratados con ambas toxinas, aunque el efecto inhibitorio se acentúa con la PTx.

## EFFECTO DEL MASTOPARÁN Y LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE LA $[Ca^{2+}]_i$ DE MACROFAGOS PERITONEALES

**Fig. 11** Determinación de la  $[Ca^{2+}]_i$  en macrófagos peritoneales tratados con moduladores de proteínas G



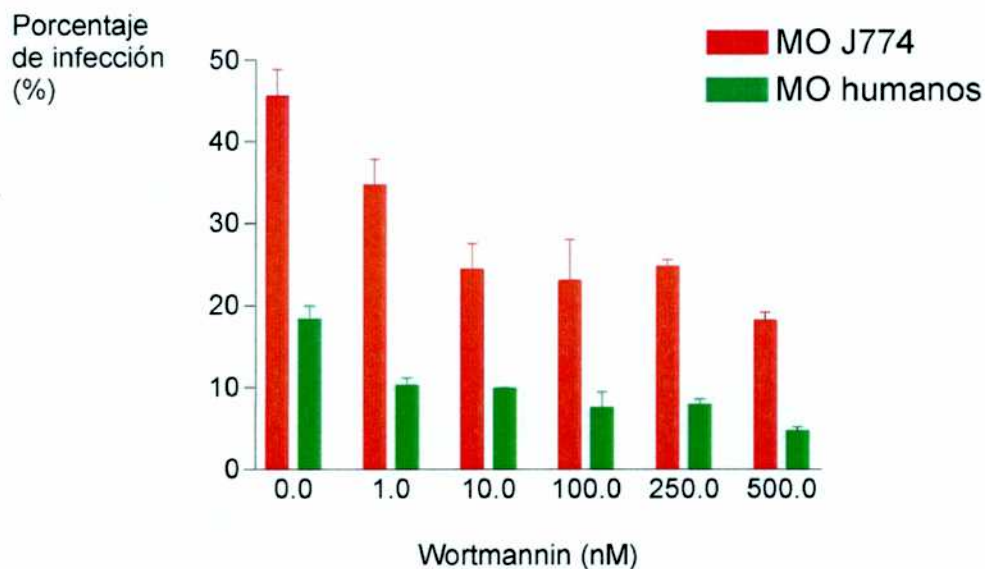
En la **Fig. 11** se muestran los resultados del tratamiento de los MOp con Mastoparán y PTx en la  $[Ca^{2+}]_i$  de dichas células. El Mastoparán induce un aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  de 4 veces el valor basal (**Fig. 11**: 30" y 3 min.). La adición de la PTx provocó un descenso en los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$ , que se recupera a los 11 min sin llegar al valor basal (**Fig. 11**: 7, 9 y 11 min). Por otra parte la PTx impide el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , aún luego del agregado de Mastoparán a los 5 min.

## DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE INFECCIÓN EN CÉLULAS DE MAMÍFERO PRETRATADAS CON INHIBIDORES DE PI3 KINASA

Para estudiar la participación de la PI3 kinasa en el proceso de invasión parasitaria se utilizaron inhibidores específicos de esta enzima como el Wortmannin y el LY 294002 para el tratamiento de las células previo a la infección.

Se evaluó el efecto inhibitor del Wortmannin y el LY294002 tanto en células fagocíticas (MO J774 y MOh) como no fagocíticas (Vero, L6E9 y NIH3T3). Los resultados son el promedio de por lo menos 3 experimentos y se muestran en las **Figs. 12,13,14 y 15**.

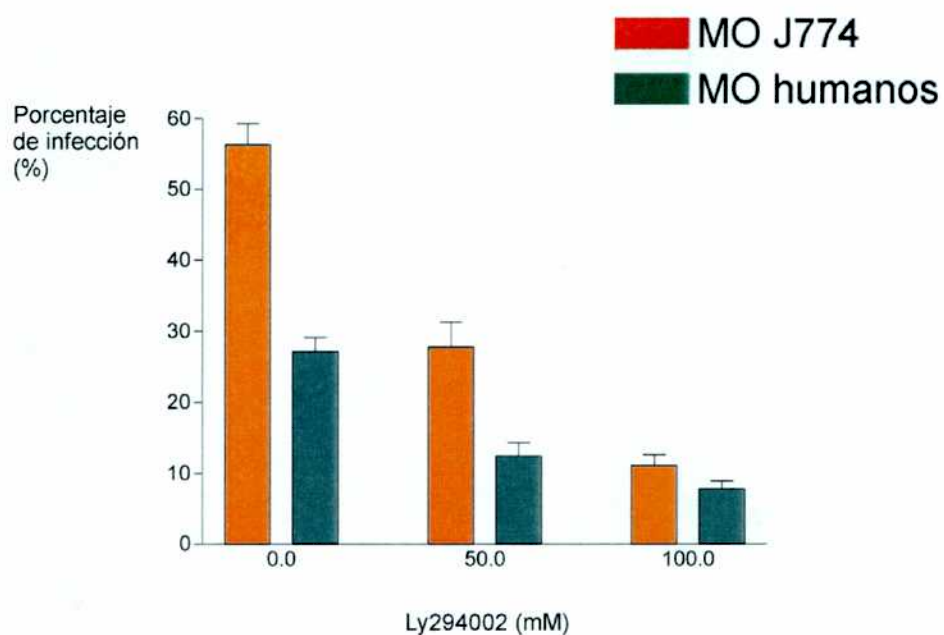
**Fig. 12** Efecto del Wortmannin en la invasión de *T.cruzi* en células macrofágicas





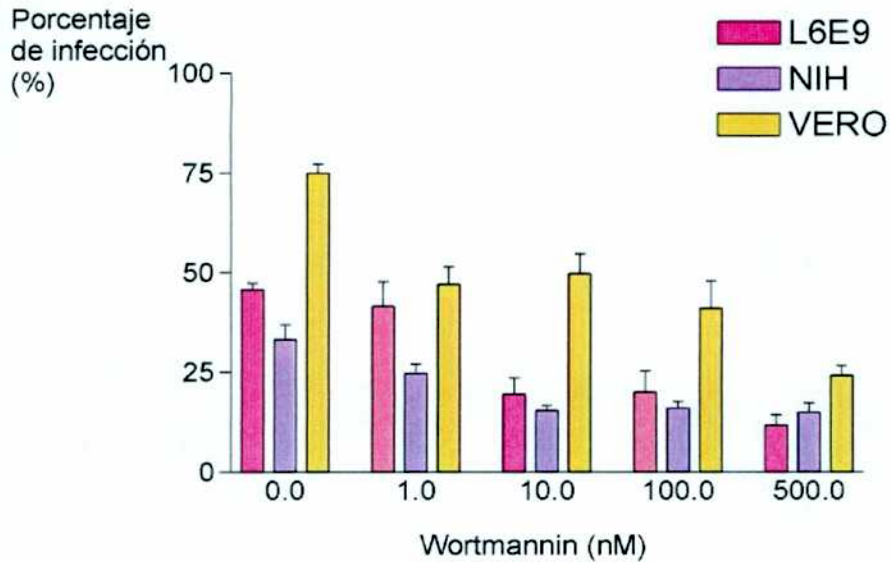
En los MOh así como los MO J774 tratados con Wortmannin se observó una inhibición dosis dependiente de la invasión alcanzándose máximos de inhibición de 28% y 40% respectivamente.

**Fig. 13 Efecto del Ly294002 en la invasión de *T.cruzi* en células macrofágicas**

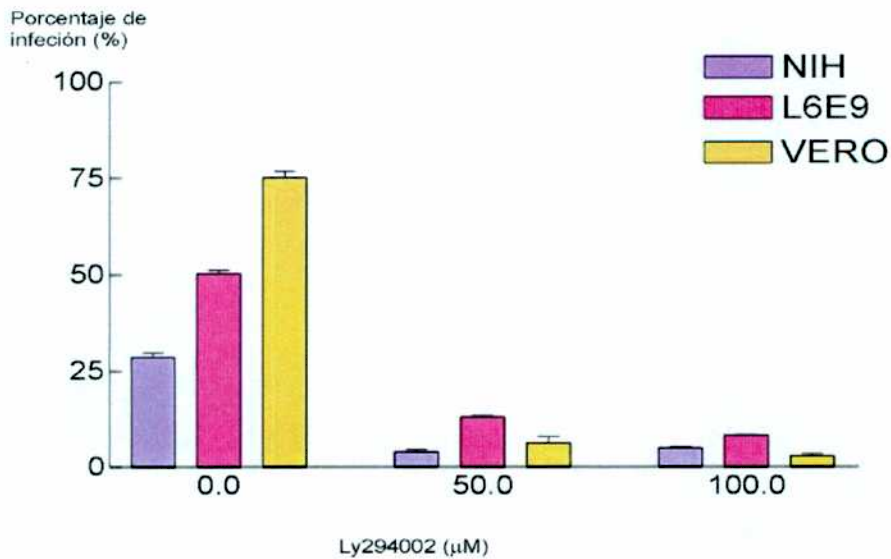


Al igual que en el caso de los macrófagos tratados con Wortmannin, se observó una inhibición significativa ( $p < 0.05$ ) de la invasión en forma dosis dependiente en ambos tipos de células, siendo en los dos casos más sensibles los MO J774

**Fig. 14** Efecto del Wortmannin en la invasión de *T.cruzi* en células no macrofágicas



**Fig. 15** Efecto del LY294002 en la invasión de *T.cruzi* en células no macrofágicas



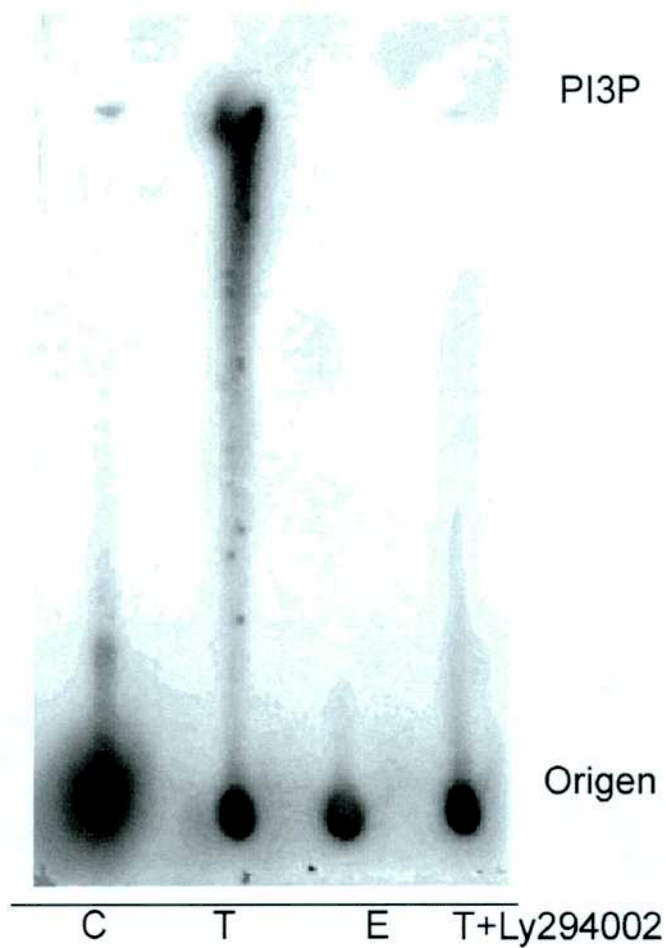
En las tres líneas no fagocíticas ensayadas, el efecto inhibitorio del LY294002 fue casi total con la dosis 50μM. Ambos inhibidores, a pesar de

que actúan por diferentes mecanismos, son muy eficaces ya que inhiben entre el 60 y el 90% de la invasión parasitaria en las tres líneas celulares ensayadas en forma significativa ( $p < 0.05$ ).

En las concentraciones utilizadas ninguno de los compuestos mencionados resultó tóxico para las células de acuerdo a los ensayos previos de curvas de concentración y toxicidad del solvente. Por otra parte, las concentraciones ensayadas fueron tomadas de bibliografía relacionada con el tema.

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PI3 KINASA EN CÉLULAS ESTIMULADAS CON MEMBRANAS PARASITARIAS**

**Fig. 16** Actividad PI3 kinasa en células Vero tratadas con membranas parasitarias



C: Células Vero sin estimular (control)

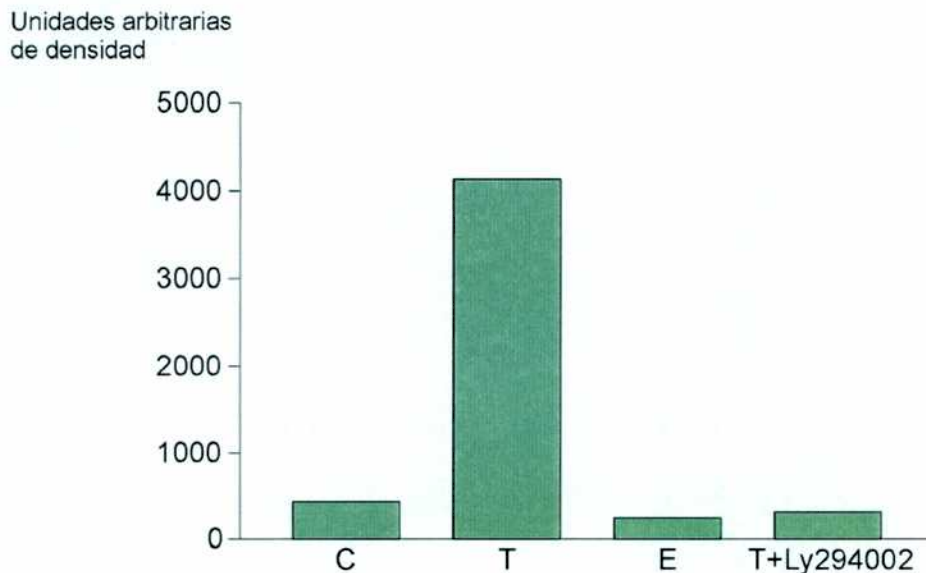
T: Células Vero estimuladas con membranas de Trip-cult.

