

Tesis de Posgrado

Inositolfoslípidos libres y como anclas de glicoproteínas en Trypanosoma cruzi : estructura y biosíntesis

Bertello, Laura Elena

2000

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

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

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

Cita tipo APA:

Bertello, Laura Elena. (2000). Inositolfoslípidos libres y como anclas de glicoproteínas en Trypanosoma cruzi : estructura y biosíntesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3308_Bertello.pdf

Cita tipo Chicago:

Bertello, Laura Elena. "Inositolfoslípidos libres y como anclas de glicoproteínas en Trypanosoma cruzi : estructura y biosíntesis". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3308_Bertello.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Inositolfosfolípidos libres y como anclas de glicoproteínas
en *Trypanosoma cruzi*. Estructura y biosíntesis.**

Directora de Tesis

Dra. Rosa M. de Lederkremer

Lugar de Trabajo

Departamento de Química Orgánica

Laura E. Bertello

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Noviembre de 2000

100
100

A Daniel, por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

A nuestros hijos, Belén y Matías.

A mis padres, por estar siempre y brindarme su apoyo.

A la Dra. Rosa M. de Lederkremer, a quien le agradezco su estímulo permanente, su confianza y el haberme brindado toda su experiencia y su apoyo para realizar este trabajo.

Quiero además agradecer a las Instituciones y personas sin cuya participación no hubiera podido llevar adelante este trabajo de Tesis.

Al Dr. Walter Colli y la Dra. Maria Julia Manso Alves del Departamento de Bioquímica, Instituto de Química de la Universidad de San Pablo, Brasil, y todos sus colaboradores, en especial, a Marinei Gonçalves, por los cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, las incorporaciones metabólicas de precursores radioactivos realizadas y la colaboración en las incubaciones con membranas de *T. cruzi*.

A la Dra. Norma Andrews de la Yale University, USA, por los cultivos de trypomastigotes, amastigotes de distintos períodos de diferenciación y por el inmunoprecipitado de la glicoproteína Ssp-4.

Al Dr. Martin Low por la enzima PI-PLC de *Bacillus thuringiensis*.

A la Universidad de Buenos Aires por las Becas de Investigación de Iniciación y de Perfeccionamiento otorgadas.

A UMYMFOR y en especial al Sr. Jorge Aznárez por la realización de los CGL-EM y a Meri Rivero por las columnas de cromatografía gaseosa prestadas.

A Laura Salto, por su amistad, apoyo y colaboración permanentes.

A Laura Salto y Carola Gallo, por tantos momentos compartidos.

A mis compañeros de laboratorio: Laura Salto, Carola Gallo, Alejandro Chioconni, Rosalía Agusti, María Laura Uhrig, Carla Marino, Carlos Lima, Alicia Couto, Oscar Varela, Karina Mariño y Lucía Gandolfi, por compartir cordialmente el trabajo de todos los días. También a Cristián Di Nardo, Adriana Veleiro, Alejandro

Nin, Hernán Orgueira, Mariano Castro, Hernán Schulz por estar siempre dispuestos a prestarme su ayuda.

A Daniel Carvallo y Luis Bertello, por su ayuda incansable en la redacción, escritura y compaginación de esta tesis.

A Rosalía Agusti, María Laura Uhrig y Carlos Lima, por sus asesoramientos, sobre todo en mis primeros pasos.

A mi suegra, a mis hermanos, cuñados y amigos que de una forma u otra me brindaron su apoyo y estímulo.

A Pedro Carvallo, por la encuadernación de algunos ejemplares de esta tesis.

A todo el personal del Departamento de Química Orgánica, profesores, auxiliares y no docentes por su cordialidad permanente.

Al personal de Biblioteca y Publicaciones, por su colaboración.

Inositolfosfolípidos libres y como anclas de glicoproteínas en *Trypanosoma cruzi*. Estructura y biosíntesis.

En este trabajo se presenta un análisis detallado de los inositolfosfolípidos (IPLs) de células epimastigotes de *T. cruzi* y de la variación de lípidos libres durante el proceso de diferenciación celular de trypomastigotes a amastigotes y a epimastigotes. Los IPLs están formados por dos componentes que se caracterizaron como fosfatidilinositol (PI) e inositolfosfoceramida (IPC). El PI está constituido por diacilglicerol y 1-*O*-alquil-2-acilglicerol y la IPC por *N*-palmitoildihidroesfingosina, *N*-palmitoilesfingosina, *N*-estearoildihidroesfingosina y *N*-estearoilesfingosina.

Testigos de alquilacilglicerol, no disponibles comercialmente, fueron sintetizados por dos métodos, uno enzimático y otro químico.

Durante la diferenciación de trypomastigotes a amastigotes hay un aumento de la ceramida libre, principalmente palmitoildihidroesfingosina, que coincide con la liberación progresiva de la glicoproteína Ssp-4, antígeno de superficie específico de células amastigotes, que se encuentra anclado por GPI. La porción lipídica del ancla de esta glicoproteína se identificó como la palmitoildihidroesfingosina; lo que abre la posibilidad de que la ceramida juegue algún rol en la diferenciación celular.

Se determinó la presencia en membranas de *T. cruzi* de fosfolipasas A₁, A₂, C y de aciltransferasas.

También se estudió el primer paso de la biosíntesis de las anclas GPI, es decir, la incorporación de GlcNH₂ a partir de UDP-[³H]-GlcNAc y se descartó a la IPC como aceptora de GlcNH₂ para la formación de anclas con ceramida. Este resultado indicaría que las fosfolipasas identificadas estarían involucradas en procesos de remodelación de los lípidos de los GIPLs que son utilizados para la construcción de anclas GPI.

Este trabajo contribuye al conocimiento de las estructuras y del camino biosintético de los GPI de *T. cruzi* que anclan, a la membrana, glicoproteínas involucradas en procesos de diferenciación, reconocimiento y penetración celular. La inhibición del anclaje de estas glicoproteínas a la membrana constituye una alternativa atractiva como quimioterapia contra la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi* / inositolfosfolípidos / GPI / ceramida / fosfolipasas / Ssp-4 / alquilacilglicerol

Inositolphospholipids, free and as anchors of glycoproteins in *Trypanosoma cruzi*. Structure and biosynthesis.

A detailed analysis of inositolphospholipids (IPLs) from epimastigote cells of *T. cruzi*, and the regulated expression of free lipids during the cellular differentiation process from trypomastigotes to amastigotes and epimastigotes is presented. The IPLs are formed by two components that were characterized as phosphatidylinositol (PI) and inositolphosphoceramide (IPC). The PI has a diacylglycerol and an 1-*O*-alkyl-2-acylglycerol, and the IPC is constituted by *N*-palmitoyldihydrosphingosine, *N*-palmitoylsphingosine, *N*-stearoyldihydrosphingosine and *N*-stearoylsphingosine as the lipid moiety.

The alkylacylglycerols needed as standards were synthesized by two different chemical and enzymatic methods.

During the differentiation of trypomastigotes to amastigotes, there is an increase of free ceramides, mainly palmitoyldihydrosphingosine. This is coincident with the progressive shedding of the Ssp-4 glycoprotein, a surface antigen specific of amastigote cells, that is anchored through GPI. The lipid moiety of this glycoprotein anchor was identified as palmitoyldihydrosphingosine, which suggests that ceramide plays a role in cellular differentiation.

The presence of phospholipases A₁, A₂, C and acyltransferases in *T. cruzi* membranes was ascertained. The two latter activities were also proved on IPC.

The incorporation of GlcNH₂ from UDP-[³H]-GlcNAc, the first step of the GPI anchor biosynthesis, was also studied. The possibility of IPC acting as acceptor of GlcNH₂ to form anchors with ceramides was disproved suggesting that the identified phospholipases may be involved in the process of remodelling GIPLs used in the formation of GPI anchors.

This thesis contributes to the knowledge of structures and biosynthetic pathways of *T. cruzi* GPIs that anchor membrane glycoproteins involved in cellular differentiation, recognition and penetration processes. Inhibition of the anchoring to membranes, is an attractive alternative in Chagas disease chemotherapy.

Key words: *Trypanosoma cruzi* / inositolphospholipids / GPI / ceramide / phospholipases / Ssp-4 / alkylacylglycerol

ABREVIATURAS

AAG	alquilacilglicerol
AChE	acetilcolinesterasa
AHM	anhidromanitol
ATP	adenosinatrifosfato
BSA	albúmina bovina
CGL	cromatografía gaseosa
Ci	Curie
<i>p</i> -CMPS	<i>p</i> -cloro-mercurifenilsulfónico
cpm	cuentas por minuto
CRD	determinante de reacción cruzada
DAG	diacilglicerol
DCC	1,3-diciclohexilcarbodiimida
DEAE	dietilaminoetil
4-DMAP	4- <i>N,N</i> -dimetilaminopiridina
Dol	dolicol
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilendiaminotetraacetato
EGTA	etilen glicol-bis(β -aminoetil éter) <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetato
EtN	etanolamina
EtNP	etanolaminafosfato
GBq	gigaBecquerel
GDP	guanosina 5'-difosfato
GIPL	glicoinositolfosfolípido
GPI	glicosilfosfatidilinositol
GPI-PLC	glicosilfosfatidilinositol fosfolipasa C
HBSS	Solución de sales balanceadas de Hanks'
Hepes	(<i>N</i> -[2-hidroxietyl]piperazina- <i>N'</i> -[2-etansulfonato])

HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IPG	inositolfosfoglicano
IPL	inositolfosfolípido
LPG	lipofosfoglicano
LPPG	lipopéptidofosfoglicano
MAG	monoacilglicerol
MBq	megaBecquerel
m/z	relación masa/carga
NP-40	Nonidet P-40
P	fosfato
PBS	buffer fosfato salino
Ph	fenilo
PI	fosfatidilinositol
PI-PLC	fosfatidilinositol fosfolipasa C
PKC	proteínquinasa C
PLA ₂	fosfolipasa A2
PMSF	fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
ppm	partes por millón
RE	retículo endoplásmico
RMN	resonancia magnética nuclear
rpm	revoluciones por minuto
RP-TLC	cromatografía en capa delgada en fase reversa
SAPA	antígeno liberado de fase aguda
SDS	dodecilsulfato de sodio
TFA	ácido trifluoroacético
TLC	cromatografía en capa delgada
TLCK	1-cloro-3-tosilamida-7-amino-L-2-heptano
TMS	trimetilsilano
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano

UDP	uridinadifosfato
VSG	glicoproteína variable de superficie
<i>mf</i> VSG	VSG unida a membrana
<i>s</i> VSG	VSG soluble

INDICE

Resumen / Abstract

INTRODUCCION

Capítulo 1: <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	1
Taxonomía	2
Estadíos de diferenciación y ciclo de vida	3
Morfogénesis de formas vertebradas del <i>Trypanosoma cruzi</i> y antígenos de superficie estadio-específicos	6
Diversidad biológica entre cepas de <i>T. cruzi</i>	7
Invasión a la célula huésped	7
<i>Adhesión a la célula huésped</i>	8
<i>Interiorización del parásito en la célula huésped</i>	9
 Capítulo 2: Glicosilfosfatidilinositoles como anclas de proteínas de membrana.	
Estructura y biosíntesis	12
Anclaje de proteínas a la membrana	12
Proteínas que utilizan un GPI como ancla a la membrana	15
Estructura de glicoinositolfosfolípidos libres (GIPLs) y como anclas de proteínas de membrana (GPIs)	18
Métodos de identificación y caracterización de anclas GPI	27
<i>Sensibilidad al tratamiento con fosfatidilinositol fosfolipasa C</i>	27
<i>Sensibilidad al tratamiento con GPI-PLD</i>	27
<i>Tratamiento con ácido nitroso</i>	28
<i>Detección del determinante de reacción cruzada (CRD)</i>	29
<i>Hidrólisis químicas y enzimáticas</i>	31

<i>Marcaciones biosintéticas</i>	31
Biosíntesis de anclas GPI	32
<i>Biosíntesis de N-acetilglucosaminil-PI</i>	33
<i>Des-N-acetilación de GlcNAc-PI</i>	34
<i>Adición de manosas</i>	36
<i>Adición de etanolaminafosfato</i>	37
<i>Características de la biosíntesis de GPI en distintos organismos</i>	39
Remodelación del ácido graso	39
Intercambio de glicerolípido por esfingolípido	41
Acilación del inositol	41
Adición de fosfoetanolaminas extras	43
<i>Regulación de la biosíntesis de GPI</i>	44
Función de las anclas GPI	45
<i>Funciones especializadas en parásitos protozoarios</i>	47
 Capítulo 3: Fosfolipasas y señalización celular	48
Fosfatidilinositol-fosfolipasas C (PI-PLC)	49
<i>Fosfatidilinositol fosfolipasas C específicas de origen bacteriano</i>	49
<i>Glicosil-fosfatidilinositol fosfolipasa C de T. brucei (GPI-PLC)</i>	50
<i>Glicosil-fosfatidilinositol fosfolipasa C de semilla de maní</i>	51
<i>Fosfatidilinositol fosfolipasa C específica de T. cruzi</i>	51
Fosfolipasas A de trypanosomas	53
Función de los glicerolípidos y esfingolípidos en la señalización celular	54
<i>Glicerolípidos como segundos mensajeros: Diacilglicerol</i>	54
<i>Esfingolípidos como segundos mensajeros</i>	55
Metabolismo de ceramida en mamíferos y en levaduras	56
Actividad biológica de la ceramida	60

RESULTADOS Y DISCUSION

Capítulo 4: Extracción, fraccionamiento y caracterización de los inositolfosfo-

lípidos (IPLs) de formas epimastigote de <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
Extracción y purificación	62
Análisis estructural de los lípidos ácidos	66
<i>Identificación de inositol</i>	68
Análisis de Fr1 (PI)	69
<i>Identificación de los glicerolípidos</i>	72
Análisis de Fr2 (IPC)	81

Capítulo 5: Análisis de lípidos libres de formas amastigote y su variación en el **proceso de diferenciación morfológica *in vitro***

Ceramida y alquilglicerol	94
Acidos grasos	99
Alquilacilglicerol	102
Inositolfosfolípidos y precursores de GPI	103

Capítulo 6: Porción lipídica del ancla de la glicoproteína Ssp-4 de *Trypanosoma cruzi*

Anclas GPIs en <i>Trypanosoma cruzi</i>	110
Antígeno de superficie Ssp-4 de formas amastigotes de <i>T. cruzi</i>	111
Lípido del ancla de la glicoproteína Ssp-4	112

Capítulo 7: Actividades de fosfolipasas y lipasas en membranas de *Trypanosoma cruzi*

Actividad de fosfolipasa C en membranas de <i>T. cruzi</i>	121
<i>Efecto de inhibidores sobre la actividad de PI-PLC y de IPC-PLC</i>	129
Actividad de fosfolipasas A ₁ y A ₂ y de aciltransferasa	130

Actividad de inositolfosfoceramida-acil hidrolasa y –acil transferasa	138
Actividad de DAG/AAG y ceramida lipasas	141
Capítulo 8: Biosíntesis de glicoinositolfosfolípidos en <i>Trypanosoma cruzi</i>.	
Incorporación de [³H]-GlcNAc en sistema <i>in vitro</i>.	143
Incorporación de GlcNH ₂ a partir de UDP-6-[³ H]-GlcNAc	144
Caracterización de posibles precursores de GPI	147
<i>Compuesto I</i>	148
<i>Compuesto II</i>	149
<i>Compuesto III</i>	151
<i>Compuestos IV y IV'</i>	152
<i>Compuesto V</i>	156
Incubación en presencia de vanadato de sodio	159
Incorporación de GlcNH ₂ en membranas tratadas con tunicamicina	159
Incubación en presencia de GTP	162
Conclusiones	162
Capítulo 9: Síntesis química y enzimática de alquilacilglicerol	
Uso de lipasas en solventes orgánicos	165
Esterificación enzimática del 1- <i>O</i> -hexadecil- <i>rac</i> -glicerol	167
<i>Efecto del solvente</i>	172
<i>Efecto de la temperatura de reacción</i>	176
Síntesis química del 1- <i>O</i> -hexadecil-2- <i>O</i> -hexadecanoil- <i>rac</i> -glicerol y del 1- <i>O</i> -hexadecil-3- <i>O</i> -hexadecanoil- <i>rac</i> -glicerol	178
Capítulo 10: PARTE EXPERIMENTAL	
Instrumental utilizado	183
Solventes	184
Soluciones centelleadoras	184

Técnicas cromatográficas	185
<i>Cromatografía en capa delgada</i>	185
Cromatografía de adsorción en fase normal	185
Cromatografía en fase reversa	185
Elución de muestras de la sílica	186
Métodos de revelado	186
Autorradiografías	187
Cuantificación de las muestras radioactivas	187
<i>Cromatografía en columna</i>	187
Acido silícico o sílica	187
Columnas de fase reversa C18	188
<i>Cromatografía de intercambio iónico</i>	188
<i>Cromatografía gaseosa capilar</i>	189
<i>Cromatografía gaseosa / espectrometría de masa</i>	189
Preparación de derivados	190
Hidrólisis básicas	191
<i>Saponificación</i>	191
<i>Tratamiento con NaOH 1M a 105°C</i>	191
<i>Tratamiento con propanol/NH₃</i>	191
<i>NH₄OH 9M</i>	191
Hidrólisis ácidas	192
<i>HCl 4N</i>	192
<i>Metanólisis</i>	192
<i>Hidrólisis ácida suave para azúcares-1-fosfato</i>	192
<i>Tratamiento con HNO₂</i>	192
<i>Tratamiento con HF</i>	193
Hidrólisis enzimáticas	193
<i>Tratamiento con fosfatidilinositol fosfolipasa C</i>	193
<i>Tratamiento con fosfolipasa A₂</i>	194

<i>Tratamiento con fosfatasa alcalina</i>	194
<i>Tratamiento con α-manosidasa</i>	194
Hidrogenación catalítica	194
Preparación de [^3H]-2,5-anhidromanitol	195
Parásitos	195
Incorporaciones metabólicas de precursores radioactivos	196
Inmunoprecipitación de la glicoproteína Ssp-4 de formas amastigote	197
Extracción y purificación de inositolfosfolípidos	197
Utilización de sistemas libres de células para estudios de biosíntesis de precursores de GPI	198
<i>Preparación de lisados de membrana</i>	198
<i>Extracción de los lípidos radioactivos del sistema de membranas</i>	198
Estudio de actividad de fosfolipasas en membranas de <i>T. cruzi</i>	199
Incorporación de UDP-[^3H]-UDP-GlcNAc en sistemas libres de células	200
Preparación de estándares de alquilacilglicerol	200
<i>Esterificación de 1-O-hexadecilglicerol por medio de lipasas</i>	200
Determinación del solvente y de la temperatura óptima de reacción	201
Purificación de los alquilacilglicerol por cromatografía en columna	201
<i>Síntesis química de 1-O-hexadecil-2-O-hexadecanoilglicerol (4) y de 1-O-hexadecil-3-O-hexadecanoilglicerol (5)</i>	201
Preparación del tritil derivado del 1-O-hexadecilglicerol (2)	201
Acilación del 1-O-hexadecil-3-O-tritilglicerol	202
Destritilación del 1-O-hexadecil-2-O-hexadecanoilglicerol-3-O-tritilglicerol (3). Obtención del 1-O-hexadecil-2-O-hexadecanoilglicerol (4) y del 1-O-hexadecil-3-O-hexadecanoilglicerol (5)	202
Cuantificación de alquilacilglicerol	204

RESUMEN	205
REFERENCIAS	211

INTRODUCCION

CAPITULO 1 *Trypanosoma cruzi*

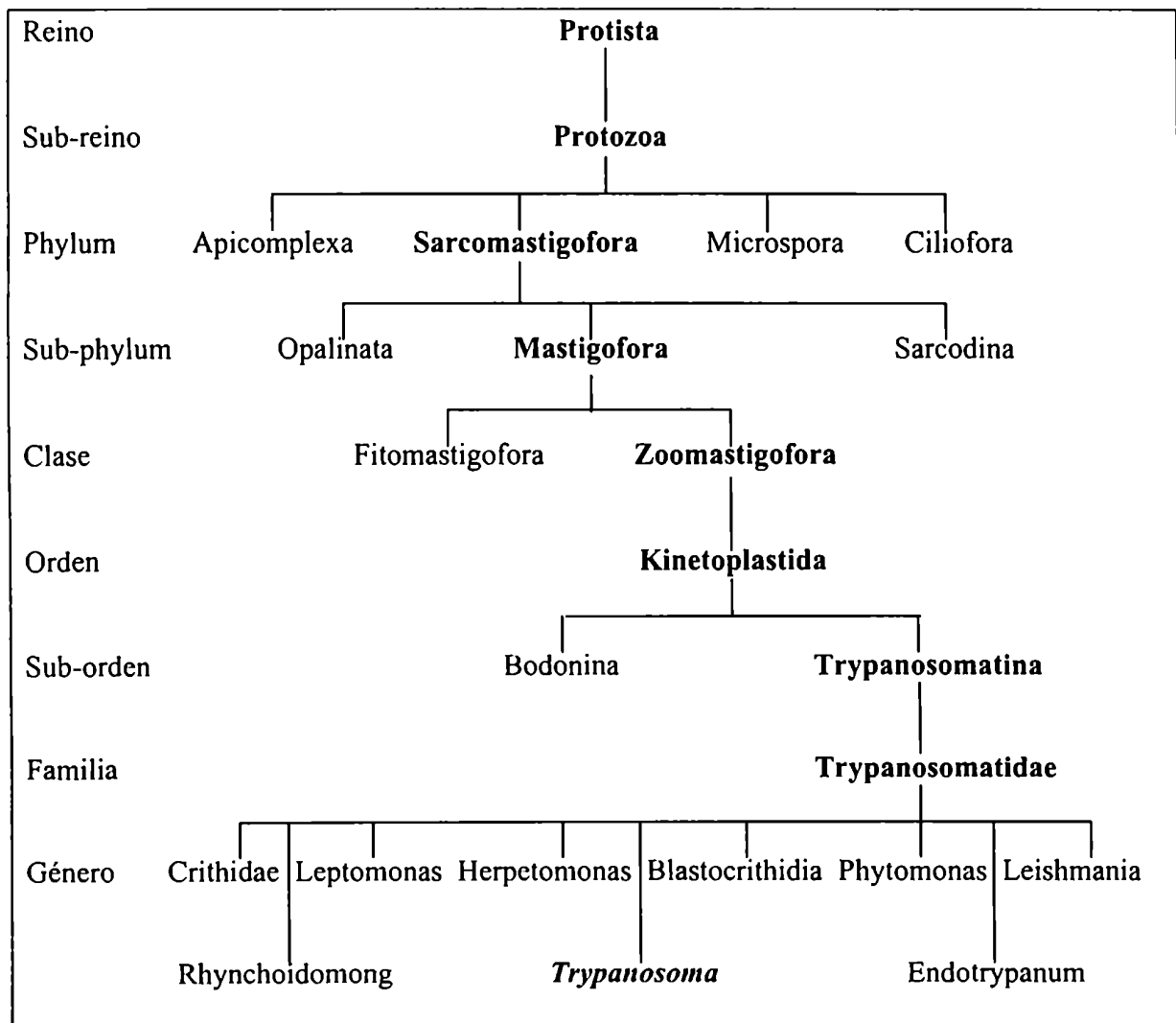
TRYPANOSOMA CRUZI

Trypanosoma cruzi, protozooario flagelado, es el agente causante de la enfermedad de Chagas o trypanosomiasis americana. Las estimaciones sobre la mortalidad por esta enfermedad oscilan entre 16 y 18 millones de personas en América Latina. Resulta ser una de las principales causas de mortalidad en esta región, debido a que la amplia distribución del insecto vector y su relativa resistencia a los insecticidas más comunes, favorecen su supervivencia. A ello se suman las condiciones de pobreza, la falta de agentes inmunoprolácticos y de tratamientos efectivos que logren la cura de la enfermedad.

El insecto vector es un insecto hematófago perteneciente a la familia *Reduviidae* y a la sub-familia *Triatominae*. Las especies más involucradas en la transmisión del *T. cruzi* son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus*.

TAXONOMIA

Trypanosoma cruzi, pertenece a uno de los grupos de organismos más primitivos y especializados del reino animal. En el Esquema 1 se muestra la clasificación taxonómica más moderna que lo ubica dentro de la familia Trypanosomatidae (Molyneux & Ashford, 1983).



Esquema 1 – Clasificación taxonómica del *Trypanosoma cruzi*.

ESTADIOS DE DIFERENCIACION Y CICLO DE VIDA

El *T. cruzi* es un parásito protozoario cuyo ciclo de vida alterna entre huéspedes vertebrados e invertebrados. Presenta tres estadios principales de diferenciación: amastigotes, trypomastigotes y epimastigotes, en los cuales se distinguen tres estructuras características del orden kinetoplástico: el kinetoplasto, el cuerpo basal y el flagelo. La posición del flagelo en relación con el kinetoplasto y el punto por el cual emerge de la célula es la característica morfológica utilizada como base para la clasificación de los distintos estadios.

- Amastigotes: Son células esféricas de 2,4-6,5 μm de diámetro. Presentan un flagelo muy corto y representan la forma divisible en el citoplasma de la célula del huésped mamífero (Colli, 1979).
- Epimastigotes: Presenta el kinetoplasto anterior al núcleo y la base del flagelo próxima al kinetoplasto. Representan la forma divisible dentro del lumen del intestino medio del insecto vector donde se multiplica por fisión binaria. Miden aproximadamente 20-40 μm de largo y poseen gran movilidad (Colli, 1979).
- Trypomastigotes (formas metacíclicas y sanguíneas): Posee el kinetoplasto posterior al núcleo, y el flagelo, que también sale de la parte posterior al núcleo, acompaña al cuerpo del parásito con una membrana ondulante que lo envuelve. Aparece en el lumen del recto del insecto vector y en la sangre del mamífero. Estas formas móviles, no pueden dividirse, son invasivas y están dotadas de un mecanismo aún no conocido de penetración celular y de resistencia contra los mecanismos de defensa de lisosomas y citoplásmicos. Miden de 11 a 30 μm de largo.

En la Figura 1 se puede observar un esquema del ciclo de vida del *T. cruzi*. La infección se inicia en los mamíferos con la picadura del insecto vector que, al momento de alimentarse con la sangre del vertebrado, deposita sus heces conteniendo formas trypomastigote metacíclicas (las formas infectivas del parásito), en la proximidad de la picadura. El escozor producido incita al rascado y de esta forma el parásito penetra a través de las lesiones que así se generan y llega a la circulación sanguínea. En el huésped vertebrado el *T. cruzi* es un patógeno intracelular obligado ya que debe entrar en las células del huésped para replicarse. Una vez en el interior del huésped vertebrado los trypomastigotes invaden células a través de la formación de una vacuola unida a la membrana iniciando el ciclo intracelular que dura entre 4-5 días. Pueden penetrar en células fagocitarias (macrófagos) y en células de otros tejidos como fibroblastos, células musculares y epiteliales. La primera organela del parásito que penetra la membrana de la célula huésped es el flagelo. El primer paso del ciclo intracelular es la ruptura de la membrana vacuolar que ocurre entre la primera y segunda hora de la invasión y una vez alcanzado el citoplasma los trypomastigotes se diferencian en amastigotes. Estos luego de un período de aproximadamente 20 h comienzan su división por fisión binaria. Luego de varias generaciones, 24 horas antes de que el parásito escape de la célula, las formas amastigote se diferencian a trypomastigotes, la célula huésped se rompe y los parásitos son liberados a la circulación sanguínea donde pueden infectar otras células (Colli, 1979; Burleigh & Andrews, 1995). El ciclo se cierra al alimentarse el insecto vector con sangre infectada. Los trypomastigotes sanguíneos ingeridos se diferencian a epimastigotes en el intestino medio. Estas células se multiplican y para el tercer o cuarto día aparecen en el recto. Al quinto día se diferencian a formas trypomastigotes metacíclicas que son eliminadas con las heces.

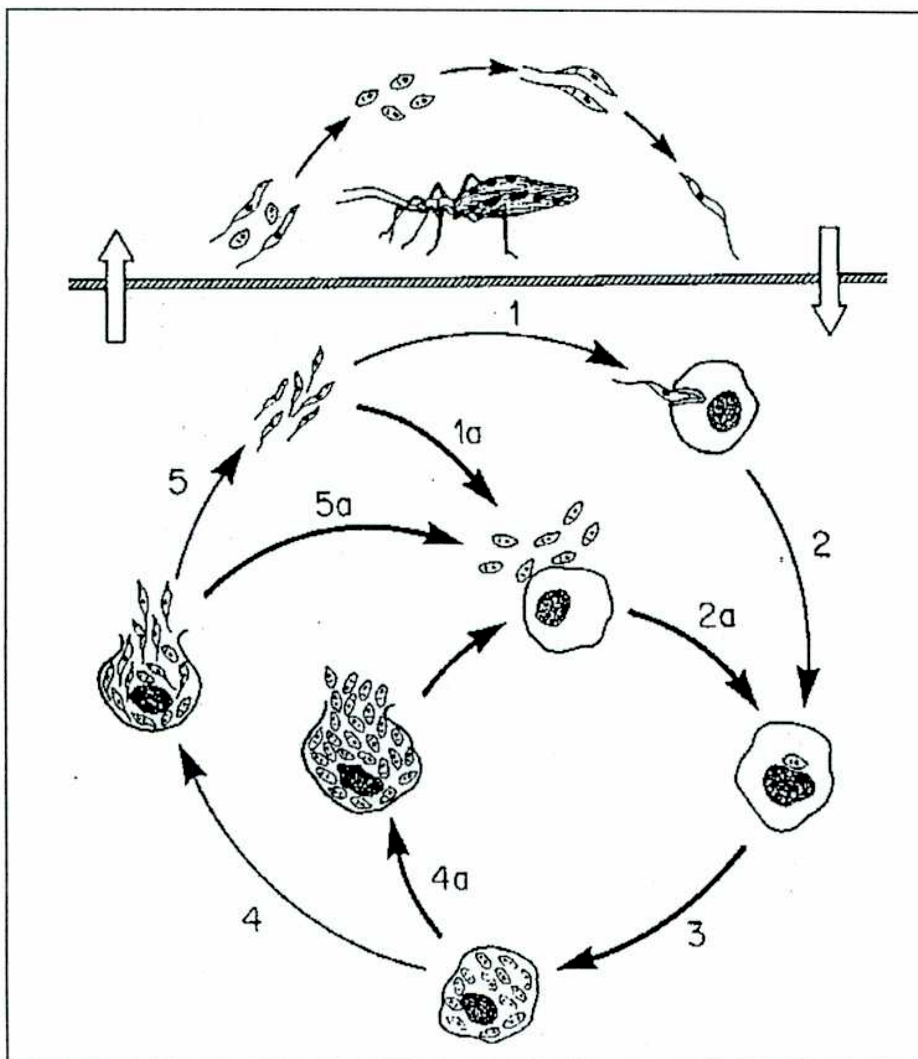


Figura 1 – Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*. (1) Los trypomastigotes metacíclicos invaden las células del huésped vertebrado, (2) luego se escapan de la vacuola y se transforman en amastigotes. (3) Estos se replican en el citoplasma y (4) se diferencian a trypomastigotes sanguíneos, (5) que son liberados por ruptura de la célula huésped. Un subciclo alternativo puede tener lugar en el vertebrado cuando los amastigotes, ya sea, (4a, 5a) provenientes de una ruptura prematura de la célula huésped o (1a) por diferenciación extracelular de trypomastigotes, (2a) son ingeridos por los macrófagos, donde pueden sobrevivir y completar el ciclo de vida intracelular (Burleigh & Andrews, 1995).

MORFOGENESIS DE FORMAS VERTEBRADAS DEL TRYPANOSOMA CRUZI Y ANTIGENOS DE SUPERFICIE ESTADIO-ESPECIFICOS

El proceso de transformación de trypomastigotes en amastigotes puede ser reproducido *in vitro* incubando a 37°C los trypomastigotes alargados recién liberados de células infectadas. A medida que transcurre la incubación en ausencia de células se empiezan a detectar progresivamente formas más anchas. Los cambios se completan a las 24-48 h de incubación extracelular cuando aparece una población homogénea de amastigotes. En la superficie de estos parásitos se han identificado cuatro antígenos diferentes, denominados Ssp-1 a Ssp-4 (Andrews *et al.*, 1987).

Los trypomastigotes intracelulares y el 90% de los trypomastigotes alargados recién liberados de la célula presentan el antígeno Ssp-1. Este antígeno desaparece progresivamente de la superficie celular. A las 2 h una gran proporción de este antígeno es liberado y puede inmunoprecipitarse del sobrenadante de incubación y luego de 12 h de incubación extracelular ya no es detectable.

También se detectó en los trypomastigotes intracelulares y en un 60% de los parásitos recién liberados la glicoproteína Ssp-2. A medida que los trypomastigotes se van diferenciando disminuye la cantidad de células que expresan el antígeno Ssp-2, que ya no es detectable luego de 24 a 48 h de incubación extracelular.

El antígeno Ssp-3 se detectó principalmente en los trypomastigotes más anchos y en formas intermedias. A diferencia de lo que ocurre con Ssp-1 y Ssp-2, hay un aumento en la expresión de este antígeno entre las 0-6 h de diferenciación extracelular. El porcentaje de células positivas disminuye entre las 12-24 h y luego de las 48 h, cuando sólo hay amastigotes presentes, Ssp-3 deja de ser detectable en la superficie celular.

Si se efectúa una incubación extracelular a 37°C, se observa que una gran proporción de los parásitos presenta el antígeno Ssp-4 en paralelo con su transformación a amastigotes. Luego de 48 h todos los parásitos son redondeados y expresan esta glicoproteína. Esto indica que Ssp-4 es un antígeno específico de los

amastigotes. El Ssp-4 se detectó en parásitos intracelulares unas horas después de infectar las células con trypomastigotes de cultivo celular. A las 96-100 h el Ssp-4 fue sólo detectado débilmente en escaso número de las células infectadas mientras que Ssp-1, Ssp-2 y Ssp-3 estaban presentes en los parásitos con morfología de trypomastigotes (Andrews *et al.*, 1987).

DIVERSIDAD BIOLOGICA ENTRE CEPAS DE *T. CRUZI*

El término cepa se aplica a una dada población de parásitos aislada de un huésped mamífero o invertebrado y establecida en cultivos o mantenida en animales de laboratorio (Colli, 1979). Las diferentes cepas pueden variar en cuanto a cinética de crecimiento, virulencia, habilidad para inducir lesiones, susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos, infectividad, tropismo celular, duración del ciclo celular, isoenzimas y constitución antigénica (Brenner, 1980). Las cepas Y y CL, por ejemplo, difieren en la mayoría de estos parámetros por lo que son consideradas cepas 'polares' (Brenner, 1977). Los trypomastigotes de la cepa Y son más infectivos y presentan una mayor velocidad de replicación que los de la cepa CL.

INVASION A LA CELULA HUESPED

Una característica del *T. cruzi* es su capacidad para invadir una gran variedad de células vertebradas. Los epimastigotes no infectan al mamífero ya que no tienen capacidad de penetrar las células, excepto a los macrófagos, que los ingieren y destruyen. Estos fagocitan los parásitos, la vacuola fagocitaria se fusiona con los lisosomas y los epimastigotes son destruidos rápidamente dentro de los fagolisosomas mientras que los trypomastigotes escapan y se diferencian en el citoplasma (Milder & Kloetzcl, 1980; Nogueira & Cohn, 1976). Los amastigotes también son internalizados

por los macrófagos dentro de los cuales escapan del fagolisosoma y se replican con normalidad en el citoplasma (Ley *et al.*, 1988). Así se inicia un modo de propagación alternativo, que puede ser significativo para la supervivencia del parásito en presencia de una respuesta citotóxica, donde la lisis de las células infectadas llevaría a la liberación de amastigotes intracelulares viables (Burleigh & Andrews, 1995).

Dado que ambos, epimastigotes y trypomastigotes, se unen a la célula del mamífero, pero sólo los últimos la penetran, es posible que las estructuras responsables de la adhesión e interiorización sean distintas (Andrews & Colli, 1982).

Adhesión a la célula huésped

La invasión celular involucra una interacción entre componentes complementarios en la célula huésped y la superficie del parásito.

Si se considera que la superficie de las membranas de la célula huésped y la de los trypomastigotes son las primeras organelas que interactúan, hay que tener en cuenta las diferencias y similitudes de estas membranas entre los distintos estadios. *In vitro* se han encontrado diferencias en los índices de infección dependiendo de la línea celular y de la cepa de *T. cruzi* utilizada. Esto sugiere que la interacción entre el parásito y la célula huésped es dependiente de las características biológicas particulares de ambas células interactuantes.

La unión del parásito a la célula de mamífero es sensible a inhibidores de la fosforilación oxidativa lo que sugiere que este es un proceso dependiente de la energía.

Las $\beta 1$ -integrinas forman parte de una familia de proteínas que unen la matriz extracelular al citoesqueleto cortical, y serían los receptores para la unión del *T. cruzi*, ya que anticuerpos específicos contra éstas, tienen un efecto inhibitorio significativo en la invasión (Fernández *et al.*, 1993). Dado que las $\beta 1$ -integrinas están involucradas en la transducción de señales (Hynes, 1992) son buenas candidatas para mediar los cambios celulares que acompañan la invasión del *T. cruzi*.

Utilizando líneas celulares mutantes deficientes en ácido siálico de superficie, resistentes a la invasión, se demostró que el ácido siálico del huésped está involucrado

en la infección (Schenkman *et al.*, 1993a; Ming *et al.*, 1993). La invasión en estas células mutantes puede restablecerse re-sialilando con la trans-sialidasa de *T. cruzi* en presencia de un donador de ácido siálico. El reconocimiento de otros azúcares también tendría un rol en la unión del parásito.

El hecho de que el *T. cruzi* puede invadir muy distintos tipos de células *in vitro* sugiere que su heterogeneidad de glicoproteínas de superficie le imparte la habilidad para unirse a muy diferentes receptores específicos. Podría interactuar con varias moléculas distintas pero con similares características bioquímicas. El tipo de interacción ligando-receptor podría variar en los distintos tipos celulares.

Interiorización del parásito en la célula huésped

Estudios ultraestructurales han clarificado el mecanismo de invasión del *T. cruzi* a células no-fagocíticas. Este mecanismo involucra la formación, alrededor del trypomastigote, de una vacuola fuertemente unida a la membrana. En principio se creía que esta vacuola se originaba de la membrana plasmática de la célula huésped. A través de micrografías electrónicas se observó a los trypomastigotes entrando en las células sin formación de pseudópodos ni cualquier otra alteración de la membrana plasmática del huésped (Schenkman *et al.*, 1988a), características clásicas de la fagocitosis. La citocalasina D, inhibidor de la fagocitosis, no evitó sino que aumentó la entrada de trypomastigotes en varios tipos celulares (Schenkman *et al.*, 1991; Tardieux *et al.*, 1992). Esto abre la posibilidad de que la membrana requerida para formar la vacuola intracelular durante la internalización se origine a partir de organelas internas.

En las primeras etapas del proceso de invasión se detectó una asociación inusual de los lisosomas de la célula huésped con los trypomastigotes. Utilizando distintos métodos se demostró que los lisosomas se agrupaban muy cerca de la membrana en la región de contacto con los trypomastigotes. Por otra parte, pudieron detectarse marcadores lisosomales en vacuolas parcialmente formadas rodeando al parásito, lo cual sugirió, que la fusión gradual de lisosomas provee la membrana requerida para la formación de la vacuola (Tardieux *et al.*, 1992).

El primer factor que asegura la continuidad del ciclo biológico del *T. cruzi* es su efectividad para penetrar las células. La penetración celular y la resistencia a la lisis intracelular son los mecanismos que aparentemente son fundamentales para la supervivencia de la especie (Colli, 1979). Estos eventos implican el disparo de mecanismos de transducción de señales. Varios investigadores observaron que para la fusión de los lisosomas con la membrana plasmática y la invasión se requiere un aumento en el Ca^{2+} citosólico de la célula huésped (Tardieux *et al.*, 1994; Moreno *et al.*, 1994). Este efecto se debería a factores solubles del trypomastigote que también provocarían la hidrólisis de fosfoinosítidos, y a señales inducidas por el contacto con la célula huésped. Estas señales disparadas en la célula huésped y en el *T. cruzi* durante las primeras interacciones parásito-huésped serían la clave reguladora del proceso de invasión (Burleigh & Andrews, 1998).

Dado que la entrada del parásito a la célula involucra un proceso de contacto, de reconocimiento, de unión y de interiorización, los componentes de la superficie celular deben estar involucrados en estos procesos.

La infección de células de vertebrados por *T. cruzi* es modulada por el ciclo de dichas células (Dvorak y Crane, 1981). Es probable que en alguna etapa del ciclo, la célula huésped exprese la mayor concentración de componentes de superficie que actúan como receptores para la interiorización del *T. cruzi*.

Células Vero y macrófagos tratados con tripsina y quimotripsina fueron menos susceptibles a la infección que células control (Alcantara & Brener, 1978; Piras *et al.*, 1980; Henriquez *et al.*, 1981). El tratamiento con lectinas como Con A y WGA antes de la infección, mostraron una inhibición del 60-70% en la interiorización del parásito (Piras *et al.*, 1983). En macrófagos de ratón y mioblastos de rata tratados con α -manosidasa se observó una disminución significativa de la adhesión e interiorización de los trypomastigotes (Villalta & Kierszenbaum, 1983). Esto sugiere que las glicoproteínas y/o glicolípidos de superficie de la célula huésped son necesarios para la unión y la invasión y que el mantenimiento de la arquitectura de la membrana

plasmática juega un rol importante en la internalización del parásito (Zingales & Colli, 1985).