E: Células Vero estimuladas con membranas de Epi

T+Ly294002: Células Vero incubadas por 30 min con 50 $\mu$ M de Ly294002 y luego estimuladas con membranas de Trip-cult.

Los resultados de los experimentos de estimulación de células Vero con membranas purificadas de tripomastigotes se muestran en la **Fig. 16**. Los resultados obtenidos demuestran una importante activación enzimática en las células tratadas con membranas parasitarias en comparación con los controles sin tratar (**Fig. 16 calles T vs C**). Por el contrario, en las células pretratadas con Ly 294002 50 $\mu$ M y luego estimuladas con membranas parasitarias, el efecto activador de las mismas se observa anulado (**Fig. 16 calles T vs. T+Ly294002**)

**Fig. 17** Determinación densitométrica de la actividad PI3 kinasa en células tratadas con membranas parasitarias



En el siguiente gráfico se muestra la cuantificación densitométrica de las manchas correspondientes PI<sub>3</sub>P (producto de la fosforilación del PI por la enzima) de la autorradiografía de la **Fig. 16**. El programa NIH Image transforma los picos de densidad en valores numéricos que corresponden a la integración del área bajo la curva.

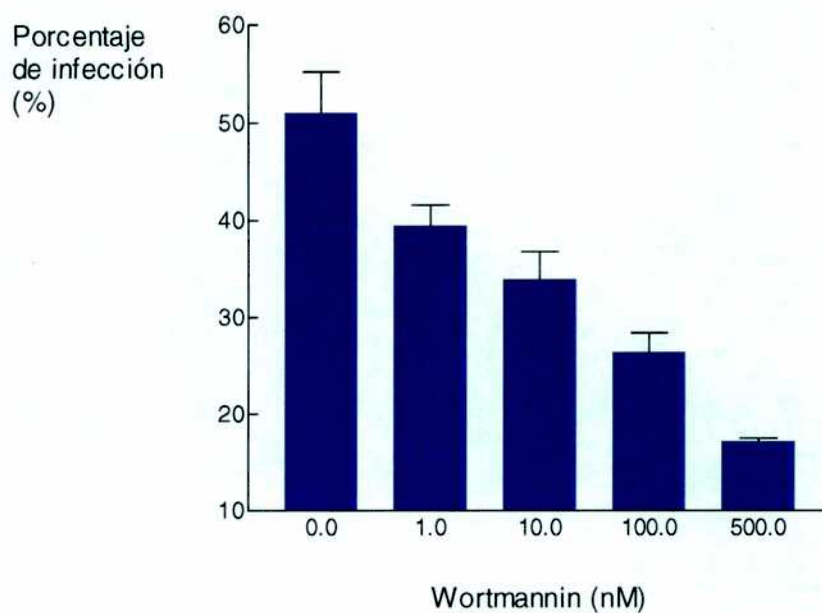
La determinación densitométrica muestra un aumento de la actividad PI3K de las células estimuladas con membranas de Trip-cult. de aproximadamente 8 veces con respecto a los controles sin estimular. En las células estimuladas con membranas de Epi o tratadas con el inhibidor y luego estimuladas con membranas de Trip-cult. la actividad enzimática no difiere del control, es decir no se observa activación enzimática.



### DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE INFECCIÓN EN TRIPOMASTIGOTES DE CULTIVO PRETRATADOS CON INHIBIDORES DE PI3 KINASA

En base a los resultados de inhibición de la invasión en células pretratadas con inhibidores de PI3K, se decidió evaluar si la propia enzima parasitaria podría estar también involucrada. Para ello se realizaron experimentos de invasión en células Vero infectadas con tripomastigotes de cultivo tratados con diferentes concentraciones de Wortmannin.

**Fig. 18** Determinación de los niveles de infección en parásitos pretratados con Wortmannin

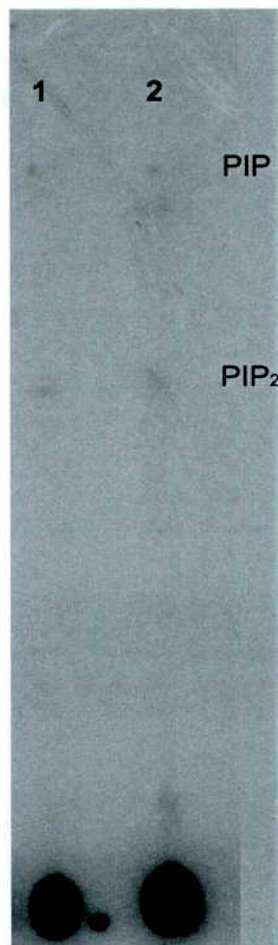


Los resultados mostraron una inhibición significativa de los porcentajes de infección en todas las concentraciones ensayadas. El efecto además fue dosis dependiente (**Fig. 18**).

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PI3K DEL ESTADÍO  
TRIPOMASTIGOTE**

Para confirmar que el efecto de los inhibidores se debía a su acción sobre la PI3K parasitaria y ya que esta enzima no se halla descrita aún en *Trypanosoma cruzi*, se ensayó la actividad enzimática basal de tripomastigotes de cultivo.

**Fig. 19** Determinación de actividad PI3K en tripomastigotes de *T. cruzi*



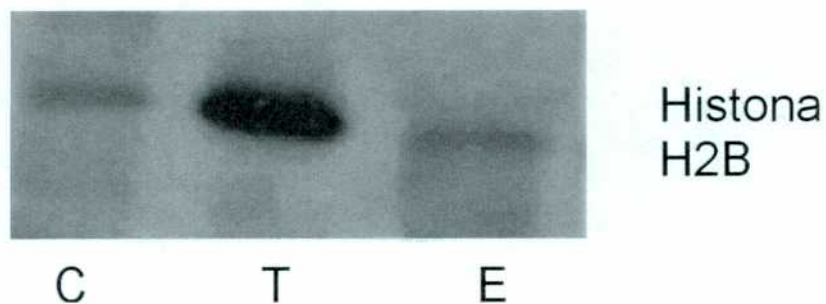
Las calles 1 y 2 representan duplicados de la misma muestra



Los resultados mostraron (**Fig. 19**) que efectivamente existe actividad de PI3K en lisados totales de tripomastigotes y que dicha enzima inmunoprecipita con el anticuerpo anti subunidad p85 de la enzima de mamíferos.

**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PKB EN CELULAS ESTIMULADAS CON FRACCIONES SUBCELULARES PARASITARIAS**

**Fig. 20** Gel de actividad PKB en células Vero estimuladas con membranas de Trip-cult. y Epi



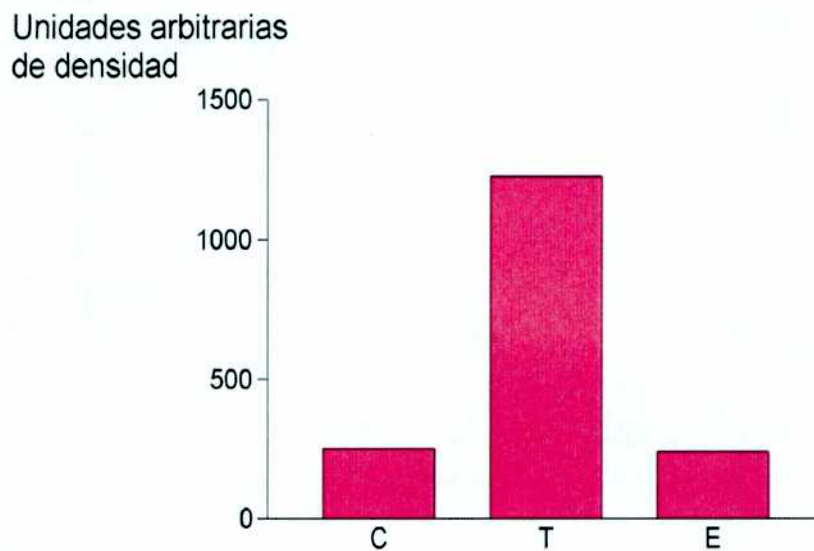
C: Células Vero sin estimulas (Control)

T: Células Vero estimuladas con membranas de Trip-cult.

E: Células Vero estimuladas con membranas de Epi

Como se observa en la **Fig. 20**, en las células estimuladas con membranas de tripomastigotes se produce una importante estimulación de la fosforilación de la Histona H2B utilizada como sustrato de la PKB.

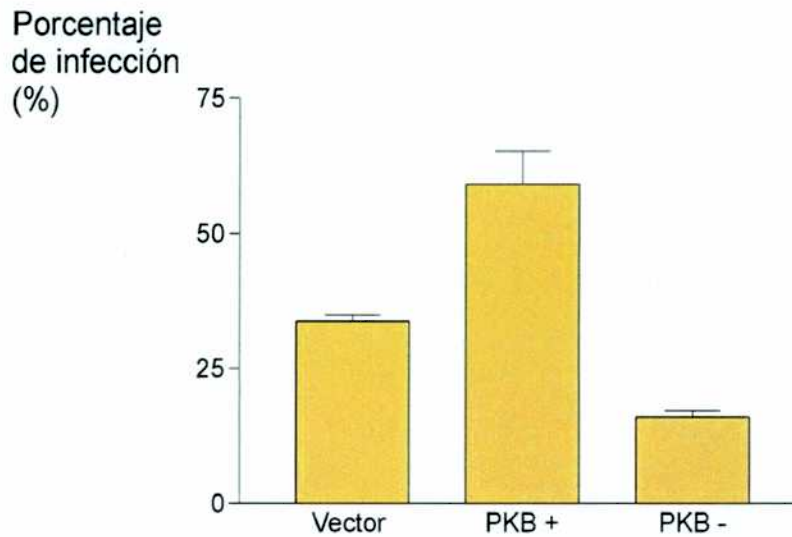
**Fig. 21** Determinación densitométrica del gel de actividad PKB en células tratadas con membranas parasitarias



En el siguiente gráfico se muestra la cuantificación densitométrica de las manchas correspondientes a la Histona H2B fosforilada de la autorradiografía de la **Fig. 20**. El programa NIH Image transforma los picos de densidad a valores numéricos que corresponden a la integración del área bajo la curva. Como se observa en el gráfico se obtuvo una activación enzimática de aproximadamente 5 veces en relación al control (**calle C vs. T**) cuando las células Vero fueron tratadas con las membranas de Trip-cult.. En cambio el tratamiento con membranas de Epi, no produjo modificaciones con respecto al control (**calle E vs. C**)

## INVASION EN CELULAS NIH 3T3 QUE SOBREENPRESAN PKB

**Fig. 22.** Determinación de los porcentajes de infección en células NIH 3T3 que sobreexpresan mutantes positivas y negativas de PKB



Vector: células NIH3T3 transfectadas con el vector pcDNA3 vacío (control)

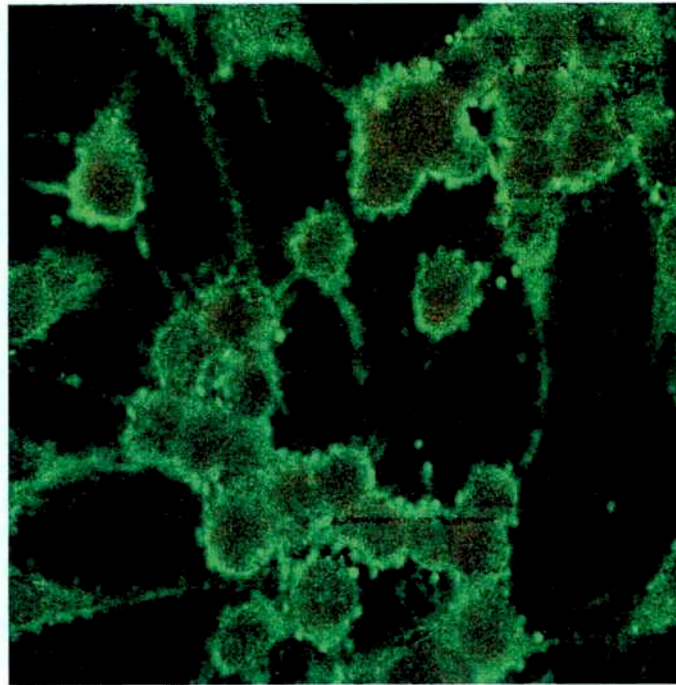
PKB+: células NIH 3T3 que sobreexpresan una forma activa de la PKB

PKB-: células NIH 3T3 que sobreexpresan una forma inactiva de la PKB

Los resultados de la **Fig. 22** muestran que en las mutantes activas se produce un aumento significativo de los porcentajes de infección en comparación con el control. Por el contrario, la invasión se inhibe significativamente cuando se infectan las células PKB-.

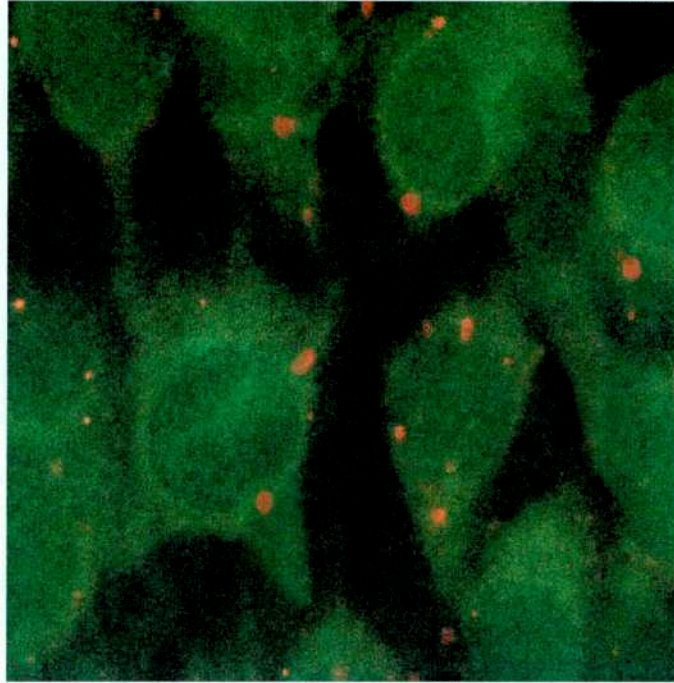
ANALISIS POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA INVASION DE  
TRIPOMASTIGOTES DE CULTIVO EN CELULAS NIH3T3 QUE  
SOBREEXPRESAN MUTANTES DE PKB

Fig. 23 Microscopía confocal de células NIH3T3 PKB- infectadas con  
Trip-cult.





**Fig. 24** Microscopía confocal de células NIH3T3 PKB+ infectadas con Trip-cult.



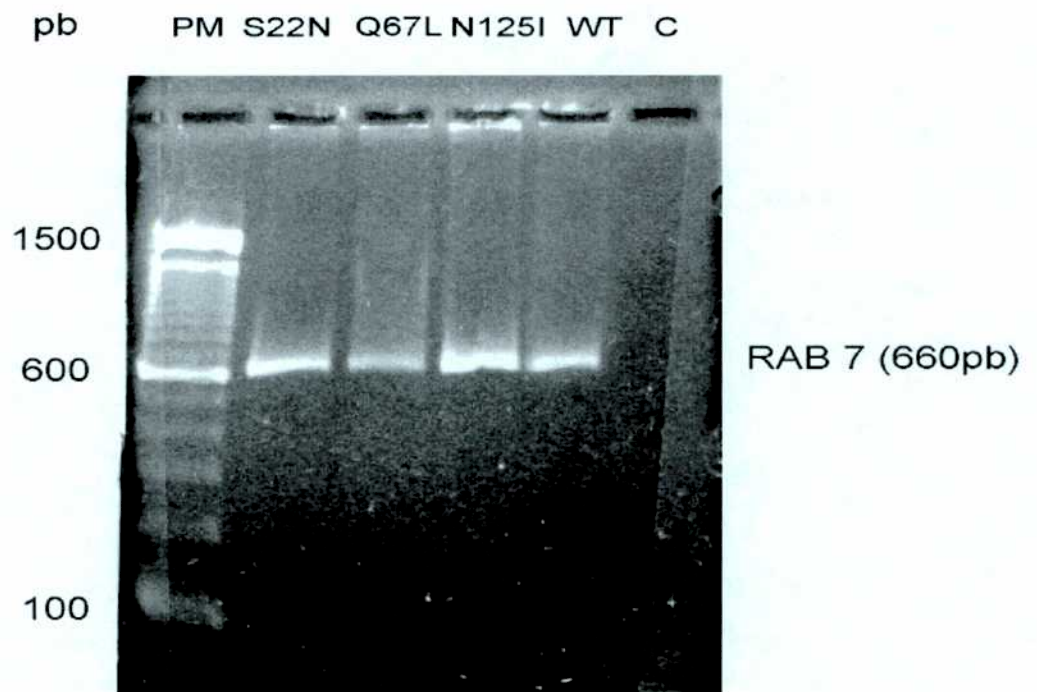
Como se observa en las **Figs. 23 y 24** en las células PKB-, no se observan amastigotes intracelulares, mientras que en las PKB+, se detectan los amastigotes como puntos rojos, ya que han sido marcados indirectamente con un anticuerpo conjugado con Texas Red.

Los campos que se muestran en las fotos son representativos del total de células observadas (al menos 100).

**OBTENCION DE LINEAS CELULARES QUE SOBREENPRESAN LA PROTEINA RAB 7**

Obtención de los fragmentos Rab 7 wt, S22N, N125I y Q67L por PCR

**Fig. 25** Electroforesis en gel de agarosa de los productos por PCR correspondientes a los fragmentos de las distintas formas de Rab 7.



PM: marcadores de peso molecular

S22N: mutante negativa

Q67L: mutante positiva

N125I: mutante doble negativa

WT: enzima sin mutar

C: Control sin DNA

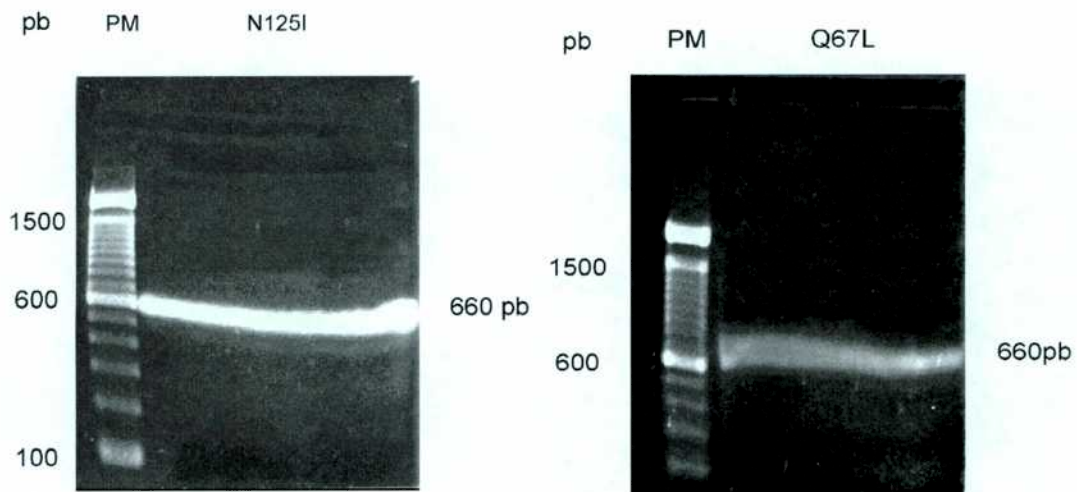
Pb: pares de bases

En la siguiente figura se observa la electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos obtenidos por PCR a partir de los vectores pGEX conteniendo

las distintas formas de la GTPasa Rab 7. En todos los casos se obtuvo una banda única de peso molecular correspondiente al tamaño del fragmento Rab 7 (660 pares de bases (pb)).

**PURIFICACIÓN DE LOS DE LOS FRAGMENTOS N125I Y Q67L  
OBTENIDOS POR PCR**

**Fig. 26** Electroforesis en gel de agarosa de los productos por PCR correspondientes a los fragmentos de Rab7 N125I y Q67L



PM: Marcadores de PM

Pb: pares de bases

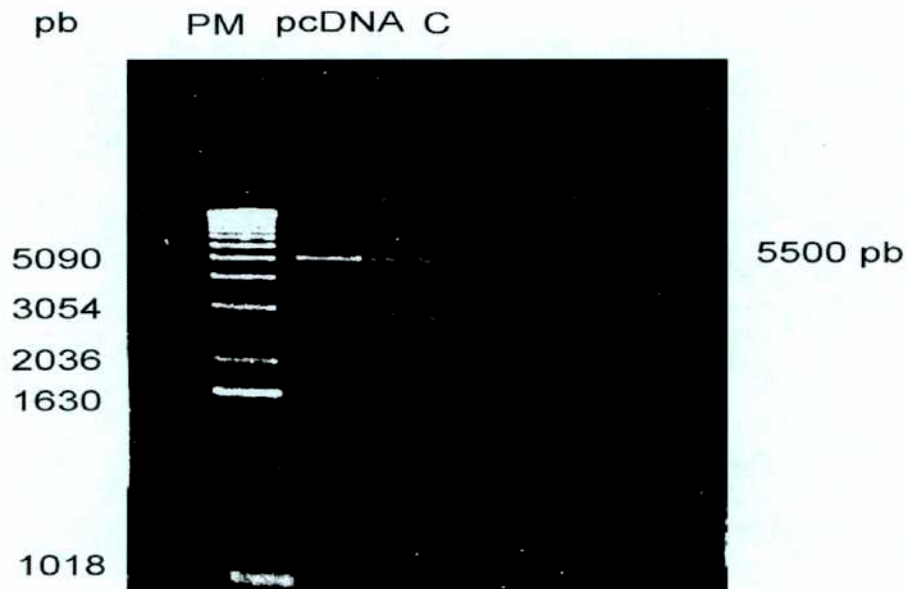
En la **Fig. 26** se observa la corrida electroforética en gel de agarosa 1.5% del volumen total de la muestra de las mutantes N125I y Q67L sembrado en un solo pocillo, con el fin de recortar la banda correspondiente a 660pb para



su posterior purificación. Se realizó el mismo procedimiento con las otras 2 mutantes obteniéndose resultados similares.

### OBTENCIÓN DEL VECTOR pcDNA 3.1/HYGRO LINEALIZADO

**Fig. 27** Electroforesis en gel de agarosa del vector pcDNA 3.1/Hygro linealizado



Pb: pares de bases

PM: marcadores de peso molecular

C: control sin DNA

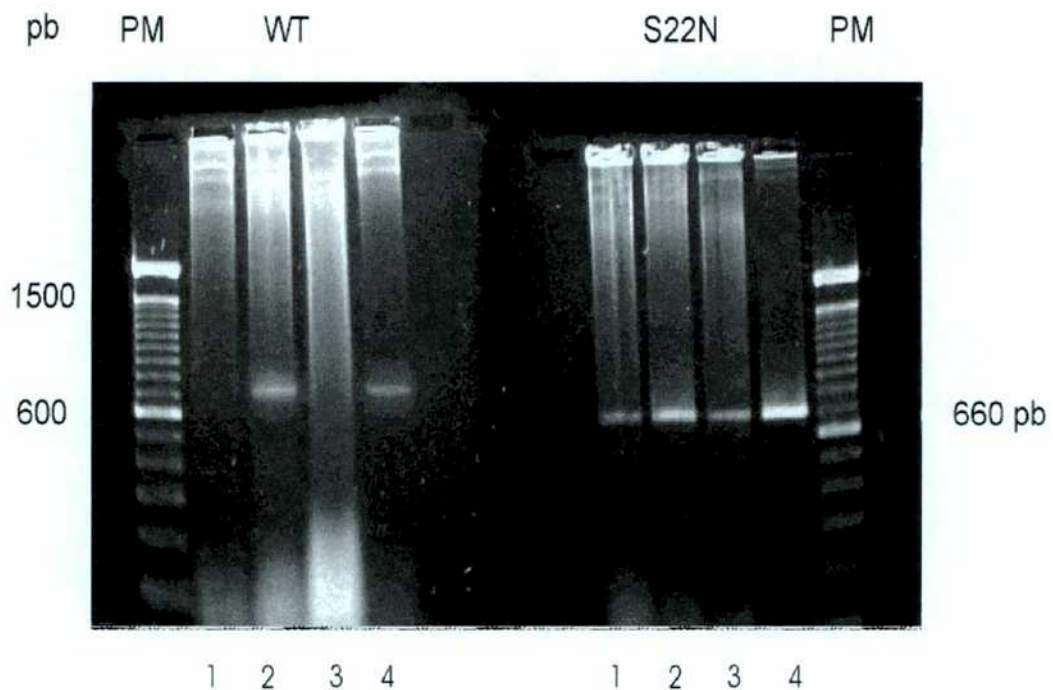
En la **Fig. 27** se observa el gel de agarosa 0.8% correspondiente al vector pcDNA 3.1 luego de su digestión con las enzimas de restricción Hind III y Xba I. La presencia de una sola banda de PM aproximado de 5.5 Kpb indica



que la digestión se realizó completamente y que el vector se halla totalmente linealizado y listo para su ligado con los distintos fragmentos de Rab 7.

**SCREENING DE LAS COLONIAS OBTENIDAS POR TRANSFORMACIÓN CON LA CONSTRUCCIÓN RAB 7-PCDNA 3.1/HYGRO**

**Fig. 28** Electroforesis en gel de agarosa de los productos del screening por PCR de transformantes Rab 7 WT y S22N



PM: marcadores de peso molecular

Pb: pares de bases

En la **Fig. 28** se observan los geles de agarosa 1.5% del DNA correspondiente al screening por PCR de las colonias crecidas luego de la

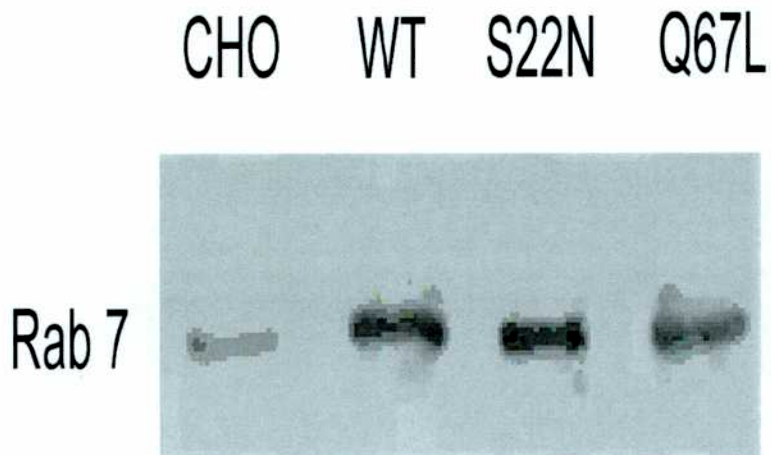
transformación con Rab 7 WT y S22N. Cada calle representa una colonia elegida al azar. La presencia de bandas de PM algo mayor que el correspondiente a Rab 7 se debe a que el fragmento amplificado contiene Rab 7 más un fragmento del vector pcDNA3.1/Hygro. La positividad de las bandas de cada calle indica que la colonia correspondiente contiene efectivamente el inserto y en la orientación correcta (**calles 2 y 4 en WT y 1,2,3 y 4 en S22N**). Como se nota en los geles el proceso de transformación bacteriana resultó sumamente eficiente ya que alrededor de un 50% de las colonias para la WT y un 100% para la mutante S22N resultaron positivas. Resultados similares se obtuvieron en el screening de las mutantes N125I y Q67L.

### PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS

A partir de las colonias transformadas positivamente y una vez obtenidos los datos de secuenciación de las diferentes mutantes de Rab 7, se procedió a la transfección de células CHO utilizando lipofectina según lo descrito en Materiales y Métodos. Salvo en el caso de las células transfectadas con la mutante N125I, que no pudo ser mantenida en cultivo, las otras 3 líneas transfectadas se amplificaron hasta obtener un número de células que permitiera su uso en los experimentos de infección.

## DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RAB 7 EN CÉLULAS CHO TRANSFECTADAS

**Fig.29** Western-blot de lisados de células CHO transfectadas con las distintas formas de Rab 7

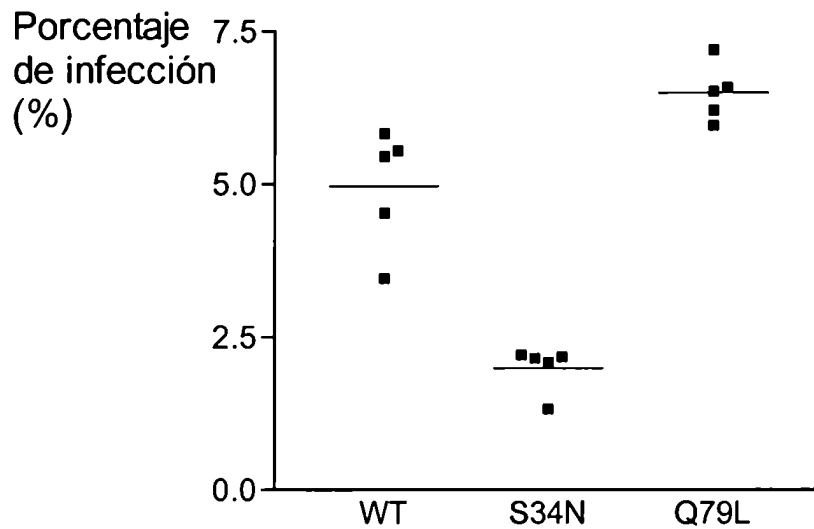


CHO: células CHO normales sin transfectar (control)

Como se observa en la **Fig. 29**, se pudo detectar la expresión de las 3 mutantes de Rab 7 en las células CHO transfectadas. Además se observa una importante sobreexpresión en las células transfectadas con respecto al control sin transfectar (**calles WT, S22N y Q67L vs. CHO**).

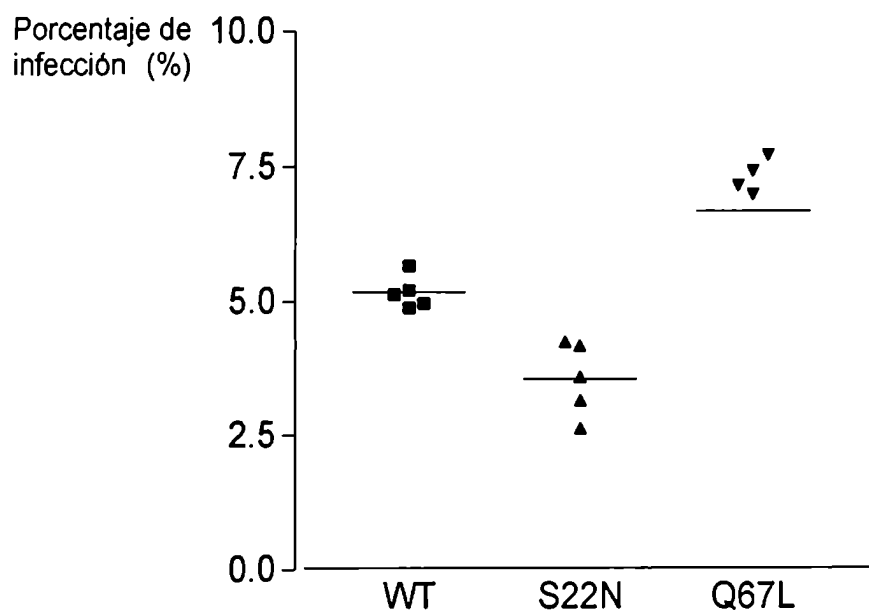
## PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RAB 5 Y 7 EN LA INVASIÓN DEL *T. CRUZI*

**Fig. 30** Efecto de mutantes de Rab 5 transfectadas en células CHO en la invasión por *T. cruzi*



WT: proteína Rab 5 wild type; S34N mutante negativa de Rab 5; Q79L mutante positiva de Rab 5. Cada punto representa la cuantificación de una laminilla de células y la línea horizontal representa el promedio de todas las determinaciones.

**Fig. 31 Efecto de mutantes de Rab 7 transfectadas en células CHO en la invasión por *T. cruzi***

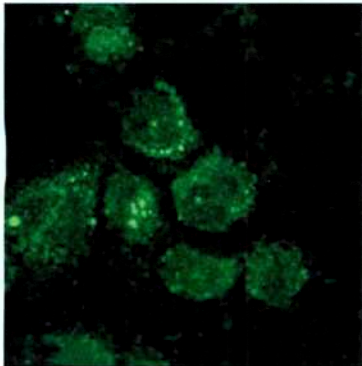


WT: proteína Rab 7 wild type; S22N mutante negativa de Rab 7; Q67L mutante positiva de Rab 7. Cada punto representa la cuantificación de una laminilla de células y la línea horizontal representa el promedio de todas las determinaciones.

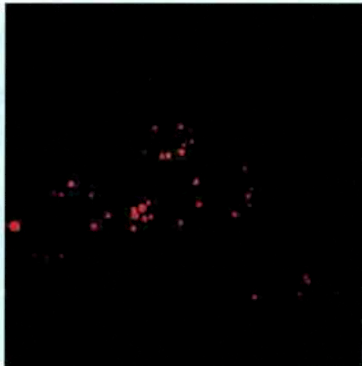
En las **Figs. 30 y 31** se muestran los resultados de los experimentos de infección en células CHO transfectadas con Rab 5 (gentileza de Carmen Alvarez-Dominguez, Washington University, St. Louis, USA) y con Rab 7. En ambos tipos de células transfectadas se determinó un aumento significativo en los porcentajes de infección en las mutantes positivas (Q79L en Rab 5 y Q67L en Rab 7) con respecto a las células transfectadas con la forma nativa (WT para ambas proteínas). Por el contrario, las mutantes negativas (S34N en Rab 5 y S22N en Rab 7) son infectadas en menor porcentaje con respecto a las WT y a las mutantes positivas. Los resultados son el promedio de al menos 3 experimentos.

**Fig. 32.** Microscopía confocal de células CHO Rab 5 WT infectadas con Trip-cult.

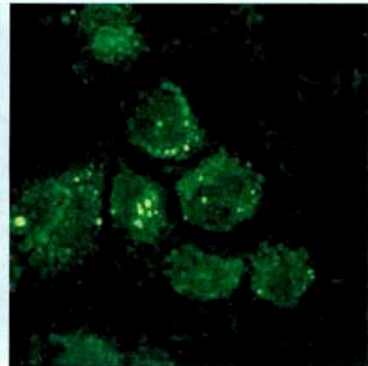
Anti Rab 5



Anti *T. cruzi*



Colocalización

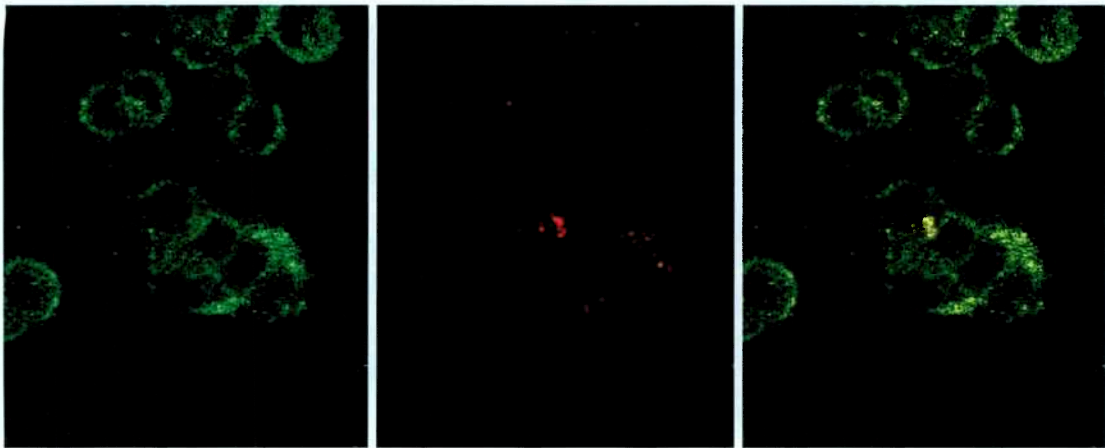


**Fig. 33** Microscopía confocal de células CHO Rab 5 S34N infectadas con Trip-cult.

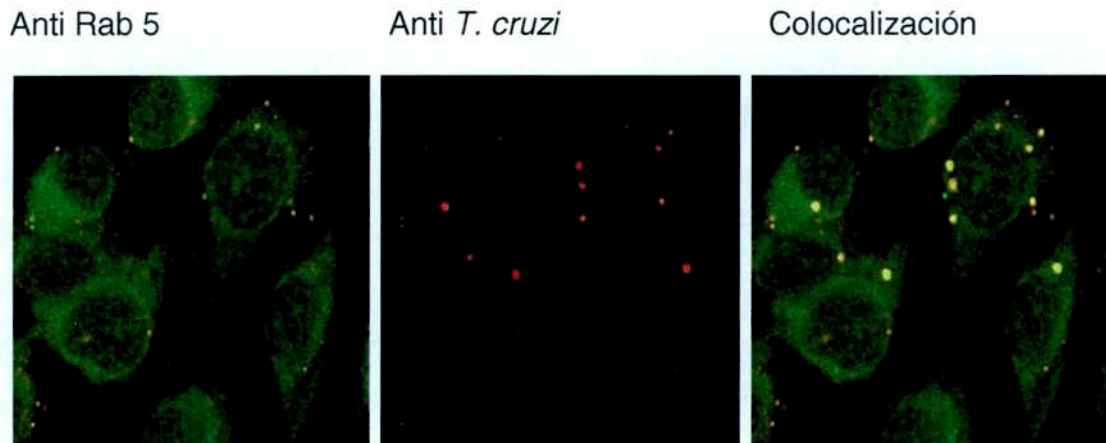
Anti Rab 5

Anti *T. cruzi*

Colocalización



**Fig. 34** Microscopía confocal de células CHO Rab 5 Q79L infectadas con Trip-cult.

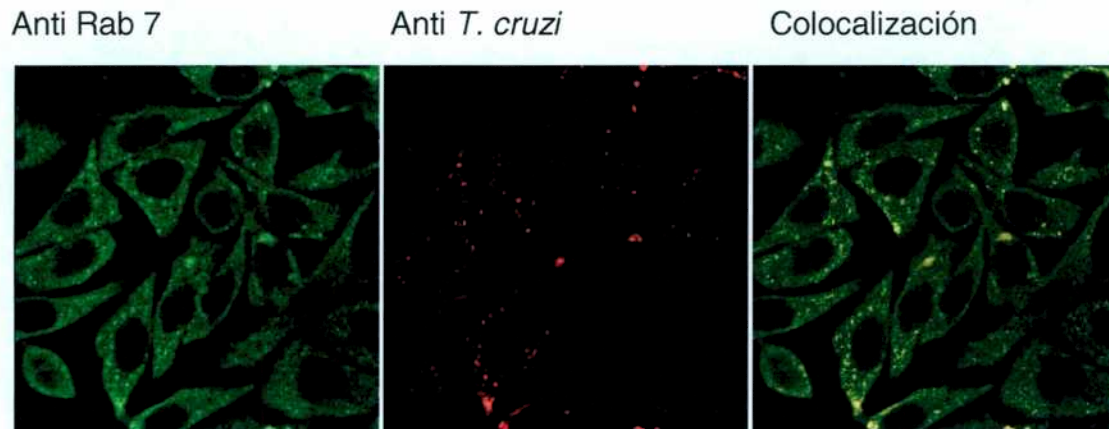


En las fotografías de las **Figs. 32-34**, se observa la marcación de los endosomas tempranos (organelas Rab 5 positivas) como puntos verdes y la marcación de los parásitos intracelulares (Ama) como puntos rojos, ya que los anticuerpos secundarios utilizados para Rab 5 y *T. cruzi* estaban conjugados con fluoresceína y Texas Red respectivamente. En todos los casos se pudo observar una colocalización de endosomas tempranos con parásitos intracelulares indicando la presencia de los mismos en estas organelas.

También se puede observar una infección creciente en magnitud entre las células Rab 5 S34N (**Fig.33**), Rab 5 WT (**Fig. 32**) y Rab 5 Q79L (**Fig. 34**).