Por otra parte la remoción de moléculas de superficie del parásito provocó una drástica reducción de la capacidad invasiva (Andrews *et al.*, 1984) y varios de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la superficie celular del parásito inhiben la invasión (Alves *et al.*, 1986; Ramirez *et al.*, 1993).

Por otra parte la falta de especificidad del parásito en cuanto a su capacidad de invadir distintos tipos celulares, implica que probablemente la interacción dependa más de las propiedades de la superficie celular del parásito, que de la presencia de estructuras específicas del huésped, a menos que esas estructuras sean ubicuas.

INTRODUCCION

CAPITULO 2

Glicosilfosfatidilinositoles como anclas de proteínas de membrana.

Estructura y biosíntesis

GLICOSILFOSFATIDILINOSITOLES COMO ANCLAS DE PROTEINAS DE MEMBRANA. ESTRUCTURA Y BIOSINTESIS

ANCLAJE DE PROTEINAS A LA MEMBRANA

Muchas proteínas están unidas a la membrana por interacciones hidrofóbicas entre el interior de la bicapa lipídica y una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos (Capaldi, 1982). Estas fuerzas no sólo son importantes para unir estas proteínas a la membrana, sino también para permitir que la proteína adopte su conformación y orientación correcta para llevar a cabo su función. Pero existen otras formas de anclaje de proteínas de superficie.

En la Figura 2 hay un resumen de los distintos tipos de interacciones entre las proteínas y la bicapa lipídica de la membrana celular. En algunos casos una gran proporción de la proteína se encuentra enterrada en la membrana (**a**), mientras que en otros casos, sólo hay una secuencia corta de aminoácidos hidrofóbicos y grandes dominios hidrofílicos a uno o ambos lados de la membrana celular.

En ocasiones, este polipéptido hidrofóbico atraviesa la membrana (**b**); en otras, con una única región hidrofílica esta secuencia polipeptídica hidrofóbica está localizada en el extremo COOH- o -NH₂ de la proteína y no necesariamente atraviesa la membrana, pudiendo asumir una orientación relativamente variable (**c**).

También se ha observado que muchas proteínas tienen un lípido unido en forma covalente. Por ejemplo, un ácido graso puede estar acilando el amino terminal o un residuo de cisteína con la formación de un tioéster (Schmidt, 1989; James & Olson, 1990; Gordon *et al.*, 1991); o un grupo prenilo de cadena larga puede unirse en forma covalente a un residuo de cisteína (Glomset *et al.*, 1990, Deschenes *et al.*, 1990, Maltese, 1990) (**d,e**).

En los últimos años se ha descripto un nuevo tipo de anclaje de proteínas a través de un glicosilfosfatidilinositol (GPI) (**f**). La diversidad de proteínas a las cuales está unido el GPI hace suponer que cumple funciones adicionales al anclaje.

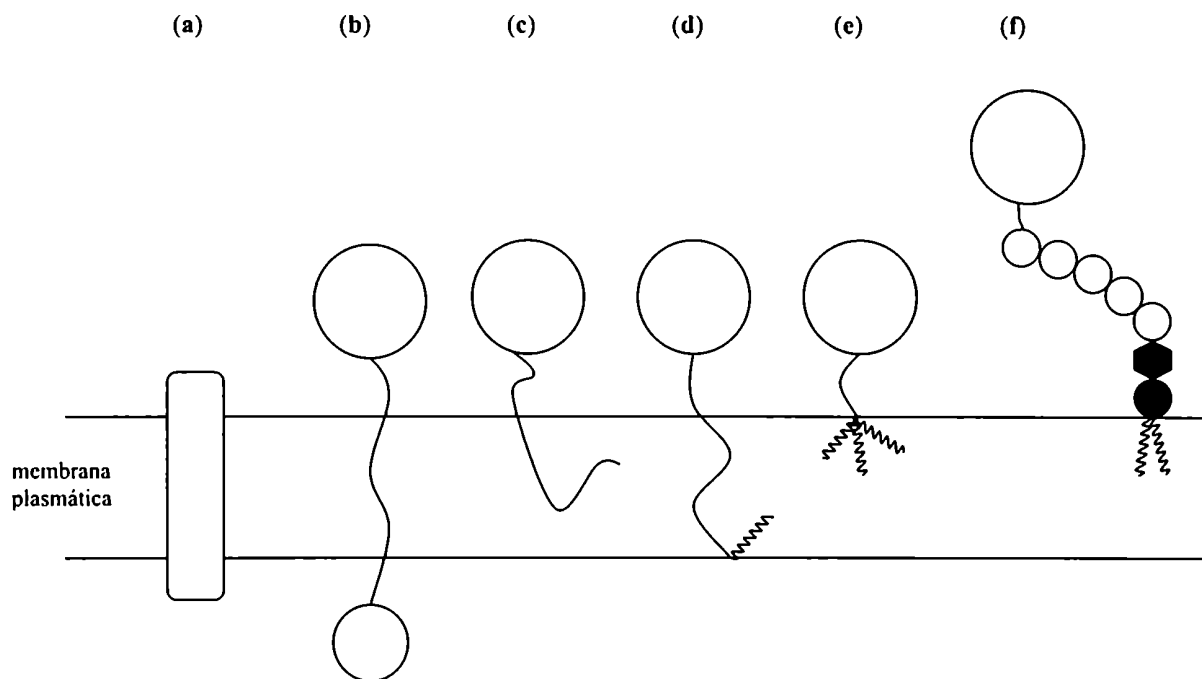


Figura 2 – Anclaje de proteínas a la membrana.

Los primeros indicios de que el fosfatidilinositol (PI) estaba involucrado en la unión de las proteínas a la membrana lipídica, se obtuvieron al observarse que la fosfatasa alcalina de tejidos de mamífero podía ser liberada de la membrana por tratamiento con fosfolipasa C de *Bacillus cereus*, parcialmente purificada, que aparentemente tenía cierta especificidad por PI (Slein & Logan, 1965). Esto se confirmó posteriormente utilizando fosfolipasa C específica para PI (PI-PLC), purificada de varias especies bacterianas (Ikezawa, *et al.*, 1976; Low & Finean, 1977a, 1977b; Taguchi *et al.*, 1980).

Los estudios realizados sobre la acetilcolinesterasa (AChE) de *Torpedo* demostraron que el efecto liberador de estas enzimas era causado por la degradación de una molécula de PI unida covalentemente al sitio de unión a membrana de la proteína (Futerman *et al.*, 1985a).

La determinación de la hidrofobicidad de la fosfatasa alcalina y la AChE, entre otras proteínas, indicó que el tratamiento con PI-PLC removía el dominio hidrofóbico de anclaje. Este dominio hidrofóbico estaba fuertemente asociado a la proteína ya que la sensibilidad a la PI-PLC era retenida durante la solubilización con butanol o detergentes.

Estas proteínas, por otra parte, no se re-asociaban a la membrana una vez hidrolizadas con PI-PLC y no podían ser liberadas de la membrana por variación del ambiente iónico.

Estas observaciones confirmaron que la interacción entre PI y la proteína es irreversible y de carácter no-iónico y llevaron a la conclusión de que estas proteínas están ancladas a la membrana a través de una interacción covalente con la cabeza polar del GPI (Low & Zilversmit, 1980; Futerman *et al.*, 1985). Sin embargo, en ausencia de evidencias químicas directas esta propuesta fue ignorada por mucho tiempo.

La primera evidencia química de una unión covalente entre un fosfolípido y una proteína surgió del trabajo con el antígeno de rata Thy-1 que desarrolló el grupo de Williams, quienes encontraron cantidades estequiométricas de etanolamina (EtN) y ácido graso unido al fragmento proteolítico C-terminal (Campbell *et al.*, 1981).

Posteriormente Holder demostró que la EtN está unida en forma de amida al aminoácido C-terminal de la glicoproteína variable de superficie (VSG) de *T. brucei* y que está asociada a un glicano (Holder & Cross, 1981; Holder, 1983).

Hasta ese momento la VSG de *T. brucei* se había aislado en forma soluble (sVSG) sin evidencia de un sitio de inserción hidrofóbico a la membrana que diera cuenta de su asociación estable con ella. Cardoso de Almeida y Turner en 1983 aislaron por primera vez la VSG unida a membrana (mfVSG). Esto sugirió que el ancla de la VSG era de naturaleza lipídica. Análisis químicos posteriores confirmaron esta hipótesis (Ferguson & Cross, 1984; Ferguson *et al.*, 1985a) y se elucidó una estructura parcial a la que se le asignó el término glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Ferguson *et al.*, 1985b).

Al mismo tiempo también se determinó la asociación covalente de componentes GPI con otras proteínas, AChE de Torpedo (Futerman *et al.*, 1985b), Thy-1 (Tse *et al.*, 1985) y AChE de eritrocitos (Roberts & Rosenberry, 1985).

PROTEINAS QUE UTILIZAN UN GPI COMO ANCLA A LA MEMBRANA

La Tabla 1 muestra algunas de las proteínas que se encuentran ancladas covalentemente a través de un GPI. Como se puede observar este tipo de anclaje está ampliamente distribuido entre diversos organismos eucariotes, desde mamíferos, insectos, protozoarios, levaduras y plantas.

Las proteínas ancladas de esta forma son funcionalmente diversas, e incluyen enzimas hidrolíticas encontradas en varios tipos de tejido, proteínas involucradas en interacciones célula-célula, en la regulación del complemento, en la protección e invasión de parásitos y antígenos y moléculas de adhesión.

Excepto algunas proteínas de gránulos secretorios pancreático y adrenal (Fouchier *et al.*, 1988; LeBel & Beattie, 1988), todas las proteínas ancladas por GPI se encuentran en la cara exterior de la membrana celular.

Es de gran interés el hecho de que este tipo de anclaje es utilizado con mucha mayor frecuencia por los protozoarios que por los eucariotes superiores. Esto se puede apreciar en la Tabla 2.

Tabla 1 – Proteínas con un ancla glicosilfosfatidilinositol.

Proteína	Fuente
Enzimas hidrolíticas	
Fosfatasa alcalina	tejido mamífero, <i>Schistosoma</i>
5'-nucleotidasa	tejido mamífero
Acetilcolinesterasa	<i>Torpedo</i> órgano eléctrico, cerebro de insecto y células sanguíneas de mamíferos, <i>Schistosoma</i>
Fosfodiesterasa alcalina I	tejido de ratas
proteínasa gp63	<i>Leishmania mayor</i>
Dipeptidasa	riñón de cerdo, pulmón ovino
proteínasa p76	<i>Plasmodium falciparum</i>
Lipasa lipoproteica	3T3-L1 adipocitos
Antígenos de mamíferos	
Thy-1	cerebro y linfocitos de mamíferos
Thy-3	linfocitos de ratón
RT-6	linfocitos de rata
MEM-43	leucocitos y eritrocitos humanos
Antígenos carcinoembrionarios	células tumorales humanas
Antígenos de protozoarios	
Ssp-4	<i>Trypanosoma cruzi</i>
1G7	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Glicoproteína variable de superficie (VSG)	<i>Trypanosoma brucei</i>
Prociclina	<i>Trypanosoma brucei</i>
Antígenos de superficie	<i>Paramecium primaurelia</i>
Antígeno de 195 kDa	<i>Plasmodium falciparum</i>
Receptor transferrínico	<i>Plasmodium falciparum</i>
P30	<i>Toxoplasma gondii</i>
Interacción célula-célula	
LFA-3	células sanguíneas humanas
Heparán sulfato proteoglicano	hepatocitos de ratas
Sitio A de contacto	<i>Dictyostelium discoideum</i>
F11	cerebro de pollo
Proteína reguladora del complemento	
DAF	células sanguíneas humanas

Tabla 2 – Presencia de proteínas ancladas por GPI en parásitos protozoarios.

Especie	Proteína	Propiedades	Referencia
<i>Trypanosoma brucei</i>	Glicoproteína variable de superficie (VSG)	Proteína de superficie de trypomastigotes sanguíneos	Ferguson <i>et al.</i> , 1988
	Proteína ligadora de transferrina	Proteína de superficie de trypomastigotes sanguíneos	Schell <i>et al.</i> , 1991
	PARP/prociclina	Proteína de superficie de formas procíclicas	Clayton & Mowatt, 1989
	Trans-sialidasa	Proteína de superficie de formas procíclicas	Engstier <i>et al.</i> , 1992
<i>T. congolense</i> / <i>T. equiperdum</i>	Glicoproteína variable de superficie	Proteína de superficie de trypomastigotes sanguíneos	Lamont <i>et al.</i> , 1987; Ross <i>et al.</i> , 1987
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Ssp-4	Proteína mayoritaria de sup. de amastigotes	Andrews <i>et al.</i> , 1988; Bertello <i>et al.</i> , 1996
	Antígeno 1G7	Proteína mayoritaria de sup. de trypomastigotes metacíclicos	Schenkman <i>et al.</i> , 1988b; Guthrie <i>et al.</i> , 1992.
	Gp 50-55	Antígeno de formas trypo/epi/amastigote	Hernandez-Munain <i>et al.</i> , 1991
	Antígeno 10D8	Aceptor de ácido siálico de epimastigotes	Schenkman <i>et al.</i> , 1993b
	TCNA/SAPA	Familia de sialidasas de 120-200 kDa	Pereira <i>et al.</i> , 1991; Pollevick <i>et al.</i> , 1991; Schenkman <i>et al.</i> , 1992; Agusti <i>et al.</i> 1997
	Tc85	Glicoproteína de superficie de trypomastigotes	Couto <i>et al.</i> , 1993
<i>Leishmania sp.</i>	Fl-160	Antígeno del flagelo	Van Voorhis <i>et al.</i> , 1991
	Ssp-3	Aceptor de ácido siálico de trypomastigotes	Camargo <i>et al.</i> , 1997
	Antígeno 35/50 kDa	Aceptor de siálico de metacíclicos	Acosta Serrano <i>et al.</i> , 1995
	Gp63	Proteína mayoritaria de sup. de promastigotes	Etges <i>et al.</i> , 1986
<i>Crithidia fasciculata</i>	Gp42/M2	Proteína de superficie de promastigotes	Lohman <i>et al.</i> , 1990
	PSA-2	Proteína de superficie de promastigotes	Murray <i>et al.</i> , 1989
	proteasa	homóloga de gp63 de <i>Leishmania</i>	Inverso <i>et al.</i> , 1993
<i>Herpetomonas samuelpessoai</i>	proteasa	homóloga de gp63 de <i>Leishmania</i>	Schneider & Glaser, 1993
<i>Plasmodium falciparum</i>	MSA-1	Proteína mayoritaria de sup. de merozoítos	Halder <i>et al.</i> , 1985
	Prot. ligadora de transferrina	Proteína de superficie de merozoítos	Halder <i>et al.</i> , 1986
	MSA-2	Proteína de superficie de merozoítos	Smythe <i>et al.</i> , 1988

ESTRUCTURA DE GLICOINOSITOLFOSFOLIPIDOS LIBRES (GIPLs) Y COMO ANCLAS DE PROTEINAS DE MEMBRANA (GPIs)

El primer glicoconjugado con estructura de glicoinositolfosfolípido que se aisló de un parásito es el llamado lipopéptidofosfoglicano (LPPG). Este glicolípido mayoritario de la superficie celular de formas epimastigote de *T. cruzi*, fue purificado (Lederkremer *et al.*, 1976) y su posterior análisis demostró que tenía un lípido-inositol-fosfato unido a un glicano (Lederkremer *et al.*, 1978). También se determinó que el glicano se encuentra sustituido con ácido aminoetilfosfónico (Lederkremer *et al.*, 1985) y que el lípido es una ceramida (Lederkremer *et al.*, 1978).

En 1985 se determinó que esa estructura de glicoinositolfosfolípido constituía un nuevo anclaje de glicoproteínas (Ferguson *et al.*, 1985b). Así se elucidó la primera estructura química completa, la del ancla de la VSG de *Trypanosoma brucei* (Ferguson *et al.*, 1988), a la que siguieron la del antígeno Thy-1 de cerebro de rata (Homans *et al.*, 1988) y de la AChE de eritrocitos humanos (Roberts *et al.*, 1988a).

La comparación de las primeras estructuras determinadas permitió sugerir que todas las anclas GPI tienen una región que se conserva, “core”, que puede estar variablemente sustituida con azúcares y 1 o 2 etanolaminas fosfato adicionales (Figura 3).

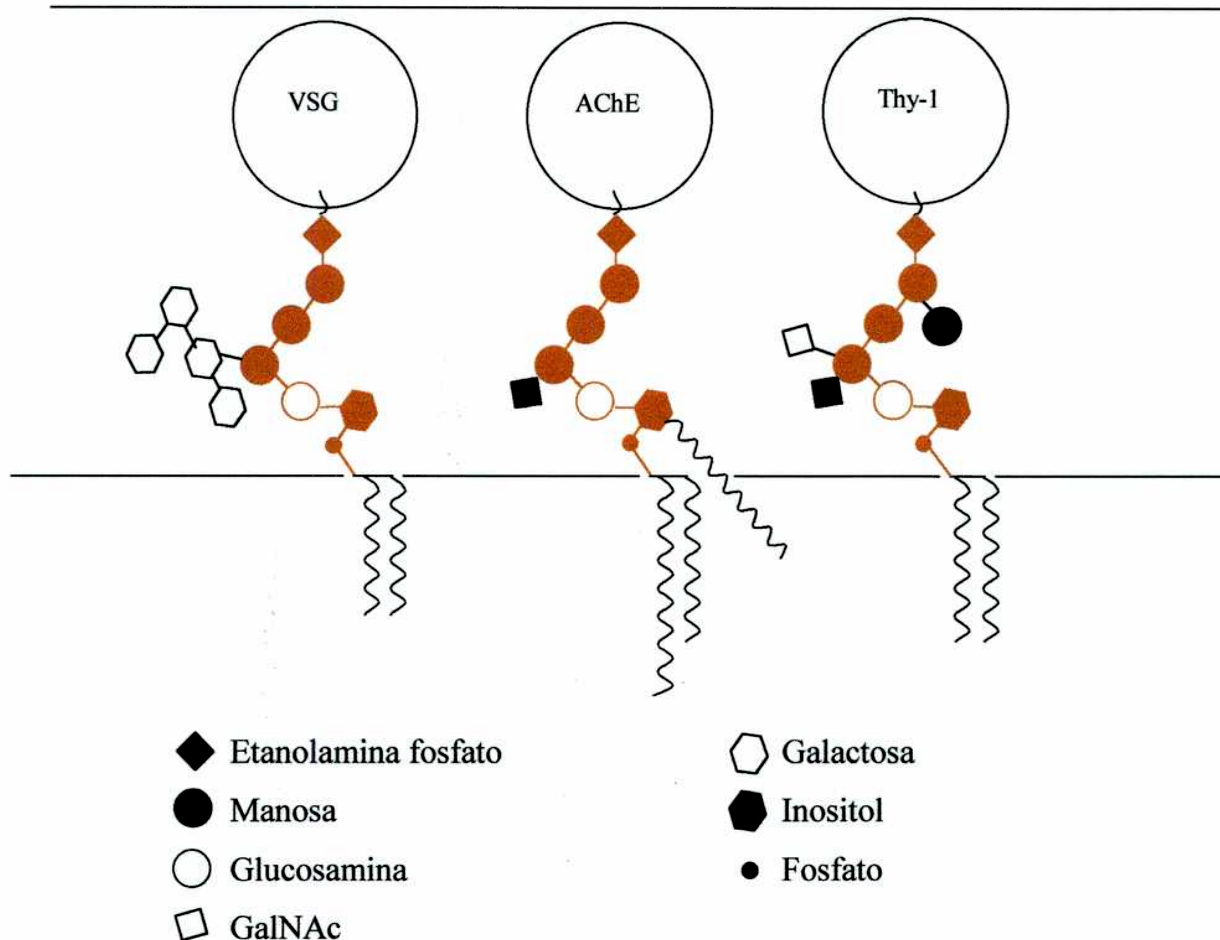


Figura 3 – Conservación y variación estructural de las anclas glicosilfosfatidilinositol. En color se presenta la estructura conservada.

La proteína está unida al GPI a través del aminoácido C-terminal. Este aminoácido varía considerablemente dependiendo de la proteína (Low, 1989a). El grupo α -carboxilo está unido al grupo amino de una fosfoetanolamina formando una unión amida y el hidroxilo de la etanolamina está unido por una unión fosfodiéster a la posición 6 de una manosa. Este residuo de manosa se encuentra en el extremo no reductor de un glicano constituido por 3 manosas y glucosamina (Figura 4).

La presencia de GlcNH_2 en lugar de glucosamina *N*-acetilada (GlcNAc) es una característica particular de las anclas GPI y se convirtió en un elemento de diagnóstico de este tipo de anclas.

Se encontraron como sustituyentes del “core”, manosa, glucosa, galactosa, *N*-acetilgalactosamina, *N*-acetilglucosamina y ácido siálico. Las cadenas laterales más elaboradas se encontraron en dos proteínas de *T. brucei*, la VSG y la proteína ácida repetitiva de formas procíclicas (PARP). El ancla de la VSG está sustituida con galactosas (Ferguson *et al.*, 1988), mientras que el ancla de la PARP tiene una cadena compleja conteniendo *N*-acetilglucosamina, galactosa y residuos de ácido siálico (Ferguson *et al.*, 1993). La ramificación con oligosacárido de α -galactosa encontrada en la VSG de *T. brucei* sería única del trypanosoma Africano (Ferguson, 1991). Se encontró una unidad de α -Gal sustituyendo la primer manosa del core en la trans-sialidasa de *T. cruzi* (Agusti *et al.*, 1998).

La presencia de por lo menos una etanolamina fosfato extra aparentemente sería una característica de los eucariotes superiores.

Los residuos de α -manosa adicionales son una modificación, encontrada con frecuencia, en eucariotes superiores e inferiores.

Como se mencionó anteriormente el “core” de GPI también se encontró en glicolípidos de membrana libres, es decir que no anclan proteínas a la membrana. Estos glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) son muy abundantes en la superficie celular de algunos trypanosomatídeos. Entre los mejor caracterizados se encuentran el lipopéptidofosfoglicano (LPPG) de formas epimastigotes de *T. cruzi* (Lederkremer *et al.*, 1990, 1991; Previato *et al.*, 1990) y el lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania donovani* (McConville *et al.*, 1987; Turco *et al.*, 1987, 1989).

La estructura completa del glicano del LPPG de *T. cruzi* se muestra en la Figura 5 (Previato *et al.*, 1990; Lederkremer *et al.*, 1991). Una característica particular de éste es la presencia de ácido aminoetilfosfónico (Lederkremer *et al.*, 1985) y de galactosa furanósica (Lederkremer *et al.*, 1980). Esta última determinada por primera vez en un trypanosomatideo por Lederkremer y col. (1980). En cuanto a la porción lipídica, el lípido encontrado en el LPPG aislado de células en la fase estacionaria de crecimiento fue una ceramida (Lederkremer *et al.*, 1990), mientras que en la fase logarítmica también se encontró alquilacilglicerol (Lederkremer *et al.*, 1993).

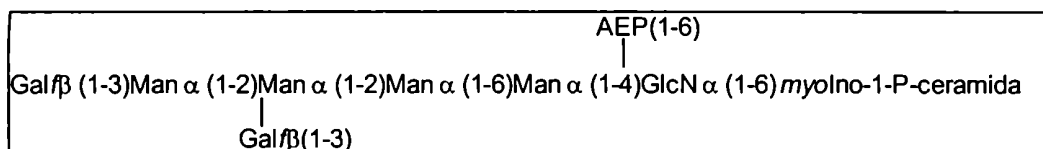
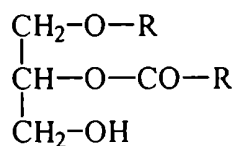


Figura 5 – Estructura más abundante del LPPG encontrada en epimastigotes de *T. cruzi*.

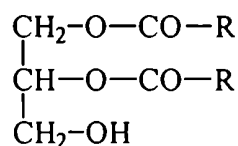
Los lípidos que se han encontrado formando parte de estas anclas son: 1,2-diacilglicerol (DAG), 1,2-alkilacilglicerol (AAG), los correspondientes *lisolípidos* (monoacilglicerol y monoalkilglicerol) y ceramida. Las estructuras de éstos se pueden observar en la Figura 6.

GLICEROLIPIDOS

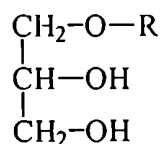
Alquilacilglicerol



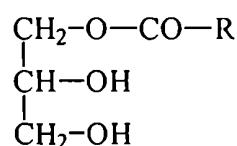
Diacilglicerol



Alquilglicerol



Monoacilglicerol



ESFINGOLIPIDO

Ceramida

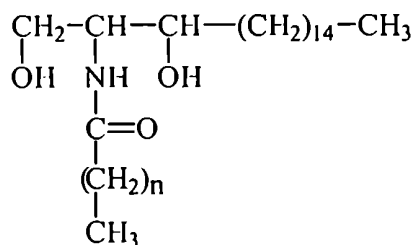
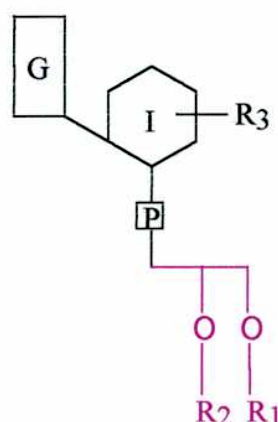
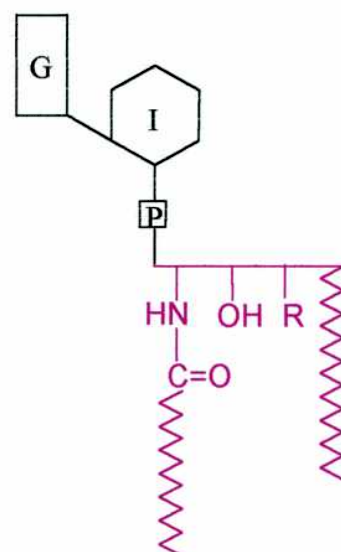


Figura 6 – Lípidos encontrados formando parte de las anclas GPI.

La porción lipídica es altamente variable. Varía la naturaleza del lípido (glicérido vs ceramida) (Tabla 3), el tipo de enlace de la cadena carbonada (éster vs éter) y el número o largo de las cadenas hidrocarbonadas. En este caso también algunas de las diferencias son especie específicas mientras que otras dependen del estadio de desarrollo del organismo (Lederkremer *et al.*, 1993; Stevens, 1995).

Como se puede ver en la Tabla 3 se ha encontrado DAG en la VSG de *T. brucei* y en proteínas de mamífero, monoacilglicerol en la PARP de *T. brucei*, AAG en anclas de mamífero, en la gp63 de *Leishmania* y en el antígeno 1G7 y GIPLs de *T. cruzi*.

La ceramida se determinó por primera vez en el LPPG de *T. cruzi* (Lederkremer *et al.*, 1978) y luego se encontró como el lípido más común de las anclas de levaduras (Conzelmann *et al.*, 1992; Fankhauser *et al.*, 1993) y de *Dictyostelium discoideum* (Stadler *et al.*, 1989; Haynes *et al.*, 1993). También se la encontró en *T. cruzi* formando parte del ancla de la glicoproteína Ssp-4 (Bertello *et al.*, 1996), de la trans-sialidasa (Agusti *et al.*, 1997) y de las mucinas de formas metacíclicas (Acosta Serrano *et al.*, 1995). En algunas proteínas de parásito se encontró *lisoalquilglicerol* (Couto *et al.*, 1993), como así también en el LPG de *Leishmania* (Turco & Descoteaux, 1992).

Tabla 3 – Variación lipídica en las anclas GPI.**ANCLAS CON GLICEROLIPIDO****ANCLAS CON CERAMIDA**

	R1	R2	R3		R
<i>T. brucei</i> VSG ¹	acil	acil	-	<i>T. cruzi</i> Ssp-4 ¹⁴	H
<i>T. brucei</i> PARP ²	acil	-	C _{16:0}	<i>T. cruzi</i> SAPA ¹⁵	H
<i>L. major</i> PSP ³	alquil	acil	-	<i>T. cruzi</i> mucinas metacíclicas ⁶	H
<i>Leishmania</i> LPG ⁴	alquil	-	-	<i>T. cruzi</i> LPPG ¹⁶	H
<i>Leishmania</i> GIPLs ⁵	alquil	acil	-	<i>S. cerevisiae</i> ¹⁷	H/OH
<i>T. cruzi</i> mucinas (epi,trypo) ⁶	alquil	acil	-	<i>D. discoideum</i> ¹⁸	OH
<i>T. cruzi</i> 1G7 ⁷	alquil	acil	-		
<i>T. cruzi</i> Tc85 ⁸	alquil	-	+/-		
<i>T. cruzi</i> GIPLs ⁹	alquil	acil	-		
<i>P. falciparum</i> MSP ¹⁰	acil	acil	C _{14:0}		
AchE humana ¹¹	alquil	acil	C _{16:0}		
DAF humana ¹²	alquil	acil	C _{16:0}		
Fosfatasa alcalina (ternero) ¹³	acil	acil	+/-		

Referencias: 1. Ferguson *et al.*, 1985; 2. Field *et al.*, 1991; 3. Schneider *et al.*, 1990; 4. Orlandi & Turco, 1987; 5. Mc Conville & Ferguson, 1993; 6. Acosta Serrano *et al.*, 1995; Previato *et al.*, 1995; Camargo *et al.*, 1997; 7. Heise *et al.*, 1995; 8. Couto *et al.*, 1993; Abuin *et al.*, 1996; 9. Lederkremer *et al.*, 1993; 10. Gerold *et al.*, 1996; 11. Roberts *et al.*, 1987; 12. Medof *et al.*, 1986; 13. Armesto *et al.*, 1996; 14. Bertello *et al.*, 1996; 15. Agusti *et al.*, 1997; 16. Lederkremer *et al.*, 1990; 17. Fankhauser *et al.*, 1993; 18. Haynes *et al.*, 1993.

En la mayoría de las especies aparentemente no habría un requerimiento específico rígido de ácidos grasos excepto en la VSG de *T. brucei* donde únicamente se encuentra ácido mirístico formando parte del fosfatidilinositol.

Un cambio interesante se observa en el lípido de las mucinas de *T. cruzi* cuando los epimastigotes se diferencian a trypomastigotes metacíclicos. El ancla GPI de las mucinas de epimastigotes tienen exclusivamente AAG mientras que más del 70% de las mucinas metacíclicas contiene ceramida en su porción lipídica (Acosta Serrano *et al.*, 1995). Este cambio en la estructura del lípido puede correlacionarse con la habilidad de las mucinas de insertarse en la membrana celular del huésped durante la invasión, ya que el antígeno 1G7, otra glicoproteína metacíclica que contiene AAG (Heise *et al.*, 1995), permanece unida al parásito (Schenkman *et al.*, 1993).

En la Figura 7 se esquematizan los lípidos caracterizados de anclas de glicoproteínas en los distintos estadios del ciclo de vida celular del *T. cruzi*.

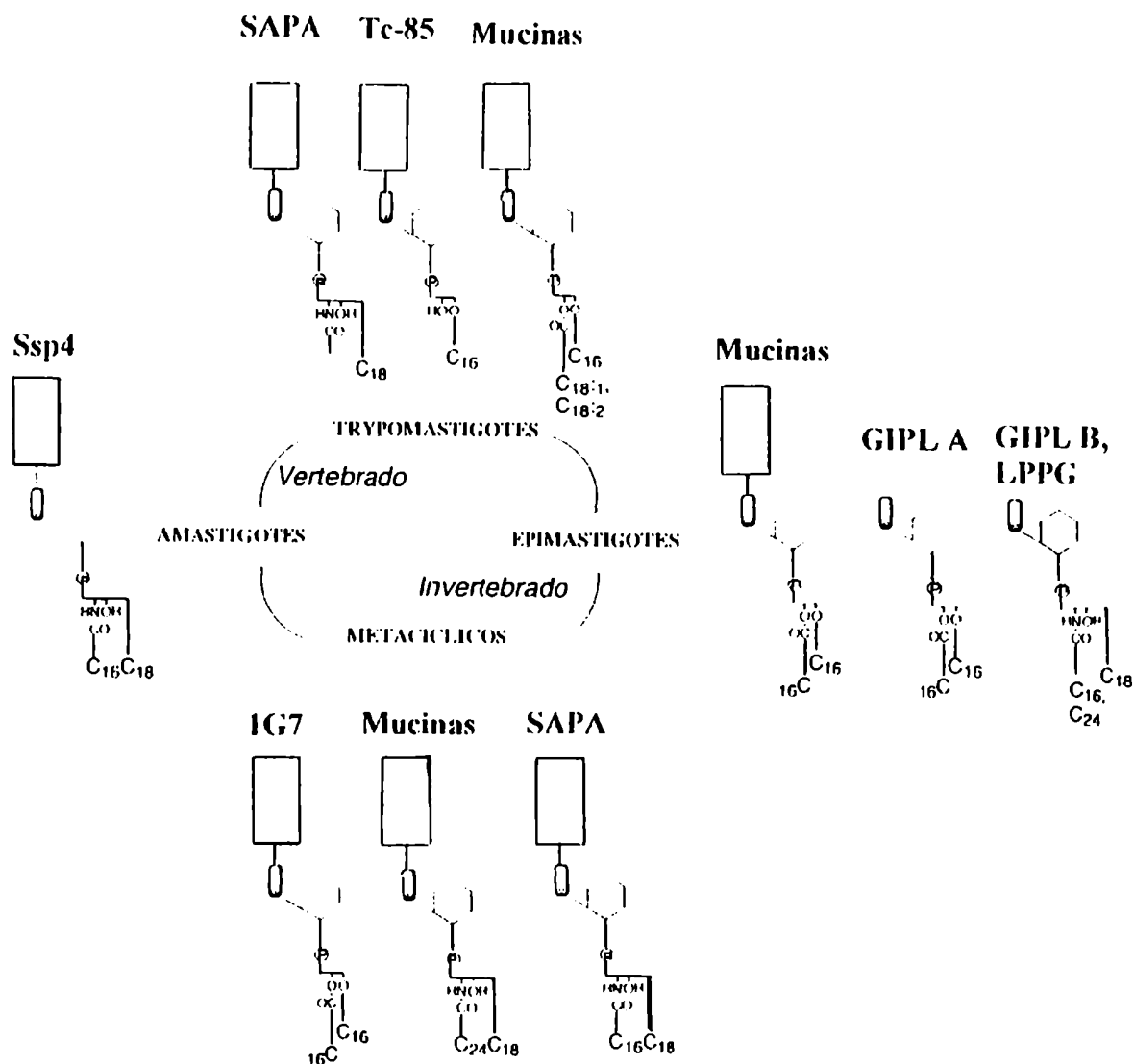


Figura 7 – Representación esquemática de las estructuras de las anclas GPI o GIPLs libres mayoritarias en los distintos estadios del ciclo celular del *Trypanosoma cruzi*.

METODOS DE IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE ANCLAS GPI

Las reacciones características de las anclas de tipo GPI son:

□ Sensibilidad al tratamiento con fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC)

Las PI-PLC más utilizadas para el estudio de las anclas GPI son las PI-PLCs bacterianas (Ikezawa, 1991) purificadas de *Staphylococcus aureus* (Low & Finean, 1977a, 1977b; Low, 1981), *Bacillus thuringiensis* (Taguchi *et al.*, 1980; Low, *et al.*, 1988) y *Bacillus cereus* (Ikezawa *et al.*, 1976; Ikezawa & Taguchi, 1981). Se había determinado que estas enzimas tienen especificidad hacia el PI y no otro tipo de fosfolípidos. Cortan el PI entre el glicerol y el grupo fosfato (Esquema 2). Lederkremer y col. determinaron que también hidroliza IPC en el LPPG (Lederkremer *et al.*, 1990).

El tratamiento con PI-PLC elimina la interacción con la membrana de una proteína anclada por GPI liberando la proteína en una forma soluble. Una forma de monitorear esta separación de la proteína es utilizando una técnica de partición en Tritón X-114 (Bordier, 1981).

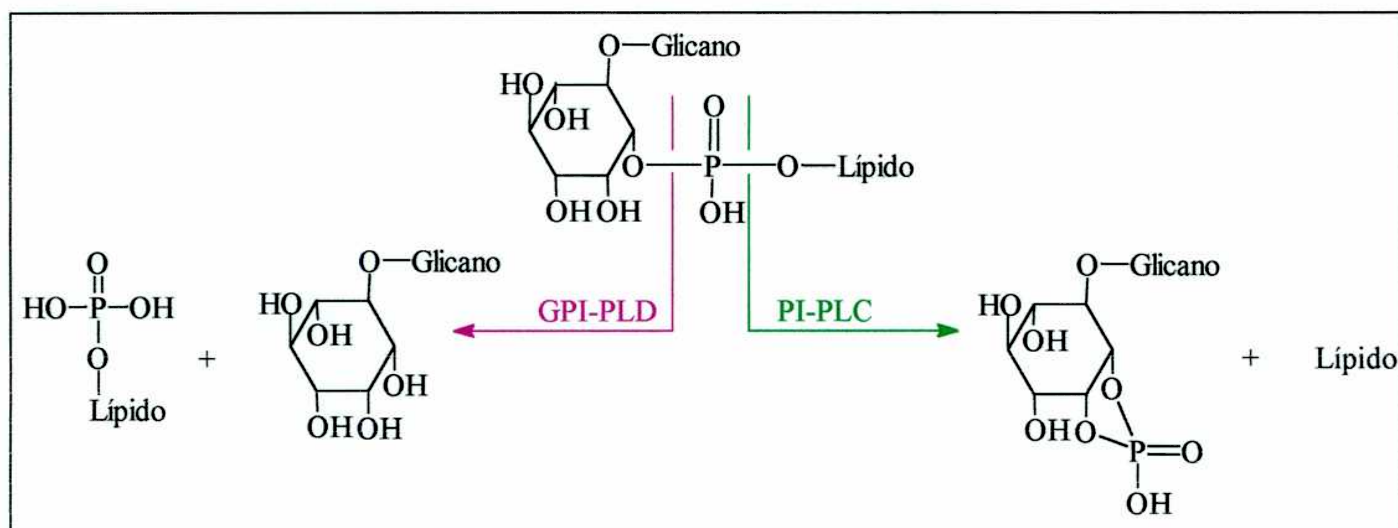
Algunas anclas tienen también un ácido graso adicional acilando el anillo de inositol. Esta característica descrita primero por el grupo de Rosenberry (Roberts *et al.*, 1988a) le confiere al ancla resistencia frente a la hidrólisis con la enzima PI-PLC. La hidrólisis con PI-PLC involucra la formación de un 1,2-inositol fosfato cíclico, por lo tanto, la acilación del inositol en el C2 sería la causa de la resistencia a esta enzima.

Esta hidrólisis es el criterio más común utilizado para la identificación de anclas GPI, pero como las proteínas con anclas GPI resistentes a la PI-PLC no serían detectadas por este método, un resultado negativo debe interpretarse con cuidado.

También se utiliza ampliamente como método para separar el lípido de la porción oligosacáridica en el análisis estructural de precursores y anclas GPI.

□ Sensibilidad al tratamiento con GPI-PLD

Este tipo de fosfolipasa se purificó de suero humano, de rata y de conejo y de placenta humana (Davitz *et al.*, 1987; Low & Prasad, 1988; Malik & Low, 1986). Esta enzima corta entre el inositol y el grupo fosfato de los GPI pero no tiene actividad hacia el PI u otros fosfolípidos (Esquema 2). Es GPI-específica. Se determinó que el LPPG de *T. cruzi* es hidrolizado por la PLD de plasma sanguíneo de rata con formación de ceramida fosfato (Lederkremer *et al.*, 1996).

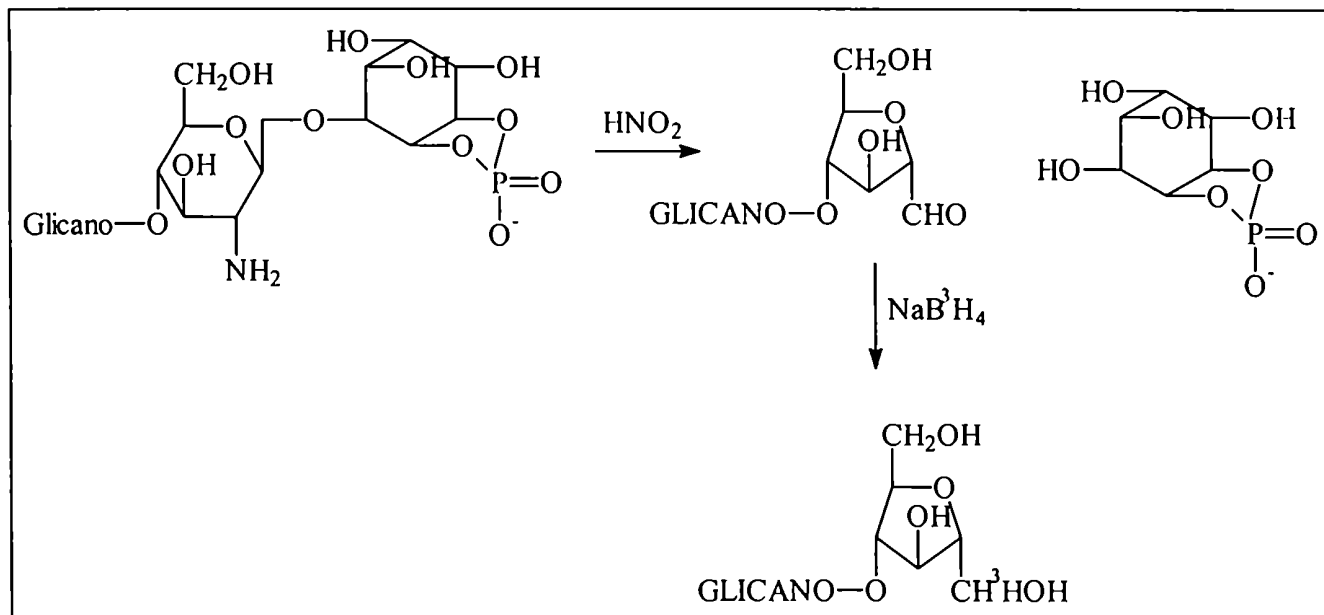


Esquema 2

□ Tratamiento con ácido nitroso

La desaminación con ácido nitroso es específica para hexosaminas no *N*-acetiladas y es útil para separar el glicano de la porción lipídica en anclas resistentes a la hidrólisis con PI-PLC. Dado que la presencia de GlcNH_2 es muy poco común en otros glicoconjugados, la sensibilidad al HNO_2 puede utilizarse como un método diagnóstico de anclas GPI (Ferguson & Williams, 1988).