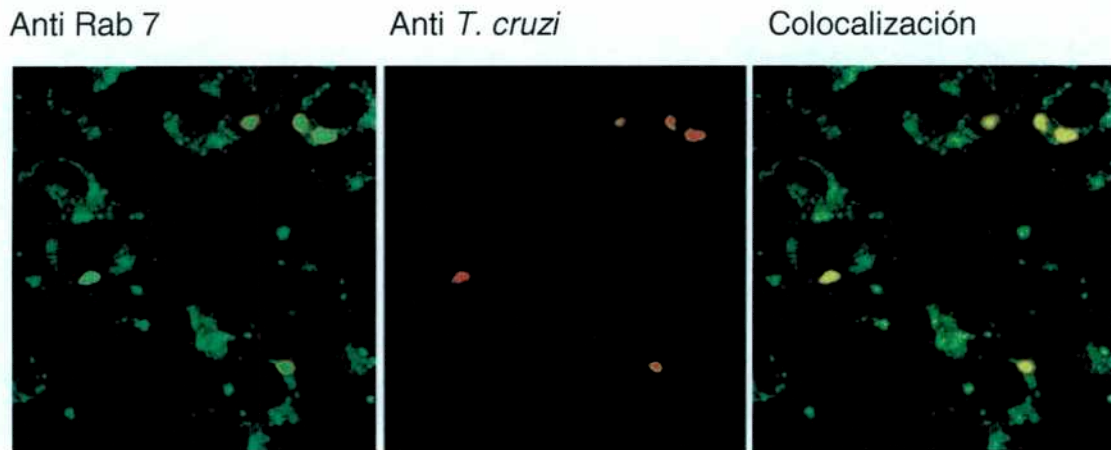


**Fig. 35** Microscopía confocal de célulasg CHO Rab 7 WT infectadas con Trip-cult.



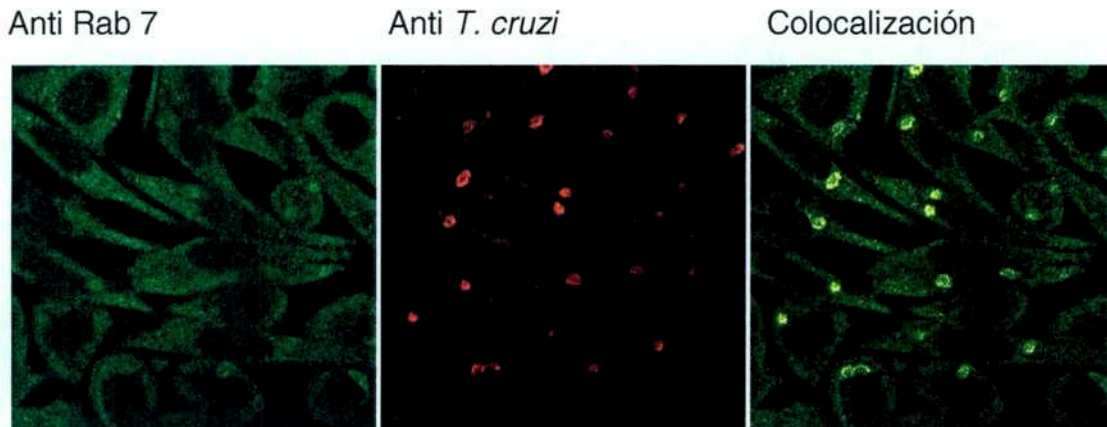
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100

**Fig. 36** Microscopía confocal de células CHO Rab 7 S22N infectadas con Trip-cult.



118

**Fig. 37** Microscopía confocal de células CHO Rab 7 Q79L infectadas con Trip-cult.



De manera similar a las células Rab 5, en las fotografías de las **Figs. 35-37**, se observa la marcación de los endosomas tardíos (organelas Rab 7 positivas) como puntos verdes y la marcación de los parásitos intracelulares (Ama) como puntos rojos, ya que los anticuerpos secundarios utilizados para detectar Rab 7 y *T. cruzi* estaban conjugados con fluoresceína y Texas Red respectivamente. En todos los casos se pudo observar una colocalización de endosomas tardíos con parásitos intracelulares indicando la presencia de los Ama en estas organelas.

También como en el caso de las células Rab 5, se puede observar una infección creciente en magnitud comparando entre las células Rab 7 S2N (**Fig.36**), Rab 7 WT (**Fig. 35**) y Rab 5 Q79L (**Fig. 37**).

# DISCUSSION

- **ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO DE MACRÓFAGOS PERITONEALES Y J774 E INFECCIÓN DE LOS MISMOS CON TRIPOMASTIGOTES METACÍCLICOS O SANGUÍNEOS**

La estandarización de las técnicas de obtención e infección de MOp y cultivo de MO J774 estuvieron dirigidas a la utilización de estos modelos para evaluar la acción de análogos y antagonistas de 2<sup>dos</sup> mensajeros en la relación parásito célula.

El mayor porcentaje de penetración obtenido con el estadio Mtc sugiere que, en el ciclo natural del parásito el estadio metacíclico (de alta infectividad) proveniente del vector tendría más posibilidades de éxito en la penetración y multiplicación dentro de la célula, asegurando así su propia supervivencia. En el caso del tripomastigote sanguíneo, el menor porcentaje de infección obtenido nos sugeriría una estrategia adaptativa del parásito tendiente a mejorar su relación con el huésped infectado y permitir su supervivencia (Tablas 1 y 2). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Meirelles y col. (109) con otras cepas de parásitos.

A pesar de que los MOp resultaron adecuados para realizar los primeros experimentos, en el transcurso de esta tesis, se decidió proseguir los estudios utilizando líneas celulares fagocíticas y no fagocíticas para disminuir las variantes biológicas atribuibles a las diferencias entre distintos lotes animales. Asimismo, también se estandarizó la técnica de obtención de Trip-cult. en células Vero irradiadas con un rendimiento muy superior en cantidad de parásitos en comparación con los Trip-sang o los Mtc (97). Es por ello que los Trip-cult. fueron utilizados en los experimentos posteriores.

### • PARTICIPACIÓN DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN LA INTERACCIÓN MACRÓFAGO-PARÁSITO

Trabajos publicados recientemente demostraron que el ion  $\text{Ca}^{2+}$ , uno de los 2<sup>os</sup> mensajeros que intervienen en un gran número de funciones vitales como diferenciación, motilidad, endo y exocitosis, (53).

Las evidencias actuales indican que en el *T.cruzi* así como en otros parásitos intracelulares como *Leishmania donovani* (110) y *Plasmodium falciparum* (111) el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular está involucrado en la invasión parasitaria

En nuestros experimentos, los MOp tratados con BAPTA AM (quelante intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ) o Metoxiverapamil (bloqueante de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ) e infectados con Mtc mostraron un menor porcentaje de infección lo cual estaría indicando que el parásito necesita del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol de la célula para mejorar su ingreso a la misma (**Tabla 3**). Estos resultados estarían de acuerdo con los hallados en los tratamientos de los parásitos con compuestos similares realizados por Yakubu y col. (112) en cuanto a la necesidad del aumento de la concentración del ion  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula huésped.

Por otra parte, el tratamiento de los MOp con Bay K 8644 (agonista de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ) aumentó los porcentajes de parasitización de los MOp lo cual estaría confirmando que la alteración de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula huésped modifica la capacidad del parásito para establecerse (**Tabla 3**). En cuanto a los resultados obtenidos con Ionomicina (ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ ), si bien era esperable un aumento en la infección, éstos no mostraron valores significativamente diferentes a los controles, a pesar de que se ensayaron concentraciones más altas que las referidas en la literatura (112) (**Tabla 3**). Los trabajos publicados en los que se utilizó esta droga muestran resultados contradictorios (113) lo que estaría indicando que

los diferentes modelos de estudio pueden responder de manera distinta al mismo estímulo.

En cuanto a la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, nuestros resultados indicaron, que la infección de las células hospedadoras por *T. cruzi* altera en las mismas la homeostasis normal del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (**Tabla 4**) aumentando la misma al doble de la concentración basal. Otros autores, trabajando con otras líneas celulares (endoteliales y HeLa) y otras cepas parasitarias (venezolana y Tulahuén) encontraron resultados similares (114,115), por lo que se deduce que el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico de la célula huésped infectada es un evento general en la invasión del *T. cruzi* a cualquier célula hospedadora.

En cuanto a las variaciones cíclicas determinadas en los MOp tras la adición de membranas purificadas de Trip-sang. (**Fig. 10**), Tardieux y col. (116) observaron el mismo efecto, sugiriendo que un factor derivado de tripomastigotes dispararía señales transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula huésped, promoviendo la invasión del parásito. Actualmente si bien no se ha aislado el factor de tripomastigotes que dispara la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , se describió una serin proteasa citosólica que sería responsable de clivar el profactor presente en la membrana del parásito (46). Nuestros resultados efectivamente comprueban que se trata de un factor de membrana de los tripomastigotes ya que ni la fracción citosólica de Trip-sang. ni la fracción de membrana de Epi fueron capaces de modificar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  del MOp (**Fig. 9**).

Además en un trabajo reciente (117) se ha demostrado que los aumentos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la invasión del *T. cruzi* en células no fagocíticas están acompañados de una exocitosis de lisosomas  $\text{Ca}^{2+}$ - dependiente que está regulada por un aumento en los niveles de AMPc de la célula huésped.

En el proceso de transducción de señales, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular está mediada por la formación de  $\text{IP}_3$  en la membrana a partir de  $\text{PIP}_2$ . El

IP<sub>3</sub>, al ser soluble en agua, pasa rápidamente al citosol celular, donde se une a receptores del retículo endoplasmático y mitocondria, induciendo la liberación de Ca<sup>2+</sup> de estas organelas. El trabajo publicado por Rodríguez y col. (31) demostró efectivamente que existe un aumento de la hidrólisis de polifosfoinosítidos y de IP<sub>3</sub> cuando fibroblastos de riñón de rata fueron tratados con un factor derivado de membranas de tripomastigotes, indicando la participación de canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles al IP<sub>3</sub> en la célula huésped durante la interacción temprana entre la membrana del parásito y dicha célula huésped.

Por otra parte, Yakubu y col. (112), y Moreno y col. (118) demostraron que los tripomastigotes tratados con los quelantes citosólicos de Ca<sup>2+</sup> Bapta AM y Quin 2, disminuyen significativamente su infectividad sobre mioblastos. La misma observación se hizo cuando los parásitos fueron tratados con fenotiazinas, que actúan como inhibidores de Calmodulina (enzima activadas por Ca<sup>2+</sup>). Sin embargo los parásitos pretratados con Ionomicina, que actúa como ionóforo de Ca<sup>2+</sup>, aumentan su capacidad de invasión (112).

En conclusión, por los resultados mostrados en esta tesis y por los trabajos relacionados, el aumento transiente del Ca<sup>2+</sup> intracelulares una señal requerida tanto en el parásito como en la célula huésped para asegurar el éxito de la invasión parasitaria



- **PARTICIPACIÓN DE LA PKC EN LA INTERACCIÓN MACRÓFAGO-PARÁSITO**

Ha sido demostrado que diferentes clases de proteínas kinasas tienen un rol clave en la transducción de señales en células de mamíferos (119,120). En el caso de la infección de macrófagos con *Leishmania donovani*, se produce una respuesta menor de la PKC de éstas células a los ésteres de forbol, en la acción de éstos de inducir la expresión de los oncogenes c-fos. Como ya es conocido, éstos ésteres son capaces de activar la PKC. Esta respuesta defectiva en éstos macrófagos infectados sugiere la existencia de una PKC alterada por la infección (59).

En los experimentos realizados en esta tesis, el tratamiento de los MOp con los inhibidores de PKC como Staurosporina y H-7 y posterior infección con Mtc aumentó el número de MOp infectados, con respecto a los controles sin tratar (**Tabla 5**). Por el contrario el trabajo publicado por Vieira y col (121) mostró resultados inversos, en donde la incubación de MOp con concentraciones de Staurosporina entre 0.5 y 2  $\mu\text{M}$  resultó en una disminución de los porcentajes de infección. Sin embargo estas concentraciones son 10 veces mayores que las utilizadas en nuestros experimentos y en nuestro caso las concentraciones utilizadas por Vieira y col. resultaron tóxicas para las células, por lo cual los resultados de ambos estudios no son comparables.

Por otra parte, los resultados de Rodríguez y col. (122) coinciden con los nuestros en cuanto al efecto de la Staurosporina, en el sentido de un aumento en los porcentajes de invasión en células no fagocíticas tratadas con éste compuesto. Según estos autores, este efecto, según ellos mismos determinaron, podría ser causado por la disrupción del citoesqueleto de actina en las células tratadas con Staurosporina. Esta disrupción del citoesqueleto de actina, similar a la observada cuando las células son

tratadas con Citocalasina D, aumenta significativamente la invasión de los tripomastigotes (123).

Por otra parte, la Staurosporina y el H-7 también son inhibidores de otras kinasas como la PKA ( $IC_{50}$  para Staurosporina 7nM,  $K_i$  para H-7 3 $\mu$ M) y PKG ( $IC_{50}$  para Staurosporina 8.5 nM,  $K_i$  para H-7 5.8  $\mu$ M) además de la PKC ( $IC_{50}$  para Staurosporina 0.7nM,  $K_i$  para H-7 6  $\mu$ M). Además estos compuestos en altas concentraciones tienen otros efectos secundarios como la inducción de muerte celular y fragmentación del DNA.

En conclusión, futuros trabajos utilizando inhibidores específicos de PKC, determinación de la actividad enzimática en células infectadas o estimuladas con fracciones subcelulares parasitarias, e infección en líneas celulares que sobreexpresen mutantes activas o inactivas de esta proteína deberán ser realizados a fin de determinar la participación de esta kinasa en la interacción *T. cruzi*-célula huésped descartando acciones secundarias de los inhibidores ensayados.

- **PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS DE LA CELULA HUESPED EN LA INTERACCIÓN MACRÓFAGO-PARÁSITO**

Clásicamente las proteínas G heterotriméricas participan en el mecanismo de transducción de señales a través de la membrana plasmática, activadas por receptores que responden a estímulos extracelulares, generando una serie de 2<sup>os</sup> mensajeros. En los últimos años se ha demostrado que las proteínas G triméricas no solo participan en la transducción de señales sino también en el transporte intracelular (124,125). Aunque resulta difícil explorar los mecanismos moleculares que regulan el transporte vesicular en células intactas, existen reactivos que permiten estudiar la participación de este tipo de GTP-proteínas. Un ejemplo de estos reactivos lo constituyen el Fluoruro de Aluminio (AIF), el Mastoparén (péptido obtenido del veneno de avispa), las toxinas bacterianas (colérica y pertussis) y los péptidos que interactúan con las proteínas G simulando regiones citoplasmáticas del receptor.

Como ya se ha mencionado, el AIF es capaz de activar exclusivamente proteínas G heterotriméricas. Los resultados obtenidos a partir de macrófagos pretratados con AIF mostraron una disminución en el porcentaje de infección, los cuales implican a las proteínas G triméricas en la entrada del parásito a la célula huésped (**Tabla 6**) La principal desventaja de este compuesto es que no permite discriminar si se trata de una proteína G activadora o inhibitoria (63)

En el caso del Mastoparén, éste compuesto simula regiones citoplasmáticas de receptores que interactúan con proteínas  $G_{\alpha i}$  de manera tal que este péptido estimula el intercambio de nucleótidos en la proteína  $G_{\alpha i}$ , activándola (61). En los experimentos realizados con macrófagos preincubados con Mastoparén se observó un aumento significativo en los porcentajes de infección con respecto a los controles infectados sin tratar (**Tabla 6**), lo cual

sugeriría que la proteína  $G_{\alpha i}$  podría estar involucrada con en el proceso de invasión parasitaria.