La reducción con NaB^3H_4 luego del tratamiento con HNO_2 es una forma conveniente de introducir una marca radioactiva en el glicano (Esquema 3).



Esquema 3

□ **Detección del determinante de reacción cruzada (“cross-reacting determinant”, CRD)**

El determinante conocido como CRD queda expuesto cuando la proteína se convierte a su forma soluble por tratamiento con PI-PLC. La detección de éste en una proteína es un criterio útil para diagnosticar la presencia de un ancla GPI.

Inyectando VSG soluble en conejos se generan anticuerpos anti-CRD que pueden ser utilizados en técnicas de Western blott con distintas proteínas. El suero anti-CRD reconoce una mezcla de epitopes (Figura 8).

Estudios sobre la naturaleza química de este CRD sugieren que estarían involucrados el inositol-1,2-fosfato cíclico, la glucosamina no *N*-acetilada y la cadena

de galactosas. El principal epitope sería el inositol fosfato cíclico (Zamze *et al.*, 1988; Shak *et al.*, 1988) porción que está presente en todas las anclas GPI tratadas con PI-PLC.

La importancia de la GlcNH₂ y/o el inositolfosfato cíclico se demostró por la pérdida de antigenicidad luego de la desaminación con HNO₂ y por *N*-acetilación (Holder, 1983; Zamze *et al.*, 1988). Para que haya actividad CRD completa el fosfato tiene que estar en la forma inositol-1,2-cíclica ya que la hidrólisis ácida suave que rompe el fosfato cíclico causa una reducción sustancial de la antigenicidad. La degradación de las anclas GPI con GPI-PLD o HF no expone el CRD.

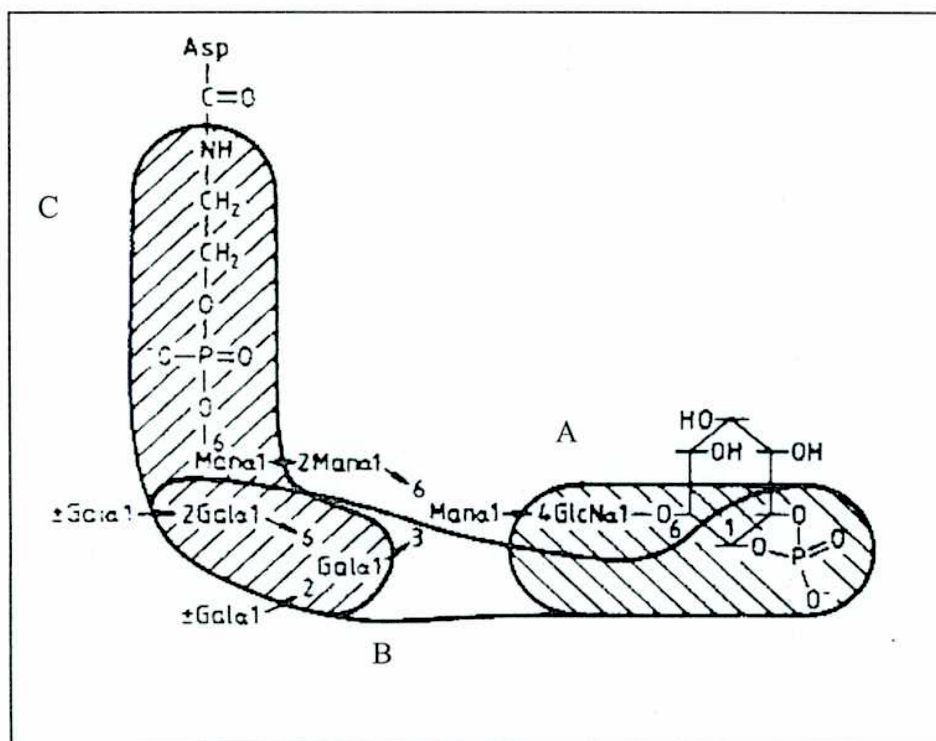


Figura 8 – Epitopes constituyentes del determinante de reactividad cruzada (CRD) propuestos para el ancla de la VSG de *T. brucei*.

A - El fosfato cíclico y la glucosamina no acilada.

B - El fosfato cíclico y la ramificación de galactosas.

C - La ramificación de galactosas y el puente de fosfato de etanolamina entre el glicano y la proteína.

Otras técnicas utilizadas son:

□ **Hidrólisis químicas y enzimática**

- ✓ Se utilizan proteasas para separar la proteína del ancla GPI (pronasa, tripsina y papaína).
- ✓ La remoción de grupos fosfato se realiza por tratamiento con HF acuoso a 0°C evitando de esta forma la hidrólisis de uniones glicosídicas.
- ✓ La digestión con exoglicosidasas específicas produce cambios en el tamaño del glicano que pueden monitorearse por métodos cromatográficos (Biogel P4, DIONEX). La secuenciación con glicosidasas específicas y posterior metilación y análisis por CGL permite definir los tipos de unión entre los azúcares.

✓ **Marcaciones biosintéticas**

Las células pueden marcarse metabólicamente con componentes del ancla como [³H]-ácidos grasos, [³H]-*myo*-inositol, [³H]-glucosamina o [³H]-etanolamina. La proteína de interés se inmunoprecipita y se analiza por electroforesis en gel de poliacrilamida.

El inconveniente de esta técnica sería la falta de selectividad de la marcación radioactiva; por lo tanto, para brindar evidencia de la presencia de anclas GPI, debe acompañarse con la detección de estos componentes diagnósticos por análisis específicos químicos y enzimáticos.

BIOSINTESIS DE ANCLAS GPI

La alta conservación del “core” **EtNP-6Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN α 1-6myo-Inositol-1-P-lípido** en todas las proteínas ancladas a la membrana por GPI sugiere también la existencia de una cierta conservación en la maquinaria biosintética.

El *Trypanosoma brucei* se utilizó para desarrollar los primeros sistemas libres de células que sirvieron para delinear la ruta biosintética de los GPI (Masterson *et al.*, 1989). Estos sistemas de membranas se adaptaron a una variedad de organismos incluyendo células de mamífero y levaduras (Hirose *et al.*, 1992; Puoti & Conzelmann, 1993; Costello & Orlean, 1992; Canivenc-Gansel *et al.*, 1998; Sutterlin, *et al.*, 1998).

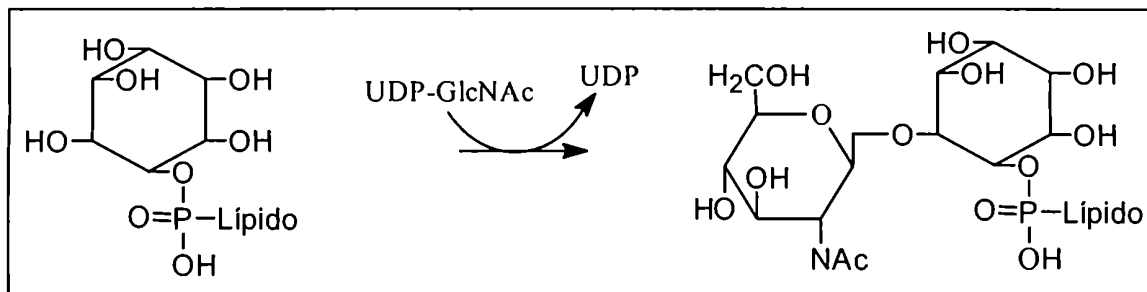
Una vez que el polipéptido atraviesa la membrana del retículo endoplásmico (RE), la adición del GPI ocurre en 1-5 minutos (Bangs *et al.*, 1985; Ferguson *et al.*, 1986; Krakow *et al.*, 1986; Conzelmann *et al.*, 1987; Takami *et al.*, 1988). Esta rapidez con que se une el ancla a la proteína sugirió un modelo biosintético en el que la proteína se une en bloque a un precursor GPI preformado, en lugar de que los componentes individuales del ancla se unan a la proteína en distintos pasos.

La adición del ancla es similar a una reacción de transamidación donde el NH₂ de la etanolamina ataca nucleofílicamente a la unión peptídica desplazando el péptido C-terminal, predominantemente hidrofóbico, que actúa como señal (Gerber *et al.*, 1992).

El estudio de los distintos pasos de la biosíntesis de GPI permitió elucidar la secuencia de reacciones y la mayoría de los donantes endógenos de los distintos componentes del ancla. Esto ha resultado de gran importancia ya que permitió encontrar diferencias significativas entre las distintas especies. Los pasos específicos de la biosíntesis de GPI se han identificado como blancos potenciales para desarrollar agentes antiparasitarios y antifúngicos.

Biosíntesis de *N*-acetilglucosaminil-PI

En la primera reacción de la biosíntesis de los GPI la GlcNAc es transferida desde UDP-GlcNAc al PI para formar *N*-acetylglucosaminil-PI (GlcNAc-PI).



Esta reacción fue estudiada en sistemas libres de células utilizando membranas de *Trypanosoma brucei* (Masterson *et al.*, 1989; Doering *et al.*, 1989; Menon *et al.*, 1990a, 1990b), lisados de células de mamífero (Stevens & Raetz, 1991; Hirose *et al.*, 1991) y membranas de levaduras (Costello & Orlan, 1992).

En estos ensayos la [^3H]-GlcNAc es transferida desde un donante soluble en agua a un sustrato proporcionado por las membranas, el PI. Las membranas a su vez también contienen la actividad enzimática que cataliza la reacción. De esta forma se obtiene un producto soluble en cloroformo (GlcNAc-PI).

La actividad biosintética para GlcNAc-PI en células de mamífero y en *Trypanosoma brucei* reside en la cara citoplasmática del RE (Vidugiriene & Menon, 1993, 1994).

En células de mamífero esta simple reacción necesita de por lo menos cuatro proteínas que forman un complejo en la membrana del RE (Watanabe *et al.*, 1996, 1998). En células de mamífero también se observó que hay un metabolismo significativo de UDP-GlcNAc a productos no-GPI que disminuye la cantidad de sustrato disponible para la biosíntesis de GlcNAc-PI (Stevens, 1993). Esta competencia no ocurre en membranas de *T. brucei* (Menon *et al.*, 1990a).

Curiosamente las porciones lipídicas de muchos GPIs son distintas del conjunto de PI mayoritario de la misma molécula. Los distintos lípidos pueden ser adquiridos

como resultado de la selección inicial de un subconjunto de especies moleculares del PI celular o por remodelamiento lipídico anterior o posterior a la unión a la proteína.

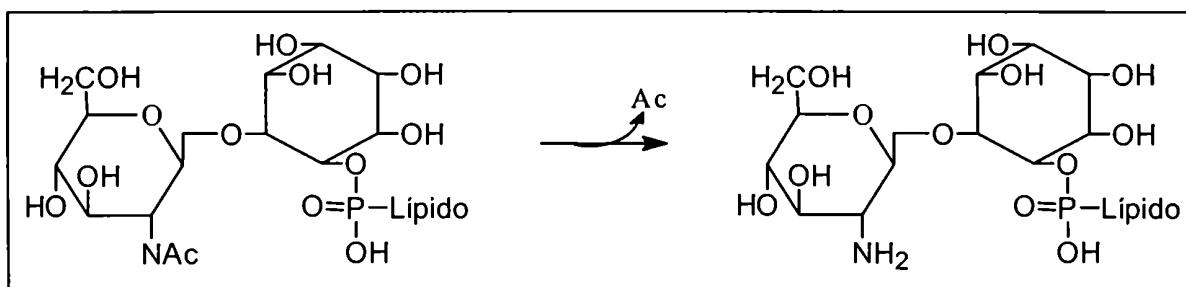
Por ejemplo, una proporción significativa de GlcNH₂/GlcNAc-PI en células animales está formada por alquilacil-PIs que también predominan en los GPIs unidos a la proteína pero que sólo dan cuenta de 1-5% del total de los PI (Butikofer *et al.*, 1992).

Un ejemplo extremo de selección de PIs ocurre en *Leishmania mexicana* donde sólo alquilacil-PIs con cadenas alquílicas largas (C_{24:0}, C_{26:0}) se incorporan a los GPIs unidos a proteínas. Estas especies moleculares representan menos del 1% del conjunto total de PI, pero están ya altamente enriquecidos en los primeros intermediarios GPI (Ralton & McConville, 1998). Esta incorporación selectiva de especies moleculares de PI puede ocurrir si la UDP-GlcNAc-PI GlcNAc transferasa tiene una especificidad de sustrato definida para especies moleculares de PI.

El remodelamiento lipídico se discutirá más adelante en este capítulo.

Des-*N*-acetilación de GlcNAc-PI

En la segunda reacción de la biosíntesis de GPI, el grupo *N*-acetilo de la GlcNAc-PI es removido para formar GlcNH₂-PI. Esta desacetilación fue primero demostrada en membranas de *T. brucei* (Doering *et al.*, 1989).



La formación de GlcNH₂-PI ocurre a partir de GlcNAc-PI y no por transferencia directa de GlcNH₂ desde UDP-GlcNH₂ al PI. Esto se estableció demostrando que el intermediario *N*-acetilado era el primero en formarse y que la adición de niveles elevados de UDP-GlcNH₂ no afectaba los niveles de síntesis de los precursores GPI conteniendo manosa.

La GlcNAc-PI des-*N*-acetilasa es una de las pocas enzimas de la biosíntesis de GPIs que fue parcialmente purificada de membranas de *T. brucei* y caracterizada bioquímicamente (Milne *et al.*, 1994). Recientemente se clonó el gen de rata correspondiente a esta enzima y se identificaron sus homólogos en levadura y humanos (Nakamura *et al.*, 1997).

Estudios realizados utilizando una serie de análogos permitieron caracterizar la enzima de *T. brucei* (Cottaz *et al.*, 1995). Sustratos análogos sin ácidos grasos fueron pobremente des-*N*-acetilados y no resultaron inhibidores de la enzima, indicando que la porción lipídica es importante para la presentación del sustrato. Análogos sin la porción del glicerofosfato tampoco fueron sustratos ni inhibidores de la des-*N*-acetilasa. El enlace fosfodiéster entre el inositol y el glicano es esencial para el reconocimiento enzimático.

La enzima aparentemente no tendría especificidad por las configuraciones de los hidroxilos del C2 al C5 del inositol ya que el D-*myo*-inositol puede ser reemplazado por L-*myo*-inositol sin pérdida de reconocimiento del sustrato (Stevens, 1995).

GlcNH₂-PI es sólo un inhibidor débil de la des-*N*-acetilación. Esto sugiere que la inhibición de esta reacción por el producto final no juega un rol en la regulación de la biosíntesis de los GPIs en *T. brucei*.

También se analizó la especificidad de sustrato respecto al tamaño del grupo *N*-acilo (R) que puede hidrolizarse de una serie de sustratos GlcNR-PI. Las enzimas de trypanosoma y humana son activas cuando el R es acetilo o propionilo, pero la actividad es mucho menor cuando R es butirilo, isobutirilo, pentanoílo o hexanoílo (Sharma *et al.*, 1997).

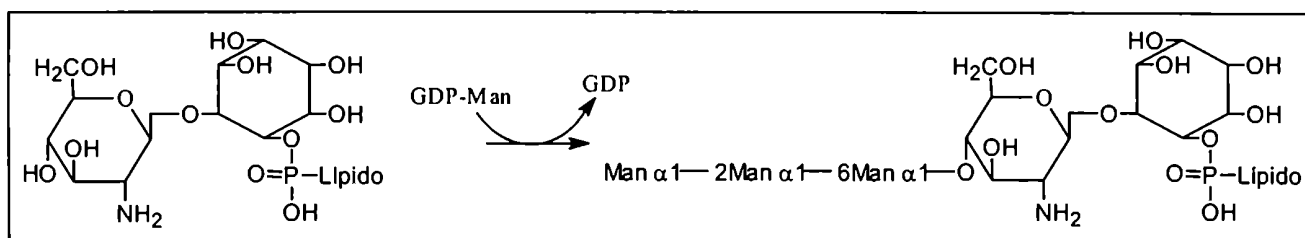
Este grupo de investigadores también demostró que las GlcNAc-PI manosiladas no son sustratos para estas enzimas lo que demuestra que la des-*N*-acetilación debe preceder a la manosilación en la biosíntesis de GPI.

Utilizando sustratos con sustituyentes *O*-alquilo en la posición 2 del inositol se encontraron diferencias entre la enzima de trypanosoma y la humana (Sharma *et al.*, 1999). La enzima humana sólo actuó sobre GlcNAc-(2-*O*-metil)PI mientras que la de

trypanosoma también actuó sobre GlcNAc-(2-O-octil)PI y GlcNAc-P(L)I. Estas diferencias en la especificidad de sustrato sugieren que es posible diseñar inhibidores específicos para la des-*N*-acetilasa de parásito, que tengan potencial terapéutico.

Adición de manosas

Luego de la des-*N*-acetilación de GlcNAc-PI el “core” del GPI se extiende con la adición de tres manosas.



Una de las mayores diferencias en la ruta biosintética entre el parásito y los mamíferos es el orden relativo de la acilación del inositol y la manosilación de GlcNH₂-PI (Figura 9).

En *T. brucei*, GlcNH₂-PI es el sustrato para la manosilación (Masterson *et al.*, 1989; Menon *et al.*, 1990a), mientras que en levaduras (Costello & Orlean, 1992) y células de mamífero (Urakaze *et al.*, 1992; Stevens & Zhang, 1994; Smith *et al.*, 1997; Doerrler *et al.*, 1996) un ácido graso debe acilar al anillo de inositol antes de que puedan adicionarse las manosas. Por lo tanto, GlcNH₂-(acil)PI es el sustrato para la adición de manosas en estas especies.

La adición se produce en forma secuencial y no por transferencia de un “core” de manosas preformado. La primer manosa se adiciona a la GlcNH₂ en una unión α1-4, la segunda se une α1-6 a la primera y la tercera se une α1-2 a la segunda.

En *T. brucei*, como era de esperar, ManGlcNH₂-PI es el sustrato para la adición de la segunda manosa y Man₂GlcNH₂-PI es el sustrato para la adición de la tercera manosa. En células de mamífero el mecanismo sería más complicado. Aparentemente un residuo de etanolamina-fosfato (EtNP) se une a la primera manosa antes de que se unan la segunda y tercera manosas (Figura 9).

Las manosas del “core” del GPI pueden marcarse radioactivamente agregando GDP-[³H]manosa a membranas de *T. brucei* (Masterson *et al.*, 1989; Menon *et al.*, 1990b), sin embargo, el donante endógeno es el dolicol-fosfato-manosa (Dol-P-Man) (DeGasperi *et al.*, 1990; Menon *et al.*, 1990b; Orlean, 1990; Singh & Tartakoff, 1991).

Dado que distintos sustratos y distintas uniones son utilizadas para cada una de las tres manosas probablemente tres manosiltransferasas diferentes catalicen estas reacciones.

La manosamina inhibe la biosíntesis de GPI en células de mamífero (Lisanti *et al.*, 1991; Pan *et al.*, 1992), en *Trypanosoma brucei* (Lisanti *et al.*, 1991; Ralton *et al.*, 1993) y en *Leishmania* (Field *et al.*, 1993). La manosamina se incorporaría en el GPI predominantemente en la posición de la segunda manosa. De esta forma queda un grupo NH₂ en el lugar del OH aceptor de la tercera manosa. Así se inhibe la acción de la tercera manosiltransferasa bloqueando la biosíntesis.

Adición de etanolaminafosfato

La biosíntesis del core del GPI se completa con la adición de EtNP al OH en posición 6 de la tercera manosa. Esta EtN actúa como puente entre la manosa y el aminoácido COOH terminal de la proteína. El donante endógeno en levaduras (Menon & Stevens, 1992) y en *T. brucei* (Menon *et al.*, 1993) es la fosfatidiletanolamina.

Esta reacción en *T. brucei* es inhibida tanto *in vivo* como *in vitro* por el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y el di-isopropilfluorofosfato (Masterson & Ferguson, 1991). Esto sugiere que la fosfoetanolamina transferasa tiene un residuo de serina en el sitio activo.

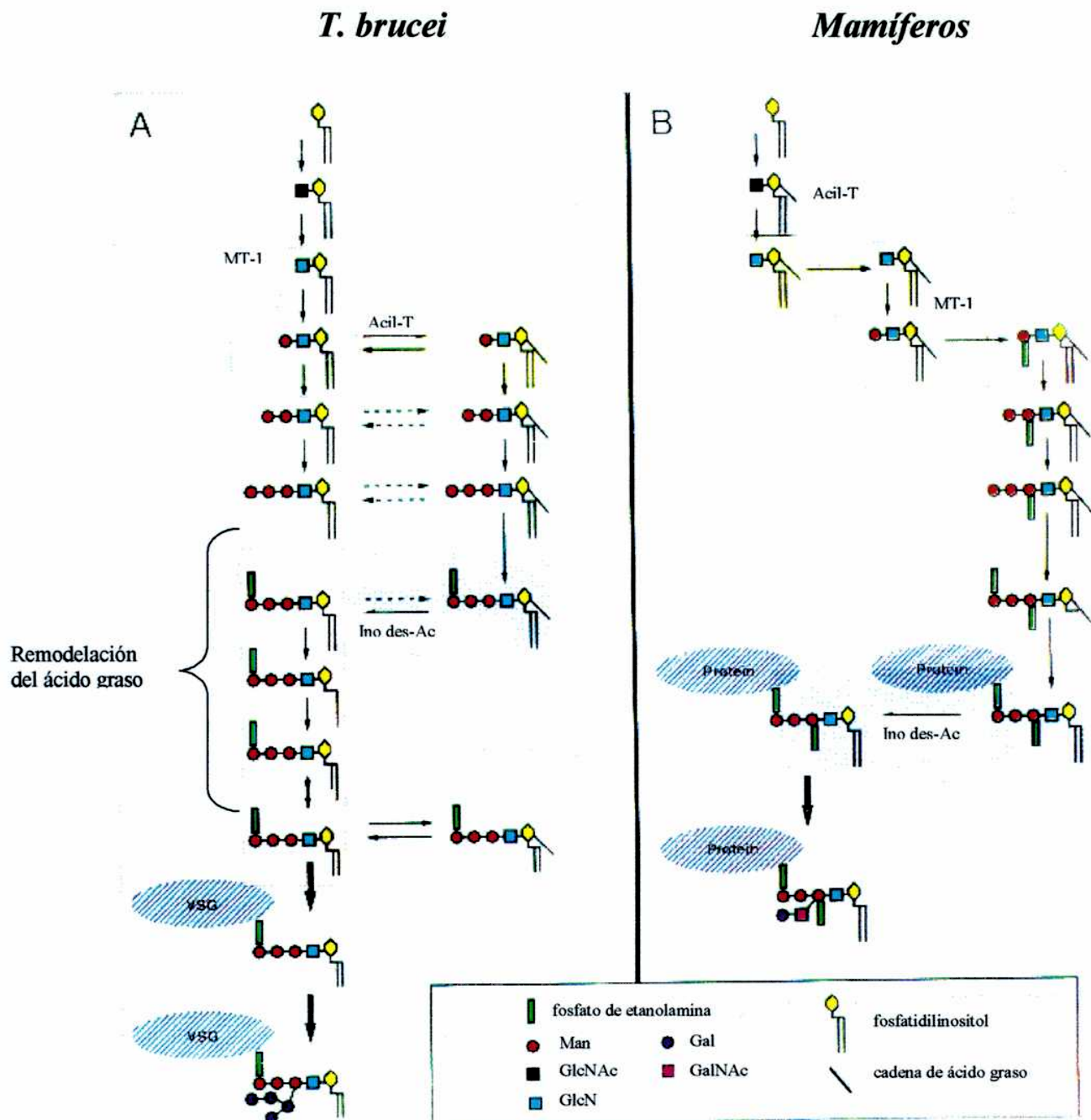


Figura 9 – Biosíntesis de GPI en formas sanguíneas de *T. brucei* (A) y en células de mamífero (B). (MT, manosiltransferasa; Acil-T, aciltransferasa; Ino des-Ac, inositol desacilasa)

Características de la biosíntesis de GPI en distintos organismos

Remodelación del ácido graso

Reacciones de remodelamiento lipídico llevan a mayores cambios en la composición del lípido final de los GPIs libres o unidos a proteína. El caso más estudiado es el del ancla de la glicoproteína VSG de *T. brucei* que tiene exclusivamente ácido mirístico unido en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del glicerol (Ferguson *et al.*, 1985a, 1985b).

A pesar de esto el GPI es inicialmente sintetizado con ácido esteárico en la posición *sn*-1 y una mezcla de ácidos grasos que incluyen el 18:0, 18:1, 20:4 y 22:6 en la posición *sn*-2 (Doering *et al.*, 1994). Esto hace que el ácido graso deba ser removido y reemplazado por mirístico.

Este proceso, llamado remodelación del ácido graso fue estudiado utilizando un sistema de membranas libre de células (Masterson *et al.*, 1990; Morita *et al.*, 2000). El remodelamiento ocurre mediante un reemplazo secuencial por mirístico de los ácidos grasos, primero el de la posición *sn*-2 y luego el de la *sn*-1 (Figura 10). El donante de ácido graso es la miristoil-CoA.

Durante este remodelamiento, el GPI siempre retiene por lo menos un ácido graso para poder mantenerse asociado a la membrana. El glicolípido que es normalmente sustrato para esta remodelación es el GPI que contiene la fosfoetanolamina (Masterson *et al.*, 1990). Sin embargo cuando la adición de la fosfoetanolamina está bloqueada por la presencia de PMSF el intermediario $\text{Man}_3\text{GlcNH}_2\text{-PI}$ que se acumula puede sufrir remodelación *in vivo* (Guther *et al.*, 1994).

También se ha descripto un proceso similar al remodelamiento llamado intercambio de mirístico (Buxbaum *et al.*, 1994, 1996). Durante este proceso los ácidos mirísticos del ancla GPI de la VSG son intercambiados por nuevos ácidos mirísticos suministrados por la miristoil-CoA. Este intercambio se cree que ocurriría en un compartimento celular diferente al del remodelamiento y aunque su función no está

aún clara, sería un mecanismo de reconfirmación para asegurarse la exclusividad del dimiristoilglicerol en el ancla de la VSG.

Este tipo de remodelación mirístico-específica se describió también en *Leishmania* donde ácidos grasos de cadena larga en la posición *sn*-2 del *sn*-1-alkil-2-acil-PI son reemplazados por mirístico (Ralton & McConville, 1998).

Varios análogos del ácido mirístico resultaron tóxicos para el *T. brucei* (Doering *et al.*, 1991, 1994) y dado que los huéspedes de este parásito no tienen requerimiento de ácido mirístico, las enzimas involucradas en la remodelación del ácido graso o en el intercambio de mirístico son blancos posibles para la quimioterapia antitrypanosoma.

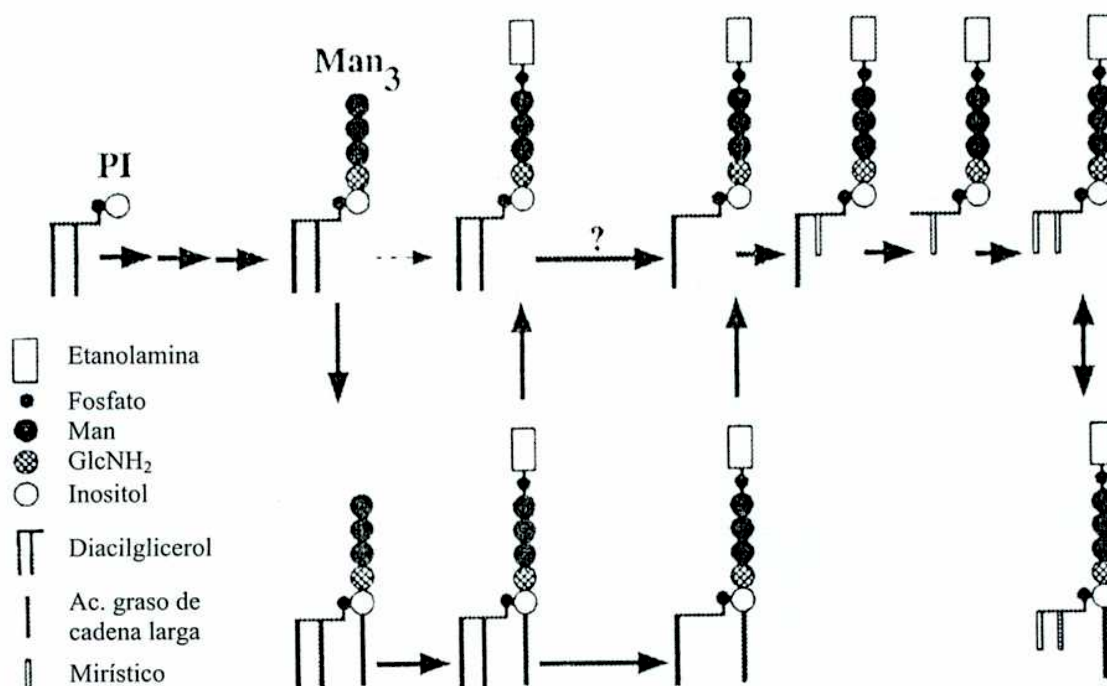


Figura 10 – Mecanismo de miristoilación del GPI por remodelamiento del ácido graso.

La flecha discontinua indica un paso ineficiente o que puede no ocurrir. La reacción indicada por un signo de pregunta puede ser ineficiente pero su contribución exacta debe ser clarificada.

Intercambio de glicerolípido por esfingolípido

Este es otro tipo de remodelación lipídica que involucra el reemplazo de un glicerolípido por ceramida. Esto ocurre en la mayoría de las proteínas ancladas por GPI en levaduras y podría ser también importante en *T. cruzi* (Lederkremer *et al.*, 1993; Heise *et al.*, 1996).

En levaduras, se mencionó anteriormente que la mayoría de las proteínas ancladas por GPI tienen ceramida en su porción lipídica. En contraste con esto los precursores son completamente sensibles al álcali suave, lo cual indica que hay una reacción de intercambio en la cual el glicerolípido es reemplazado por una ceramida (Conzelmann *et al.*, 1992). Esta reacción ocurre en el RE luego de la transferencia del glicolípido a la proteína, pero a su vez esa ceramida puede ser intercambiada por otra en el aparato de Golgi (Sipos *et al.*, 1994, 1997; Reggiori *et al.*, 1997; Reggiori & Conzelmann, 1998). La razón del reemplazo del glicerolípido por la ceramida en levaduras es desconocida.

Acilación del inositol

El rol de la acilación del inositol (esterificación del grupo OH en posición 2 del inositol con un ácido graso) en la biosíntesis de GPI no se conoce. No es un paso esencial en todos los organismos ya que por ejemplo en *Leishmania* aparentemente no ocurre (Smith *et al.*, 1997; Ralton & McConville, 1998). Mas aún, en muchos casos el GPI final que ancla la proteína no está acilado.

En *T. brucei* el ancla de la VSG es completamente sensible al tratamiento con PI-PLC, sin embargo, se han detectado y caracterizado precursores acilados en el inositol (Mayor *et al.*, 1990a; Masterson *et al.*, 1989; Menon *et al.*, 1990a; Krakow *et al.*, 1989). El mayoritario llamado P3 o glicolípido C tiene todos los componentes del “core” y puede ser transferido a la VSG en un sistema de membranas (Mayor *et al.*, 1991). Algunos autores especulan que este glicolípido es utilizado como reservorio del GPI en exceso que puede, si es necesario, movilizarse para unirse a la proteína previa desacilación (Guther *et al.*, 1994).

La mayoría de los intermediarios GPI de *T. brucei* sanguíneos están en un equilibrio dinámico entre la forma acilada y desacilada del inositol por acción de una inositolaciltransferasa sensible a PMSF y una inositol desacilasa sensible a diisopropilfluorofosfato (Figura 9).

En varios protozoarios (*T. brucei*, *Leishmania* spp, *Toxoplasma gondii*), la acilación del inositol no es un requerimiento para la adición del primer residuo de manosa pero ocurre en intermediarios manosilados posteriores. (Guther *et al.*, 1994; Guther & Ferguson, 1995, Hilley *et al.*, 1999).

En *T. brucei* esta reacción es independiente de ATP y CoA como cofactores (Guther & Ferguson, 1995).

En este organismo la acilación del inositol es necesaria para una adición eficiente del puente de EtNP y la desacilación es esencial para las reacciones de remodelación del ácido graso (Guther *et al.*, 1994; Guther & Ferguson, 1995). Dada la importancia del remodelamiento de ácido graso en *T. brucei* y la naturaleza esencial de la EtNP para la adición del GPI a la proteína, ambas enzimas, la inositolaciltransferasa y la desacilasa son potenciales blancos terapéuticos.

En levaduras, la mayoría de los intermediarios GPI están acilados en el inositol (Sipos *et al.*, 1994) y esta reacción también fue estudiada en estos organismos utilizando un sistema de membranas libre de células (Costello & Orlean, 1992). A diferencia de lo que ocurre en *Trypanosoma brucei*, en levaduras, el acilo se une al segundo intermediario del camino biosintético, GlcNH₂-PI.

Esta reacción es estimulada cuando se agregan a la incubación ATP y CoA, sugiriendo que el donante del grupo acilo es en este caso, una acil-CoA.

En levaduras defectuosas en la síntesis de Dol-P-Man se acumula el intermediario GlcNH₂-(acil)PI (Orlean, 1990), lo que indicaría que es un intermediario obligado en la ruta biosintética (Costello & Orlean, 1992).

En células de mamífero la mayoría de los precursores que contienen manosa tienen este grupo acilo extra (Puoti *et al.*, 1991; Kamitani *et al.*, 1992; Hirose *et al.*, 1992; Puoti & Conzelmann, 1992, 1993). En las células de mamífero, al igual que en

las levaduras, la acilación de GlcNH₂-PI es el tercer paso obligado en la biosíntesis de GPI (Urakaze *et al.*, 1992), y parecería ser esencial para el siguiente paso de manosilación (Smith *et al.*, 1997).

Los precursores GPI maduros con el inositol acilado se adicionan a la proteína, y en muchos casos luego de esta transferencia, el ácido graso es inmediatamente removido del inositol, en el RE (Sipos *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1998).

Esta acilación es estimulada por CoA en ausencia de ATP, cofactor esencial para la síntesis de acil-CoA. Esto indicaría que CoA libre es un efector endógeno de esta reacción y el grupo acilo derivaría de un fosfolípido. Se ha propuesto que el tercer paso de la biosíntesis de GPI en mamíferos es catalizado por una transacilasa CoA-dependiente (Stevens & Zhang, 1994).

La acilación del inositol involucra los mismo sustratos (GlcNH₂-PI) pero distintos donantes del acilo en levaduras (acil-CoA) y en mamíferos (fosfolípido). En *T. brucei* y en células de mamífero difiere el sustrato para la acilación mientras que el donante del acilo podría ser el mismo.

Los ácidos grasos transferidos al inositol son más heterogéneos en *T. brucei* que en células de mamífero (Guther *et al.*, 1996). Este es generalmente ácido palmítico (Mayor *et al.*, 1990b) que provendría de un fosfolípido (Field *et al.*, 1991).

La enzima que cataliza la acilación del inositol en el parásito es inhibida por el PMSF (Guther *et al.*, 1994) mientras que no ocurre lo mismo en mamíferos (Stevens & Zhang, 1994), indicando que existe una importante diferencia en los sistemas responsables de esta reacción.

Adición de fosfoetanolaminas extras

En células de mamífero muchos de los intermediarios detectados que contienen manosa tienen fosfoetanolaminas extras unidas al “core” (Puoti *et al.*, 1991; Kamitani *et al.*, 1992; Hirose *et al.*, 1992; Puoti & Conzelmann, 1992, 1993). Probablemente una fosfoetanolamina se une al intermediario ManGlcNH₂-(acil)PI antes que las otras dos manosas. Luego se uniría a la tercera manosa, la fosfoetanolamina que hace de puente

con la proteína y por último una tercera fosfoetanolamina se une a la segunda manosa del “core” (Figura 9).

El donante y el tipo de unión de las fosfoetanolaminas unidas a las dos primeras manosas todavía no se conocen. Algunos de estos residuos de EtNP extra pueden ser removidos luego de la unión del GPI a la proteína o bien estos GPIs libres modificados pueden ser productos finales o precursores en exceso que no son utilizados como anclas (Canivenc-Gansel *et al.*, 1998).

Recientemente se encontró estas EtNP adicionales en levaduras (Canivenc-Gansel *et al.*, 1998; Sutterlin *et al.*, 1998; Benachour *et al.*, 1999). *T. brucei* y otros organismos protozoarios como *Leishmania* y *Plasmodium falciparum* no expresan EtNP adicionales en las manosas primera y segunda.

Regulación de la biosíntesis del GPI

En *T. brucei* sanguíneos una inhibición del 90% de la biosíntesis de GPI no afecta la transferencia del glicolípido a la VSG (Masterson & Ferguson, 1991; Ralton *et al.*, 1993). De acuerdo a esto el GPI es aparentemente sintetizado 5 a 10 veces en exceso de lo que se necesita para el anclaje de proteínas.

La segunda reacción de la biosíntesis de GPI, la desacetilación de GlcNAc-PI es estimulada *in vitro* por GTP en células de mamífero (Stevens, 1993). Esta estimulación podría reflejar un mecanismo de regulación que involucre una proteína de unión a GTP y no se podría descartar la hidrólisis de éste como requerimiento de energía (Stevens, 1995).

FUNCION DE LAS ANCLAS GPI

La función fundamental de la mayoría de las anclas GPI es **mantener la asociación estable** de la proteína con la bicapa lipídica. El GPI es una forma de anclaje eficiente y estable comparable con un dominio polipeptídico hidrofóbico.

La utilización de un ancla GPI le confiere a la proteína nuevas propiedades fisico-químicas dado que la interacción entre la proteína y la bicapa lipídica está restringida a la cara externa de la membrana. Entre ellas podemos mencionar:

□ Mayor movilidad

Moléculas ancladas por proteína normalmente presentan muy baja velocidad de difusión o están inmóviles en la bicapa. Esto probablemente se deba a interacciones del dominio citoplasmático con otras moléculas de membrana o componentes del citoesqueleto (Jacobson *et al.*, 1987). Las moléculas ancladas por GPI poseen una mayor movilidad lateral en la bicapa, de manera más semejante a la de los lípidos.

□ Liberación de proteínas

La presencia de un ancla GPI permite la **liberación selectiva** de algunas proteínas de superficie vía la acción de fosfolipasas específicas. Este podría ser un mecanismo de regulación de la expresión proteica en la superficie celular ya que puede ser controlado por modificaciones específicas de la estructura básica del ancla.

Estas modificaciones pueden determinar, no sólo qué proteína es potencialmente hidrolizable, sino también, el tipo de fosfolipasa que llevaría a cabo esa degradación. Esta es una propiedad importante de los GPI que los distingue de un anclaje polipeptídico, donde sería más difícil regular la liberación mediada por proteasas (Low, 1989b).

Muchas proteínas ancladas por GPI están comprometidas en la adhesión célula-célula. En estos casos la degradación del ancla sería un mecanismo útil para romper las interacciones entre las células.

Para algunas enzimas, el cambio drástico en su relación con la bicapa lipídica producido por la degradación del ancla, podría aumentar la actividad o cambiar la especificidad como resultado de la alteración de la accesibilidad del sitio activo.

En *T. cruzi* hay evidencias de que se produce una liberación de proteínas al medio por acción de una fosfolipasa endógena, por ejemplo, del antígeno de formas amastigote Ssp-4 (Andrews *et al.*, 1988) y de la familia de trans-sialidasa/sialidasas (Rosenberg *et al.*, 1991; Hall *et al.*, 1992). Recientemente se determinó que mucinas recombinantes, ancladas por GPI, se liberan activamente al medio (Pollevick *et al.*, 2000).

□ Comunicación celular

Proteínas ancladas por GPI están involucradas en la transducción de señales de activación a través de la membrana, y pueden actuar como fuentes de segundos mensajeros (Low, 1989b).

Simultáneamente con la liberación de la proteína hay una producción de lípidos biológicamente activos como el 1,2-diacilglicerol, el ácido fosfatídico y la ceramida que pueden atravesar la membrana plasmática y afectar el metabolismo intracelular.

La hidrólisis de GPI también conduce a la formación de inositolfosfoglicanos (IPG) que afectan enzimas y caminos metabólicos claves. Los IPGs estimulan la síntesis de glucógeno, la glicólisis, la lipogénesis, el transporte de aminoácidos y la síntesis de proteínas (Brodbeck, 1998).

Las dos enzimas responsables de la generación de estos segundos mensajeros son la glicosilfosfatidilinositol fosfolipasa C (GPI-PLC) y la GPI-PLD. La hidrólisis de GPI por acción de la PI-PLC lleva a la formación de un producto hidrofóbico, un glicerolípido o una ceramida, y el glicano hidrofílico con el residuo de inositol terminal con un fosfodiéster cíclico. Los productos de hidrólisis producidos por la GPI-PLD son ácido fosfatídico y el correspondiente glicano hidrofílico.

Funciones especializadas en parásitos protozoarios

En parásitos protozoarios las anclas GPI son la forma predominante de anclaje por su capacidad de aislar proteínas con funciones puramente extracelulares (como proteasas) del interior de la célula (McConville & Ferguson, 1993).

También permiten lograr un alto grado de empaquetamiento de la proteína sin comprometer el espacio para la inclusión de transportadores de nutrientes. Este es el caso de la VSG de *T. brucei* donde 10 millones de copias de ésta pueden ocupar la superficie celular (McConville & Ferguson, 1993).

Además, los GPI pueden ser modificados con cadenas laterales complejas de oligosacáridos para formar estructuras de glicocalix (McConville & Ferguson, 1993).

INTRODUCCION

CAPITULO 3

Fosfolipasas y señalización celular

FOSFOLIPASAS Y SEÑALIZACIÓN CELULAR

Las fosfolipasas son una serie de enzimas diversas diseñadas para el catabolismo de los fosfolípidos. Como tales, juegan roles críticos en la generación de derivados lipídicos que actúan como segundos mensajeros. Estas se clasifican de acuerdo a la unión éster del fosfolípido que hidrolizan (Figura 11).

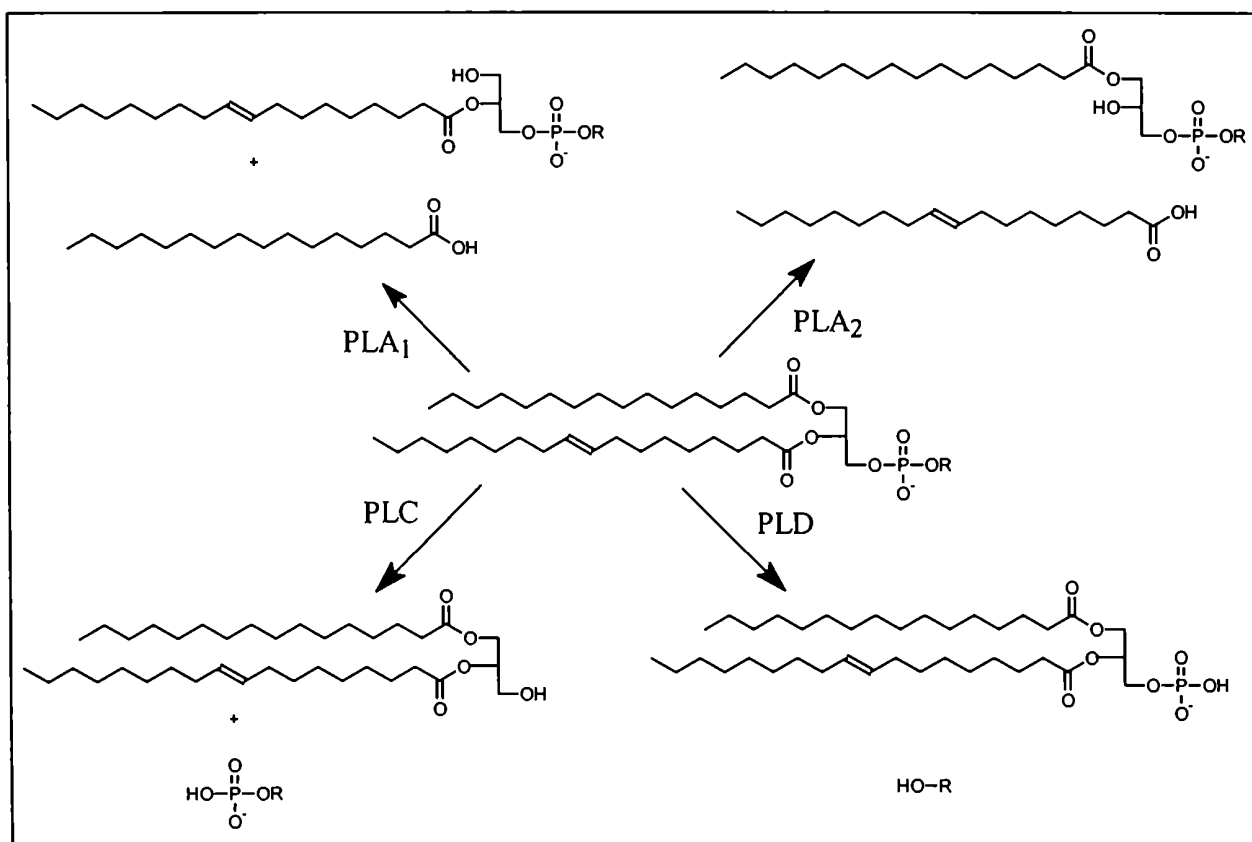


Figura 11 - Reacciones catalizadas por fosfolipasas A₁, A₂, C y D.

FOSFATIDILINOSITOL-FOSFOLIPASAS C (PI-PLC)

Las fosfatidilinositol fosfolipasas C (PI-PLC) específicas fueron extensamente estudiadas a la luz de su rol central en eventos de transducción de señales (Rhee *et al.*, 1989; Meldrum *et al.*, 1991).

Fosfatidilinositol fosfolipasas C específicas de origen bacteriano

PI-PLCs son producidas por diversas bacterias entre ellas *Staphylococcus aureus* (Doery *et al.*, 1965), *Clostridium novyi* (Taguchi & Ikezawa, 1978), *Bacillus cereus* (Slein & Logan, 1965) y *Bacillus thuringiensis* (Taguchi *et al.*, 1980) en cantidades relativamente elevadas. Estas enzimas resultaron de gran utilidad ya que, a diferencia de sus análogas de mamífero, son capaces de hidrolizar las anclas glicosilfosfatidilinositol de membrana. Esto hizo que se las utilizara ampliamente en el estudio de anclas GPI.

Las PI-PLC bacterianas degradan PI originando un lípido neutro e inositol-1,2-fosfato cíclico que lentamente se convierte en inositol-1-fosfato (Ikezawa, 1991). Son capaces de hidrolizar PI, *lyso*PI, proteínas ancladas por GPI y sus precursores, pero otros fosfolípidos como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, esfingomielina y PI-fosforilados no son reconocidos como sustratos (Ikezawa *et al.*, 1976; Low & Finean, 1976; Low & Finean, 1977b; Taguchi *et al.*, 1980; Griffith *et al.*, 1991). Lederkremer y col. (1990) demostraron que la enzima de *B. thuringiensis* hidroliza también estructuras análogas a GPI pero conteniendo ceramida como lípido.

Las PI-PLCs bacterianas no son metaloenzimas como las de mamífero ya que no son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA y la *o*-fenantrolina. Son inhibidores los iones metálicos divalentes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} , concentraciones de NaCl o KCl mayores a 0,1M y el *p*-cloromercuribenzoato. El detergente desoxicolato de sodio estimula la actividad de estas enzimas en bajas concentraciones (Ikezawa *et al.*, 1976; Low & Finean, 1976; Taguchi & Ikezawa, 1978; Sundler *et al.*, 1978; Taguchi *et al.*, 1980).

La observación de que estas enzimas podían liberar ciertas proteínas de membrana de la superficie celular (Ikezawa & Taguchi, 1981; Low, 1981), llevó a la identificación estructural de las anclas GPI (Low *et al.*, 1986; Ferguson *et al.*, 1988). Algunas PI-PLC bacterianas fueron caracterizadas en términos de su habilidad para hidrolizar PI y GPI (Low *et al.*, 1988; Stieger & Brodbeck, 1991) convirtiéndose como se dijo anteriormente en herramientas muy valiosas en el estudio de estas anclas (Hirose *et al.*, 1995).

Glicosil-fosfatidilinositol fosfolipasa C de *T. brucei* (GPI-PLC)

El *Trypanosoma brucei* posee una enzima que hidroliza, durante la lisis celular, la unión fosfodiéster de la VSG de membrana, liberando dimiristoilglicerol y la proteína en forma soluble (Ferguson *et al.*, 1985a, 1985b; Jackson & Voorheis, 1985). La enzima fue purificada y caracterizada por tres grupos de investigadores (Bülow & Overath, 1986; Hereld, *et al.*, 1986; Fox, *et al.*, 1986) quienes demostraron su alta especificidad hacia el glicolípido de la VSG y algunos intermediarios biosintéticos.

Esta enzima de masa molecular relativa 39 000 está asociada a la cara citoplasmática de membranas intracelulares del trypanosoma (Bülow *et al.*, 1989) y su solubilización requiere el uso de detergentes. Es inhibida por iones metálicos como el Zn^{2+} y el Hg^{2+} y por el ácido *p*-cloro-mercurifenilsulfónico (*p*-CMPS), mientras que el ditioneitol (DTT), agente reductor de grupos tioles, estimula su actividad.

En forma análoga a las PI-PLCs bacterianas pero a diferencia de las fosfolipasas de mamíferos esta enzima no requiere de iones Ca^{2+} para su actividad (Bülow & Overath, 1986; Hereld *et al.*, 1986; Fox *et al.*, 1986).

A pesar de que se describió el requerimiento del glicano para la actividad de esta enzima, utilizando distintos glicanos sintéticos (Morris *et al.*, 1995); Bütikofer y col. (1996) demostraron que el fosfatidilinositol también es hidrolizado por esta enzima si se utilizan las condiciones experimentales apropiadas.

Glicosil-fosfatidilinositol fosfolipasa C de semilla de maní

Esta enzima, la primera de planta que ha sido caracterizada en detalle (Bütikofer & Brodbeck, 1993), tiene actividad sobre anclas GPI y sobre PI. No son reconocidos como sustratos fosfatidilserina, fosfatidilinositol-4-monofosfato ni fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato.

El análisis de los productos solubles en agua luego de la hidrólisis de PI, mostró la presencia de una mezcla formada por partes iguales de inositol-1,2-fosfato cíclico y de inositol fosfato (Bütikofer & Brodbeck, 1993), lo mismo que se observa para las PI-PLCs de mamífero (Kim *et al.*, 1989). Otra similitud con este tipo de enzimas es su dependencia de Ca^{2+} . Esta enzima es activada por el Ca^{2+} y completamente inhibida por el EDTA y EGTA. Otros inhibidores son el ZnCl_2 , el ácido *p*-CMPS e inhibidores de fosfatasa como propanolol, NaF y *o*-vanadato de sodio. La *o*-fenantrolina no afecta su actividad.

La hidrólisis de las anclas GPI por la fosfolipasa C de maní se ve afectada por la concentración de detergente en el ensayo, encontrándose la concentración óptima alrededor de la concentración miscelar crítica. La actividad de la enzima es inhibida por concentraciones mayores a ésta.

Al igual que la GPI-PLC de *T. brucei* la fosfolipasa de maní no es efectiva en la hidrólisis de anclas de las proteínas unidas a membrana, para ser activa necesita una previa solubilización de las membranas en detergente. En esto se diferencia de las fosfolipasas bacterianas que actúan sobre sustratos unidos a membrana y son utilizadas con frecuencia para liberar de la superficie celular proteínas ancladas por GPI (Low *et al.*, 1988; Low, 1989a; Cross, 1990).

Fosfatidilinositol fosfolipasa C específica de *T. cruzi*

Varios grupos de investigadores sugirieron la presencia en *T. cruzi* de una actividad de fosfolipasa C, responsable de la liberación de la glicoproteína Ssp-4, durante la diferenciación de formas amastigote a epimastigote (Andrews *et al.*, 1988) y

también de la neuraminidasa, facilitando la entrada del parásito en la célula huésped (Schenkman *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1992).

Cardoso de Almeida y Heise (1993) investigaron la presencia de fosfolipasas en epimastigotes, trypomastigotes metacíclicos de cultivo axénico y de cultivo celular utilizando como sustrato la VSG unida a membrana. Los mayores niveles de actividad fueron encontrados asociados a la fracción de membranas de trypomastigotes de cultivo celular.

Al igual que la PLC de *T. brucei* esta enzima es fuertemente inhibida por el ácido *p*-CMPS, no es apreciablemente afectada por agentes quelantes, requiere de detergentes para su solubilización y presenta la actividad óptima en la misma zona de pH (7-8).

En epimastigotes y trypomastigotes metacíclicos de cultivo axénico los niveles de fosfolipasa detectados fueron menores y la mayor actividad se encontró en la fracción soluble. Esta fue inhibida por la *o*-fenantrolina y mostró un rango de pH óptimo más amplio (Schenkman *et al.*, 1988b).

Recientemente dos grupos de investigadores clonaron un gen que codifica una PI-PLC específica de *T. cruzi* (Nozaki *et al.*, 1999; Furuya *et al.*, 2000). Este gen es expresado en mayores niveles por las formas epimastigote y amastigote del parásito y su expresión es inducida durante la diferenciación de trypomastigotes a amastigotes (Furuya *et al.*, 2000).

Esta enzima presenta características similares a las PI-PLCs de mamíferos. Cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (único sustrato utilizado por ambos grupos de investigadores) y es absolutamente dependiente de Ca^{2+} alcanzando la actividad máxima a una concentración de Ca^{2+} 0,1-0,2 mM y disminuyendo significativamente al aumentar esta concentración.

FOSFOLIPASAS A DE TRYPANOSOMAS

La actividad de fosfolipasa A fue analizada en 4 especies de trypanosoma, *T. brucei*, *T. congolense*, ambos patogénicos, *T. theileri* y *T. lewisi* ambos no-patogénicos (Hambrey *et al.*, 1981). Utilizando 2-¹⁴C-linoleoil-fosfatidilcolina como sustrato se observó que la actividad predominante es de tipo A₁ y sólo hay niveles muy bajos de tipo A₂. A su vez los niveles de actividad detectados de fosfolipasa A son mayores en los trypanosomas patogénicos, lo que es compatible con la hipótesis de que las fosfolipasas contribuyan a la patogenicidad del parásito (Hambrey *et al.*, 1981).

Estas enzimas no tienen requerimientos de cationes divalentes, son estimuladas por el DTT, por el EDTA y por detergentes, variando el tipo y la concentración del detergente con la especie. También hay una variación en el pH óptimo de acción. Para *T. brucei* el pH óptimo está entre 6 y 8,5, para *T. congolense* es 6, para *T. theileri* es 6,75 y para *T. lewisi* es de 5,25 (Hambrey *et al.*, 1981).

En *T. brucei* donde la fosfolipasa A₁ es particularmente activa se detectaron dos isoenzimas, una soluble y otra (sólo el 7%) asociada al material particulado, probablemente localizada en los lisosomas (Oppendoes & Van Roy, 1982).

FUNCION DE LOS GLICEROLIPIDOS Y LOS ESFINGOLIPIDOS EN LA SEÑALIZACION CELULAR

Los lípidos fueron vistos clásicamente como entidades biológicas inertes cuya función principal era mantener la integridad de la membrana celular y proveer de una barrera permeable entre el exterior y el interior. Hoy en día se considera a los lípidos activos participantes de la vida celular. Existen dos categorías de lípidos; la clase de lípidos que están constitutivamente presentes en la célula y los intermediarios lipídicos que persisten un tiempo de vida finito, lo que los hace adecuados para el proceso celular altamente especializado de transducción de señales. La transducción de señales esencialmente trata de explicar el comportamiento celular elucidando eventos moleculares por los cuales señales extracelulares finalmente generan una respuesta intracelular (Ghosh *et al.*, 1997).

La transducción de la señal extracelular está mediada por moléculas con un tiempo de vida finito conocidas como segundos mensajeros (McCovern *et al.*, 1995). Los segundos mensajeros se generan en respuesta a una señal específica a partir de un precursor pre-existente. La interacción de agonistas extracelulares con receptores de membrana específicos produce la activación de enzimas específicas que generan segundos mensajeros intracelulares a partir de precursores lipídicos.

Entre los lípidos con actividad de segundos mensajeros que pueden generarse por acción de las fosfolipasas de membrana sobre los PI o GPI, se encuentran el DAG y la ceramida.

Glicerolípidos como segundos mensajeros: Diacilglicerol

El DAG, intermediario en el metabolismo de los glicerolípidos (Bell & Coleman, 1980) es históricamente el primer lípido conocido como segundo mensajero. Agentes extracelulares específicos interactúan con receptores específicos de la membrana provocando la activación de una PI-PLC, que hidroliza PI generando DAG.

El DAG también puede originarse por acción de una PLC sobre la fosfatidilcolina (Exton, 1990).

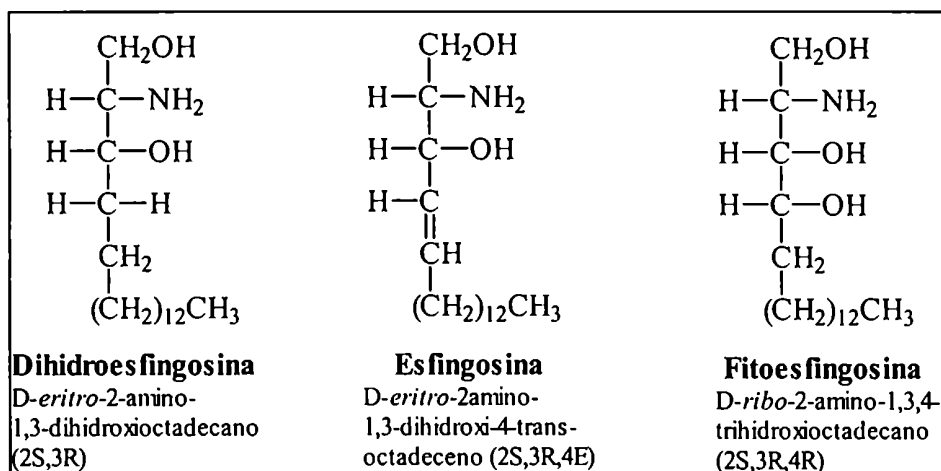
Kishimoto y col. (1980) observaron que la adición de *sn*-1,2-DAG aumentaba drásticamente la velocidad de reacción de la proteinquinasa C (PKC) y reducía los requerimientos de calcio de esta enzima. La naturaleza transitoria del DAG, generado en respuesta a la activación de fosfolipasas, llevó a proponer su rol como segundo mensajero (Nishizuka, 1984; Bell, 1986). La activación de la enzima involucra la unión de factores de activación (DAG, Ca^{2+} , fosfolípidos) al dominio regulatorio, que inducen un cambio conformacional en la enzima liberando el dominio catalítico (Lambeth & Ryu, 1996).

Estudios con más de 20 análogos de diglicéridos demostraron un requerimiento estereoespecífico para la activación de la PKC. Tanto los grupos carbonilos como el 3-hidroxilo son esenciales para la función del DAG. El reemplazo de los ésteres por éteres o amidas resultó en DAG no funcionales (Ganong *et al.*, 1986; Hannun & Bell, 1986).

Esfingolípidos como segundos mensajeros

Los esfingolípidos son componentes de la membrana celular que constituyen una de las clases de biomoléculas química y funcionalmente más diversas. Esta diversidad y complejidad estructural le permite a estos compuestos tener funciones y actividades biológicas múltiples en la célula (Hakomori, 1981; Hannun & Bell, 1989; Merrill, 1991), lo que es avalado por los cambios que se producen en los esfingolípidos durante el crecimiento celular, la diferenciación, la embriogénesis y el desarrollo (Bell *et al.*, 1993).

Los esfingolípidos están formados por una base de cadena larga (normalmente es de 18C) con el C1 y el C3 hidroxilados y un grupo amino en el C2. Las bases esfingosínicas comúnmente encontradas son la dihidroesfingosina (esfinganina), la esfingosina y la fitoesfingosina.



El descubrimiento de que la esfingosina podía comportarse como potente inhibidor de la PKC (Hannun *et al.*, 1986), dirigió la atención al componente lipídico de los esfingolípidos y sugirió la hipótesis de que los productos derivados de esfingolípidos podían funcionar como segundos mensajeros (Hannun & Bell, 1989). Desde este descubrimiento, se encontró que concentraciones micromolares de esfingosina afectaban muchos sistemas biológicos y que otros esfingolípidos eran candidatos a ser mediadores lipídicos, incluyendo ceramidas (*N*-acil-esfingosinas), ceramidas-1-fosfato, esfingosina-1-fosfato y *N*-metil-esfingosinas.

Metabolismo de ceramida en mamíferos y en levaduras

En analogía al rol central del DAG en el metabolismo de los glicerolípidos, la ceramida juega un rol equivalente como componente estructural y funcional del metabolismo de esfingolípidos. Debido a la función de la ceramida como efector intracelular, las enzimas que regulan el metabolismo de ceramida son reguladores potenciales del nivel de ceramida y consecuentemente de las funciones mediadas por ceramida.

Los esfingolípidos son componentes abundantes de la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*, lo que hace a este organismo unicelular un modelo

importante para descifrar los mecanismos de los procesos celulares en eucariotes y los modos de regulación.

Los primeros pasos de la síntesis de esfingolípidos en mamíferos y en *Saccharomyces cerevisiae* son similares pero producen bases de cadena larga y ceramidas estructuralmente y químicamente diferentes (Figura 12). La biosíntesis *de novo* de ceramida se inicia por condensación de serina con palmitoil-CoA para dar 3-cetodihidroesfingosina (3-cetoesfinganina) que es luego reducida a dihidroesfingosina (esfinganina). Estos pasos son comunes a todos los organismos. Por hidroxilación del C4 de la dihidroesfingosina se obtiene la fitoesfingosina, base de cadena larga encontrada principalmente en hongos y levaduras. Luego, su unión con un ácido graso produce la ceramida correspondiente. La ceramida que se halla en mayor cantidad en *S. cerevisiae* tiene un ácido graso de 26 carbonos α -hidroxilado (α OH-C₂₆) unido a fitoesfingosina. Los mamíferos en cambio generalmente utilizan ácidos grasos de cadena más corta (C₁₆ a C₂₄) para formar *N*-acildihidroesfingosina (dihidroceramida), donde es introducido el doble enlace *trans*-4,5 para obtener la *N*-acilesfingosina (ceramida) (Merrill & Wang, 1992; Rother *et al.*, 1992). Por lo tanto los animales sintetizan ceramida mientras que los hongos y plantas sintetizan mayormente fitoceramida. La adición de uno o dos grupos OH al ácido graso de la ceramida es común en levaduras pero es rara en mamíferos (Lester & Dickson, 1993)

Una vez formada, la ceramida se utiliza como precursor para otros esfingolípidos complejos (Van Echten & Sandhoff, 1993). Los hongos, levaduras y plantas transfieren inositolfosfato del fosfatidilinositol al 1-OH de la fitoceramida para formar inositol-fosfoceramida (IPC). Esta reacción es catalizada por una IPC sintasa.

S. cerevisiae sintetiza sólo tres tipos de esfingolípidos complejos: IPC, manosa-inositol-P-ceramida (MIPC) y manosa-(inositol-P)₂-ceramida (M(IP)₂C). Estos no son especies monomoleculares sino que están formados por una mezcla que difiere en el largo de la cadena y el grado de hidroxilación tanto de la base de cadena larga como del ácido graso (Lester & Dickson, 1993).

Los mamíferos en cambio, no transfieren inositolfosfato a ceramida sino que transfieren fosfocolina de la fosfatidilcolina a la ceramida para formar esfingomielina, esfingolípido mayoritario. Los mamíferos también pueden unir glucosa y galactosa a la ceramida dando un gran número de glicosfingolípidos complejos (Merrill & Sweeley, 1996).

Dado que la síntesis de esfingolípidos es esencial para la viabilidad de las células y que IPC no es sintetizada por mamíferos, la IPC sintasa es un blanco prometedor para drogas antifúngicas.

En todos los organismos estudiados hasta el momento la biosíntesis de esfingolípidos hasta la formación de ceramida se lleva a cabo en el RE. En mamíferos la ceramida es transportada por vesículas secretorias al aparato de Golgi donde es convertida en esfingolípidos complejos (Rosenwald & Pagano, 1993; Sandhoff & van Echten, 1993). En *S. cerevisiae* por lo menos una parte de la ceramida es convertida en IPC antes de ser transportada al aparato de Golgi (Puoti *et al.*, 1991). Una revisión sobre la biosíntesis de esfingolípidos en *S. cerevisiae* se puede encontrar en los trabajos de Dickson & Lester, 1999a, 1999b. En este organismo se han identificado los genes involucrados en la mayor parte de los pasos del metabolismo de esfingolípidos pero ninguna de las enzimas fue purificada hasta el momento.

El catabolismo de la ceramida aún no ha sido muy estudiado. Se detectaron tres ceramidases en mamíferos que se diferencian por su pH óptimo (Wertz & Downing, 1990; Sugita *et al.*, 1975) y que originan esfingosina que puede ser degradada o reincorporarse en ceramida (Buehrer & Bell, 1992; Van Veldhoven & Mannaerts, 1993).

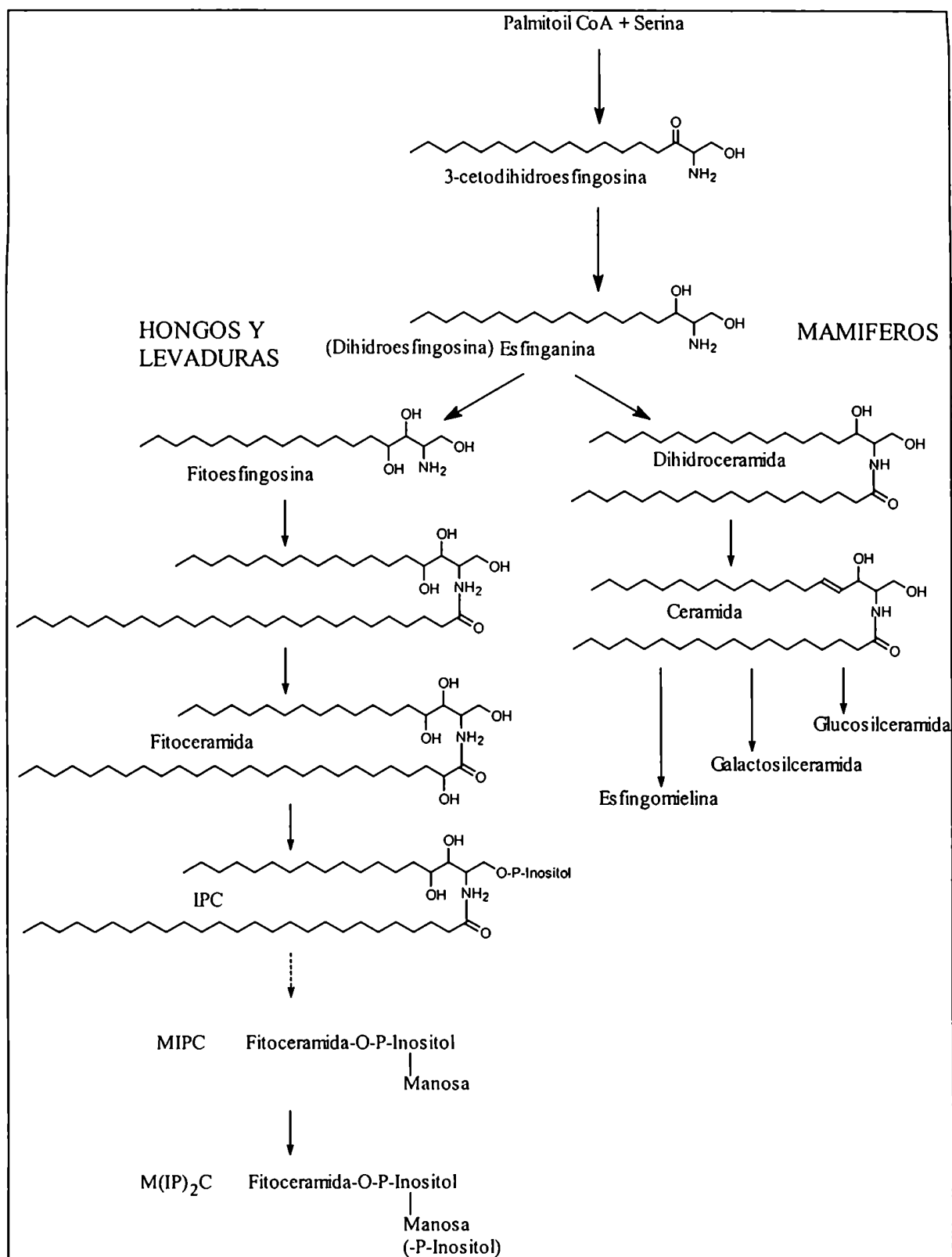


Figura 12 - Camino biosintético comparativo de esfingolípidos en hongos y mamíferos.

Actividad biológica de la ceramida

La ceramida es considerada hoy en día un potente segundo mensajero involucrado en la regulación del crecimiento celular, en la diferenciación y en la mediación intracelular de citotoxicidad participando en eventos de apoptosis. En células de mamífero regula la secreción proteica, tiene un rol en la modulación de la función inmune y en la respuesta inflamatoria (Hannun, 1997). También participa en procesos de transducción de señales activando una serina/treonina proteínaquinasa (Mathias *et al.*, 1991) y una proteína fosfatasa (Dobrowsky & Hannun, 1992) e inhibe la actividad celular de la fosfolipasa D.

La especificidad de la ceramida fue estudiada examinando los efectos de otros lípidos, análogos e isómeros. Estos resultados indicaron que la ceramida tiene una especificidad significativa cuando se la compara con otros lípidos estrechamente relacionados como DAG. La D-eritro-C2-ceramida es más potente que el enantiómero L-eritro-C2-ceramida y la D-eritro-dihidro-C2-ceramida no posee actividad celular (Obeid *et al.*, 1993; Fishbein *et al.*, 1993; Bielawska *et al.*, 1993).

En contraste con la ceramida, la dihidroceramida es inactiva frente a la antiproliferación, diferenciación y apoptosis (Kok *et al.*, 1997). Dado que la única diferencia estructural es la presencia del doble enlace trans-4,5 en la ceramida esto abre la posibilidad de que el doble enlace del esfingolípido sirva para impartir una actividad biológica crítica a la ceramida.

Ceramida y DAG definen mecanismos opuestos de regulación celular (Hannun, 1994). Estos efectos opuestos sugieren que más importante que los valores absolutos de ambos lípidos es su concentración relativa.

En *S. cerevisiae* se observó que los esfingolípidos tienen un rol esencial en la resistencia a situaciones de estrés, calor, bajo pH, estrés osmótico y supervivencia en la fase estacionaria de crecimiento (Patton *et al.*, 1992; Dickson *et al.*, 1997). Son reguladores importantes en la homeostasis del Ca^{2+} o componentes en mecanismos de señalización mediados por calcio (Zhao *et al.*, 1994; Nwaka *et al.*, 1995; DeMesquita *et al.*, 1997). Son necesarios para el transporte en vesículas, desde el RE al aparato de

Golgi, de proteínas ancladas por GPI (Horvath *et al.*, 1994; Skrzypek *et al.*, 1997; Sutterlin *et al.*, 1997). Una revisión de las funciones de los esfingolípidos en levaduras se puede encontrar en el trabajo de Dickson, 1998.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO 4

Extracción, fraccionamiento y caracterización de los inositolfosfolípidos de formas epimastigote de Trypanosoma cruzi

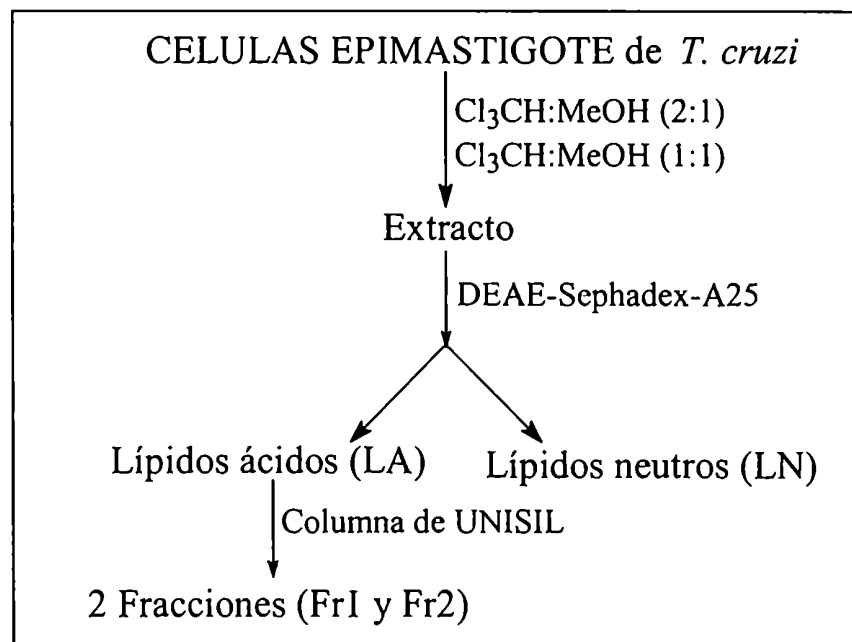
EXTRACCION, FRACCIONAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS INOSITOLFOSFOLIPIDOS DE FORMAS EPIMASTIGOTE DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Los inositolfosfolípidos (IPLs) junto con la fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina son los fosfolípidos mayoritarios encontrados en formas epimastigote de *T. cruzi* (Da Silveira & Colli, 1981) y son los precursores de las anclas glicosilfosfatidilinositol (GPI). Este tipo de anclaje de glicoproteínas a la membrana es muy frecuente en parásitos protozoarios (Mc Conville & Ferguson, 1993) y algunas de las glicoproteínas ancladas de esta forma estarían involucradas en el proceso de infección (Cross & Takle, 1993). Este hecho sugiere que la inhibición del anclaje a la membrana del parásito es una alternativa atractiva para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas. El conocimiento de la estructura y biosíntesis de los IPLs es una contribución en esa dirección.

En este capítulo se presenta el primer análisis detallado de las especies moleculares de IPLs disponibles para la construcción de las anclas GPI. La caracterización de los IPLs de formas epimastigote (Bertello *et al.*, 1995) permitió contar con los testigos y la metodología adecuada para la identificación de estos compuestos en formas trypomastigote (Uhrig *et al.*, 1996).

Extracción y purificación

Células epimastigote de *T. cruzi* (5×10^9 , cepa Y y CL) incorporadas metabólicamente con ácido [9,10(n)- ^3H]-palmítico fueron extraídas con cloroformo : metanol (2:1) y (1:1) (Esquema 4). Estos extractos previamente mezclados, se llevaron a seco y se fraccionaron en lípidos ácidos (LA) y neutros (LN) por cromatografía de intercambio aniónico en una columna de DEAE-Sephadex A25 (forma acetato). Para separar ambas fracciones se eluyeron en primer término los lípidos neutros que no interactúan con la resina, con cloroformo : metanol : agua (15:30:4). A continuación fue eluída con cloroformo : metanol : AcONa 0,8M (15:30:4) la fracción de lípidos ácidos que interactúa con la resina.

**Esquema 4**

Este paso de purificación separa los IPLs de los fosfolípidos que contienen grupos amino, como fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, que constituyen el 75-80% de los fosfolípidos totales en las formas epimastigotes de *T. cruzi* (Da Silveira & Colli, 1981). En algunos casos, previo al fraccionamiento en LA y LN se lavó el extracto cloroformo : metanol con éter o hexano para eliminar el exceso de ácido palmítico radioactivo utilizado en la incorporación.

Ambas fracciones se llevaron a seco y su análisis por cromatografía en capa delgada (TLC) junto con el extracto original (solvente A) permitió verificar la correcta separación de estos lípidos (Figura 13). Se obtuvo un perfil similar para ambas cepas.

Este mismo procedimiento de extracción y purificación también se llevó a cabo sobre células no incorporadas con el precursor radioactivo.

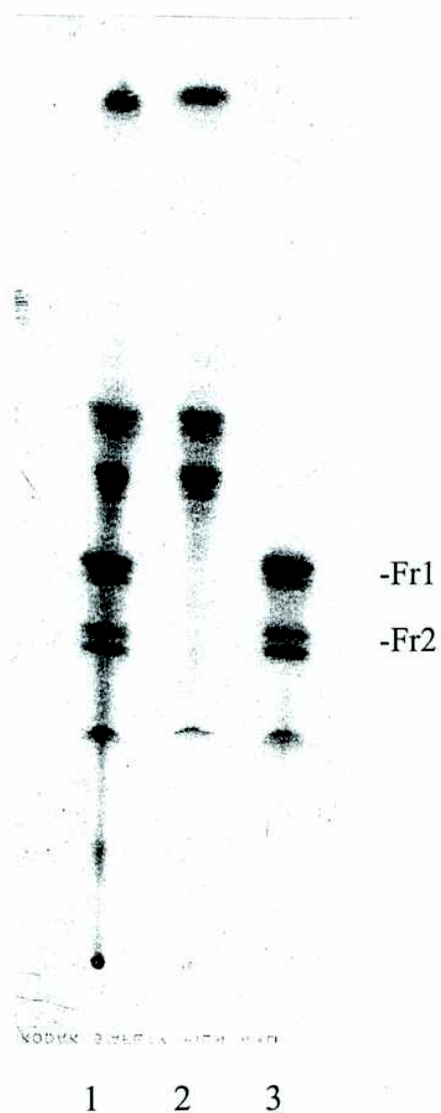


Figura 13 – TLC y fluorografía del extracto lipídico cloroformo:metanol radioactivo de células epimastigote de *T. cruzi* cepa CL (canal 1) y de las fracciones de lípidos neutros (canal 2) y ácidos (canal 3) obtenidos de acuerdo al Esquema 4. Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol: NH_4OH 2,5M (15:10:2).

Estas dos bandas llamadas Fr1 y Fr2 pudieron ser purificadas por cromatografía en columna de ácido silícico (Unisil) (Figura 14).

La proporción de Fr1 a Fr2 radioactivas para las formas epimastigote de las dos cepas estudiadas se puede ver en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3 – Proporción de Fr1 a Fr2 radioactivas

	Fr1	Fr2
Cepa Y	40%	60%
Cepa CL	55%	45%

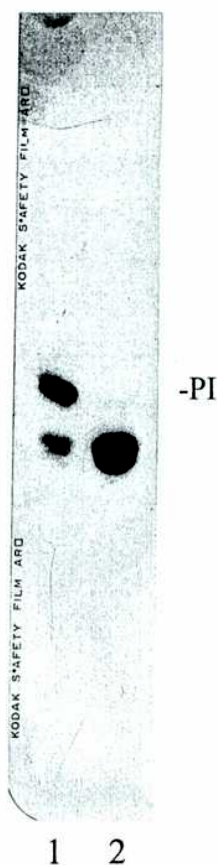
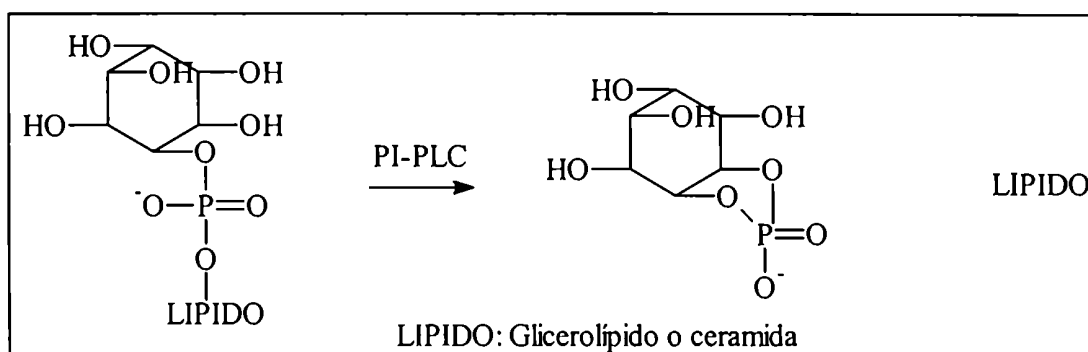


Figura 14 – TLC y fluorografía de los lípidos ácidos radioactivos (cepa Y) purificados en columna de Unisil. Fr1, canal 1; Fr2, canal 2. Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol: NH_4OH 2,5M (15:10:2). Testigo: PI, fosfatidilinositol.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS LÍPIDOS ÁCIDOS

La estructura general de los dos compuestos (Fr1 y Fr2) obtenidos por fraccionamiento de los lípidos ácidos se dilucidó por tratamiento enzimático de los mismos con fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC) de *Bacillus thuringiensis*. Esta enzima cataliza en forma específica la hidrólisis de los IPLs liberando el lípido y formando un inositolfosfato cíclico (Volwerk *et al.*, 1990).



Las PI-PLC bacterianas, en general, son utilizadas como una herramienta importante en la identificación de los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) que se encuentran anclando proteínas a la membrana celular. En un principio se atribuyó la hidrólisis con PI-PLC a la presencia de un glicerolípidos unido al inositolfosfato (Majerus *et al.*, 1986; Low, 1989), pero posteriormente se comprobó que la PI-PLC bacteriana también era capaz de degradar los GIPLs conteniendo ceramida (Lederkremer *et al.*, 1990).

Como puede observarse en la Figura 15, canal 2, ambos compuestos fueron sensibles a este tratamiento enzimático lo que permitió identificarlos como IPLs.

Con el fin de descartar la presencia de un azúcar unido al inositol a través de GlcNH_2 como en los GPI, se trataron las fracciones con HNO_2 . En estas condiciones los GIPLs que contienen glucosamina no *N*-acetilada unida al inositol se hidrolizan dando como producto un glicano neutro (Esquema 3). Como puede observarse en la Figura 15, canal 3, ninguno de los dos compuestos alteraron sus movi­lidades cromatográficas con este tratamiento. Por otra parte, también fueron resistentes al tratamiento con α -

manosidasa, lo cual indica la ausencia de α -manosas.