Como ya se ha mencionado en la introducción, algunos péptidos correspondientes a dominios citoplasmáticos de receptores pueden regular el funcionamiento de proteínas G (62). El uso de péptidos como el TrMP14, capaz de activar  $G_{i2}$  (la proteína G que inhibe adenililciclase) permite determinar la GTP-proteína involucrada en un determinado sistema. El péptido 14 está estructuralmente relacionado al Mastoparán, el cual debido a su carácter hidrofóbico, es capaz de insertarse en la membrana y activar proteínas G. En nuestro modelo, el péptido TrMP14 (activo) demostró una acción inhibitoria de la infección, mientras que su contraparte el TrMP<sub>14</sub>A<sub>2</sub> (inactivo) no modificó significativamente los porcentajes de infección, como era esperable (**Tabla 6**). Aunque estos resultados se contraponen con los obtenidos con el Mastoparán, los efectos del TrMP14 podrían explicarse en el sentido de que este péptido al insertarse en la membrana del macrófago, esté alterando la interacción entre el/los ligandos del parásito y un receptor distinto al que interacciona con el Mastoparán en el macrófago.

En cuanto a los experimentos de infección de macrófagos pretratados con toxinas bacterianas, el tratamiento de los MOp con CTx (activadora de  $G_{\alpha s}$ ) no produjo cambios significativos en los porcentajes de infección, lo cual estaría sugiriendo que la proteína  $G_{\alpha s}$  no estaría relacionada en la interacción tripomastigote-macrófago (**Tabla 6**). En cuanto a los experimentos con PTx, la cual desacopla las subunidades  $G_{\alpha i}$  y  $G_{\alpha o}$  de los receptores bloqueando la transducción de señales, la inhibición detectada en los porcentajes de infección concuerda con los resultados obtenidos con Mastoparán en cuanto al efecto sobre  $G_{\alpha i}$  (**Tabla 6**). La magnitud de la inhibición observada (54%) está de acuerdo con lo publicado por Tardieux y col. (116) en células no fagocíticas, corroborando que una proteína G heterotrimérica posiblemente con subunidad del tipo  $G_{\alpha i}$  estaría involucrada

tanto en la interacción del tripomastigote con el macrófago como con células no fagocíticas

Por otra parte, diversos trabajos publicados (126,127) comunicaron que el Mastoparén podía inducir además en algunas células la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por  $\text{IP}_3$  y que el efecto del Mastoparén sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  podía ser revertido por la PTx. Para determinar si en nuestro sistema, el tratamiento de los MOp con Mastoparén, además de su efecto de activar a la proteína  $G_{\alpha i}$  disparaba una señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , se llevaron a cabo una serie de experimentos en los que se determinó la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de MOp luego de la adición de Mastoparén y de la PTx (**Fig. 11**). Los resultados mostraron que efectivamente el Mastoparén es capaz de inducir una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  de aproximadamente 5-6 veces el valor basal, mientras que la posterior adición de la PTx no logra anular el efecto (**Fig. 11**). Por el contrario la adición de la PTx a la monocapa de MO no induce una señal significativa de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Fig. 11**). El efecto pareciera ser irreversible, al menos en tiempos de hasta 11 minutos, dado que la posterior adición de Mastoparén no provoca la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  esperada. Estos resultados son coherentes en cuanto al aumento de la infección observado en los MOp pretratados con esta droga y a la inhibición producida con la PTx. En el trabajo de Murthy y col. (128) se describió en células musculares intestinales la asociación entre la proteína  $G_{\alpha i}$  y la fosfolipasa C (PLC), enzima encargada de clivar el  $\text{PIP}_2$  a  $\text{IP}_3$  y diacilglicerol, por lo cual nuestros resultados apoyarían la hipótesis de que la activación de una proteína  $G_{\alpha i}$  podría estar mediando la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  dada por el parásito y aumentando así los porcentajes de infección por ambas señales  $G_{\alpha i}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .

- **PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS DEL *T. CRUZI* EN LA INTERACCIÓN PARÁSITO- CÉLULA HUÉSPED**

Con el fin de determinar si las proteínas G del parásito están también involucradas, se realizaron experimentos de tratamiento de los Mtc con las toxinas colérica o pertussis en las mismas condiciones que con los MOp. Los resultados obtenidos mostraron que existe sensibilidad de las proteínas G del parásito a ambas toxinas, aunque el efecto fue levemente acentuado con la PTx (**Tabla 7**). La inhibición observada en los porcentajes de infección sugeriría la participación de subunidades  $G_{\alpha s}$  y  $G_{\alpha i}$  del parásito en el proceso de invasión, aunque el efecto con PTx podría estar indicando una participación más importante de la subunidad inhibitoria. En este sentido Coso y col. (129) han identificado y caracterizado una proteína  $G_{\alpha i}$  de epimastigotes de *T. cruzi* capaz de ser ADP ribosilada por PTx por lo que nuestros resultados nos permitirían sugerir la existencia de esta proteína también en el estadio tripomastigote.

En síntesis el conjunto de estos resultados muestran que en el proceso de interacción parásito-MOp, los componentes del sistema de transducción de señales se ponen en marcha tanto en la célula a ser infectada como en el parásito que la va a invadir.

### • PARTICIPACION DE LA PI3K Y LA PKB DE LA CELULA HUESPED EN LA INTERACCION PARASITO-CELULA

Numerosos estudios utilizando herramientas genéticas, inhibidores de PI3K y células que sobreexpresan PI3K han implicado a esta enzima en la regulación de la proliferación celular, supervivencia, metabolismo, reorganización del citoesqueleto y transporte vesicular (85).

Los resultados de esta tesis mostraron que los dos inhibidores específicos de PI3K conocidos, Wortmannin y LY294002, inhibieron significativamente la invasión en células tanto fagocíticas como no fagocíticas (**Figs.12,13,14,15**). De estas últimas, las células Vero resultaron ser altamente sensibles al efecto de ambos compuestos, aunque la concentración necesaria para inhibir al menos un 50% de la invasión resultó ser más alta para *T. cruzi* que para estudios de invasión en la bacteria *Listeria monocytogenes* (130). Ambos inhibidores redujeron la invasión de *T. cruzi* en una forma dosis-dependiente tal como ha sido reportado para *L. monocytogenes*. Aunque no se conoce cómo la activación de la PI3K afectaría la invasión bacteriana y en nuestro caso la parasitaria, uno de los mecanismos sería a través de la reorganización del citoesqueleto de actina, dado que se conoce que los fosfoinosítidos productos de esta enzima, modifican los filamentos de actina. Por otro lado, se ha demostrado que la PI3K puede interactuar con proteínas que regulan el citoesqueleto (pp125<sup>FAK</sup> y GTPasas Rho) así como proteínas que participan en la endocitosis mediada por clatrina como la dinamina (131). También de acuerdo con nuestros resultados, se ha reportado que el Wortmannin es capaz de inhibir la invasión del protozoario *Cryptosporidium parvum* en células epiteliales (132). La observación de que ambos compuestos, Wortmannin y Ly294002, fueron fuertes inhibidores de la invasión por *T. cruzi* en ambos tipos de células ensayadas en concentraciones en las que se sabe que sólo inhiben PI3K (133,134) (**Figs. 12 a 15**), indican que esta enzima de la célula huésped podría ser parte de un camino de señalización requerido por el parásito para concluir en una invasión exitosa. Tal como lo descrito para otras moléculas señalizadoras

como el  $\text{Ca}^{2+}$ , la cascada PI3K/PKB podría ser un camino común usado por varios patógenos para la invasión y supervivencia dentro de la célula huésped.

En *T. cruzi*, el contacto parasitario con células no fagocíticas está asociado con cambios en el citoesqueleto de actina (122) que facilitan la migración de los lisosomas de la célula huésped al sitio de invasión (123). Por lo tanto la actividad PI3K podría estar involucrada en la regulación de la formación de los microfilamentos de actina, por lo que, una relación entre la activación de la PI3K y la reorganización del citoesqueleto no puede ser descartada (135).

Por otra parte, como será discutido más adelante, ésta kinasa en cooperación con la proteína Rab 5 está involucrada en el tráfico vesicular a través de la formación de endosomas tempranos.

Un blanco bien caracterizado de la activación de la PI3K es la proteína kinasa Akt también conocida como PKB. La PKB juega un rol de importancia en proteger a las células de la apoptosis y en promover la supervivencia celular (86).

Los resultados de activación de PI3K y PKB en células estimuladas por membranas de tripomastigotes y la no activación observada cuando se utilizaron membranas de epimastigotes (**Figs.16 y 20** respectivamente), demostraron que las membranas del estadio infectivo contienen los factores necesarios para optimizar la invasión. El uso de membranas parasitarias agregadas a monocapas celulares constituyó un buen modelo de estudio para determinar los cambios bioquímicos en la célula huésped asociados a la invasión.

Las membranas parasitarias se eligieron dado que la/s molécula/s activadoras de cascadas de señalización en la célula huésped están muy probablemente localizadas en la superficie del parásito. Muchas moléculas señaladoras que activan los caminos de transducción de señales que



involucran a PI3K y PKB han sido descritas en la superficie de varios microorganismos patogénicos entre ellos bacterias y virus (136-140).

Por ejemplo, en el caso del *T. cruzi*, se ha descrito que una molécula aislada como la transialidasa, regula positivamente la invasión a través de las MAP kinasas de la célula huésped (141).

En cuanto a los experimentos de invasión en células que sobreexpresan mutantes activas o inactivas de PKB, los resultados mostraron una inhibición significativa de la invasión en las células PKB- (**Figs. 22 y 23**), mientras que en las células PKB+, los porcentajes de invasión se incrementaron (**Figs. 22 y 24**). Estos resultados destacan la importancia de una molécula con actividad promotora de supervivencia celular como es la PKB en el proceso de invasión parasitaria. Diversos trabajos (138,139) han demostrado que varias moléculas presentes en la superficie de otros microorganismos como el virus de polyoma o lipopolisacáridos bacterianos, son capaces también de activar a la PKB a través de la PI3K.

En conjunto estos resultados están mostrando que una activación de la cascada PI3K-PKB favorece la invasión parasitaria. Los mecanismos involucrados podrían ser el reordenamiento del citoesqueleto, la formación de endosomas tempranos y la activación de señales que induzcan la supervivencia celular. Estos hechos podrían constituir una estrategia adaptativa del parásito para preservar la vida de la célula huésped y permitirle a éste obtener un ambiente seguro para su establecimiento y posterior multiplicación.

## **PARTICIPACION DE LA PI3K DEL T. CRUZI EN LA INVASION A LA CELULA HUESPED**

Por otra parte la unión del parásito a la célula huésped es un proceso complejo que lleva también a la activación de vías de señalización en el propio parásito, tal como ocurre en la célula huésped. En este sentido, Moreno y col. (118) han detectado señales de  $Ca^{2+}$  en los tripomastigotes cuando éstos estaban en contacto con la célula huésped. Yakubu y col. reportaron que estos incrementos estaban asociados a una capacidad infectiva aumentada (112).

Dado que, las moléculas involucradas en los sistemas de transducción de señales son altamente conservadas en todas las células eucariotas, se decidió investigar si la PI3K del *T.cruzi* estaba también involucrada en la invasión celular. Los resultados mostraron que la actividad PI3K de tripomastigotes era requerida para la invasión ya que el tratamiento de los parásitos con Wortmannin, resultó en una inhibición de la invasión dosis-dependiente (**Fig. 18**). La determinación enzimática de la actividad PI3K de Trip-cult. indicó además que la enzima parasitaria presenta similitud con la subunidad p85 de la PI3K de mamíferos ya que dicha subunidad en el *T.cruzi* pudo ser inmunoprecipitada con el anticuerpo contra la subunidad de mamíferos (**Fig. 19**).

La PI3K parasitaria podría estar actuando a través la activación de una PLC $\gamma$  por el producto de esta kinasa que es el  $PI_3P$ . La activación de la PLC $\gamma$ , daría como resultado la producción de  $IP_3$  y DAG y éste  $IP_3$  activaría la señal de  $Ca^{2+}$  que ya fue descrita (135,112) posibilitando la invasión parasitaria. Se desconoce al momento cual es el mecanismo que dispara la activación de esta PI3K parasitaria ni qué otras señales se activan en el parásito a través de esta enzima.

### • PARTICIPACION DE RAB 5 Y RAB 7 EN LA INTERACCION PARASITO-CELULA HUESPED

Con el objetivo de determinar la posible participación de las GTPasas monoméricas Rab 5 y 7 en la invasión de células no fagocíticas por *T. cruzi*, se decidió construir líneas celulares transfectadas que sobreexpresen la proteína Rab 7 en su forma nativa y mutantes positivas y negativas por técnicas de biología molecular. El protocolo de subclonado de las 4 mutantes por PCR resultó una manera rápida y efectiva de obtener los insertos buscados (**Fig.25**). Si bien el uso de esta técnica demandó que las construcciones obtenidas tuvieran que ser secuenciadas posteriormente, los resultados confirmaron la exactitud de las secuencias con las originales así como la exacta ubicación de las mutaciones para la expresión de las GTPasas activas o inactivas.

En cuanto a la transfección de las líneas celulares de mamífero, se probó inicialmente la transfección por electroporación. Si bien se probaron distintas condiciones de voltaje y tiempos de electroporación, esta técnica no resultó adecuada para las células CHO utilizadas ya que provocaba la destrucción de la mayoría de las mismas. Como una alternativa se utilizó la lipofectina la cual permitió una transfección mucho más controlada, lo cual fue determinado por un seguimiento permanente de las células por microscopía óptica. El proceso de selección de las transfectantes positivas requirió un tiempo más largo dado que ante cada concentración creciente del antibiótico Hygromicina se reducía notablemente el número de células vivas.

En cuanto a la sobreexpresión de las proteínas transfectadas, los resultados del Western blot mostraron que efectivamente las 3 líneas celulares tenían niveles de proteína Rab 7 mucho mayores que el control de células CHO sin transfectar (**Fig. 29**), indicando que el vector elegido para la transfección fue

adecuado. Este experimento fue indispensable para concluir la etapa de construcción de las líneas celulares transfectadas con Rab 7.

En relación a los experimentos de infección con *T.cruzi* en estas células transfectadas, los resultados mostraron una correlación entre proteínas Rab activas (Rab 5Q79L y Rab 7 Q67L) y mayores porcentajes de invasión así como una inhibición significativa de la invasión en las mutantes negativas (Rab 5 S34N y Rab 7 S22N) (**Figs. 30 y 31**) cuando se compararon los resultados con los de infección en células WT de Rab 5 y Rab 7.