Figura 15 – Cromatografía en capa delgada y autorradiografía de los lípidos ácidos radioactivos (canal 1) y de los mismos tratados con PI-PLC (canal 2) y con HNO_2 (canal 3). Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol: NH_4OH (15:10:2).

Identificación de inositol

Las fases acuosas resultantes, luego de tratar Fr1 y Fr2 obtenidas de células no radioactivas con PI-PLC, fueron sometidas a hidrólisis ácida con HCl 4N. Luego de eliminar el ácido realizando sucesivas evaporaciones con agua, se eliminaron las sales utilizando una resina de intercambio iónico mixta MB3. El material eluido con agua, se llevó a seco y se acetiló para ser analizado por CGL (condiciones C). En ambas muestras se detectó un pico coincidente con un testigo de *myo*-inositol acetilado (Figura 16). El *myo*-inositol es el isómero comúnmente encontrado en las anclas GPI. No se detectó ningún otro monosacárido.

Con todos estos datos podemos concluir que Fr1 y Fr2 son inositolfosfolípidos. Por lo tanto se procedió a determinar la diferencia estructural entre ambos compuestos para compararlos con las estructuras encontradas en los GPI.

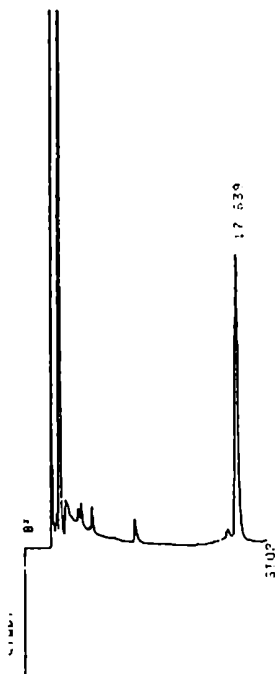


Figura 16 – Cromatografía gaseosa del producto de hidrólisis ácida de la fase acuosa remanente luego del tratamiento de Fr1 con PI-PLC.

La fase acuosa resultante luego de tratar Fr1 con PI-PLC se sometió a hidrólisis ácida con HCl 4N, la muestra se acetiló y se analizó por CGL utilizando las condiciones C. El tiempo de retención de 17,639 min coincide con el de un testigo de *myo*-inositol acetilado.

ANÁLISIS DE Fr1 (PI)

El lípido marcado radioactivamente, liberado por tratamiento de Fr1 con PI-PLC, fue analizado en el solvente B (Figura 17A, canal 2). Como puede observarse, se obtuvo una banda coincidente con los testigos de alquilacilglicerol (AAG) y diacilglicerol (DAG) que no son separados por este solvente. Esta banda se eluyó y se recromatografió en el solvente D donde se detectaron ambos glicerolípidos (Figura 17B).

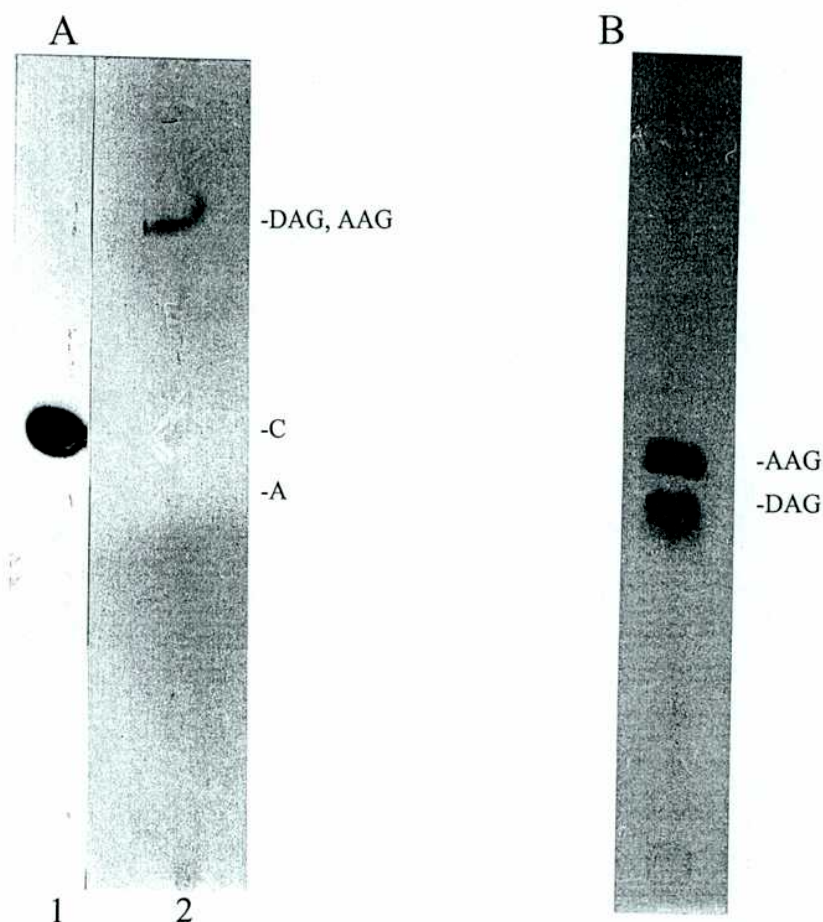


Figura 17 – TLC y fluorografía de los lípidos marcados con [^3H]-palmitico liberados por acción de la PI-PLC sobre los IPLs.

A) Fr1 y Fr2 (Fig. 14) se trataron con PI-PLC de *B. thuringiensis*. Los lípidos (Fr2, canal 1 y Fr1, canal 2) se extrajeron con éter y se cromatografiaron utilizando cloroformo:metanol (38:3) como solvente de desarrollo.

B) Los lípidos liberados por acción de la PI-PLC sobre la Fr1 se re-cromatografiaron en hexano:acetato de etilo (4:1).

Testigos: A, alquilglicerol (1-*O*-hexadecilglicerol); C, ceramida (palmitoildihidroesfingosina); DAG, 1,2-dipalmitoilglicerol; AAG, 1-*O*-hexadecil-2-*O*-palmitoilglicerol.

Este resultado permitió identificar la Fr1 de los IPLs como fosfatidilinositol (PI). La cuantificación de la radioactividad eluída para cada lípido permitió obtener una relación AAG:DAG de 3:2 para la cepa Y y de 1:1 para la cepa CL, pudiendo éstas variar en distintas incorporaciones.

No se encontró dialquiloglicerol, especie descrita en *Leishmania mexicana mexicana* (Singh *et al.*, 1988), como tampoco fue encontrada en *T. brucei* (Patnaik *et al.*, 1993)

En concordancia con estos resultados, el PI sometido a saponificación se hidrolizó dando el ácido graso y un *liso*PI, que como era de esperar presentó menor movilidad que el PI original al ser analizado por TLC en el solvente A (Figura 18). Este resultado confirma la presencia de un AAG en el PI y la incorporación de [³H]-palmítico en el alquilo de cadena larga.



Figura 18 – TLC y autorradiografía de los PI marcados radioactivamente con [^3H]-palmítico (canal 1) y de los productos obtenidos por saponificación de los mismos (canal 2). Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol: NH_4OH (15:10:2). Testigo: P, ácido palmítico.

Identificación de los glicerolípidos

Para la identificación de los glicerolípidos el PI (20 000 cpm) marcado con ácido [^3H]-palmitico se sometió a metanólisis ácida con $\text{HCl}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:29:4). Los lípidos extraídos con éter luego de este tratamiento se separaron por TLC en el solvente C. En esta TLC se pudo observar una mancha correspondiente a los ésteres metílicos de los ácidos grasos y otro compuesto con movilidad similar a un testigo de alquilglicerol. Este último se eluyó y se analizó por RPTLC en el solvente P (Figura 19) pudiendo identificarlo como hexadecilglicerol. Es interesante notar que en casi todas las muestras incorporadas con ácido palmítico radioactivo el AAG incorporó la mayor parte de la radioactividad en el grupo alquilo a diferencia de lo observado por Cardoso de Almeida y col. en el estudio del ancla glicolípídica del antígeno 1G7 de formas metacíclicas de *T. cruzi* y sus precursores (Heise *et al.*, 1995, 1996). Este grupo de investigadores no encuentra marca radioactiva en el grupo alquilo.

La escasa marcación que a veces hemos encontrado en los ácidos grasos de los PI puede deberse a la acción de enzimas de membrana que permiten un intercambio rápido con los ácidos grasos del medio, tema que se discute en otro capítulo.

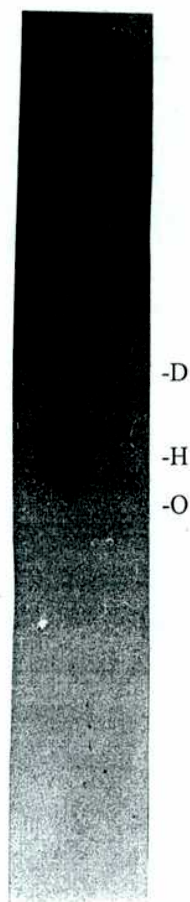


Figura 19 – RPTLC del alquilglicerol marcado radioactivamente con [^3H]-palmítico, obtenido por hidrólisis del glicerofosfoinositol.

La Fr1 radioactiva se hidrolizó con HCl/metanol/agua (3:29:4) a 70-78°C durante 18h. Los lípidos se separaron por TLC en el solvente C y el componente con la movilidad del alquilglicerol se eluyó de la placa y se analizó por RPTLC. Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol:agua (20:55:3). Testigos: D, 1-*O*-dodecilmglicerol; H, 1-*O*-hexadecilmglicerol; O, 1-*O*-octadecilmglicerol.

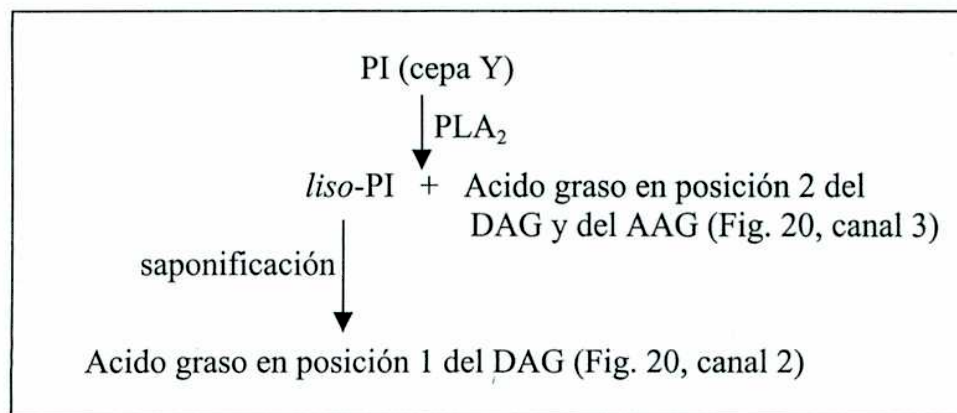
Para el análisis de los ácidos grasos, los glicerolípidos, DAG y AAG, de la Fig. 17B fueron eluidos y saponificados. Los productos de saponificación para cada compuesto fueron separados por TLC en el solvente I. Para el DAG se detectó una mancha correspondiente a ácido graso como único producto, mientras que para el AAG además de los ácidos grasos se confirmó la presencia de alquilglicerol. Esto se realizó para ambas cepas estudiadas. Los ácidos grasos fueron eluidos de la sílica, se metilaron con $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$ y se analizaron por RPTLC (Figura 20). Para el DAG, en ambas cepas se halló que el ácido esteárico es el ácido graso mayoritario, junto con una pequeña cantidad de ácido palmítico. La proporción de esteárico a palmítico varía con la cepa. En la cepa CL (canal 4) se hallan en cantidades similares, mientras que en la Y (canal 1) sólo hay una pequeña cantidad de palmítico.

Por tratamiento del PI (Y) de acuerdo al Esquema 5, se intentó determinar si existe alguna preferencia en la ubicación de estos ácidos grasos en el DAG. El PI se trató con PLA_2 , obteniéndose así los ácidos grasos presentes en posición 2 del DAG y del AAG (canal 3). El *liso*-PI resultante se saponificó y se analizó de esta forma el ácido graso en posición 1 del DAG (canal 2). Así se encontró que el acilante en la posición 1 del DAG (canal 2) es sólo ácido esteárico, mientras que en la posición 2 tenemos además ácido palmítico (canal 3).

Para el AAG, como se dijo anteriormente, se encontró muy poca radioactividad en el ácido graso. Sólo se detectó una pequeña cantidad de ácido esteárico junto con trazas de palmítico.

En ningún caso los perfiles cromatográficos se modificaron en forma apreciable después de la hidrogenación.

Es interesante notar que en trypomastigotes el único ácido graso encontrado formando parte de estos compuestos fue el ácido esteárico (Uhrig *et al.*, 1996).



Esquema 5

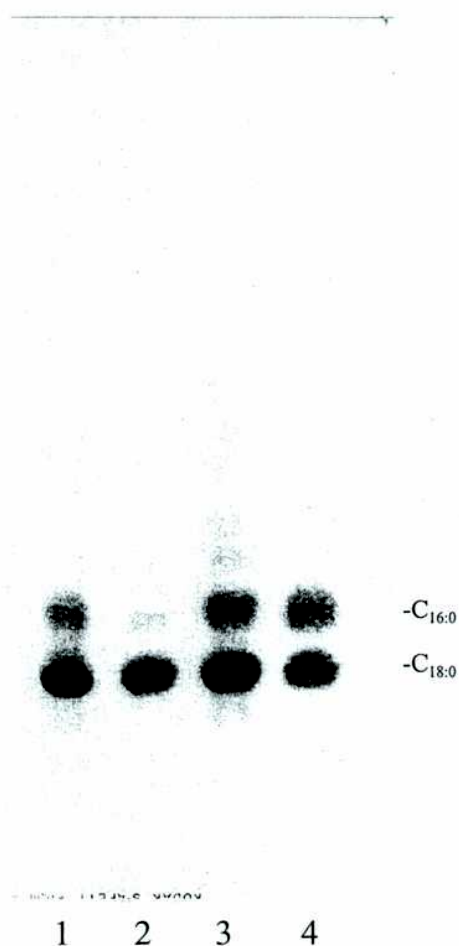


Figura 20 – TLC en fase reversa de los ácidos grasos metilados constituyentes de los PI, cepa Y (canales 1-3) y cepa CL (canal 4). Canal 1, Ácidos grasos DAG (Y); canal 2, ácidos grasos en posición 1 del DAG (Y); canal 3, ácidos grasos en posición 2 del DAG y AAG (Y); canal 4, ácidos grasos DAG (CL). Solvente de desarrollo: Ácido acético:acetonitrilo (1:1). Testigos: C_{16:0}, palmitato de metilo; C_{18:0}, estearato de metilo.

Las muestras de PI no radioactivas también se trataron con PI-PLC, los lípidos se extrajeron con éter y se analizaron por TLC en el solvente D para separar el AAG del DAG. Estos fueron eluidos, saponificados y analizados como trimetilsilil derivados por CGL (condición B) y CGL-EM (condición E) (Figura 21).

Para la cepa Y se detectaron entre los productos de saponificación del AAG un solo alquilglicerol, el 1-*O*-hexadecilglicerol, con un tiempo de retención de 27,3 min y dos ácidos grasos, linoleico (16,9 min) y oleico (17,2 min) (Figura 21a).

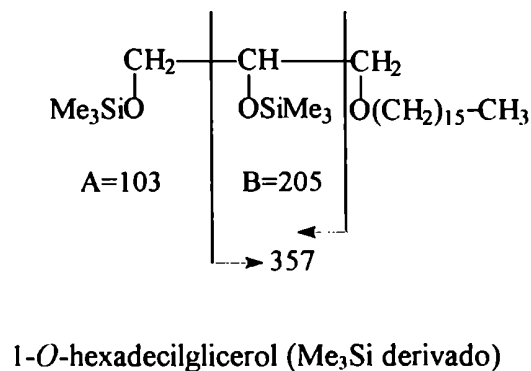
El espectro de masa del pico 1 fue idéntico al obtenido con un testigo del trimetilsilil derivado del ácido linoleico. Este presenta un pequeño ion molecular a m/z 352, el ion M-15 a m/z 337 (20%), el ion M-TMSO a m/z 262 y M-TMSOCOCH₂ a m/z 220 (Figura 21b).

El pico 2 tiene un espectro de masa igual al de un testigo de ácido oleico y en concordancia con esto sus fragmentos de masa aparecen desplazados dos unidades respecto del pico 1. El ion molecular aparece a m/z 354, el ion M-15 a m/z 339 (30%), el ion M-TMSO a m/z 264 y M-TMSOCOCH₂ a m/z 222 (Figura 21c).

El espectro de masa del pico 3 presenta el pico base m/z 205 característico de los 1-monoalquilglicerol (Myher *et al.*, 1974) y los iones diagnósticos a M-15, M-90 y M-103 consistentes con una cadena alquílica C_{16:0} (Figura 21d).

1-*O*-HEXADECILGLICEROL

Fragmento	m/z	Intensidad
M-CH ₃	445	1,6
M-TMSOH	370	1,1
M-A	356	1,5
M-147	313	7,2
B	205	100,0
TMSOSi(CH ₃) ₂	147	41,7
TMSOCH ₂ CHOH	133	33,2
TMSOCHCHO	131	22,1
(CH ₃) ₂ SiOCH ₂ CHO	117	41,1
CH ₂ OTMS	103	17,7
TMS	73	56
C ₄ H ₉	57	35,0



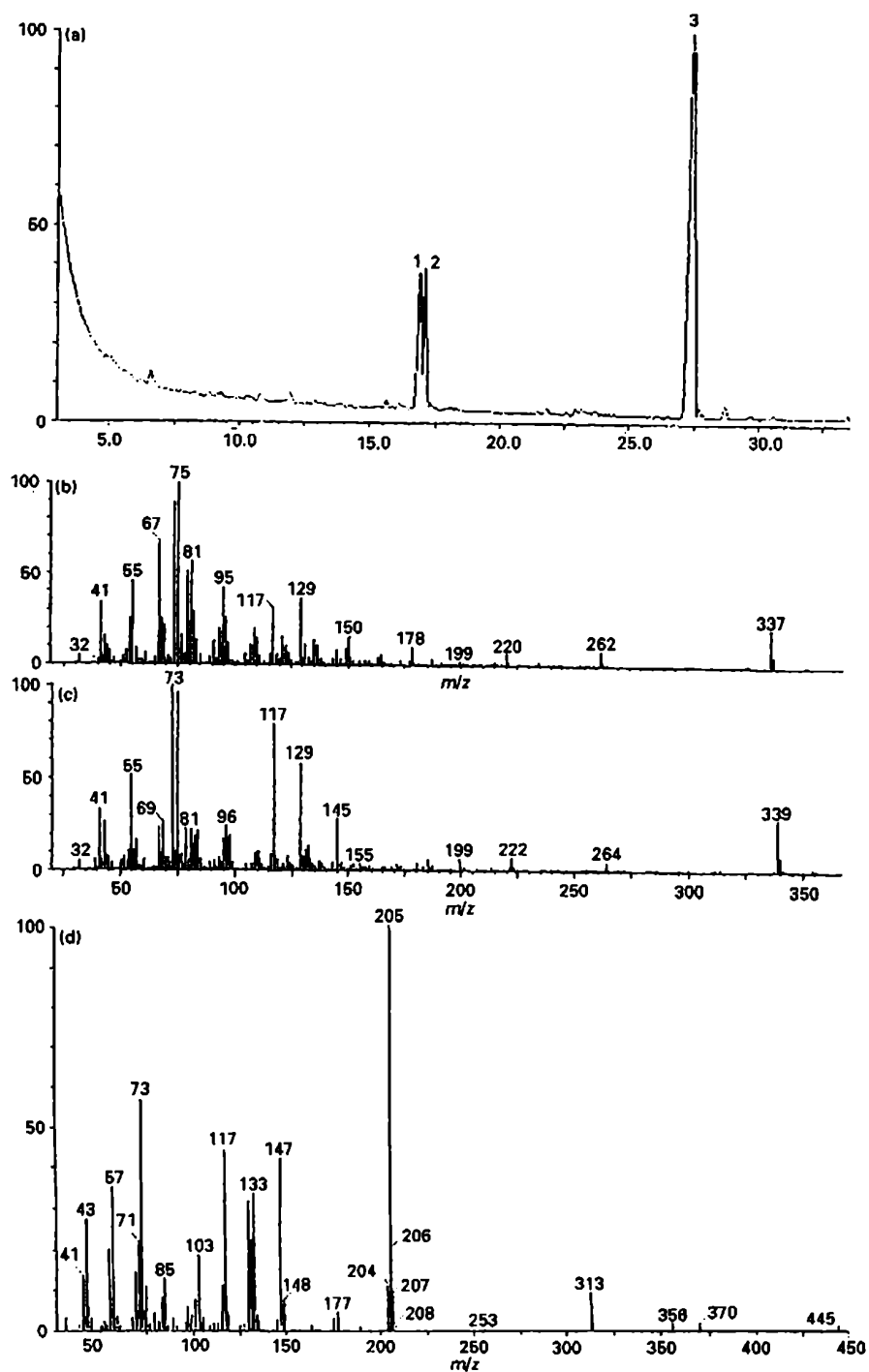


Figura 21 – CGL-EM de los productos obtenidos por saponificación del alquilacilglicerol (cepa Y).

a) La Fr1 se trató con PI-PLC y los glicerolípidos se separaron por TLC en el solvente D. Estos se eluyeron de la placa y se saponificaron. Los lípidos obtenidos del alquilacilglicerol se analizaron como trimetilsilil derivados en una columna capilar DB5 (0,25 mm x 30 m). b) Espectro de masa del pico 1 (ácido linoleico). c) Espectro de masa del pico 2 (ácido oleico). d) Espectro de masa del pico 3 (1-*O*-hexadecilglicerol).

Ningún otro pico apareció por monitoreo selectivo a m/z 205, por lo tanto los dos ácidos grasos serían componentes del 1-*O*-hexadecil-2-*O*-oleoilglicerol y del 1-*O*-hexadecil-2-*O*-linoleoilglicerol.

Cuando se analizan los ácidos grasos del DAG la relación entre $C_{18:2}$ y $C_{18:1}$ fue 1:1.

Para la cepa CL se analizaron en conjunto los productos de saponificación de ambos glicerolípidos obteniéndose además del 1-*O*-hexadecilglicerol, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico.

En formas trypomastigote de *T. cruzi* (cepa Y), se encontraron $C_{16:0}$, $C_{18:1}$ y $C_{18:0}$ formando parte de los PI, siendo el $C_{18:1}$ el mayoritario (Urhig *et al.*, 1996).

Por otra parte se pudieron analizar por CGL los glicerolípidos (DAG y AAG) obtenidos directamente por tratamiento de los PI con PI-PLC utilizando una columna capilar corta y los compuestos sililados (condiciones A_i). Para ambas cepas se detectaron dos picos (además del desoxicólico), uno correspondiente al AAG y otro al DAG (Figura 22). El conocimiento de la composición de ácidos grasos de ambos compuestos permitió la asignación de estos picos por comparación con los testigos utilizados.

En concordancia con los ácidos grasos encontrados en el AAG el tiempo de retención de éste fue muy similar al testigo de 1-*O*-hexadecil-2-*O*-oleoilglicerol, previamente sintetizado (Bertello *et al.*, 1997). A pesar de que los estándares del 1-*O*-hexadecil-2-*O*-acilglicerol con $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:1}$ y $C_{18:0}$ como ácidos grasos fueron bien resueltos no se logró separar los dos AAG encontrados (1-*O*-hexadecil-2-*O*-oleoilglicerol y 1-*O*-hexadecil-2-*O*-linoleoilglicerol).

El DAG presentó un tiempo de retención similar al 1,2-dioleoilglicerol. Para la cepa Y no se puede asegurar si ambos ácidos grasos (oleico y linoleico) están presentes en una especie molecular o hay una heterogeneidad de especies moleculares que no pudo resolverse por cromatografía gaseosa.

Dado que para la cepa CL no se observó en la cromatografía gaseosa de los lípidos liberados por PI-PLC (Fig. 22) ningún pico con R_f similar al 1-*O*-hexadecil-2-*O*-estearoilglicerol, el ácido esteárico debe provenir del DAG. Asimismo entre los DAG tampoco se detectó el 1,2-diestearoilglicerol, por lo tanto el ácido esteárico tiene que estar

formando una especie molecular junto con el ácido oleico o linoleico. Probablemente haya una heterogeneidad de especies moleculares formadas por estos tres ácidos grasos.

La relación AAG a DAG encontrada en las distintas cepas fue de **2,4:1** para la cepa Y y **1:4,5** para la cepa CL (Figura 22).

De manera similar a lo observado para la cepa CL, en formas procíclicas de *T. brucei*, se encontró que la relación AAG/DAG en el PI es de 1:9 mientras que en formas sanguíneas el PI está exclusivamente formado por DAG (Patnaik *et al.*, 1993).

También se caracterizó un 1-*O*-hexadecil-2-*O*-acilglicerol con C_{16:0} y C_{18:0} como ácidos grasos en el ancla de la glicoproteína 1G7 de formas metacíclicas de *T. cruzi* (Heise *et al.*, 1995).

En el ancla de las mucinas de formas trypomastigote se encontró 1-*O*-hexadecil-2-*O*-acilglicerol con C16:1 y C16:2 como ácidos grasos (Camargo *et al.*, 1997). Los autores señalan que los ácidos grasos insaturados son elementos importantes en la producción de citoquinas por los macrófagos en la infección.

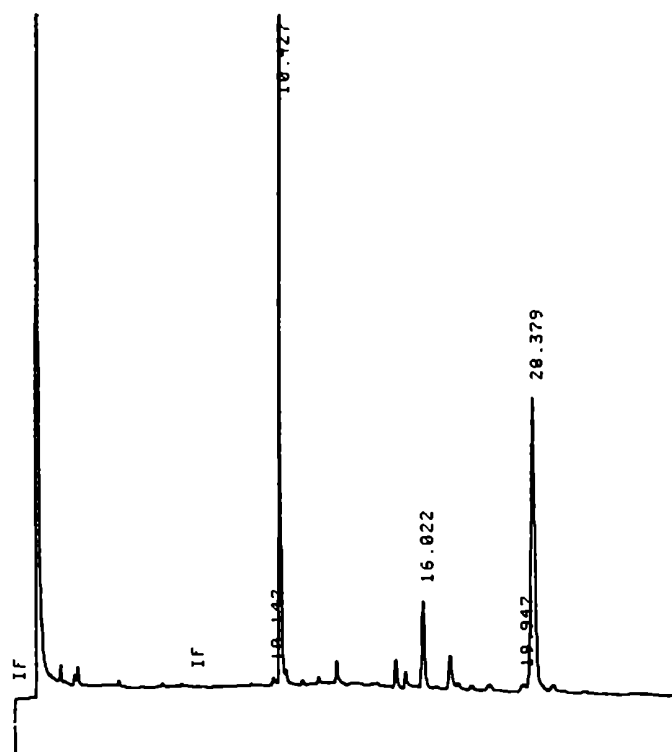


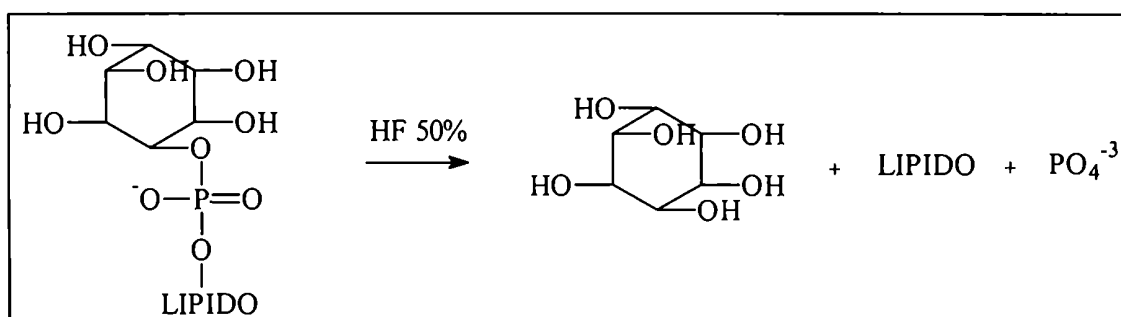
Figura 22 – Análisis por cromatografía gaseosa de los glicerolípidos liberados del PI (cepa CL) por tratamiento con PI-PLC.

Los glicerolípidos se analizaron como trimetilsilil derivados en una columna capilar HP-1 (0,20 mm x 12 m) utilizando las condiciones Ai. El pico a 10,427 min corresponde al ácido desoxicólico presente en la reacción de PI-PLC. El pico a 16,022 min corresponde al alquilacilglicerol y el pico a 20,379 min corresponde al diacilglicerol. El tiempo de retención para el testigo de 1-*O*-hexadecil-2-*O*-oleoilglicerol fue de 16,231 min y el dioleoilglicerol comercial dio dos picos a 20,108 y 20,893 min.

ANÁLISIS DE Fr2 (IPC)

Para la identificación de Fr2, se trataron 50 000 cpm de este compuesto con PI-PLC de *Bacillus thuringiensis* y el lípido marcado fue analizado por TLC en el solvente B. Por autorradiografía se pudo detectar un lípido con el mismo R_f que un testigo de ceramida (Figura 17A, canal 1). Previamente se demostró que esta enzima es capaz de degradar ceramida-GIPLs tanto como acilglicerol- o alquilglicerol-GIPLs (Lederkremer *et al.*, 1990).

Si se trata la fracción Fr2 con HF 48%, 70 horas a 5°C, el lípido extraído con éter presenta en TLC la movilidad de una ceramida. En estas condiciones se hidroliza selectivamente la unión fosfato diéster liberándose el componente lipídico.



Estos resultados permitieron identificar a Fr2 como una inositolfosfoceramida (IPC).

Para una mayor caracterización de la IPC, ésta se sometió a condiciones alcalinas suaves y a metanólisis ácida. Tanto por tratamiento con NaOH 0,1M en MeOH 90%, 1h a 37°C como por tratamiento con NH₄OH 9M, 40 min a 45°C o 40% propanol/ NH₄OH 13M (1:1) no se alteró la movilidad cromatográfica de la IPC, descartando la presencia de un glicerolípido acilado. El análisis por TLC (Figura 23A) y RPTLC (Figura 23B) de los productos obtenidos por metanólisis con HCl:MeOH:agua permitió detectar la presencia de bases esfingosínicas de cadena larga. Para la cepa Y se identificó la esfinganina (dihidroesfingosina) como base mayoritaria junto con una menor cantidad de esfingosina. Los ácidos grasos metilados identificados por RPTLC fueron C_{16:0} y trazas de C_{18:0}. En la

cepa CL la esfinganina y esfingosina se encontraron en la misma proporción.

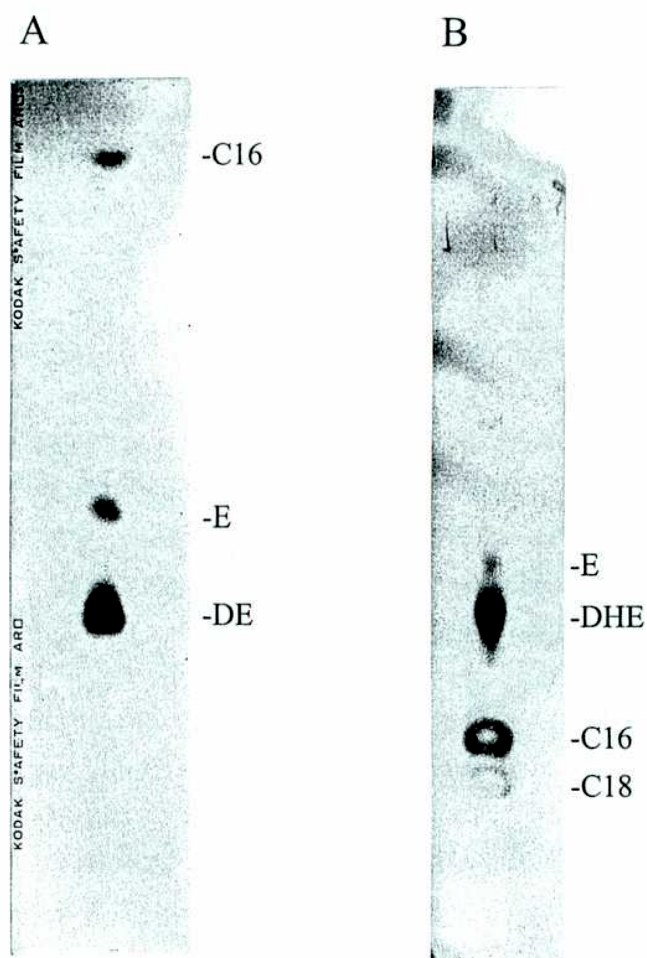


Figura 23 – Análisis de los productos obtenidos por metanólisis ácida de la IPC (cepa Y) radioactiva.

A) TLC en sílica utilizando como solvente de desarrollo cloroformo:metanol: NH_4OH 2,5M (40:10:1).

B) RPTLC utilizando ácido acético:acetonitrilo (1:1).

Testigos: E, esfingosina; DE, dihidroesfingosina; C16 y C18, ésteres metílicos de los ácidos palmítico y esteárico respectivamente.

La ceramida liberada por la PI-PLC fue analizada también por RPTLC en el solvente O donde pudo resolverse en 4 bandas (Figura 24). Las dos principales corresponden a las ceramidas con la base de cadena larga saturada (dihidroesfingosina) *N*-acilada por ácido palmítico y ácido esteárico respectivamente. Las bandas de menor intensidad corresponden a la palmitoilesfingosina y probablemente a la estearoil-esfingosina (Figura 24, canal 1).

Dado que la IPC corre como una doble banda en TLC (solvente A) (Fig. 13) se procedió a eluir de la placa cada banda por separado, se las trató con PI-PLC y las ceramidas correspondientes se cromatografiaron en fase reversa. Como se puede observar en la Figura 24, la banda superior está formada por las ceramidas con dihidroesfingosina como base (canal 2) mientras que la inferior está formada por las ceramidas con esfingosina (canal 3).

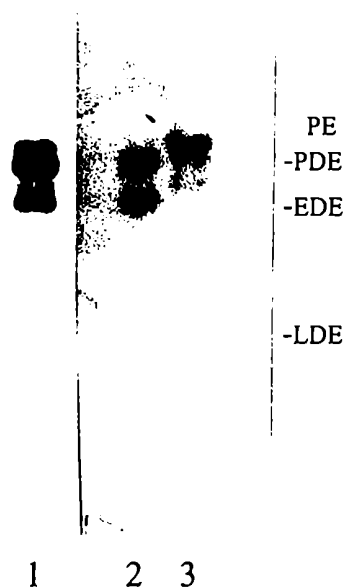


Figura 24 – TLC en fase reversa de las ceramidas radioactivas liberadas por tratamiento de la IPC (cepa Y) con PI-PLC.

Ceramidas liberadas de la IPC total (canal 1). La doble banda de IPC (Fig. 14) se separó en una banda superior y otra inferior que se trataron individualmente con PI-PLC. Las ceramidas obtenidas se analizaron por separado. Ceramida obtenida de banda superior, canal 2. Ceramida obtenida de banda inferior, canal 3. Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol:agua (10:25:1). Testigos: PE, palmitoilesfingosina; PDE, palmitoildihidroesfingosina; EDE, estearoildihidroesfingosina; LDE, lignoceroildihidroesfingosina.

Células epimastigotes de *T. cruzi* no incorporadas metabólicamente con ácido graso radioactivo se sometieron a un procedimiento análogo de extracción y purificación de IPLs. El compuesto en la fracción de lípidos ácidos, con Rf igual a la IPC radioactiva en TLC (solvente A), fue revelado con ninhidrina para la detección de grupos NH₂ libres, y con el revelador para grupos fosfato. Sólo el segundo revelador detectó este compuesto confirmandonos la presencia de grupos fosfato y descartando la presencia de GlcNH₂.

Este compuesto se trató con PI-PLC y el lípido extraído con éter se cromatografió en el solvente B donde presentó una movilidad igual a la palmitoildihidroesfingosina. La fase acuosa resultante del tratamiento con PI-PLC se descationizó utilizando una resina AG-50(H⁺) y se analizó por TLC en el solvente L observándose un compuesto con el mismo Rf=0,4 que un testigo de inositol-fosfato cíclico.

Las ceramidas obtenidas de células no radioactivas se analizaron por CGL como trimetilsilil derivados utilizando las condiciones Ai (Figura 25). En este caso se encontraron las mismas ceramidas que en la muestra radioactiva en la relación que se puede observar en la Tabla 4.

Tabla 4 – Proporción en que se encuentran las distintas ceramidas en las muestras de IPC de la cepa Y y CL.

CEPA	palmitoilesfingosina (tr 15,51 min)	palmitoildihidroesfingosina (tr 16,09 min)	estearoilesfingosina (tr 19,39 min)	estearoildihidroesfingosina (tr 20,21 min)
Y	5	2	1,4	1
CL	5,1	1	1	-

tr = tiempo de retención

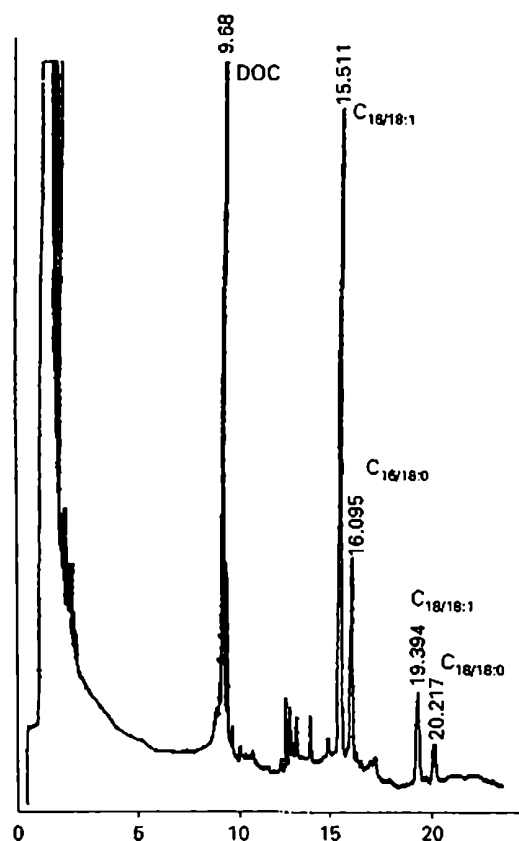
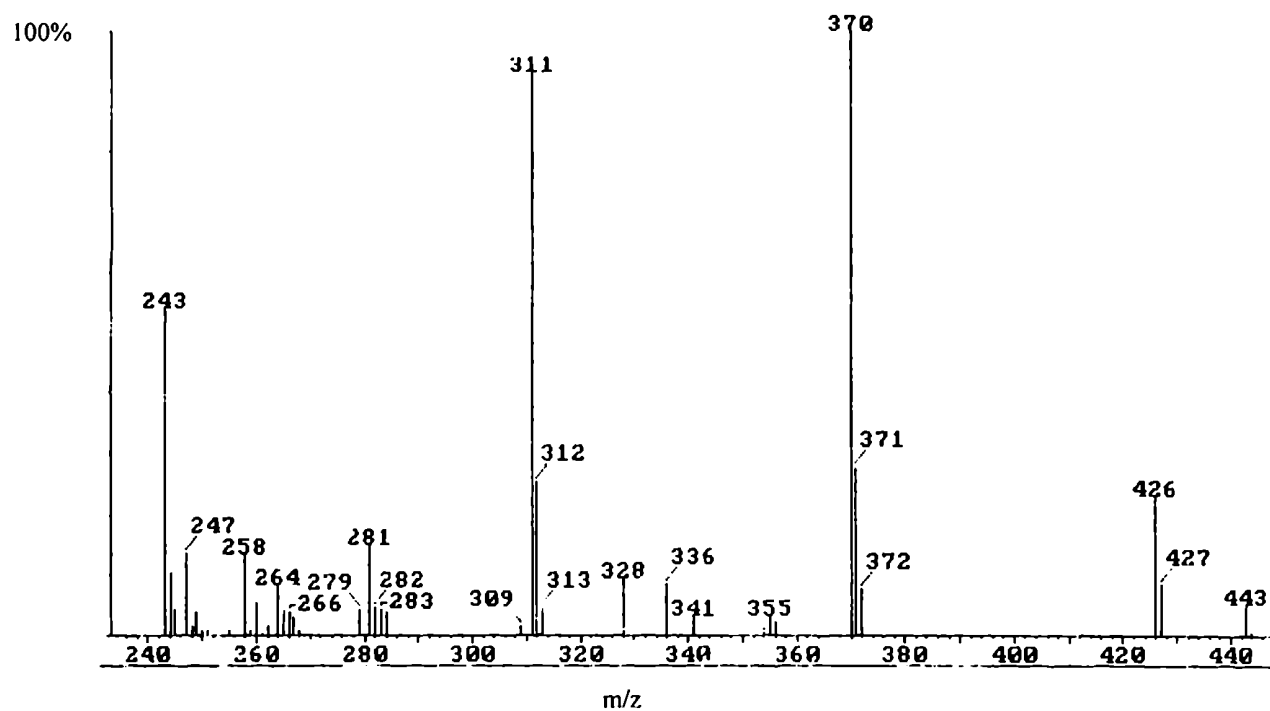


Figura 25 – Análisis por cromatografía gaseosa de las ceramidas liberadas de la IPC por tratamiento con PI-PLC.

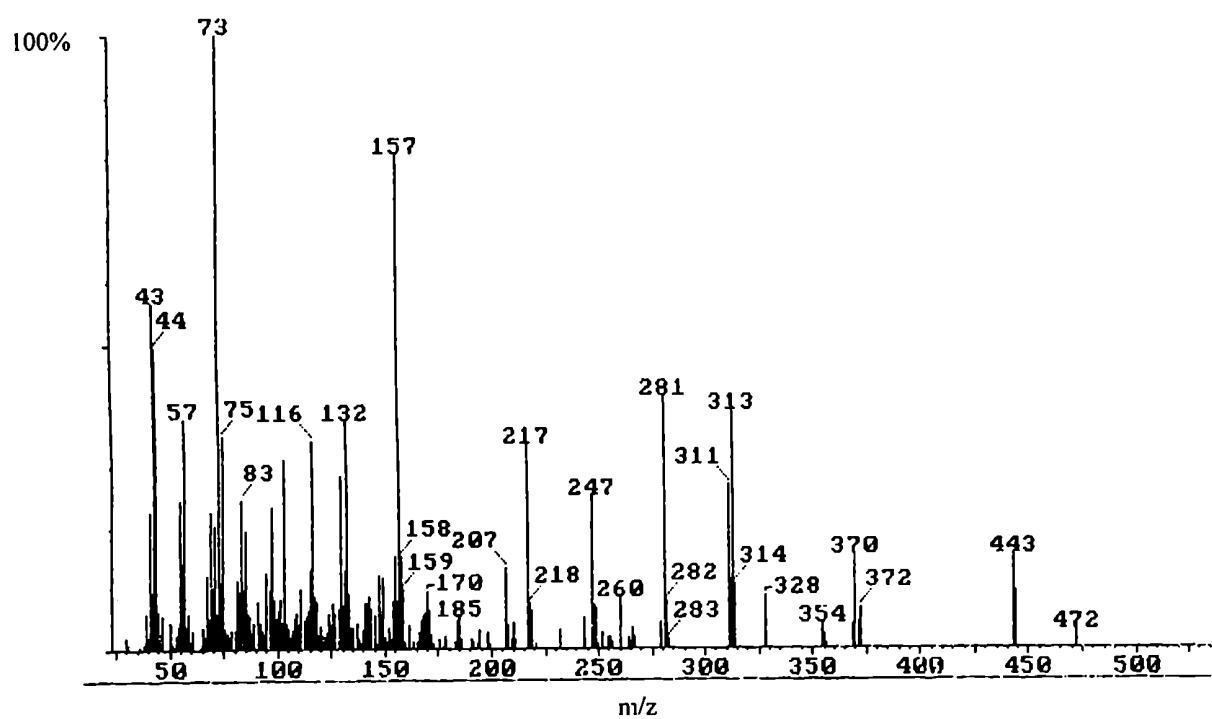
Las ceramidas se analizaron como trimetilsilil derivados en una columna capilar HP-1 (0,20 mm x 12 m). Se utilizaron las condiciones de corrida *Ai*. Los tiempos de retención coinciden con los de los derivados sililados de los testigos palmitoilesfingosina ($C_{16}/C_{18:1}$, 15,511 min), palmitoildihidroesfingosina ($C_{16}/18:0$, 16,095 min) y estearoildihidroesfingosina ($C_{18}/18:0$, 20,217 min). El pico a 19,394 min se pudo caracterizar como estearoilesfingosina ($C_{18}/18:1$) por CGL-EM. El pico a 9,68 min (DOC) corresponde al ácido desoxicólico.

El pico a 9,68 corresponde al ácido desoxicólico utilizado como detergente en el tratamiento con PI-PLC. Los tiempos de retención coincidieron con los de testigos comerciales y las estructuras de las ceramidas se confirmaron por CGL-EM (Figura 26). Los fragmentos de masa se compararon con los valores descritos en la bibliografía (Samuelsson y Samuelsson, 1969). Los picos a 15,511 min y 19,394 min mostraron iones significativos a m/z 243, 311, 336 y 426 presentes en todas las ceramidas de esfingosina mientras que los picos a 16,095 min y 20,217 min dieron los fragmentos característicos de la dihidroesfingosina a m/z 313 y 217. En la Tabla 5 pueden verse las fragmentaciones que dan origen a esos picos. Los fragmentos que dan información del ácido graso constituyente de las ceramidas aparecen, para los dos picos de menor tiempo de retención, a m/z 370 y 443, correspondiendo al ácido palmítico y para los dos picos de mayor tiempo de retención aparecen a 398 y 471, desplazados 28 unidades, correspondiendo al ácido esteárico. En la Tabla 5 se encuentran los picos diagnósticos dados por la bibliografía que sirvieron para caracterizar cada ceramida. Como se puede observar en los gráficos, aparecen la mayoría de estos picos en los espectros (Figura 26).

A)



B)



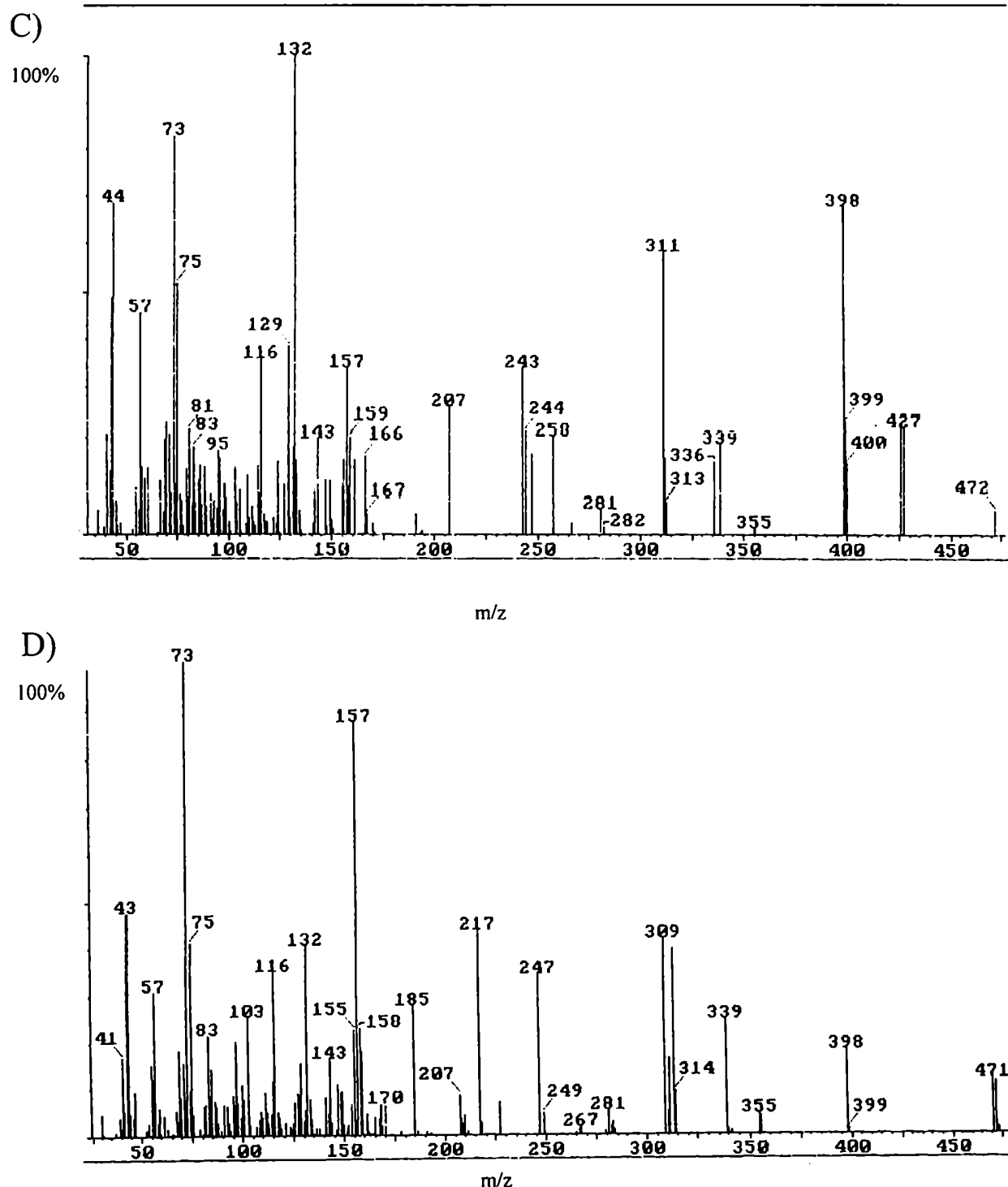


Figura 26 – Espectros de masa de las ceramidas obtenidas, por tratamiento con PI-PLC, de una muestra de IPC de formas epimastigote de *T. cruzi*.

Espectros de masa correspondientes a los picos obtenidos por cromatografía gaseosa (Figura 25).

A) Espectro de la palmitoilesfingosina (pico a 15,511 min)

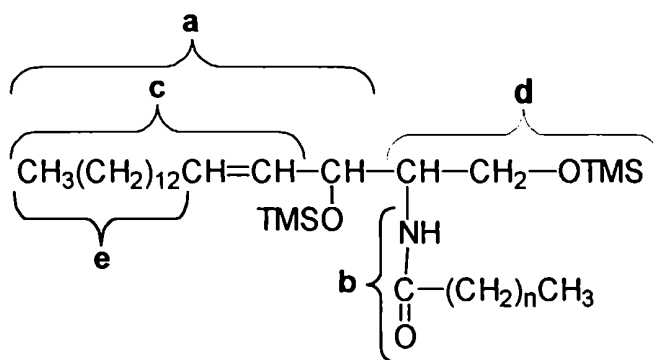
B) Espectro de la palmitoildihidroesfingosina (pico a 16,095 min)

C) Espectro de la estearoilesfingosina (pico a 19,394 min)

D) Espectro de la estearoildihidroesfingosina (pico a 20,217 min)

Tabla 5 – Fragmentos característicos del espectro de masa de las distintas ceramidas obtenidas.

	palmitoilesfingosina	palmitoildihidro- esfingosina	estearoilesfingosina	estearoildihidro- esfingosina
M-(b+l)	426	428	426	428
M-(b+l+90)	336		336	
M-d	311	313	311	313
M-(b+l+e)	243		243	
M-(b+l+c)		217		217
M-a	370	370	398	398
M-(a-73)	443	443	471	471



Otros picos que aparecen en la serie homóloga de las dihidroesfingosinas de ^{18}C son m/z 232 y 260; y para las esfingosinas, m/z 258.

Es interesante notar que a pesar de que las ceramidas encontradas en las muestras de parásitos no radioactivos son las mismas que para los lípidos radioactivos las proporciones de esfingosina a dihidroesfingosina son inversas. En el caso de las muestras frías las ceramidas mayoritarias corresponden a las de base de cadena larga insaturada mientras que para las muestras radioactivas estas son las minoritarias. Esto podría indicar que el parásito incorporaría algunos lípidos del medio.

Por otra parte, el hecho de que el ácido [^3H]-palmitico sea incorporado en esfingosina y dihidroesfingosina indica que, por lo menos en parte, las bases de cadena larga son biosintetizadas por el parásito. La biosíntesis de ceramida en mamíferos

comienza con la condensación de serina y palmitoilcoenzima A para formar 3-cetodihidroesfingosina (Figura 12). Esta es reducida a dihidroesfingosina la cual se *N*-acila dando la ceramida saturada que puede ser a su vez deshidrogenada (Hannun, 1994). El haber encontrado dihidroesfingosina como base mayoritaria de las IPC provenientes de células incorporadas con ácido palmítico radioactivo indicaría que este camino biosintético también es llevado a cabo por los epimastigotes de *T. cruzi*.

En las IPC de formas trypomastigote de *T. cruzi* también se encontraron esfingosina y dihidroesfingosina como bases de cadena larga pero únicamente se encontró palmítico como ácido graso (Uhrig *et al.*, 1996).

También fueron identificadas inositolfosfoceramidas en *Leishmania* spp. En *Leishmania donovani* los ácidos grasos encontrados en forma mayoritaria fueron C_{16:0} y C_{18:0} al igual que en las IPC de *T. cruzi*; y las esfingosinas y dihidroesfingosinas de C16 y C18 son las bases de cadena larga predominantes (Kaneshiro *et al.*, 1986). En *T. cruzi* sólo encontramos las bases de C18. En *Leishmania mexicana mexicana* la ceramida mayoritaria tiene la base esfingosina de C16 y el componente minoritario tiene la dihidroesfingosina de C16. Ambas *N*-aciladas por ácido esteárico (Singh *et al.*, 1988).

En *T. brucei* una IPC fue sólo tentativamente identificada por su comportamiento cromatográfico pero su naturaleza no fue confirmada (Patnaik *et al.*, 1993).

Lo más interesante de destacar en este aspecto es la diferencia con mamíferos donde no se detectaron inositolfosfoceramidas. En células de mamíferos en lugar de haber una transferencia de inositolfosfato a la ceramida para formar IPC, hay transferencia de fosfocolina para formar la esfingomielina, esfingolípido mayoritario en los mamíferos. También hay adición de glucosa y galactosa a la ceramida para dar esfingolípidos complejos, pero no hay formación de IPC (Figura 12) (Dickson, 1998). Esta diferencia con mamíferos hace, de la inhibición de la biosíntesis de la IPC, una alternativa atractiva para la quimioterapia.

En el LPPG, glicoinositolfosfolípido componente mayoritario de la membrana de formas epimastigote de *T. cruzi*, se encontró en cantidades apreciables palmitoildihidroesfingosina junto con lignoceroildihidroesfingosina. El ácido lignocérico

no se encontró en las IPC, por lo tanto, faltaría establecer en que paso de la biosíntesis del LPPG es introducido ese ácido graso.

En levaduras la porción lipídica de la mayoría de las anclas GPI son ceramidas diferentes a las encontradas en las IPCs (Fankhauser *et al.*, 1993). La ceramida sería introducida en el ancla GPI por remodelamiento luego de la adición a la proteína (Sipos *et al.*, 1994). No se demostró aún en *T. cruzi* si el PI es precursor de la IPC por transferencia del inositolfosfato del PI a la ceramida como se describió para *Saccharomyes cerevisiae* (Becker y Lester, 1980) ni si se lleva a cabo una reacción de remodelamiento en el GIPL completo.

En este trabajo de tesis se determinó por primera vez la presencia de IPC en *Trypanosoma* y su biosíntesis a partir de [³H]-palmítico.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO 5

Análisis de lípidos libres de formas amastigote y su variación en el proceso de diferenciación morfológica in vitro

ANÁLISIS DE LÍPIDOS LIBRES DE FORMAS AMASTIGOTE Y SU VARIACIÓN EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN MORFOLOGICA *IN VITRO*

Las distintas formas morfológicas del *Trypanosoma cruzi* tienen diferentes funciones en su ciclo de vida. La comprensión de los mecanismos involucrados en la diferenciación de los distintos estadios puede brindar medios efectivos para interferir en el ciclo de vida del parásito.

Una comparación de los lípidos presentes en cada estadio del ciclo de vida puede ser un camino útil en esta dirección y puede servir también para entender algunos de los mecanismos de la relación huésped-parásito. Los lípidos pueden servir como marcadores bioquímicos de la diferenciación celular (Leon *et al.*, 1989).

En este capítulo se presenta el análisis de distintos lípidos que pueden encontrarse formando parte de anclas GPI y que pueden originarse por acción de fosfolipasas endógenas; y su variación en el proceso de diferenciación celular.

Células trypomastigotes de *T. cruzi*, cepa Y, obtenidas del sobrenadante de células infectadas LLC-MK₂ fueron incubadas a 37°C en medio LIT para su diferenciación en amastigotes y epimastigotes de acuerdo a lo descrito por Andrews *et al.*, 1987. Los parásitos (5×10^8) se mantuvieron en el medio de cultivo 0, 24, 48 o 72 horas para su diferenciación y luego fueron incorporados metabólicamente con ácido 9,10(n)-[³H]-palmítico durante 2 horas. La misma incorporación se efectuó sobre células epimastigotes. La composición de las células a los distintos tiempos de diferenciación está dada en la Tabla 6.

Tabla 6 – Composición celular a distintos tiempos de diferenciación *in vitro* de *Trypanosoma cruzi*.

t de diferenciación	Composición celular
0 h	90% trypomastigotes, 10% amastigotes
24 h	100% amastigotes
48 h	amastigotes en transición a epimastigotes
72 h	50% epimastigotes

Las células de los distintos tiempos, incorporadas con [^3H]-palmítico y liofilizadas fueron extraídas con cloroformo:metanol (1:1, 3 x 1ml) y cloroformo:metanol:agua (10:10:3, 2 x 1ml). La Tabla 7 muestra la radioactividad extraída para cada tiempo.

Tabla 7 – Radioactividad extraída de las células diferenciadas por distintos tiempos e incubadas con [^3H]-palmítico por 2h.

t de diferenciación	cloroformo:metanol	cloroformo:metanol:agua
0 h	45 868 400 cpm	430 500 cpm
24 h	174 575 100 cpm	763 650 cpm
48 h	111 442 000 cpm	1 551 750 cpm
72 h	126 536 800 cpm	902 100 cpm
epimastigotes	141 958 900 cpm	927 600 cpm

En estos extractos se estudió principalmente la presencia de lípidos que pueden encontrarse en anclas GPI. Con todos los puntos se trabajó en paralelo para poder hacer un análisis comparativo.

Ceramida y alquilglicerol

Los extractos cloroformo:metanol fueron analizados por TLC en el solvente B (Figura 27). Como puede observarse en esta Figura además de la mancha mayoritaria correspondiente a ácido graso (debida en parte al precursor adsorbido en la superficie

de los parásitos), se detectaron otros dos compuestos con Rf similares a una ceramida y a un alquilglicerol.

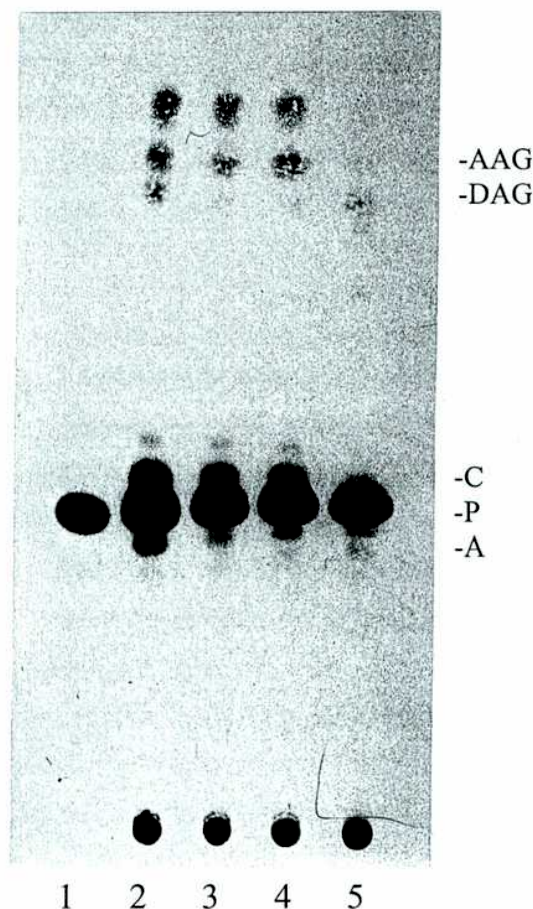


Figura 27 – TLC y fluorografía de los lípidos obtenidos de células de *T. cruzi* luego de períodos crecientes de diferenciación e incorporación con ácido [^3H]-palmítico.

Trypomastigotes diferenciados 0, 24, 48 y 72 h (canales 1-4) y epimastigotes (canal 5) fueron marcados metabólicamente con ácido [^3H]-palmítico durante 2 horas. Los lípidos extraídos con cloroformo:metanol (1:1) se analizaron por TLC utilizando cloroformo:metanol (38:3) como solvente de desarrollo. Testigos: AAG, alquilacilglicerol; DAG, diacilglicerol; C, ceramida; P, ácido palmítico; A, alquilglicerol.

Una mejor separación de estos lípidos se obtuvo utilizando el solvente E como solvente de desarrollo (Figura 28). Este solvente, donde la ceramida se separa poco del origen se utilizó principalmente como paso de purificación de estos lípidos, presentes en menor proporción, respecto al ácido graso.

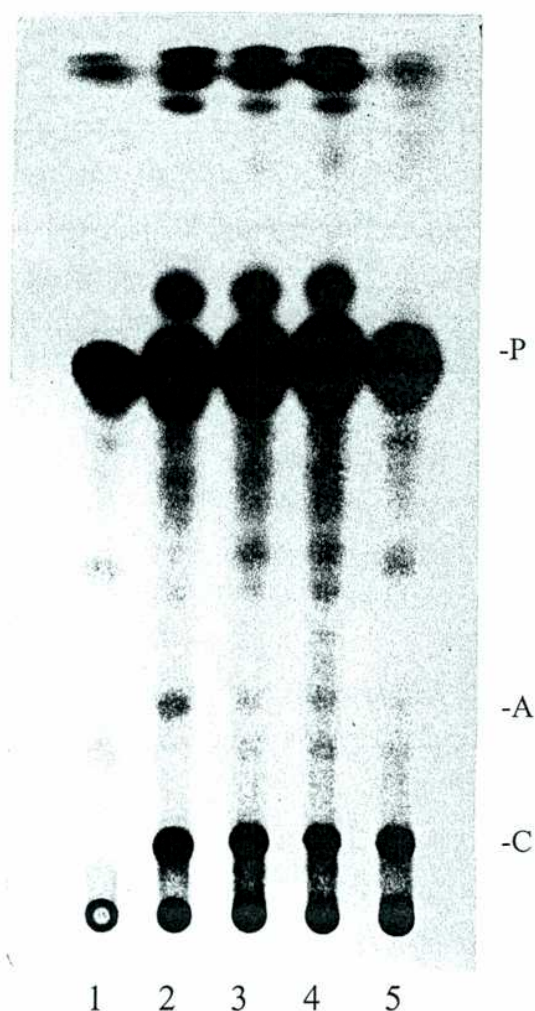


Figura 28 –TLC y fluorografía de los lípidos marcados con ácido [^3H]-palmítico obtenidos de células de *T. cruzi* luego de periodos crecientes de diferenciación.

Los lípidos obtenidos de la misma forma que lo indicado en la Fig. 27 se analizaron por TLC utilizando hexano:acetato de etilo (2:1) como solvente de desarrollo. Testigos: P, ácido palmítico; C, ceramida; A, alquilglicerol.

La ceramida y el alquilglicerol junto con el origen se eluyeron de la placa para cada punto y se recromatografiaron en el solvente B donde nuevamente corrieron como estándares de ceramida y alquilglicerol (Figura 29A). Sólo una pequeña cantidad de estos lípidos pudo detectarse en formas trypomastigote con una mayor exposición de la autorradiografía (canal 1).

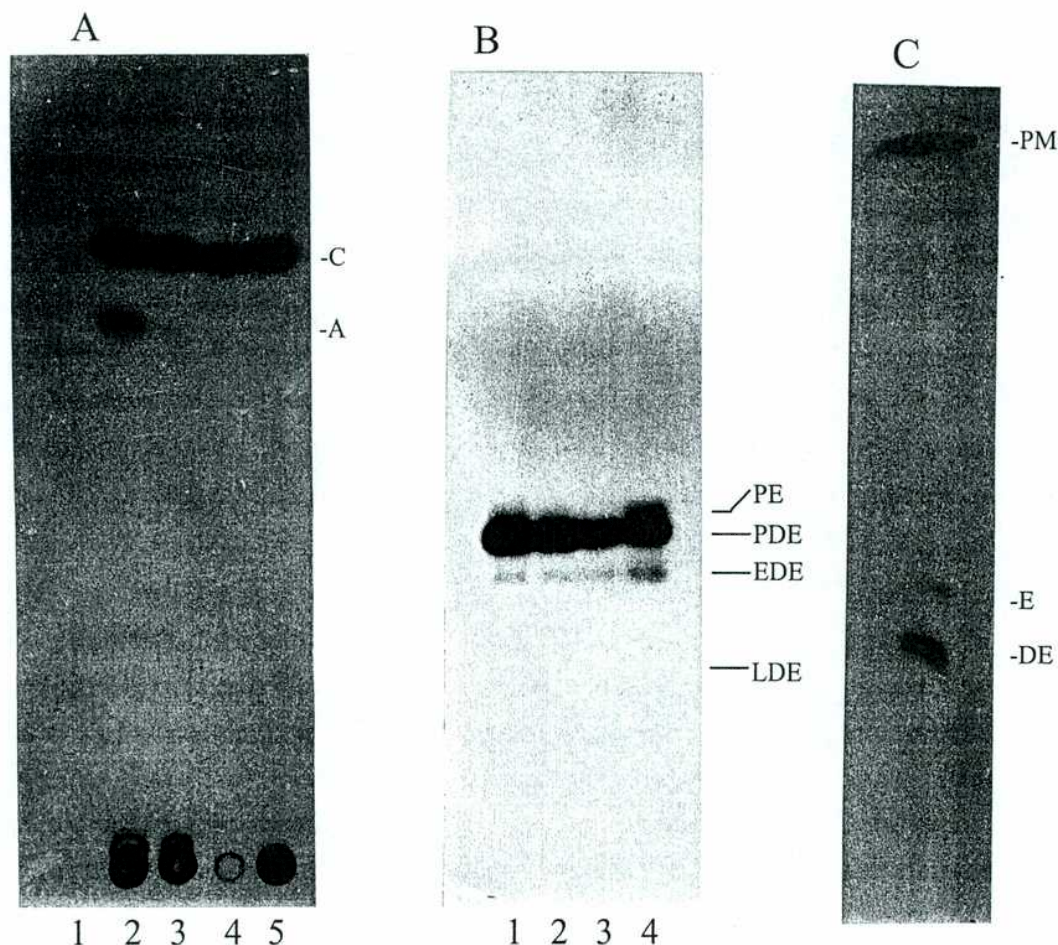


Figura 29 – Análisis de las ceramidas obtenidas de las células luego de los distintos períodos de diferenciación, como en la Figura 27.

A) TLC en cloroformo:metanol (38:3) de las ceramidas y alquilglicerol purificados de los ácidos grasos por TLC en hexano:acetato de etilo (2:1) (Fig. 28).

B) RPTLC en cloroformo:metanol:agua (40:100:3) de las ceramidas eluidas de la placa A canales 2-5.

C) Análisis de los productos obtenidos por metanólisis ácida de la ceramida. Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol: NH_4OH 2,5M (40:10:1).

Testigos: PE, palmitoilesfingosina; PDE, palmitoildihidroesfingosina; EDE, estearoildihidroesfingosina; LDE, lignoceroildihidroesfingosina; C, ceramida; A, alquilglicerol (hexadecilglicerol); PM, palmitato de metilo; E, esfingosina; DE, dihidroesfingosina.

La variación en la cantidad relativa de ceramida para cada punto se obtuvo por elución de las manchas a los distintos tiempos. Las cuentas recuperadas se dan en la Tabla 8.

Tabla 8 – Variación en la cantidad de ceramida radioactiva a los distintos tiempos de diferenciación celular.

t de diferenciación	Radioactividad
24 h	9570 cpm
48 h	6990 cpm
72 h	3630 cpm
epimastigotes	3802 cpm

Como puede observarse en la Tabla 8 hay una cantidad máxima de ceramida en formas amastigotes disminuyendo a medida que las células se diferencian a epimastigotes. Lo mismo ocurre para el alquilglicerol que sólo es detectado en células de 24 h de diferenciación.

La diferencia en la cantidad de ceramida libre en formas trypomastigote respecto de amastigote puede deberse a una menor capacidad biosintética en las células trypomastigote no replicativas; sin embargo, es interesante notar que el nivel de ceramida es máximo en las formas amastigotes donde también es máxima la cantidad de glicoproteína Ssp-4, anclada por GPI, que es progresivamente liberada al medio durante el proceso de diferenciación (Andrews *et al.*, 1987, 1988).

Las ceramidas fueron analizadas también por RPTLC utilizando el solvente O (Figura 29B). Como ceramida mayoritaria se detectó la palmitoildihidroesfingosina junto con trazas de estearoildihidroesfingosina y palmitoilesfingosina. Puede observarse en esta figura que todas disminuyen luego de las 24 horas de cultivo coincidiendo con el porcentaje decreciente de formas amastigote. Únicamente los componentes minoritarios aumentan ligeramente en las formas epimastigotes.

Para confirmar la identidad de la ceramida mayoritaria, ésta se eluyó de la fase reversa y se sometió a metanólisis ácida. De acuerdo a lo esperado encontramos

dihidroesfingosina y una traza de esfingosina como bases de cadena larga (Figura 29C).

El alquilglicerol también se eluyó de la Figura 29A y se lo identificó por RPTLC (solvente P) como el 1-*O*-hexadecilglicerol.

Ácidos grasos

Los extractos cloroformo:metanol originales fueron también analizados por RPTLC en el solvente R (Figura 30).

Los compuestos I-III fueron identificados como ácidos grasos por TLC en el solvente J, por lo tanto, fueron metilados y recromatografiados en fase reversa (Figura 31) antes (canales 1-3) y después de ser hidrogenados (canales 4-6) (solvente S). El único que cambió la movilidad con la hidrogenación fue el compuesto I.

De esta forma se pudo identificar los compuestos I, II y III como ácido palmitoleico ($C_{16:1}$), ácido palmítico ($C_{16:0}$) y ácido esteárico ($C_{18:0}$). El ácido [3H]-palmítico radioactivo utilizado como precursor fue principalmente elongado a ácido esteárico y una menor proporción fue desaturado para dar palmitoleico. Es interesante que en formas trypomastigote no detectamos ácido esteárico ni palmitoleico, el único ácido graso encontrado es ácido palmítico.

Lo que se pudo observar es un aumento en la relación de esteárico a palmítico durante el proceso de diferenciación de trypomastigotes a amastigotes y una disminución durante la diferenciación de amastigotes a epimastigotes. Esteves *et al.* (1989) informaron también cambios en la composición de ácidos grasos durante la diferenciación de epimastigotes a trypomastigotes metacíclicos indicando que estos podrían ser buenos marcadores bioquímicos de la diferenciación celular.

El compuesto V de la Fig. 30 no alteró su movilidad por saponificación ni por hidrogenación y se metiló por tratamiento con $BF_3 \cdot MeOH$. Estos datos y su movilidad en RPTLC nos permiten sugerir que el compuesto V es un ácido graso saturado de por lo menos 22 carbonos.

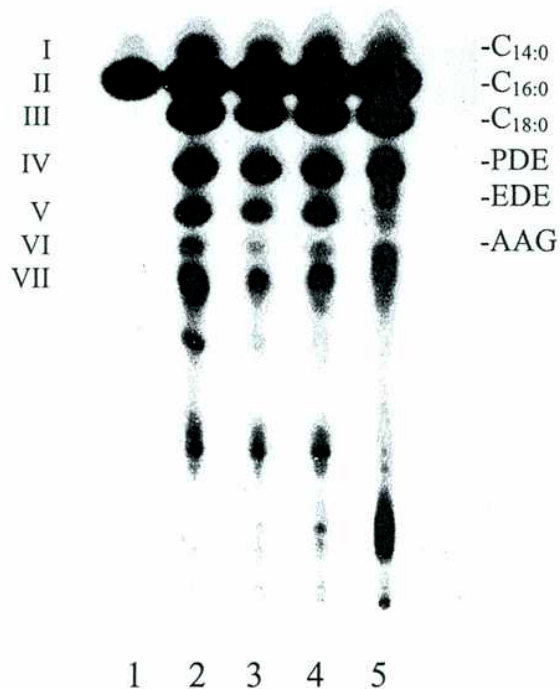


Figura 30 – RPTLC y fluorografía de los lípidos marcados con ácido [³H]-palmítico obtenidos de células de *T. cruzi* como se describe en la Fig. 27.

Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol:agua (40:80:1). Testigos: C_{16:0} y C_{18:0}, metil ésteres de los ácidos palmítico y esteárico respectivamente; PDE, palmitoildihidroesfingosina; EDE, estearoildihidroesfingosina; AAG, alquilacilglicerol.

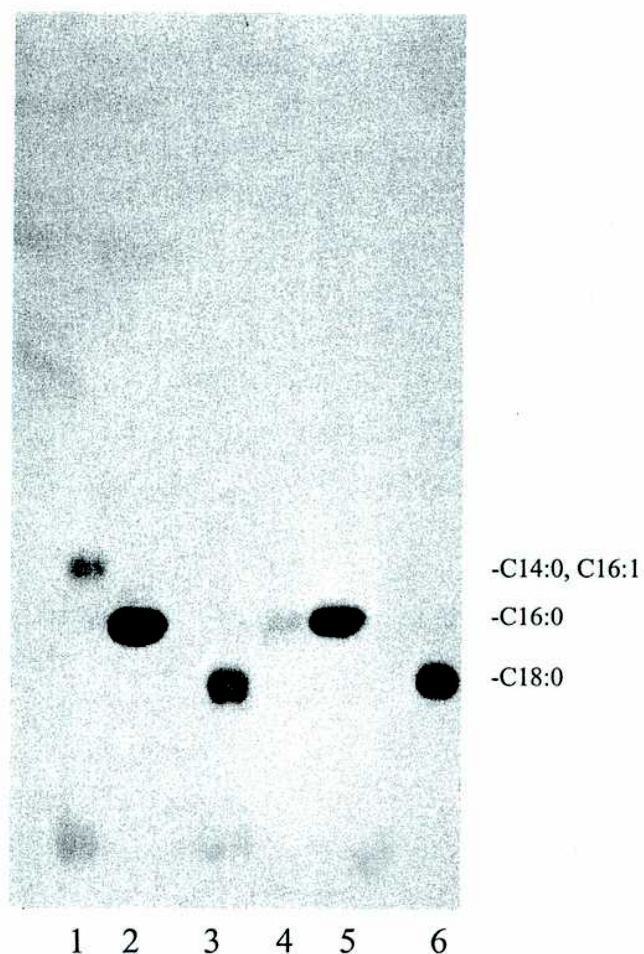


Figura 31 – Análisis de los ácidos grasos eluidos de la placa de la Fig. 30.

Los compuestos I-III (Fig. 30) se eluyeron, metilaron y los ésteres se analizaron antes (canales 1-3) y después (canales 4-6) de hidrogenarlos catalíticamente. Solvente de desarrollo: ácido acético:acetonitrilo (1:1). Testigos: C_{14:0}, C_{16:1}, C_{16:0}, C_{18:0}, ésteres metílicos de los ácidos mirístico, palmitoleico, palmítico y esteárico respectivamente.

Alquilacilglicerol

La estructura del compuesto VI (Fig. 30) con un R_f igual al del 1-*O*-hexadecil-2-*O*-palmitoilglicerol fue confirmada por saponificación y metilación. El análisis de los productos obtenidos puede observarse en la Figura 32A. El alquilglicerol se eluyó de la placa y se lo identificó como el hexadecilglicerol por RPTLC en el solvente P (Figura 32B).

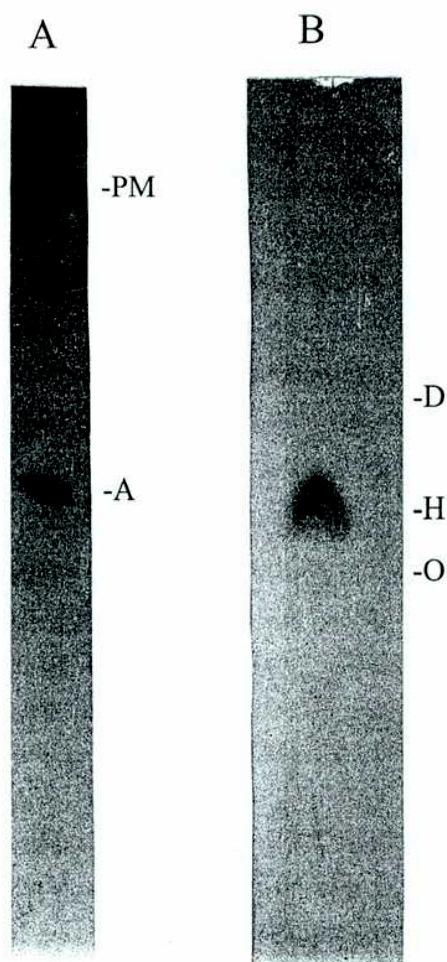


Figura 32 – Análisis de los productos obtenidos por saponificación del alquilacilglicerol (compuesto VI, Fig. 30) y posterior metilación.

A) TLC en sílica. Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol (38:3).

B) Análisis en RPTLC del alquilglicerol eluído de la placa A. Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol:agua (20:55:3).

Testigos: PM, palmitato de metilo; A, alquilglicerol; H, hexadecilglicerol; D, dodecilglicerol; O, octadecilglicerol.

Inositolfosfolípidos y precursores de GPI

Los compuestos más polares que quedaron en el origen en la placa de la Fig. 29A fueron eluidos y recromatografiados en el solvente A junto con los IPLs previamente caracterizados de formas epimastigote (Figura 33A). Como puede observarse se detectó un componente con el mismo Rf que la banda superior de la IPC de epimastigotes (base: dihidroesfingosina), que también disminuye con la diferenciación de amastigotes a epimastigotes.

Para descartar la presencia de esfingomielina, que en el solvente A tiene Rf cercano a los IPLs, este compuesto se eluyó y se analizó por RPTLC en el solvente R junto con el testigo de IPLs (Figura 33B). Como puede observarse, en esa figura no se detectó radioactividad con el Rf de la esfingomielina. Esto indicaría que en *T. cruzi* no hay incorporación de ácido palmítico radioactivo en esfingomielina.

En concordancia con esto Aeberhard *et al.*, (1980) observaron en epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Tulahuén) escasa radioactividad como esfingomielina por incorporación metabólica de 1-[^{14}C]-acetato. En esta misma cepa Racagni *et al.*, (1992) no informan la presencia de esfingomielina en epimastigotes incorporados con ^{32}P . Antunes y Oliveira (1981) encuentran en epimastigotes alrededor de un 4% de esfingomielina respecto a los fosfolípidos totales pero esta no es detectada entre los fosfolípidos incorporados con ^{31}P . Tampoco se detectó esfingomielina por incorporación de [^3H]-palmítico en formas trypomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) (Uhrig *et al.*, 1997).

La ausencia de esfingomielina en estas células excluye la especulación sobre el origen de la ceramida por acción de una esfingomielinasa.

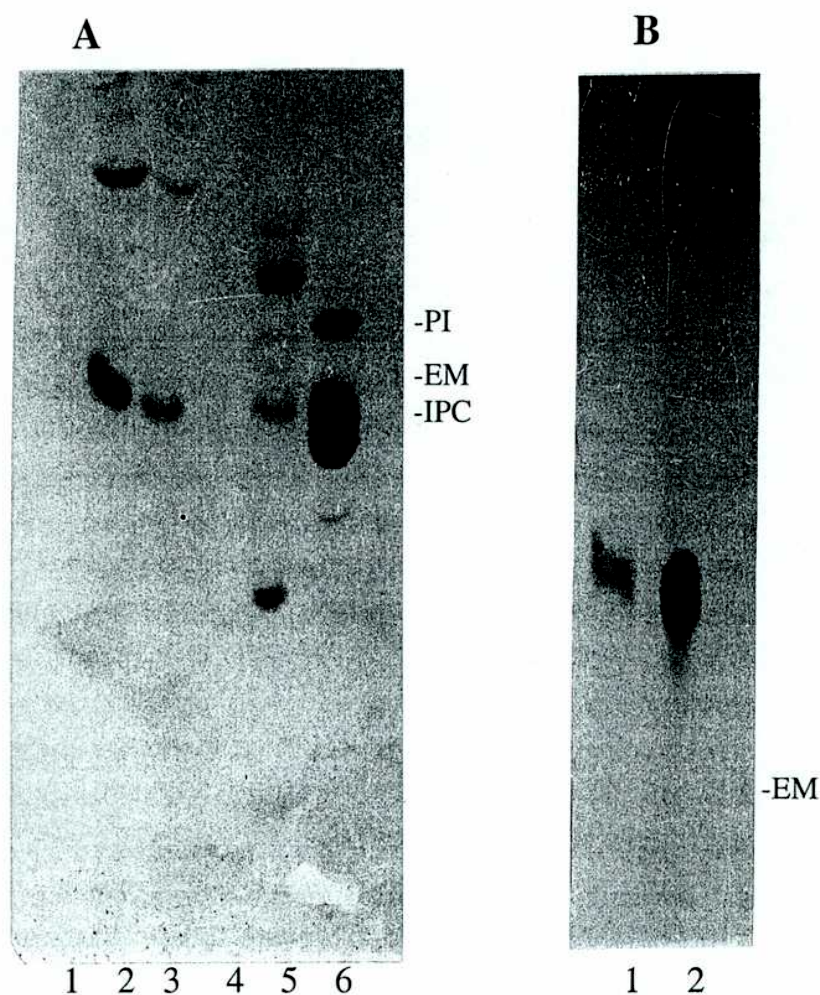


Figura 33 – Análisis de los lípidos más polares obtenidos por incorporación de [^3H]-palmítico en células diferenciadas.

- A) El origen de la placa de la Fig. 29A se eluyó y cada punto se volvió a cromatografiar en cloroformo:metanol: NH_4OH 2,5M (15:10:2). Los IPLs radioactivos (canal 6) se obtuvieron de células epimastigotes por incorporación metabólica de ácido [^3H]-palmítico.
- B) El compuesto con R_f similar a la IPC se eluyó de la placa A (canales 2-5) y se analizó por RPTLC (canal 1) junto con los IPLs de epimastigotes (canal 2). Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol:agua (40:80:1). Testigo: EM, esfingomielina.