Estos hallazgos se evidencian claramente en las fotografías de microscopía confocal, donde se destaca la colocalización de las proteínas Rab 5 y 7 con los parásitos en las células infectadas (**Figs. 32 a 34 y 35 a 37** respectivamente).

En síntesis, se estaría demostrando que durante el proceso de invasión del *T. cruzi*, los tripomastigotes utilizan tanto compartimentos Rab 5 positivos (endosomas tempranos) como compartimentos Rab 7 positivos (endosomas tardíos) sugiriendo que los parásitos intervienen en los caminos de transporte vesicular normales de las células para su establecimiento en el citosol hospedador. Por otra parte, el éxito de la invasión parasitaria estaría dependiendo de la actividad enzimática de estas proteínas Rab ya que las mutantes negativas (que no unen GTP) son ineficientemente invadidas por los parásitos (**Figs.30 y 31**)

Esta secuencia de eventos en los que el parásito se encuentra en endosomas tempranos y tardíos no concuerda con el modelo propuesto por Tardieux y col. (123), en el cual el parásito se encuentra inicialmente en una vacuola parasitófora formada por membrana plasmática y lisosomas de la célula huésped que migran hacia el sitio de invasión.

Como ya se ha comentado la fusión de endosomas tempranos requiere de un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Este último hecho se ha comprobado en

esta tesis como consecuencia de la infección por *T.cruzi* o el contacto de MOp con membranas de este parásito. La activación de la PI3K y la participación de Rab 5 así como la interacción entre ambas también ha sido demostrada en esta tesis y descrita en la literatura (91). El proceso de endocitosis continuaría con la fusión del endosoma temprano conteniendo al parásito con los endosomas tardíos, proceso regulado por Rab 7. Estos hechos se confirman por los resultados de invasión aumentada e inhibida en las mutantes positivas y negativas, respectivamente y por los hallazgos de microscopía confocal.

# CONCLUSIONES

### CONCLUSIONES

Durante la invasión parasitaria se producen modificaciones tanto en la célula huésped como en el parásito para facilitar el éxito de dicha invasión y establecimiento del mismo en esa célula.

Las modificaciones de ese proceso descritas en esta tesis son las siguientes:

- El aumento citosólico del  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula huésped es una condición necesaria para optimizar la invasión parasitaria.
- Dicho aumento se produce en la célula huésped antes de ser invadida ya que la señal disparadora se encuentra presente en membranas parasitarias aisladas.
- La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  dada por el parásito es dependiente de estadio dado que solo los Trip infectivos y no los Epi son capaces de inducir la señal.
- La participación de una proteína G heterotrimérica del tipo  $G_{\alpha i}$  sobre la base de los resultados con los moduladores de este tipo de proteínas y su relación con señales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ambos hechos nos permiten concluir que la estimulación de la invasión se produce por ambas vías simultáneamente.
- La intervención de la proteína kinasa C en el proceso de invasión no pudo ser inequívocamente determinada ya que los inhibidores utilizados producen efectos secundarios de disrupción del citoesqueleto celular, por lo cual el aumento en la invasión determinado en presencia de estos inhibidores, no puede ser atribuido exclusivamente al efecto de inhibición enzimática.

- Se determinó que el contacto de la célula huésped con membranas del estadio infectivo del parásito produce un aumento de la actividad de la enzima PI3K, lo cual fue confirmado por la disminución de los porcentajes de infección en las células tratadas con inhibidores específicos de esta enzima.
- Se demostró que existe también una activación temprana de la proteína blanco de la PI3K, la PKB, en las mismas condiciones de ensayo que para la PI3K. Además este hecho se confirma por el aumento de la invasión en células PKB+ y la disminución de dicha invasión en las células PKB-.
- La participación de las proteínas Rab 5 y Rab 7 en la invasión parasitaria se confirmó por microscopía confocal y experimentos en células transfectadas con mutantes positivas, negativas y wild type.
- Se ha demostrado que el parásito está localizado en una organela con características de endosoma temprano, donde se encuentra la proteína Rab 5, marcadora de este tipo de vesículas.
- Se determinó además una colocalización de la proteína Rab 7 (marcadora de endosomas tardíos) con el parásito internalizado.
- Dos de las moléculas descritas en este trabajo para la célula huésped, tales como PI3K y proteínas G heterotriméricas ( $G_{\alpha i}$  y  $G_{\alpha s}$ ), se encuentran también presentes en el parásito y tienen influencia definitoria sobre su capacidad invasiva ya que la inhibición de estas proteínas se traduce en una disminución de la infectividad del mismo.

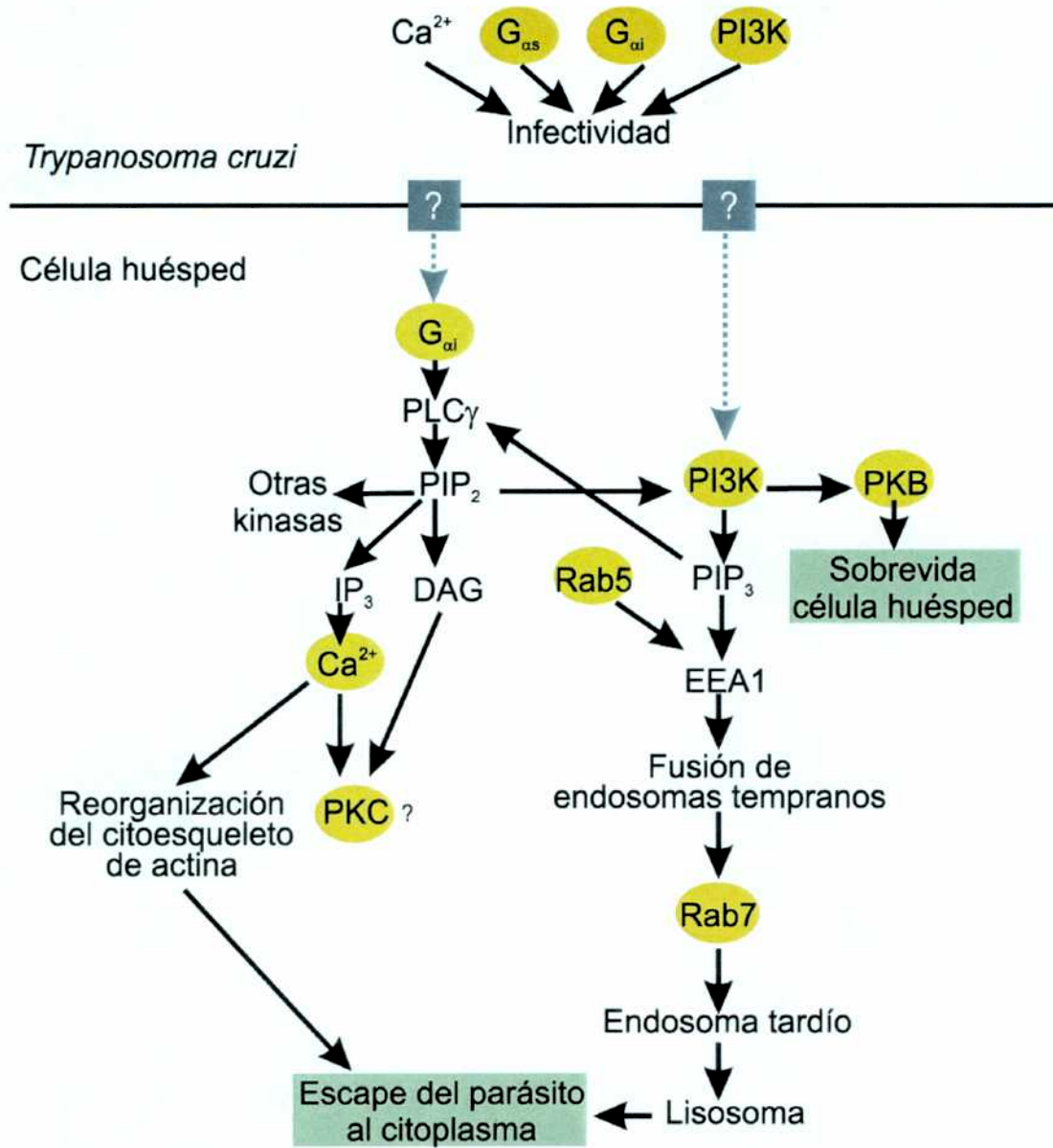
En base a las conclusiones precedentes podemos proponer un modelo de invasión del *T. cruzi* en la célula huésped donde intervienen distintos



componentes del sistema de transducción de señales y del sistema de transporte vesicular en la célula huésped y en el parásito:

**La fusión entre endosomas tempranos requiere un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, la activación de la PI3K y su cooperación con Rab 5 para localizar el antígeno temprano de endosomas (EEA1). Este proceso proseguiría con la fusión del endosoma temprano con los endosomas tardíos promovido por la proteína Rab 7. Por otra parte, el  $\text{PIP}_2$ , es sustrato de la PI3K y también de la fosfolipasa  $\text{C}\gamma$ , la cual hidroliza este fosfolípido y produce  $\text{IP}_3$  y DAG. El  $\text{IP}_3$  induce la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares con la liberación de este ion al citosol celular. Por su parte la  $\text{PLC}\gamma$ , es activada por la proteína heterotrimérica  $\text{G}_{\alpha i}$ . Por otra parte, la PI3K activa río abajo la PKB, promoviendo señales de supervivencia celular y facilitando así el establecimiento y prosecución del ciclo del parásito.**

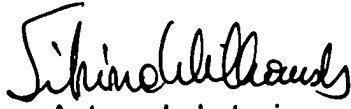
Fig. 38



Los círculos amarillos señalan los componentes celulares que intervienen en el proceso de invasión analizado en esta tesis.

## CONCLUSIONES

---

  
Autora de la tesis

Lic. Silvana Elizabeth Wilkowsky

  
Directora de Tesis

Dra. Elvira L. Durante de Isola

# BIBLIOGRAFIA

- 1 - González Cappa S.M, Isola E.L.D. "Enfermedad de Chagas". Storino Rubén y Milei José (eds). Editorial Doyma. Argentina S.A. Caps. 3-4, 1994
- 2 - Chagas C. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 8: 5, 1916
- 3 - Reunión de Investigación Aplicada en Enfermedad de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18: 46, 1984
- 4 - Brener Z., Andrade Z.A., Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª Ed. Ed. Guanabara Koogan Caps.12-15, 1999
- 5 - Storino R. "Enfermedad de Chagas". Storino Rubén y Milei José (eds). Editorial Doyma. Argentina S.A. Cap. 13:, 1994
- 6 - Barreto A.C.P. Rev. Soc. Cardiol. Est. Sao Paulo 6: 357, 1996
- 7 - Hoare C. "The trypanosomes of mammals". Blackwell Scientific Publications, Oxford, England. Cap. 5, 1972
- 8 - De Souza W. Int. Rev. Cytol. 86: 197, 1984
- 9 - Hoare C, Wallace F. Nature 212: 1385, 1966
- 10 - Del Ponte, E. Manual de Entomología Médica y Veterinaria Argentina. Ediciones Librería del Colegio Bs. Aires, Cap. XI, 1958
- 11 - Sherlock, I. "Vetores en *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas". Eds. Brener, Z.: Andrade, Z. Editorial Guanabara Koogan, Río de Janeiro. Cap. 2 pág. 43, 1979
- 12 - Zeledón R., Alvarenga N., Schosinsky K. Ecology of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. PAHO Scient. Publi. No. 347, 1977

- 13 - Fernández J., Castellani O., Kimura E. *Genetics* 61: 214, 1969
- 14 - Plessman Camargo, E. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 6: 93, 1964
- 15 - Wood D, Souza O. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*18: 93, 1976
- 16 - Isola E.D., Lammel E.M., Katzin V., González Cappa S. *J. Parasitol.* 67: 53, 1981
- 17 - Isola E.L.D., Lammel E.M., González Cappa S.M. *Exp. Parasitol.* 62: 329, 1986
- 18 - Osuna A., Adroher F., Lupiañez J. *Cell. Dif. Dev.* 30: 89, 1990
- 19 - Contreras V., Morel C., Goldenberg S. *Mol. Bioch. Parasitol.* 14: 83, 1985
- 20 - Lanar D. J. *Protozool.* 26: 457, 1979
- 21 - Isola E.D., Lammel E.M., Giovanniello O., Katzin A., González Cappa S.M. *J. Parasitol.* 72: 467, 1986
- 22 - Frandenraich D., Peña C., Isola E.L.D., Lammel E., Coso O., Díaz Añel A., Pongor S., Baralles F., Torres H., Flawiá M. *Proc. Nat. Ac. Scien. USA,* 90: 10140, 1993
- 23 - Tambourgi D.V., Kipnis T.L., da Silva W.D., Joiner K., Sher A., Heath S., Fenton Hall B., Odgen G.B. *Infect. Immun.* 61: 3656, 1993
- 24 - Milder R., Kloetzel J. *Parasitol.* 80: 139, 1980
- 25 - Nogueira N., Cohn Z. *J. Exp. Med.* 143: 1402, 1976

- 26 - Meirelles M.N.L., Araujo Jorge T.C., de Souza W. Z. Parasitenkd. 68: 7, 1982
- 27 - Kipnis T.L., Calich V.L.G., Dias Da Silva W. Parasitol. 78: 89, 1979
- 28 - Schenkman S., Robbins E.S., Nussenzweig V. Infect. Immun. 59: 645, 1991
- 29 - Burleigh B.A. Andrews N.W. Annu. Rev. Microbiol. 49: 175, 1995
- 30 - Kuhn R.E. Immunol. Series 60: 495, 1994
- 31 - Rodrigues A., Samoff E., Roiult M.C., Chung A., Andrews N.W. J. Cell Biol. 134: 349, 1996
- 32 - Wilkowsky S.E., Wainszelbaum M.J., Isola E.L.D. Biochem. Biophys. Res. Comm. 222: 386, 1996
- 33 - Ortega Barría E., Pereira M.E.A. Cell 67: 411, 1991
- 34 - Pereira M. "The biology of parasitism". MBL lectures in biology, Vol.9: 105, Eds. Englund P, Sher A, Liss A. Inc., New York. 1988
- 35 - Pereira M.E.A. Science 219: 1444, 1983
- 36 - Previato J.O, Andrade A.F., Pessolani M.C., Mendonca-Previato L. Mol. Biochem. Parasitol. 16: 85, 1985
- 37 - Zingales B. Carniol C., de Lederkremer R.M., Colli W. Mol. Biochem. Parasitol. 26: 135, 1987