Una alícuota del extracto cloroformo:metanol de células amastigotes se separó en lípidos ácidos y lípidos neutros por cromatografía de intercambio aniónico débil (DEAE-Sephadex) de acuerdo al método ya descrito para las formas epimastigote. La relación de LN a LA encontrada fue de 19:1. Los IPLs presentes en la fracción de lípidos ácidos se cromatografiaron junto con los lípidos ácidos radioactivos de formas epimastigotes. Como se puede observar en la Figura 34 en este análisis comparativo llama la atención la poca cantidad de PI respecto de IPC en amastigotes. Mientras que en epimastigotes la relación encontrada es cercana a 2:3, en amastigotes es de 1:9. Esto mismo se puede observar en la Fig. 33A.

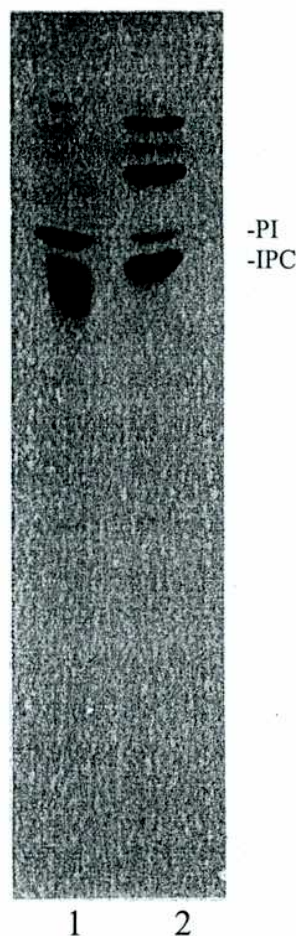


Figura 34 – TLC y autorradiografía de los lípidos ácidos incorporados con [^3H]-palmítico extraídos de células epimastigotes (canal 1) y de amastigotes (canal 2). Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol: NH_4OH 2,5M (15:10:2).

La IPC eluída de estas placas se trató con PI-PLC y como era de esperar el lípido extraído con butanol corrió en TLC como una ceramida (solvente B). En fase reversa se pudo detectar mayoritariamente la palmitoildihidroesfingosina junto con una pequeña cantidad de palmitoilesfingosina (Figura 35).

Los productos del tratamiento con HCl/metanol/agua de esta ceramida se analizaron por TLC en el solvente C, donde se pudo detectar dihidroesfingosina como base mayoritaria.

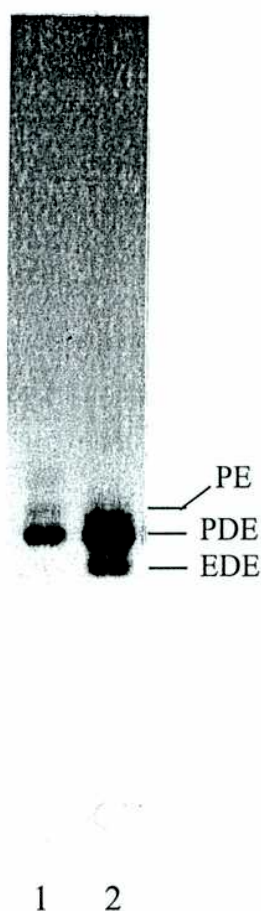


Figura 35 – Análisis de las ceramidas obtenidas por tratamiento de las IPCs de amastigotes (canal 1) y epimastigotes (canal 2) con PI-PLC.

Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol:agua (40:100:3). Testigos: PE, palmitoilesfingosina; PDE, palmitoildihidroesfingosina; EDE, estearoildihidroesfingosina.

Los extractos cloroformo:metanol:agua de las células de distintos tiempos de diferenciación, fueron también analizados por TLC en el solvente H (Figura 36A). Cuando el extracto de 24 h se trató con PI-PLC se pudo observar la presencia de por lo menos tres compuestos sensibles a esta enzima (Figura 36B). Uno de ellos, la IPC, y otros dos de menor Rf que se llamaron α y β .

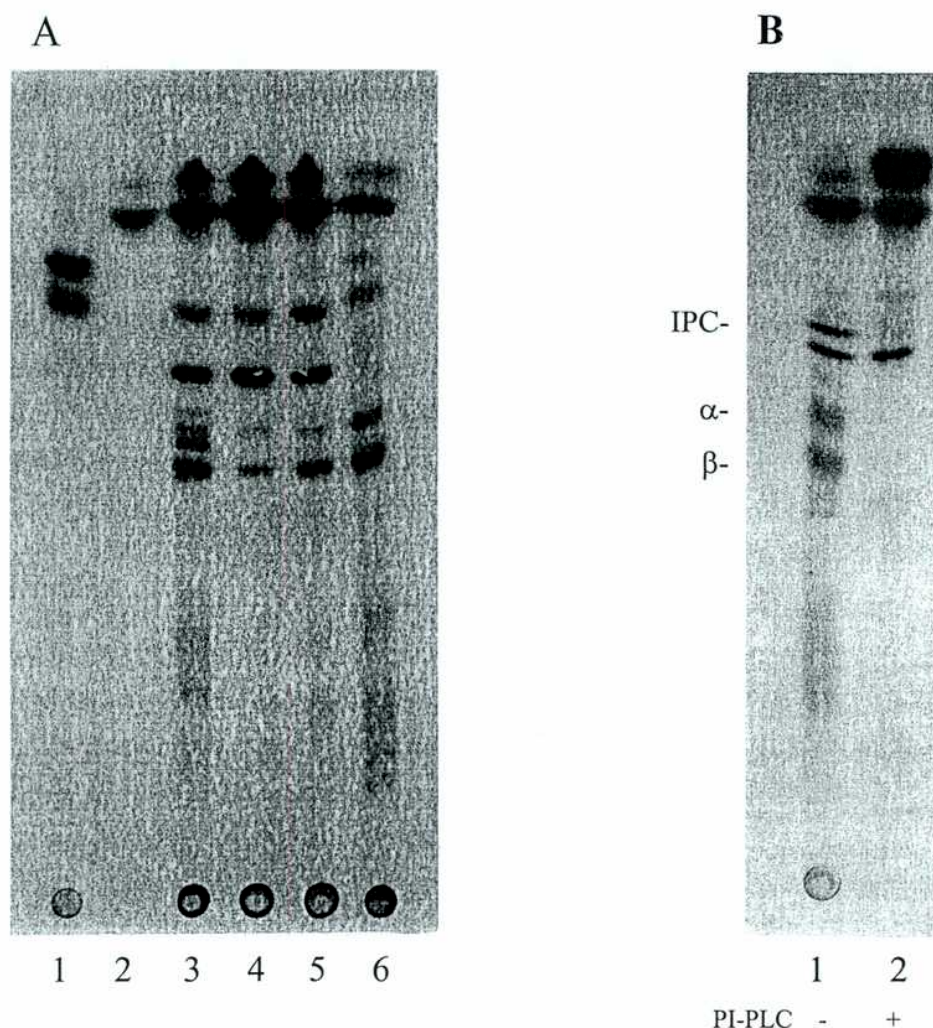


Figura 36 – TLC y fluorografía de los extractos cloroformo:metanol:agua de las células a distintos tiempos de diferenciación.

- A) Las células de distintos tiempos de diferenciación incorporadas con [^3H]-palmítico previamente extraídas con cloroformo:metanol, se extrajeron con cloroformo : metanol : agua (10:10:3). Estos extractos se analizaron por TLC (canales 2-6) junto con testigos de IPLs (canal 1), utilizando cloroformo:metanol:agua (10:10:3) como solvente de desarrollo.
- B) Extracto de células amastigotes (24h de diferenciación) sin tratar (canal 1) y tratado con PI-PLC (canal 2). Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol:agua (10:10:3).

Para el análisis de la porción lipídica, α y β se eluyeron de la placa, se trataron nuevamente con PI-PLC y los lípidos extraídos con éter se analizaron en el solvente B. Ambos corrieron con el Rf de un glicerolípido disustituído (Figura 37A) Al ser reanalizados en el solvente D se detectaron en ambos casos los isómeros 1,2- y 1,3- del AAG (Rf 0,48 y 0,37 respectivamente). Como se mencionó anteriormente este último se formaría por migración del acilo de la posición -2. Para el compuesto α también se detectaron otros dos componentes con Rf 0,54 y 0,42 que no fueron identificados (Figura 37B).

Estos precursores de GPI son más abundantes en amastigotes, disminuyen a las 48 h de diferenciación aumentando nuevamente hacia las 72 h y en los epimastigotes.

Es de señalar la ausencia de ceramida en estos compuestos.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO 6

*Porción lipídica del ancla de la glicoproteína Ssp-4 de
Trypanosoma cruzi*

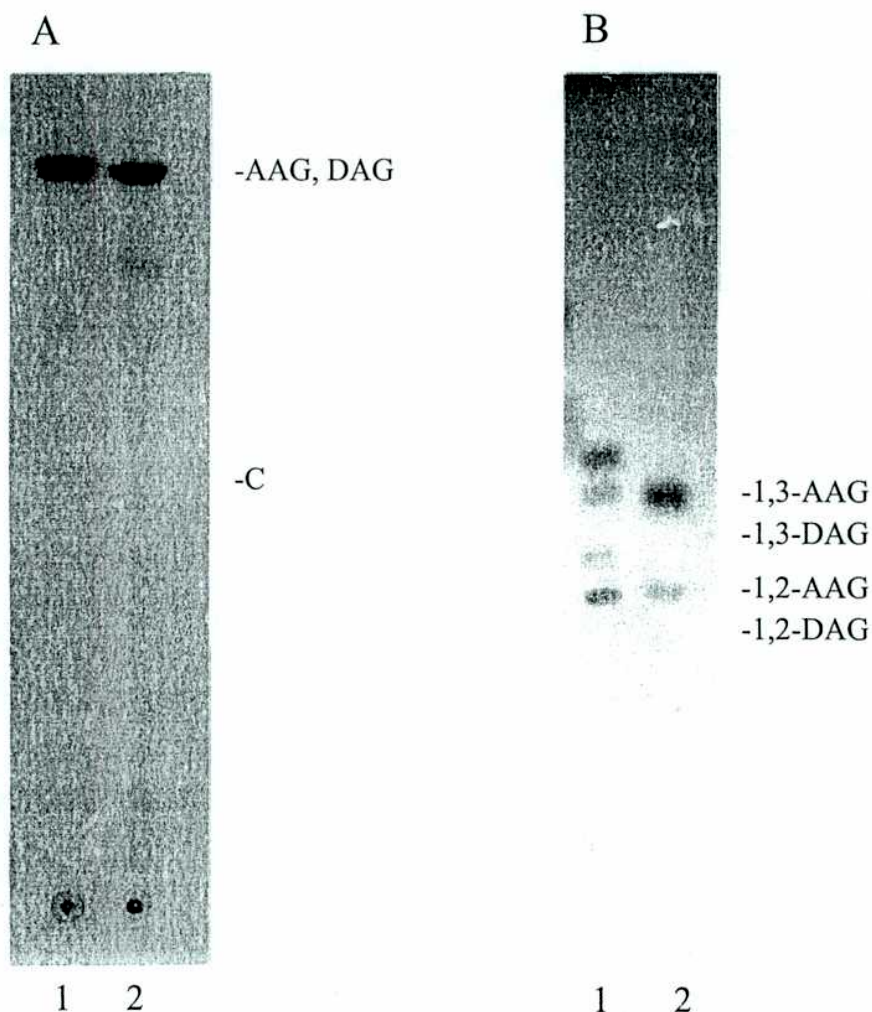


Figura 37 – Análisis de los lípidos liberados por tratamiento de los compuestos α y β con PI-PLC.

A) α y β se trataron con PI-PLC y los lípidos extraídos con éter se analizaron en TLC (canal 1 y canal 2, respectivamente) utilizando cloroformo:metanol (38:3) como solvente de desarrollo.

B) TLC de la porción lipídica de los compuestos α y β eluidos de la placa A, canal 1 y 2, respectivamente. Solvente de desarrollo: hexano:acetato de etilo (4:1).

Testigos: 1,2-AAG, 1-*O*-hexadecil-2-*O*-palmitoilglicerol; 1,3-AAG, 1-*O*-hexadecil-3-*O*-palmitoilglicerol; 1,2-DAG, 1,2-dipalmitoilglicerol; 1,3-DAG, 1,3-dipalmitoilglicerol; C, ceramida.

PORCION LIPIDICA DEL ANCLA DE LA GLICOPROTEINA Ssp-4 DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

ANCLAS GPIs EN *TRYPANOSOMA CRUZI*

Frecuentemente, se encuentran, en tripanosomátidos, GPIs como anclas de glicoconjugados a membrana (McConville & Ferguson, 1993).

La porción lipídica de estos GPIs varía significativamente entre las distintas especies y entre las formas de diferenciación dentro de una especie (Tabla 3, pág. 24). En particular en *T. cruzi* se encontró AAG y una pequeña proporción de ceramida en el ancla de la glicoproteína 1G7 de formas metacíclicas (Heise *et al.*, 1995). La porción lipídica del ancla de la glicoproteína Tc85 de formas trypomastigote (Couto *et al.*, 1993) que está involucrada en el proceso de invasión a la célula huésped (Alves *et al.*, 1986) es el 1-*O*-hexadecilglicerol. El ancla GPI de las mucinas de epimastigotes contienen exclusivamente 1-*O*-alquil-2-*O*-acilglicerol mientras que más del 70% de las mucinas de formas metacíclicas tienen una ceramida como lípido (Acosta Serrano *et al.*, 1995) (Figura 7, pág. 26).

Este cambio que ocurre en la porción lipídica de las mucinas, cuando los epimastigotes se diferencian a trypomastigotes metacíclicos, es muy interesante ya que no ocurre lo mismo con la porción oligosacáridica que se mantiene invariable. Su significado no está del todo claro pero podría correlacionarse con la habilidad de las mucinas de las formas infectantes, de insertarse en la membrana de la célula huésped durante la invasión (Ferguson, 1997). Otras glicoproteínas de formas metacíclicas ancladas por GPI, como la 1G7 que tiene predominantemente AAG, no son secretadas al medio (Schenkman *et al.*, 1993b).

La ceramida y el alquilglicerol se encontraron en relación 3:1 en el ancla de la trans-sialidasa de trypomastigote de cultivo celular (Agusti *et al.*, 1997) mientras que

en los trypomastigotes metacíclicos sólo se encontró ceramida (Agusti *et al.*, 1998). En ambos casos la glicoproteína se secreta al medio.

En el LPPG, componente mayoritario de la membrana plasmática de formas epimastigote se encontró hexadecilpalmitoil-glicerol o ceramida unidos al mismo glicano en células en la fase exponencial de crecimiento (Lederkremer *et al.*, 1993). También se encontró ceramida en anclas de *Dictyostelium discoideum* (Stadler *et al.*, 1989; Haynes *et al.*, 1993) y en *Saccharomyces cerevisiae* (Conzelmann *et al.*, 1992; Fankhauser *et al.*, 1993) pero no fue descripta en anclas de glicoproteínas de mamíferos.

ANTIGENO DE SUPERFICIE Ssp-4 DE FORMAS AMASTIGOTE DE *T. CRUZI*

La glicoproteína Ssp-4 es un antígeno de superficie específico y mayoritario de las formas amastigote y es un marcador del proceso de diferenciación, ya que es detectada con anticuerpos monoclonales sólo en amastigotes recién diferenciados (Andrews *et al.*, 1987). Su masa molar es de 70-85 kDa y está anclada por GPI. La Ssp-4 hidrofóbica puede convertirse por tratamiento con fosfolipasa C de *T. brucei* en la forma hidrofílica conteniendo el epitope CRD (Andrews *et al.*, 1988).

En experimentos realizados con Ssp-4 marcada con [³H]-mirístico no se encontró marca radioactiva en la glicoproteína inmunoprecipitada del medio de incubación. Esto sugiere que la liberación de Ssp-4 que se produce progresivamente durante la diferenciación de amastigotes a epimastigotes es mediada por hidrólisis de un ancla GPI por acción de una PI-PLC endógena (Andrews *et al.*, 1988).

En contraste con estos resultados no hay evidencia de liberación de glicoconjugados mediados por PI-PLC en *Leishmania* o en el *Trypanosoma* africano (Mc Conville & Ferguson, 1993).

La liberación de la Ssp-4 generaría en la superficie celular un glicerolípido o una ceramida que podrían actuar como segundos mensajeros. La identificación de este lípido es importante ya que se han descrito efectos opuestos en la regulación celular para el DAG y la ceramida (Hannun, 1994; Sweeley, 1994). Esto nos llevó a estudiar la porción lipídica de esta glicoproteína.

LIPIDO DEL ANCLA DE LA GLICOPROTEINA Ssp-4

Un lisado de amastigotes ($1,5 \times 10^9$) marcados con ácido [^3H]-palmítico se inmunoprecipitó con anticuerpos monoclonales anti Ssp-4. El inmunoprecipitado se extrajo con éter ($2 \times 0,5$ ml) para remover los lípidos adsorbidos. Luego se trató con PI-PLC de *Bacillus thuringiensis* y se reextrajo con éter ($4 \times 0,5$ ml). El 83% de la radioactividad se liberó por acción de la enzima. El lípido extraído con éter luego del tratamiento enzimático se analizó por TLC en el solvente I (Figura 38). En esta Figura se puede observar un compuesto con movilidad cromatográfica igual a una ceramida (R_f 0,34) y otro con un R_f de 0,61.

Para descartar que el compuesto de mayor R_f sea un glicerolípido, se lo eluyó de la placa y se lo re-analizó en el solvente B donde éste se separa bien del ácido graso. Como se puede observar en el perfil de radioactividad (Figura 39) se descartó la presencia de diacil o alquilacilglicerol en esta ancla.

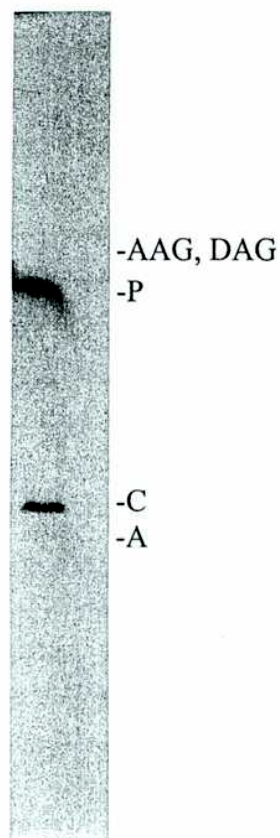


Figura 38 – TLC y fluorografía de los lípidos liberados por acción de la PI-PLC de *B. thuringiensis* sobre la glicoproteína Ssp-4.

Un inmunoprecipitado de la glicoproteína Ssp-4 radioactiva fue tratado con PI-PLC y posteriormente extraído con éter. El extracto se analizó en hexano:2-propanol (9:1). Testigos: AAG, alquilacilglicerol; DAG, diacilglicerol; P, ácido palmítico; C, ceramida (palmitoildihidroesfingosina); A, alquilglicerol (1-*O*-hexadecilglicerol).

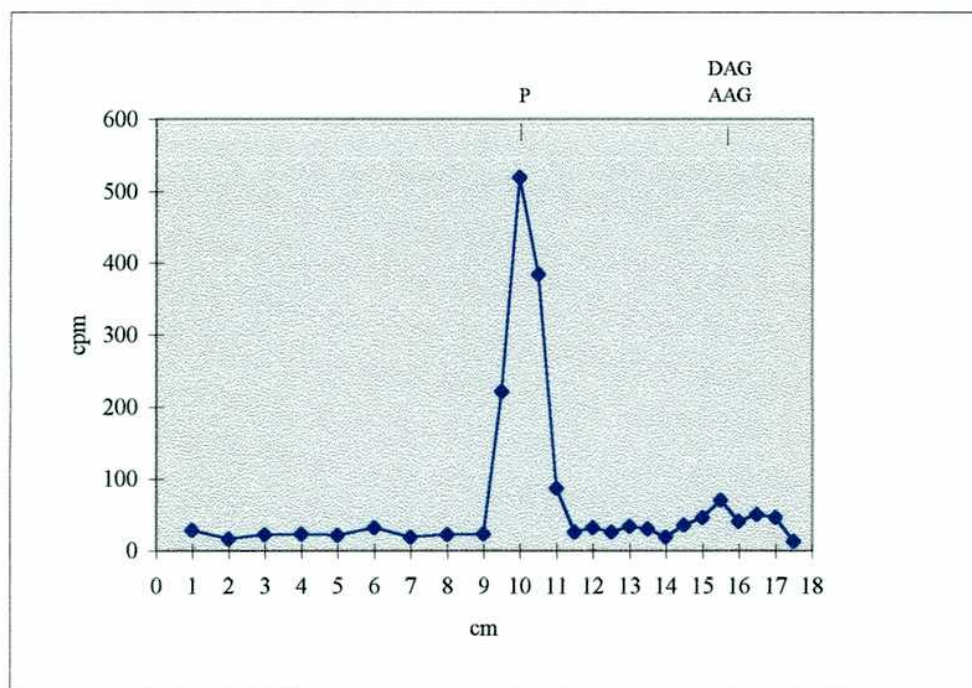


Figura 39 – Análisis en TLC del compuesto de la placa de la Figura 38 con movilidad cromatográfica igual al ácido palmítico.

Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol (38:3). Testigos: P, ácido palmítico; DAG, diacilglicerol; AAG, alquilacilglicerol.

El ácido graso detectado es probablemente parte del precursor original que no se eliminó completamente en la primera extracción.

El compuesto con igual movilidad que la ceramida (Fig. 38) se hidrolizó con HCl:metanol:agua y luego de neutralizar se extrajo con éter. Los productos de la hidrólisis se analizaron por RPTLC en el solvente S y se midió la radioactividad de la placa obteniéndose el perfil de la Figura 40. De esta manera se detectaron dos picos, uno correspondiente a dihidroesfingosina y otro al éster metílico del ácido palmítico.

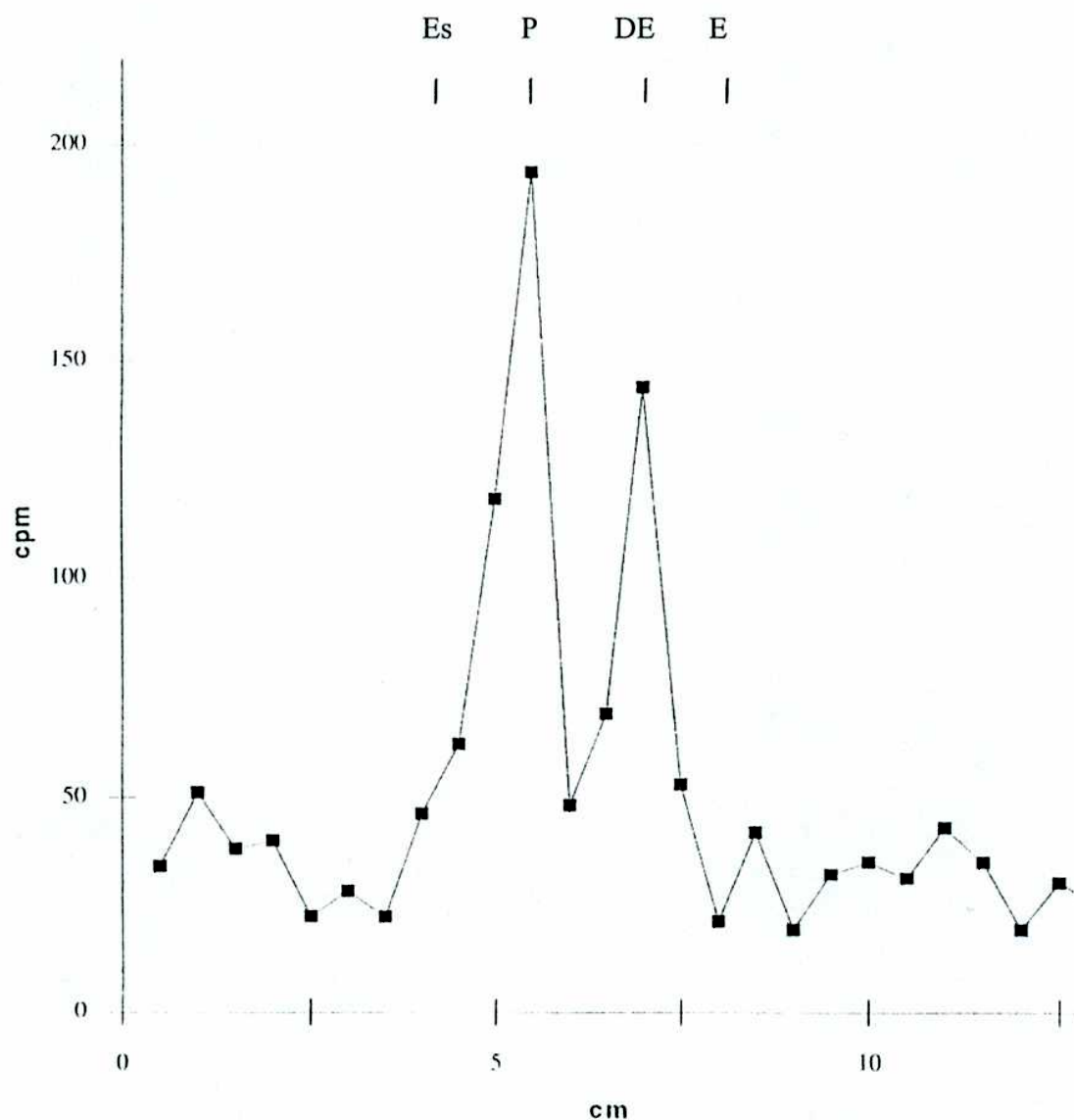


Figura 40 – Análisis en RP-TLC de los productos obtenidos por metanólisis ácida de la ceramida eluída de la TLC de la Figura 38.

Solvente de desarrollo: ácido acético:acetonitrilo (1:1). Testigos: Es, ácido esteárico; P, ácido palmítico; DE, dihidroesfingosina; E, esfingosina.

También se encontró palmitoildihidroesfingosina en el ancla de la trans-sialidasa (SAPA) de formas metacíclicas (Agusti *et al.*, 1998). Las ceramidas encontradas en las mucinas metacíclicas (Acosta Serrano *et al.*, 1995) y en el LPPG de formas epimastigote (Lederkremer *et al.*, 1990) son la lignoceroildihidroesfingosina y la palmitoildihidroesfingosina. En el presente estudio no se encontró el ácido graso de C_{24:0} (lignocérico). De todos modos hay que tener en cuenta que la incorporación con [³H]-palmitico puede no reflejar la composición real de las especies no radioactivas.

La palmitoildihidroesfingosina es también la ceramida libre mayoritaria de formas amastigote y el hecho de que sea máxima la cantidad de esta ceramida a las 24 horas de diferenciación (Resultados, Parte 2, pág. 97) estaría de acuerdo con un origen relacionado con la Ssp-4 que también es más abundante en ese punto de la diferenciación. Estos resultados abren la posibilidad de que la ceramida pueda jugar un rol en la diferenciación y proliferación celular en *T. cruzi* como se sugirió previamente para mamíferos (Olivera *et al.*, 1992).

Es interesante notar que las proteínas activamente liberadas al medio, probablemente por acción de fosfolipasas C endógenas, están ancladas a la membrana por ceramida. Este es el caso de las mucinas de trypomastigotes metacíclicos que se mencionó anteriormente. Estas mucinas de 35/50-kDa estarían involucradas en la invasión a la célula huésped. Una prueba de esto es que anticuerpos monoclonales dirigidos contra estas mucinas son capaces de inhibir la entrada del parásito a la célula (Yoshida *et al.*, 1989; Ruiz *et al.*, 1993). Los epimastigotes, que no pueden penetrar las células de mamífero, contienen, en las mucinas, 1-O-hexadecil-2-O-hexadecanoilglicerol como lípido del ancla. Este cambio en el lípido podría correlacionarse con la creciente infectividad de las formas metacíclicas y con la habilidad del parásito para liberar las mucinas en la invasión a la célula huésped.

La trans-sialidasa, enzima responsable de transferir ácido siálico desde glicoproteínas o glicolípidos del huésped a aceptores sobre la superficie del parásito, es liberada al medio de cultivo o al plasma de pacientes infectados. Esta enzima anclada

por GPI (Pollevick *et al.*, 1991) tiene como lípido, tanto en formas trypomastigotes como en trypomastigotes metacíclicos, una ceramida (Agusti *et al.*, 1997, 1998).

Otras proteínas que contienen glicerolípidos en el ancla GPI en lugar de ceramidas, como el antígeno 1G7 de *T. cruzi*, no son liberadas espontáneamente por el parásito.

Es interesante resaltar también que en *T. brucei* o en *Leishmania* no se ha determinado hasta el momento ningún ancla GPI que contenga ceramida.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO 7

*Actividades de fosfolipasas y lipasas en membranas de
Trypanosoma cruzi*

ACTIVIDADES DE FOSFOLIPASAS Y LIPASAS EN MEMBRANAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Las fosfolipasas tienen un rol importante en la generación de segundos mensajeros (Liscovitch, 1992; Hannun, 1994) y una de las más estudiadas es la fosfatidilinositol fosfolipasa C específica (PI-PLC) (Meldrum *et al.*, 1991; Rhee *et al.*, 1989).

La utilización como sustratos de los IPLs, GIPLs y lípidos neutros radioactivos obtenidos en este trabajo de tesis, y de un sistema de membranas de células epimastigotes de *T. cruzi*, permitió demostrar la presencia en la membrana de varias actividades enzimáticas.

Como se mencionó en capítulos anteriores, en las mucinas, el AAG es reemplazado por ceramida cuando el parásito se diferencia de formas epimastigote a formas metacíclicas (Acosta Serrano *et al.*, 1995). En los GIPLs de formas epimastigote AAG y ceramida están presentes en células en la fase logarítmica de crecimiento (Lederkremer *et al.*, 1993), mientras que en el LPPG de células en la fase estacionaria de crecimiento sólo se encontró ceramida (Lederkremer *et al.*, 1990). Estas y otras variaciones sugieren que estarían ocurriendo en *T. cruzi* mecanismos de remodelación, como se ha descrito para *Saccharomyces cerevisiae* (Conzelmann *et al.*, 1992; Sipos *et al.*, 1997; Reggiori *et al.*, 1997; Reggiori & Conzelmann, 1998).

Con el objeto de identificar las lipasas que podrían estar involucradas en reacciones de remodelación en *T. cruzi* se utilizaron como sustratos exógenos los IPLs y GIPLs radioactivos aislados previamente, los que se incubaron con membranas de formas epimastigotes (Esquema 6). En una primera incubación se utilizó como sustrato una mezcla de IPLs y membranas obtenidas de 5×10^8 células. La formación de lípidos de menor polaridad que los IPLs (Figura 41), los cuales analizados por TLC en otros sistemas de solventes, presentaban movilidades de ceramida, AAG y ácido graso; nos llevó a estudiar la presencia de fosfolipasas de tipo C y A en la preparación de membranas. Con los sustratos purificados se realizaron nuevas incubaciones, a

tiempos y en presencia de distintos reactivos, potenciales inhibidores o cofactores de las enzimas. Los lípidos extraídos luego de la incubación con cloroformo:metanol:agua (10:10:3) y sometidos a partición con agua/butanol se analizaron por TLC.

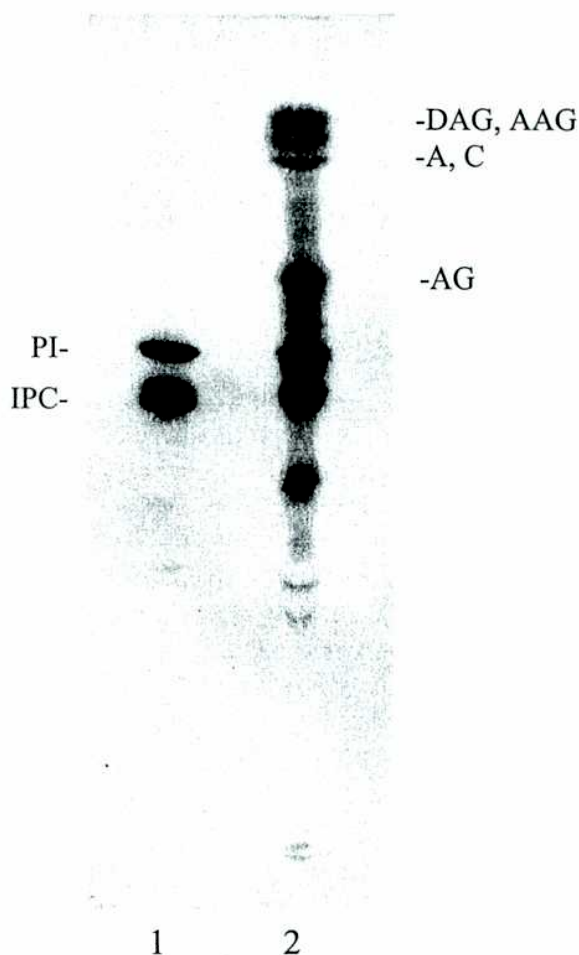
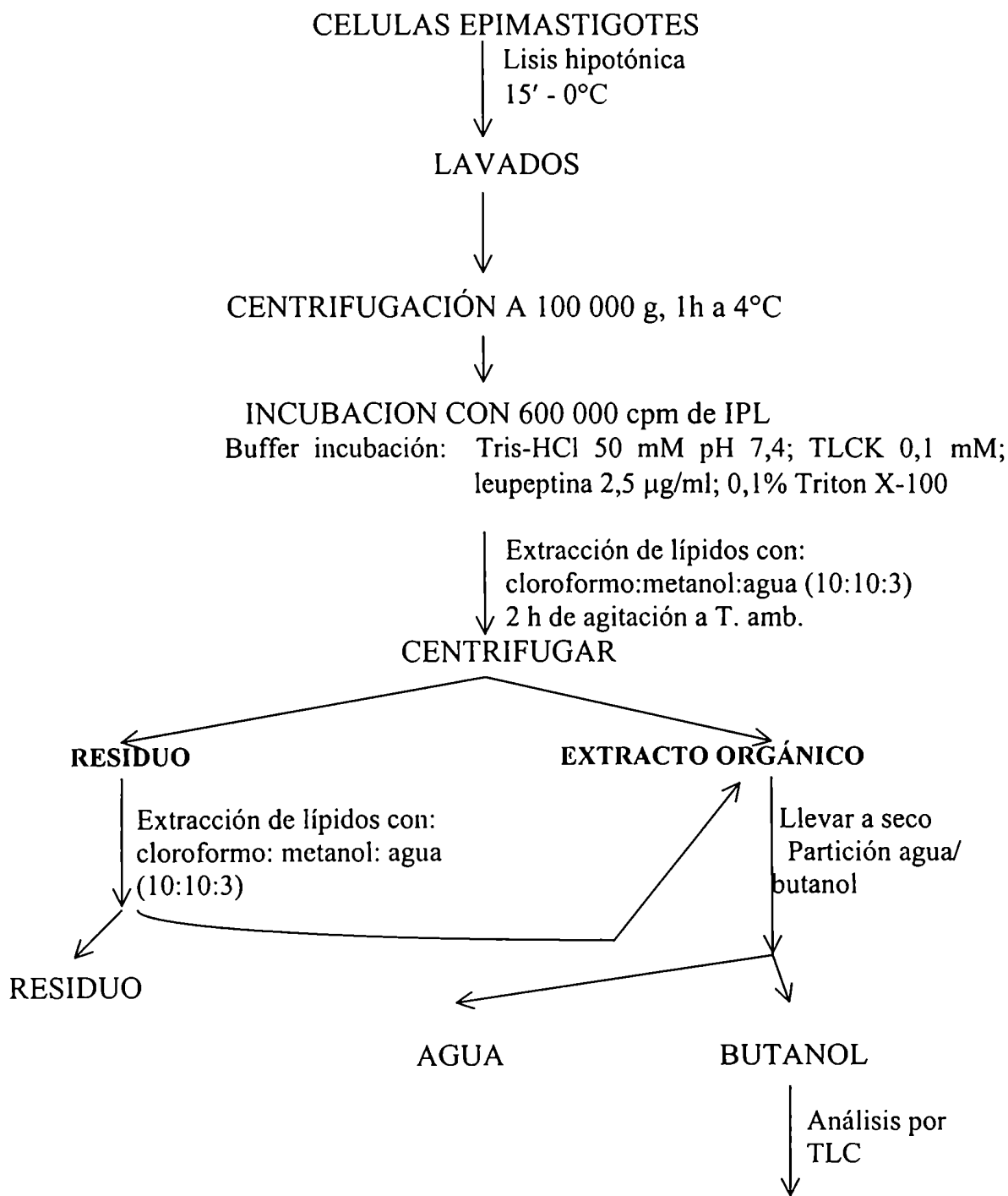


Figura 41 – TLC y autorradiografía de los lípidos extraídos luego de la incubación de los IPLs con membranas de células epimastigotes de *T. cruzi* (canal 2).

En el canal 1 se cromatografió como testigos una muestra de IPLs radioactivos. Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol: NH_4OH 2,5M (15:10:2). Testigos: AAG, alquilacilglicerol; DAG, diacilglicerol; A, alquilglicerol; C, ceramida; AG, ácido graso.

PREPARACIÓN DE MEMBRANAS DE *T. cruzi*
INCUBACION CON INOSITOLFOSFOLIPIDOS (IPL)



Esquema 6

ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA C EN MEMBRANAS DE *T. CRUZI*

Para investigar una actividad de PI-PLC en membranas de *T. cruzi* los PI (Figura 42A) e IPC (Figura 42B) radioactivos se incubaron a 30°C con las membranas (5×10^7 células) a distintos tiempos (15 min, 60 min, 120 min, 18h). Los lípidos se extrajeron y se analizaron por TLC en el solvente A donde se pudo comprobar la formación de lípidos menos polares que los IPLs en todos los canales menos en el control (IPLs incubados en el buffer sin membranas, Figuras 42A y 42B, canal 10).

Los compuestos de mayor movilidad I, II y VI de la Figura 42 se eluyeron de la sílica y se recromatografiaron en el solvente B (Figura 43A). El compuesto I presentó movilidad similar al DAG y AAG (éstos no se diferencian en este solvente) (canal 1). El lípido II se identificó como alquilglicerol (canal 2) y el lípido VI, liberado de la IPC, se identificó como ceramida (canal 3).

Para confirmar la identidad de los lípidos, el glicerolípido disustituído obtenido del PI, se cromatografió en el solvente D que discrimina AAG de DAG. En este solvente se pudo identificar el lípido I como AAG detectándose sólo trazas de DAG (Figura 43B). Este resultado se confirmó por saponificación del AAG y posterior análisis de los productos obtenidos (Figura 43C).

El hecho de que el isómero 1,3- sea más abundante se debe a una migración intramolecular del acilo de la posición 2 durante la manipulación de las muestras, fenómeno observado con frecuencia (Sjursnes & Anthonsen, 1994).

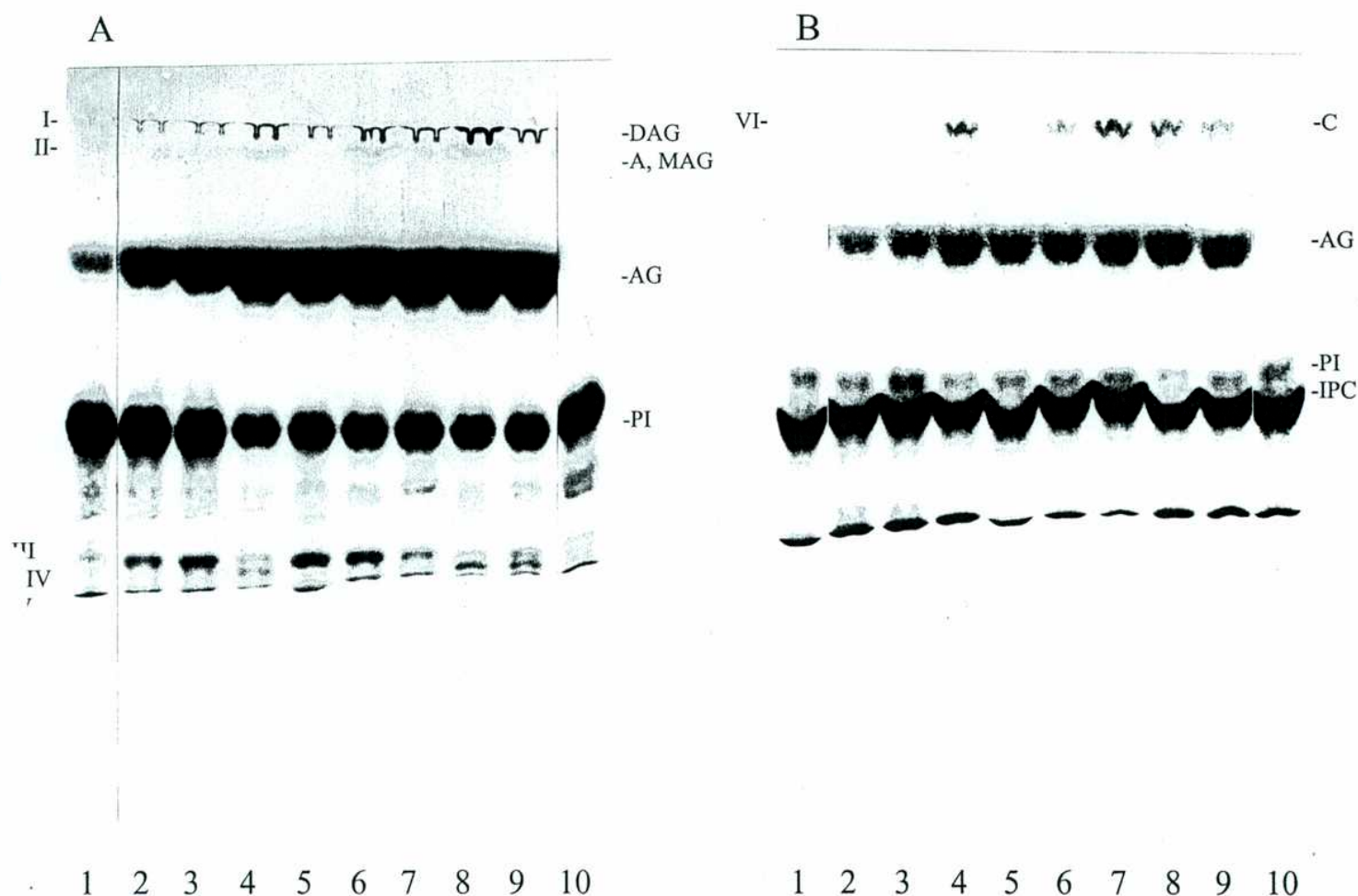


Figura 42 – (A) Actividades de PLA_1 , PLA_2 , PI-PLC y (B) de IPC-ácido graso hidrolasa e IPC-PLC en membranas de *T. cruzi*.