- 38 - Schenkman S., Jiang M.S., Hart G.W., Nussenzweig V. Cell 65: 1117, 1991
- 39 - Ming. M., Chuenkova M., Ortega Barría E., Pereira M.E.A. Mol. Biochem. Parasitol. 59: 243, 1993
- 40 - Hall B.F., Webster P., Ma A.K., Joiner K., Andrews N.W. J. Exp. Med. 176: 313, 1992
- 41 - Andrews N.W., Abrams C.K., Slatin S.L. Griffiths G. Cell 61, 1277, 1990
- 42 - Pollevick G.D., Afranchino J.L., Frasch A.C.C., Sánchez D.O. Mol. Biochem. Parasitol. 47: 247, 1991
- 43 - Afranchino J.L., Pollevick G.D., Frasch A.C.C. FEBS Lett. 280: 316, 1991
- 44 - Alves M.J.M., Abuin G., Kuwajima V.Y., Colli W. Mol. Biochem. Parsitol. 21: 75, 1986
- 45 - Moro A., Ruiz-Cabello F., Fernández-Cano A., Stock, R.P., González A. EMBO J. 14: 2483, 1995
- 46 - Burleigh B.A., Caler E.V., Webster P., Andrews N. J. Cell. Biol. 136: 609, 1995
- 47 - Dorta M.L., Ferreira A.T., Oshiro M.E.M, Yoshida N. Mol. Biochem. Parasitol. 73: 285, 1995
- 48 - Andrews N.W. Parasitol. Today. 7:12, 1991



- 49 - Ley V., Robbins E.S., Nussenzweig V., Andrews N.W. J. Exp. Med. 171: 401, 1990
- 50 - Nogueira N, Cohn Z. J. Exp. Med. 143: 1402, 1976
- 51 - Lodish H., Baltimore D., Berk A., Lawrence Zipursky S., Matsudaira P., Darnell J. Molecular Cell Biology (Tercera edición). American Scientific Books. Caps. 16 y 20, 1995
- 52 - Spiegel S., Foster D., Kolesnick R. Curr. Op. Cell Biol. Vol.8 No.2: 159, 1996
- 53 - Crynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. J. Biol. Chem. 260: 3440, 1985
- 54 - Berridge M.J. Annu. Rev. Biochem. 56: 156, 1987
- 55 - Berridge M.J. Irvine R.F. Nature 312: 315, 1984
- 56 - Nishizuka, Y. Nature. 308:693, 1984
- 57 - Nishizuka, Y. FASEB J. 9: 484, 1995
- 58 - Nishizuka, Y. Nature 334: 661, 1988
- 59 - Olivier M. Brownsey R. Reiner N.E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 89: 7481, 1992
- 60 - Bourne H.R., Sanders D.A., Mc Corminck F. Nature 349: 117, 1991
- 61 - Colombo M., Mayorga L., Casey P., Stahl P. Science 55: 1695, 1992

- 62 - Colombo M., Mayorga L., Nishimoto I., Ross E., Stahl P. J. Biol. Chem. 269: 14919, 1994
- 63 - Colombo M., Lenhard J., Mayorga L., Beron W., Hall H., Stahl P. Mol. Memb. Biol. 11: 93, 1994
- 64 - Ohkuma S., Poole B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 3327: 1978
- 65 - Allen A.H., Aderson A. Curr. Op. Immunol. 8: 36, 1996
- 66 - Bouvier, Benolieil A.M., Foa C., Bongrand P. J. Leuk. Biol. 55: 729, 1994
- 67 - Klebanoff S.F. Pinucs S.H. J. Clin. Invest. 50: 2226, 1971
- 68 - Liew F.Y., Cox F.E.G. Immunol. Today 12: A17, 1991
- 69 - Horwitz M.A. Maxfield F.R. J. Cell. Biol. 99: 1936, 1984
- 70 - Sibley L.D., Weromer E., Krahenbuhl J.L. Nature 315: 416, 1985
- 71 - Fauve R.M., Delaunay A. Ann. Inst. Pasteur 11 (suppl.5): 78, 1996
- 72 - Armstrong J.A., D'arcy Hart P. J. Exp. Med. 134: 713, 1971
- 73 - Friis R.R. J. Bacteriol. 110: 706, 1972
- 74 - Jones T.C., Hirsch J.G. J. Exp. Med. 136: 1173, 1972
- 75 - Horwitz M.A. J. Exp. Med. 158: 1319, 1983
- 76 - Berón W., Alvarez-Domínguez C., Mayorga L., Stahl P.D. Trends Cell Biol. 5: 100, 1995

- 77 - Novick P., Zerial M. *Curr.Op. Cell. Biol.* 9: 946, 1997
- 78 - Alvarez-Domínguez C., Barbieri M.A., Beron W., Wandering-Ness A., Stahl P.D. *J. Biol. Chem.* 271: 13834, 1996
- 79 - Vitelli R., Santillo M., Lattero D., Chiarielli M., Bifulco M., Bruni C., Buci C. *J. Biol. Chem.* 272: 4391, 1997
- 80 - Feng Y., Press B., Wandering-Ness. *J. Cell Biol.* 131: 1435, 1995
- 81 - Bliska J.B., Galan J.E., Falkow S. *Cell* 73: 903, 1993
- 82 - Belyi Y.F. *FASEB J.* 7: 1011, 1993
- 83 - Corvera S. D'Arrigo A., Stenmark H. *Curr.Op. Cell biol.* 11: 460, 1999
- 84 - Kobayashi T., Gu F., Gruenberg J. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 9: 517, 1998
- 85 - Leever S.J., Vanhaesebroeck B., Waterfield M.D. *Curr. Op. Cell Biol.* 11: 219, 1999
- 86 - Downward J. *Curr. Op. Cell Biol.* 10: 262, 1998
- 87 - Falasca M., Logan S.K., Lehto V.P., Baccante G., Lemmon M.A., Schlessinger J. *EMBO J.* 17: 414, 1998
- 88 - Barker S.A, Lujan D., Wilson B.S. *J. Leukoc. Biol.* 65: 321, 1999
- 89 - Wurmser A.E, Gary J.D., Emr S.D. *J. Biol. Chem.* 274: 9129, 1999
- 90 - Rameh L.E, Cantley L.C. *J. Biol. Chem.* 274: 8347, 1999

- 91 - Li G., D'Souza-Schorey C., Barbieri M.A., Roberts R.L., Klippel A., Williams L.T., Stahl P.D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92: 10207, 1995
- 92 - Simonsen A., Lippe R., Christoforidis S., Gaullier J.M., Brech A., Callaghan J., Toh B.H., Murphy C., Zerial M., Stenmark H. Nature 394: 494, 1998
- 93 - González Cappa S.M., Bijovsky A.T., Freilij H., Muller L.A., Katzin M.A. Medicina (Buenos Aires) 41: 119, 1981
- 94 - Junker C.E., Vaughn J., Cory J. Science 155: 1565, 1967
- 95 - Katzin V.; Añasco N.; Isola E.L.D.; González Cappa S.M. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 25: 55, 1983
- 96 - Mortatti R.; Munk.M. J. Parasitol. 71: 520, 1985
- 97 - Docampo R., Moreno S.N.J., Vercesi A.E. Mol. Biochem. Parasitol. 59: 305, 1993
- 98 - Goldstein P., Blomgren H. Cell. Immunol. 9: 127, 1973
- 99 - Blystone S.D., Graham I.L., Lindberg F.P., Brown E.J. J. Cell. Biol. 127: 1129, 1994
- 100 - Araujo Jorge T.; Sampaio M., De Souza W., Leal de Meirelles M. Parasitol. Res. 75: 257, 1989
- 101 - Wickham N., Vercellotti G., Moldow C., Visser M., Jacob H. J. Lab Clin. Med. 112: 157, 1988
- 102 - Campbell A.K. John Wiley & sons Inc. (eds.), New York. p556, 1983

- 103 - Shigematsu H., Iwasaki H., Otsuka T., Ohno Y., Arima F., Niho Y. J. Biol. Chem. 272: 14334, 1997
- 104 - Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. J. Biol. Chem. 193: 265, 1951
- 105 - Kohn A.D. Kovacina K.S., Roth R.A. EMBO J. 14: 4288, 1995
- 106 - Laemmli, U.K. Nature 227: 680, 1970
- 107 - Studier, F.W. J. Mol. Biol. 79:237, 1973
- 108 - Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular Cloning. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
- 109 - Meirelles M.N.L., Chiari E., de Souza W. Acta Tropica 39: 195, 1982
- 110 - Olivier M., Baimbridge K.G., Reiner N.E. J. Immunol. 148: 1188, 1992
- 111 - Adovelande J., Bastide B., Deleze J., Schrevel J. Exp. Parasitol. 76: 247, 1993
- 112 - Yakubu M., Majumder S., Kierszembau F. Mol. Biochem. Parasitol. 66: 119, 1994
- 113 - Salazar Schettino P.M., Majumder S., Kierszembau F. J. Parasitol 81: 597, 1995
- 114 - Osuna, A., Castanys, S., Rodriguez Cabezas, M.N., Gamarro, F. Int. J. Parasitol 20: 673, 1990

- 115 - Morris S., Tanowitz H., Hatcher V., Bilezikian J., Wittner M. Mol. Biochem. Parasitol. 29: 213, 1988
- 116 - Tardieux, I., Nathanson M., Andrews N. J. Exp. Med. 176: 1017, 1994
- 117 - Rodríguez A., Martínez I., Chung A., Berlot C.H., Andrews N.W. J. Biol. Chem. 274: 16754, 1999
- 118 - Moreno S., Silva J., Vercesi A., Docampo R. J. Exp. Med. 180: 1535, 1994
- 119 - Hunter T. Cell 50: 823, 1987
- 120 - Bishop J.M. Science 235: 305, 1987
- 121 - Vieira M.C.F., de Carvalho T.U., de Souza W. Biochem. Biophys. Res. Comm. 203: 967, 1994
- 122 - Rodríguez A., Rioult M.G., Ora A., Andrews N.W. J. Cell Biol. 169: 1263, 1995
- 123 - Tardieux I., Webster P., Ravensloot J., Boron W., Lunn A., Heuser J.E. Cell 71: 1117, 1992
- 124 - Homburger V., Lagriffoul A., Bockaert J. Ann. Endocrinol. (Paris) 57: 83, 1996
- 125 - Colombo M.I., Inglese J., D'Souza-Schorey C., Beron W., Stahl P.D. J Biol Chem. 270: 24564, 1995
- 126 - Joyce-Brady M., Rubins J., Pachenko M., Bernerdo J., Steele M., Kolm L., Simons E., Dickey B. J. Biol. Chem. 266: 6859, 1991

- 127 - Gil J., Higgins T., Rozengurt E. *J. Cell Biol.* 113: 943, 1991
- 128 - Murthy K.S., Makhoul G.M. *Mol. Pharmacol.* 47: 1172, 1995
- 129 - Coso O.A., Díaz Añel A., Martinetto H., Muschietti J.P., Kazanietz M., Fraidenaich D., Torres H.N., Flawiá M.M. *Biochem. J.* 287:443, 1992
- 130 - Ireton K., Payrastre B., Chap H., Ogawa W., Sakaue H., Kasuga M., Cossart P. *Science* 274: 780, 1996
- 131 - Ceresa B.P., Kao A.W., Santeler S.R., Pessin J.E. *Mol. Cell Biol.* 18:3862, 1998
- 132 - Forney J.R., deWald D.B., Yang S., Speer C.A., Healey M.C. *Infect. Immun.* 67: 844, 1999
- 133 - Vlahos C.J., Matter W.F., Hui K.Y., Brown R.F. *J. Biol. Chem.* 269: 5241, 1994
- 134 - Yano H., Nakanishi S., Kimura K., Hanai N., Saitoh Y., Fukui Y., Nonomura Y., Matsuda Y. *J. Biol. Chem.* 268: 25846, 1994
- 135 - Carpenter C.L., Cantley L.C. *Curr. Op. Cell Biol.* 8: 153, 1996
- 136 - Schulte R., Zumbihl R., Kampik D., Fauconnier A., Autenrieth I.B. *Med. Microbiol. Immunol. (Berlin)* 187: 53, 1998
- 137 - Procyk K.J., Kovarik P., von Gabain A., Baccarini M. *Infect. Immun.* 67:1011, 1999
- 138 - Salh B., Wagey R., Marotta A., Tao J.S., Pelech S. *J. Immunol.* 161: 6947, 1998

139 - Summers S.A., Lipfert L., Birnbaum M. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 246: 76, 1998

140 - Briand G., Barbeau B., Tremblay M. *Virology* 228: 171, 1997

141 - Villalta F., Zhang Y., Bibb K.E., Burns J.M. Jr., Lima M.F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249: 247, 1998



### Trabajos realizados durante el período como tesista

-*Trypanosoma cruzi*: participation of intracellular  $Ca^{2+}$  during metacyclic trypomastigote-macrophage interaction. **Wilkowsky S.E.**, Wainszelbaum M.J., Isola E.L.D. Biochemical and Biophysical Research Communications. 222, 386-389. 1996.

-*Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation are associated with parasite invasion. **Wilkowsky S.E.**, Barbieri M.A., Stahl P. Isola E.L.D. Remitido para su publicación. 1999

-*Trypanosoma cruzi*: involvement of intracellular calcium in multiplication and differentiation. Barbieri M, Lammel E, **Wilkowsky S.**, Bertini S, Isola ELD. Experimental Parasitology. 83: 240-249.1996.

-Inhibition of early endosome fusion by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophagic cytosol. Ochatt C.M., Mayorga L.S., **Wilkowsky S.**, Isola E.L.D., Torres H., Téllez-Iñón M.T. Journal of Eukaryotic Microbiology 44, 497-502. 1997.