PIs (600 000 cpm) (A) e IPCs (600 000 cpm) (B) marcados con ácido [3H]-palmítico y purificados de células epimastigotes de *T. cruzi*, se incubaron con membranas de *T. cruzi* ($5 \cdot 10^7$ células). Las incubaciones se realizaron a distintos tiempos (15 min, canal 1; 1h, canal 2; 2h, canal 3 y 18h, canal 4) a $30^\circ C$. El efecto de distintos reactivos en concentración 10 mM se estudió en las incubaciones de 18h (CMPSA, canal 5; EDTA, canal 6; *o*-fenantrolina, canal 7; $CaCl_2$, canal 8 y $MgCl_2$, canal 9). Como control los PI e IPC se incubaron 18h en el buffer sin las membranas (canal 10). Luego de la incubación los lípidos radioactivos se extrajeron con cloroformo:metanol:agua (10:10:3), se llevaron a seco y se sometieron a partición con agua/butanol. La fase orgánica se analizó por TLC utilizando cloroformo : metanol : NH_4OH 2,5M (15:10:2) como solvente de desarrollo. Testigos: DAG, diacilglicerol; A, alquilglicerol; MAG, monoacilglicerol; AG, ácido graso; C, ceramida.

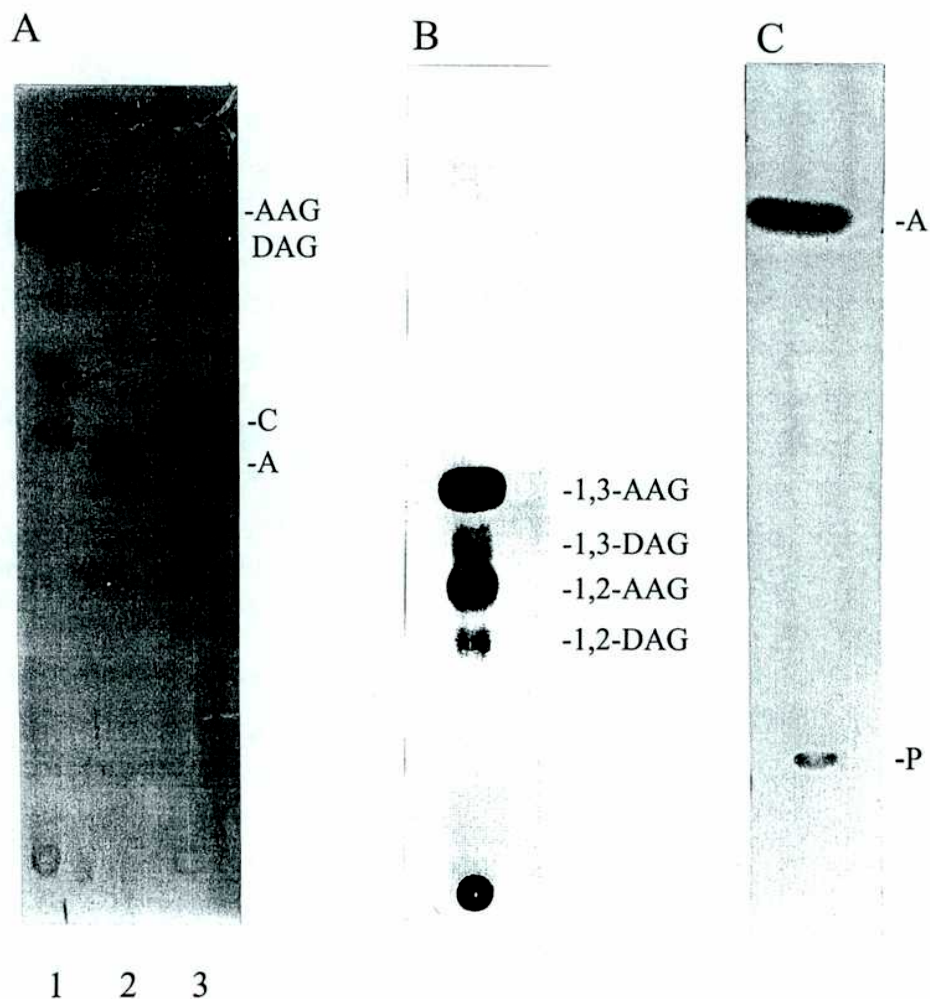


Figura 43 – Análisis de los lípidos liberados por acción de una fosfolipasa C endógena durante la incubación de los PI e IPC con membranas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

- A) Los compuestos I, II y VI de la Fig. 42 se eluyeron y recromatografiaron en cloroformo : metanol (38:3) (canales 1, 2 y 3 respectivamente).
 B) Análisis del glicerolípido eluido de placa A, canal 1; en hexano : acetato de etilo (4:1).
 C) El compuesto mayoritario con movilidad de alquilacilglicerol en placa B se eluyó y fue saponificado en NaOH 0,1M en metanol 90%. Solvente de desarrollo: cloroformo : metanol : $\text{NH}_3(\text{c})$ (100:10:1).

Testigos: AAG, alquilacilglicerol (1-*O*-hexadecil-2-*O*-palmitoilglicerol); DAG, diacilglicerol (1,2-dipalmitoilglicerol); C, ceramida (palmitoildihidroesfingosina); A, alquilglicerol (1-*O*-hexadecilglicerol); P, ácido palmítico.

La naturaleza de la ceramida liberada por incubación de la IPC con las membranas, se analizó por cromatografía en fase reversa (RPTLC) (solvente Q). Como se puede observar en la Figura 44A el componente mayoritario es palmitoildihidroesfingosina con menores cantidades de estearoildihidroesfingosina y palmitoilesfingosina (canal 3).

Las ceramidas obtenidas por tratamiento con PI-PLC de *Bacillus thuringiensis* de la IPC remanente luego de 18 h de incubación (Figura 42B, canal 4) y de la IPC control (Figura 42B, canal 10), se analizaron en la misma placa (Figura 44A, canales 1 y 2 respectivamente). Como puede observarse no hay ninguna diferencia en la composición de las mismas, lo que demuestra que todas las ceramidas son igualmente liberadas por la IPC-PLC.

La estructura de las ceramidas liberadas por acción de la IPC-PLC endógena se confirmó por metanólisis ácida y análisis de los productos obtenidos en TLC utilizando el solvente C (Figura 44B). Se detectaron DHS y trazas de esfingosina junto con los ésteres metílicos de los ácidos grasos (canal 3). Los mismos resultados se obtuvieron al analizar las ceramidas liberadas por la PI-PLC bacteriana de la IPC remanente luego de la incubación con las membranas (canal 1) y de la IPC control (canal 2).

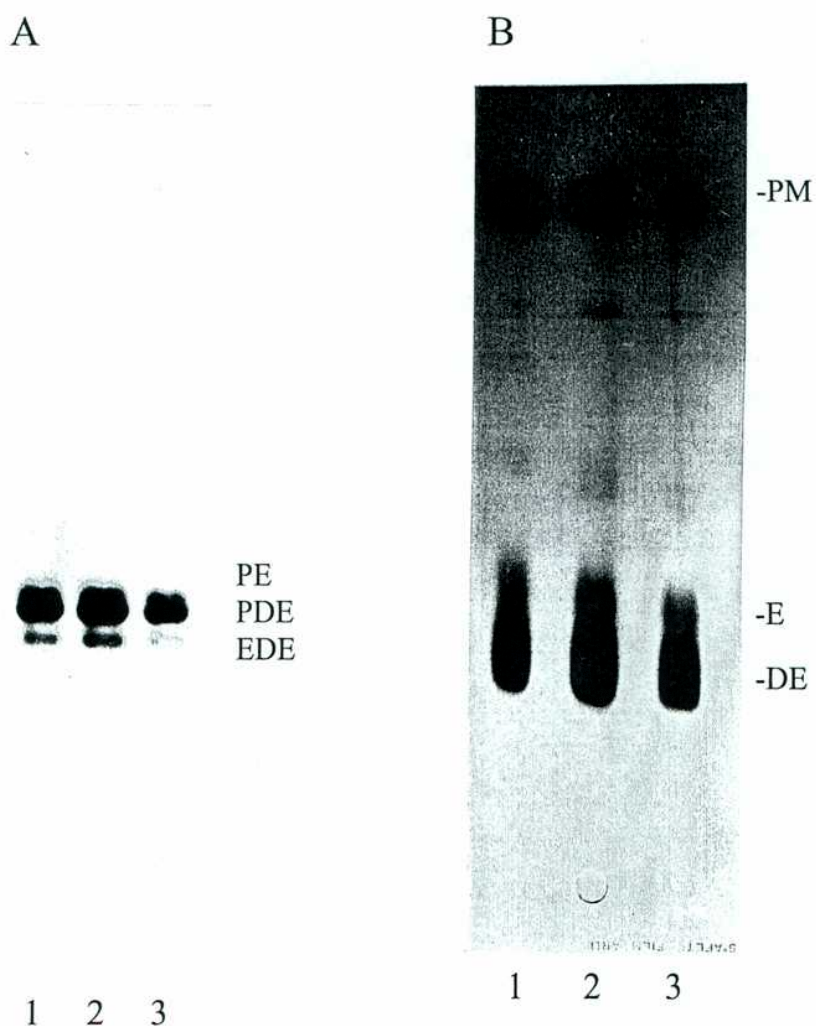


Figura 44 – La ceramida liberada de la IPC por la PLC endógena tiene la misma composición que la ceramida encontrada originalmente en la IPC, pero el ácido graso radioactivo es intercambiado en parte por ácido graso frío.

- A) Las IPCs incubadas con las membranas de *T. cruzi* 18h (Fig. 42, canal 4) y la IPC control (Fig. 42, canal 10) se trataron con PI-PLC de *Bacillus thuringiensis*. Los lípidos se extrajeron con butanol y una alícuota se analizó por RPTLC (canales 1 y 2 respectivamente) junto con la ceramida liberada de la IPC por la PLC endógena (canal 3). Solvente de desarrollo: cloroformo : metanol : agua (40:100:3).
- B) Las ceramidas analizadas en el panel A, canales 1, 2 y 3 se sometieron a metanólisis ácida y los productos se analizaron por TLC (canales 1, 2 y 3 respectivamente). Solvente de desarrollo: cloroformo : metanol : NH_4OH 2,5M (40:10:1).
- Testigos: PE, palmitoilesfingosina; PDE, palmitoildihidroesfingosina; EDE, estearoildihidroesfingosina; PM, palmitato de metilo; E, esfingosina; DE, dihidroesfingosina.

Cuando se utilizó como sustrato la fracción conteniendo los GIPLs también se pudo comprobar una actividad de PI-PLC que genera ceramidas y AAG (Figura 45). Luego de incubar 18h con el sistema de membranas se puede observar, al cromatografiar en el solvente H los lípidos extraídos, la aparición de un lípido menos polar (Figura 45A, canal 3) que también se pudo visualizar a la hora de incubación en una autorradiografía expuesta un período más prolongado. Para determinar la composición del lípido generado, se lo eluyó y analizó en el solvente G. En la Figura 45B se pueden observar dos compuestos con Rf coincidentes con testigos de palmitoildihidroesfingosina y lignoceroildihidroesfingosina respectivamente y otro compuesto con la movilidad de un glicerolípido disustituído (canal 1). También se realizó un control de los lípidos liberados de los GIPLs por tratamiento con PI-PLC comercial de origen bacteriano (canal 2). La naturaleza de las ceramidas se confirmó analizando las mismas por cromatografía en fase reversa en el solvente Q (Figura 46A). Como era de esperar se detectaron la palmitoildihidroesfingosina y la lignoceroildihidroesfingosina. Esta última se sometió a metanólisis ácida y el análisis de los productos obtenidos se observa en la Figura 46B. La única base detectada es dihidroesfingosina.

Estos resultados ponen en evidencia la presencia, en la membrana de epimastigotes de *T. cruzi*, de una fosfolipasa C que actúa sobre los PI liberando AAG, DAG y alquilglicerol; sobre las IPC liberando ceramida y sobre los GIPLs liberando ceramida y AAG. El hecho de que estos sustratos se degraden sólo parcialmente puede atribuirse al efecto de dilución producido por cantidades significativas de IPLs y GIPLs endógenos en las preparaciones de membranas.

Estas son las primeras evidencias de la presencia de fosfolipasas en membranas de epimastigotes de *T. cruzi*, activas sobre los IPLs, en particular de una IPC-PLC. Anteriormente se detectaron actividades enzimáticas que solubilizan la mfVSG de *T. brucei* en membranas de trypomastigotes y en lisados de formas epimastigote y metacíclicas (Schenkman *et al.*, 1988b, Cardoso de Almeida & Heise, 1993).

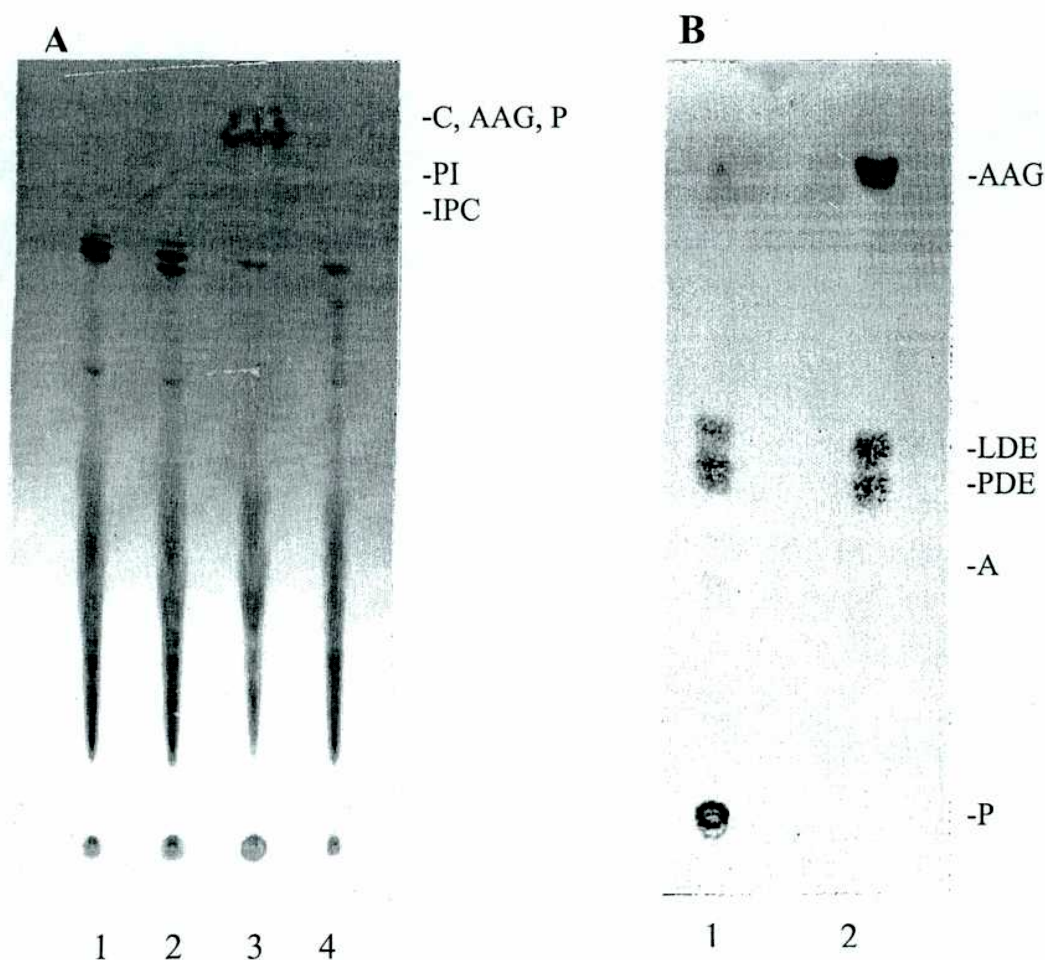


Figura 45 - Análisis de los lípidos liberados en la incubación de los GPIPLs con las membranas de *T. cruzi*.

- A) Los GPIPLs marcados con [^3H]-ácido palmítico (500 000 cpm) purificados de células de *T. cruzi* se incubaron a distintos tiempos (15 min, canal 1; 1 hora, canal 2 y 18 horas, canal 3) y los lípidos se extrajeron como se describe en la Figura 42. La TLC se desarrolló en cloroformo:metanol:agua (10:10:3). En el canal 4 se muestra un control incubado sin membranas.
- B) El compuesto de mayor movilidad en el canal 3 (placa A), se eluyó y se recromatografió utilizando cloroformo:metanol: NH_4OH (c) (300:25:2) como solvente de desarrollo (canal 1). En el canal 2 se muestra un control de los lípidos liberados de los GPIPLs por acción de la PI-PLC bacteriana. Testigos: A, alquilglicerol; AAG, alquilacilglicerol; C, ceramida; LDE, lignoceroildihidroesfingosina; PDE, palmitoildihidroesfingosina; P, ácido palmítico.

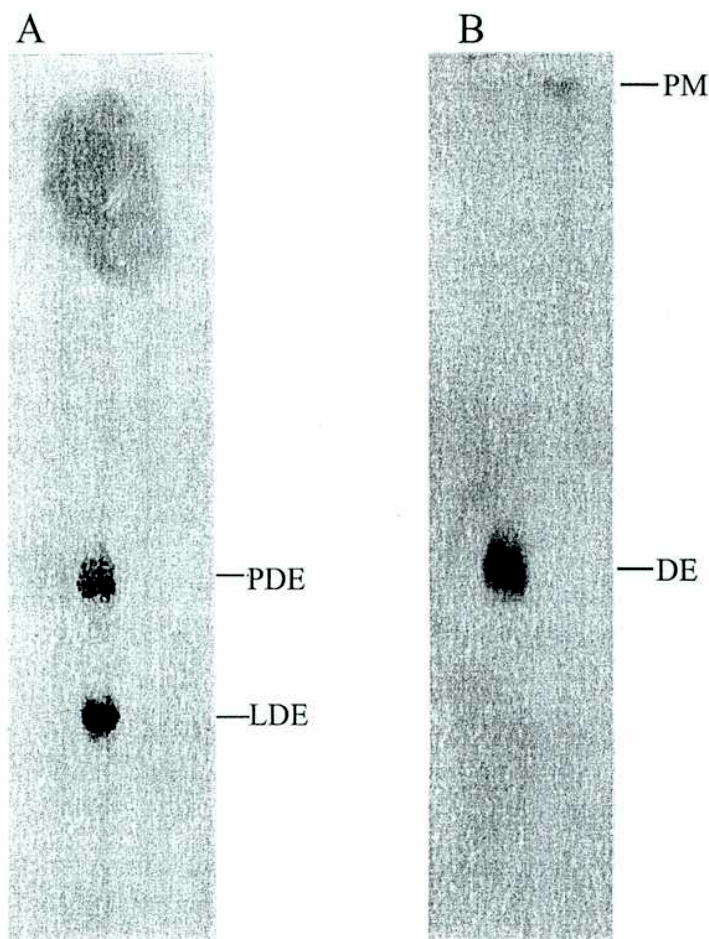


Figura 46 – Análisis por TLC y fluorografía de las ceramidas obtenidas por tratamiento con PI-PLC bacteriana de los GIPLs marcados con ácido [^3H]-palmítico.

A) Las ceramidas obtenidas de los GIPLs se separaron del AAG por cromatografía en columna de sílica y se cromatografiaron en fase reversa. Solvente de desarrollo: cloroformo:metanol:agua (40:100:3).

B) La lignoceroildihidroesfingosina se eluyó de la placa, se sometió a metanólisis ácida y los productos de este tratamiento se cromatografiaron en placa de sílica utilizando cloroformo:metanol: NH_4OH 2,5M (40:10:1).

Testigos: PDE, palmitoildihidroesfingosina; LDE, lignoceroildihidroesfingosina; PM, palmitato de metilo; DE, dihidroesfingosina.

La ceramida es un componente del ancla de las glicoproteínas de *T. cruzi* que se liberan del parásito. La glicoproteína Ssp-4 característica de formas amastigotes está anclada por una ceramida (Bertello *et al.*, 1996). También la trans-sialidasa de formas trypomastigote que es activamente liberada durante el período agudo de la infección (Affranchino *et al.*, 1989) está anclada por una ceramida (Agusti *et al.*, 1997, 1998). Esto sugiere que la actividad de IPC-PLC encontrada puede ser responsable de la hidrólisis de estos antígenos con la consecuente liberación de ceramida. Por esto, los niveles de esta enzima podrían ser mayores en amastigotes y trypomastigotes que en epimastigotes.

Efecto de inhibidores sobre la actividad de PI-PLC y de IPC-PLC

Utilizando PI como sustrato, se investigó el efecto de distintos reactivos sobre la actividad de PLC (Figura 42A). Esta actividad se inhibió (40%) con 10mM *p*CMPSA (canal 5). El *p*CMPSA es un reactivo que también inhibe la GPI-PLC de *T. brucei* (Bülow & Overath, 1986; Hereld *et al.*, 1986; Bütikofer *et al.*, 1996) y las PI-PLC bacterianas (Ikezawa & Taguchi, 1981). La máxima actividad se obtuvo con adición de Ca^{2+} (canal 8) aunque el EDTA (canal 6) no causó inhibición y no se observó ningún efecto con MgCl_2 (canal 9).

Cuando se utilizó IPC como sustrato (Figura 42B) la actividad de fosfolipasa C fue completamente inhibida por concentraciones milimolares de *p*CMPSA (canal 5) y parcialmente inhibida (45%) con EDTA (canal 6). Se observó muy poca activación con Ca^{2+} (canal 8) mientras que el Mg^{2+} inhibió en un 60% (canal 9). Como está descripto para otras PI-PLC (Low & Prasad, 1988; Bütikofer & Brodbeck, 1993) la *o*-fenantrolina no inhibió la liberación de ceramida (canal 7).

De acuerdo con los datos obtenidos, la misma enzima podría estar actuando sobre el PI y la IPC. Las pequeñas diferencias encontradas en los efectos de los inhibidores podría deberse a una distinta interacción con los sustratos. Sin embargo no puede descartarse la posibilidad de que estén actuando dos enzimas.

ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASAS A₁ Y A₂ Y DE ACILTRANSFERASA

Como se puede observar en la Figura 42A, la mayor degradación que ocurre por incubación de los PI radioactivos con membranas de *T. cruzi*, es la liberación de ácido graso.

El compuesto con el Rf de un ácido graso (AG) se eluyó de la sílica, se metiló y se analizó por RPTLC en el solvente S antes y después de hidrogenarlo catalíticamente (Figura 47, canales 1 y 2 respectivamente). Se observa que el compuesto principal tiene la movilidad de ácido esteárico. La variación del perfil cromatográfico con la hidrogenación sugirió la existencia de ácidos grasos insaturados. Para confirmar esto los compuestos **a** y **b** del canal 1 se eluyeron separadamente, se hidrogenaron y se volvieron a analizar (canales 5 y 6 respectivamente). Al hidrogenar el compuesto **a** se obtuvieron los ácidos grasos C_{16:0} y C_{18:0} indicando la presencia en el compuesto original de palmitoleico (C_{16:1}) y linoleico (C_{18:2}). El compuesto **b** se hidrogenó parcialmente a C_{18:0} indicando la presencia de palmítico (C_{16:0}) y oleico (C_{18:1}) en partes aproximadamente iguales. En conclusión, el ácido graso liberado de los PI es mayoritariamente ácido esteárico (ácido graso componente principal de los glicerolípidos). También hay palmítico, ácido oleico y trazas de ácido palmitoleico y linoleico.

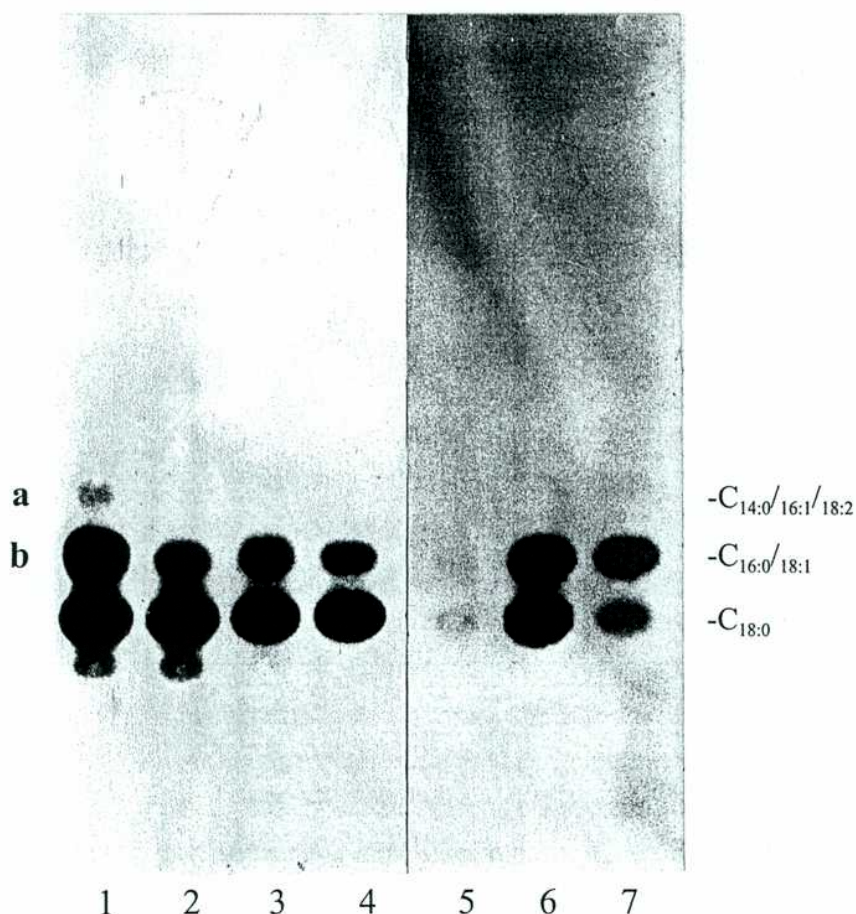


Figura 47 - Análisis de los ácidos grasos liberados en la incubación de los IPL con membranas de *Trypanosoma cruzi* por acción de una PLA₁, PLA₂ e IPC-acil hidrolasa endógenas.

Los AG de las Fig. 42A y 42B se eluyeron de las placas, se metilaron y los ésteres metílicos se analizaron antes (canales 1 y 3 respectivamente) y después de hidrogenar catalíticamente (canales 2 y 4 respectivamente). El compuesto **a** del canal 1 y el compuesto **b** de los canales 1 y 3 se eluyeron por separado, se hidrogenaron y se volvieron a cromatografiar (canales 5, 6 y 7 respectivamente). Solvente de desarrollo: ácido acético : acetonitrilo (1:1). Testigos: C_{14:0}, C_{16:1}, C_{18:2}, C_{16:0}, C_{18:1} y C_{18:0} son los ésteres metílicos del ácido mirístico, palmitoleico, linoleico, palmítico, oleico y esteárico respectivamente.

Esta actividad de PLA endógena debe generar *liso*PIs. Para su identificación el lípido V proveniente de los canales 1-3 de la Figura 42A y el lípido III de los canales 2, 3, 5 y 6 se eluyeron y trataron con PI-PLC de *B. thuringiensis*. Los lípidos obtenidos en este tratamiento se extrajeron con 1-butanol y se analizaron por TLC en el solvente F. Como se puede observar en la Figura 48A el lípido V generó un compuesto con la movilidad del alquilglicerol (canal 1) mientras que del compuesto III se obtuvo monoacilglicerol (canal 3). El tratamiento con PI-PLC de la triple banda (canales 4 y 9) generó alquilglicerol y monoacilglicerol (canal 2) indicando que el compuesto IV corresponde a la forma isomérica del monoacilglicerol ya que sólo puede estar presente el 1-*O*-alquilglicerol.

Para confirmar la presencia de dos monoacilderivados alícuotas iguales de los lípidos III-V se sometieron a saponificación o a tratamiento con PLA₂. Los productos de ambos tratamientos se cromatografiaron en placa y los resultados se muestran en la Figura 48B. La liberación de ácido graso por tratamiento con PLA₂ (canal 2) confirma la acción de una PLA₁ endógena sobre los PI, que genera el 2-*O*-acilglicerofosfoinositol. El hecho de que al saponificar se obtenga una mayor cantidad de ácido graso radioactivo indica que el 1-*O*-acilderivado también está presente. El lípido III se pudo identificar como el 2-*O*-acilderivado ya que fue degradado por tratamiento con PLA₂ comercial (Figura 48C).

Estos resultados pueden resumirse en lo siguiente:

Compuesto	Estructura
III	2- <i>O</i> -acilglicerofosfoinositol
IV	1- <i>O</i> -acilglicerofosfoinositol
V	1- <i>O</i> -alquilglicerofosfoinositol

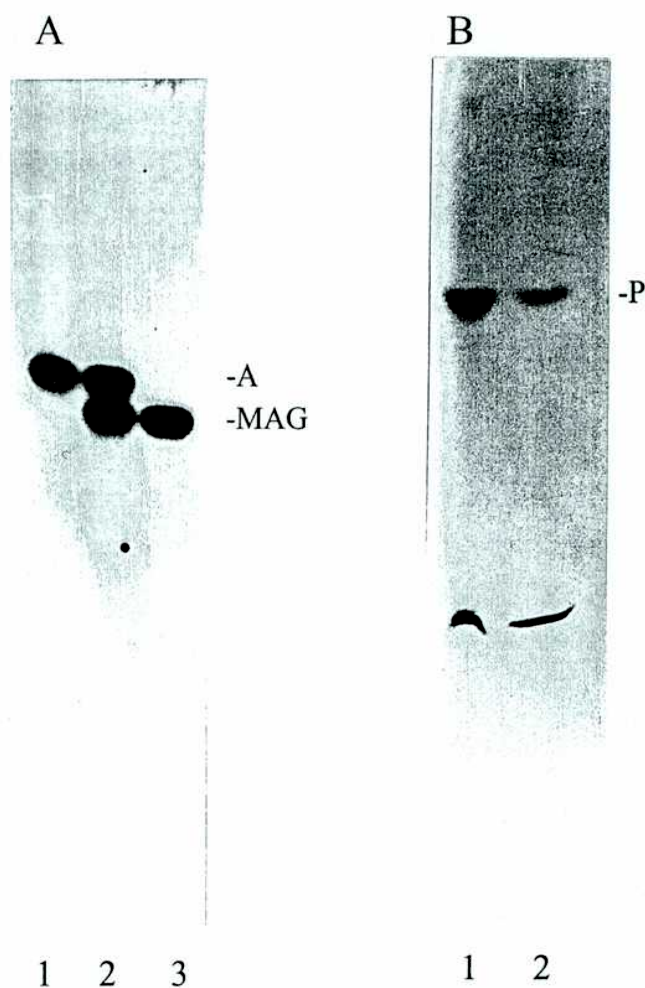


Figura 48 – Análisis de los *liso*-PIs obtenidos en las incubaciones de los PI con membranas de *T. cruzi*

- A) Los compuestos III, IV y V de la Fig. 42 se trataron con PI-PLC bacteriana, los lípidos radioactivos se extrajeron con butanol y se analizaron por TLC en cloroformo : metanol : $\text{NH}_4\text{OH(c)}$ (100:10:1). Canal 1, lípido liberado del compuesto V; canal 2, lípidos liberados de los compuestos III-V y canal 3, lípido liberado del compuesto III.
- B) Los compuestos III-V de la Fig. 42 se saponificaron (canal 1) o se trataron con PLA_2 (canal 2), los lípidos se extrajeron con butanol y se analizaron por TLC en cloroformo : metanol : $\text{NH}_4\text{OH 2,5M}$ (15:10:2).

Testigos: A, alquilglicerol; MAG, monoacilglicerol; P, ácido palmítico.

Para investigar la composición de los lípidos presentes en los PI remanentes luego de la incubación con las membranas, se eluyó el PI del canal 4 de la Figura 42A, se trató con PI-PLC bacteriana y el lípido se analizó junto con el lípido del PI control (Figura 42A, canal 10). Como puede observarse en la Figura 49A, en el PI incubado 18 h con las membranas sólo se detectó AAG (canal 1), mientras que en el control se detectaron AAG y DAG (canal 2) en concordancia con lo que se había encontrado previamente (Bertello *et al.*, 1995).

Luego de saponificar el AAG (Figura 49A, canal 1) la mayor parte de la radioactividad se encontró en el grupo alquilo (Figura 49B, canal 1). La relación **alquilglicerol/ácido graso** obtenida por elución y cuantificación de la radioactividad fue de **12,4** para el AAG obtenido del PI remanente luego de 18 horas de incubación, mientras que fue de **1,3** para el AAG obtenido del PI utilizado como control (Figura 49B, canal 2). La poca radioactividad encontrada en el ácido graso del AAG luego de la incubación indica la presencia de una aciltransferasa, que introduciría ácido graso no radioactivo, luego de la acción de la PLA₂ sobre el (AAG)-PI. Esto está en concordancia con la relación de radioactividad encontrada en los productos de saponificación del AAG liberado por acción de la PI-PLC endógena (Fig. 43C).

Lo mismo estaría ocurriendo sobre el (DAG)-PI. En este caso los dos ácidos grasos removidos por acción de una PLA₁ y una PLA₂ estarían siendo intercambiados por ácidos grasos fríos, ya que no se detecta DAG radioactivo en los PI luego de la incubación. Por otra parte no se observa una cantidad de *liso*-PIs acorde con la cantidad de ácido graso liberado. Esto refuerza la idea de que una aciltransferasa introduce ácido graso no radioactivo proveniente de las membranas.

La remoción del ácido graso radioactivo del (AAG)-PI demuestra la acción, sobre éste, de una fosfolipasa A₂. Por otra parte, la hidrólisis completa del DAG radioactivo durante la incubación, confirma la acción sobre los (DAG)-PI de una fosfolipasa A₁ y de una fosfolipasa A₂. Probablemente, sea la misma PLA₂ la que da origen al 1-*O*-alquilderivado y al 1-*O*-monoacilderivado.

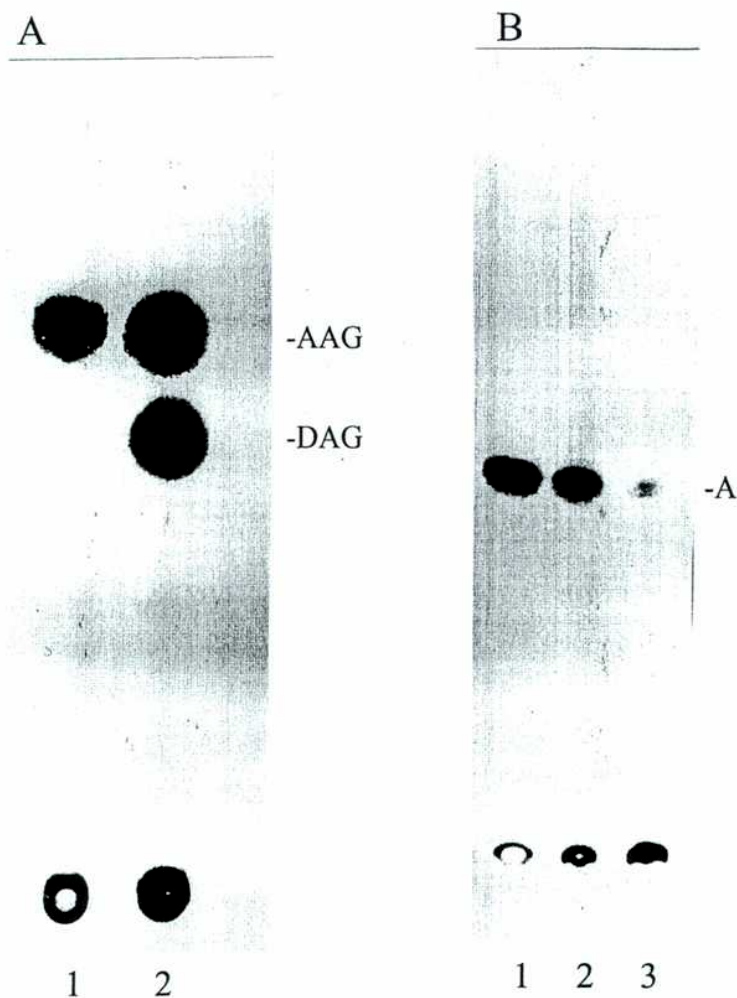


Figura 49 – El ácido graso radioactivo del glicerolípido es intercambiado por ácido graso frío durante la incubación de los PI con las membranas de *T. cruzi*.

- A) Los PI remanentes luego de 18h de incubación con las membranas (Fig. 42A, canal 4) y los PI control (Fig. 42A, canal 10) se eluyeron de la sílica y se trataron con 0,35 unidades de PI-PLC de *B. thuringiensis*. Los lípidos se extrajeron con butanol y se analizaron en hexano : acetato de etilo (4:1) (canales 1 y 2 respectivamente).
- B) Los glicerolípidos de la placa A se eluyeron, se saponificaron y analizaron con cloroformo : metanol : $\text{NH}_3(\text{c})$ (300:25:2). Canal 1, productos obtenidos del AAG del canal 1, panel A; canal 2, productos obtenidos del AAG del canal 2, panel A y canal 3, productos obtenidos del DAG de canal 2, panel A.

La incubación de los GIPLs, permitió demostrar que éstos también son sustratos de la PLA₂, ya que la mancha cercana al origen, en la Figura 45B, canal 1, se pudo identificar como ácido graso en otro sistema de solventes. Por otra parte, se puede observar en la Figura 45B, que la radioactividad en el AAG (canal 1) es significativamente menor que en el mismo glicerolípido obtenido de los GIPLs por acción de la PI-PLC comercial, y no se detectó alquilglicerol a pesar de que se produce la liberación de ácido graso del AAG. Estos resultados indican que una aciltransferasa que introduce ácido graso no radioactivo está actuando también sobre los GIPLs.

También se logró incorporar ácido palmítico radioactivo en los GIPLs utilizando este sistema de membranas. Se incubó [³H]-palmítico con membranas de formas epimastigote de *T. cruzi*. Luego de la incubación los lípidos se extrajeron con cloroformo:metanol:agua (10:10:3) y se sometieron a partición agua/butanol. El extracto acuoso se llevó a seco y se resuspendió en cloroformo:metanol:agua (10:10:3). Este extracto se cromatografió en el solvente H, y como se puede observar en la Figura 50, a las 18 horas (canal 3) se detectan por autorradiografía lípidos más polares radioactivos. De esta manera se confirmaría la acción de una aciltransferasa en nuestro sistema de membranas que intervendría en el remodelamiento o intercambio de ácidos grasos en los precursores de los GPI.

La actividad de PLA₁ se describió en otros trypanosomátidos (Hambrey *et al.*, 1981), pero no hemos hallado menciones de tal actividad en *T. cruzi*. Los resultados obtenidos por los investigadores indican para las especies patógenas un nivel relativamente alto de PLA₁ con niveles muy bajos o no detectables de PLA₂. Por su parte, Oppendoes & van Roy (1982) también caracterizaron y localizaron una fosfolipasa A₁ en *T. brucei*; más del 90% en forma soluble y el resto unida a membrana. Esta enzima fue incapaz de hidrolizar la unión éster de la mfVSG (Hambrey *et al.*, 1986). En *T. brucei* también se ha descrito una PLA₁ asociada a la membrana, que genera ácido graso libre a partir de *liso*-fosfolípidos, y una aciltransferasa (Bowes *et al.*, 1993).



Figura 50 – Incorporación de ácido [^3H]-palmítico en precursores GPI de membrana.

Membranas de *T. cruzi* se incubaron con ácido [^3H]-palmítico a distintos tiempos (15 min, canal 1; 1 hora, canal 2 y 18 horas, canal 3). Los lípidos radioactivos extraídos se analizaron por TLC y autorradiografía utilizando cloroformo:metanol:agua (10:10:3) como solvente de desarrollo. Testigos: P, ácido palmítico.

A diferencia de lo que ocurre en *T. brucei*, en *T. cruzi* no se encontró DAG ni en los GIPLs libres, ni en las anclas de proteínas. Por otra parte, el AAG presente en los GIPLs siempre se identificó como hexadecil-2-*O*-palmitoilglicerol, mientras que en los precursores PI radioactivos el hexadecilglicerol está esterificado principalmente con ácido esteárico tanto en epimastigotes (Bertello *et al.*, 1995) como en trypomastigotes (Uhrig *et al.*, 1996) y en las muestras frías de epimastigotes se determinaron oleico y linoleico. Estos resultados sugieren que se está llevando a cabo un intercambio de ácido graso. Aunque este intercambio de ácido graso fue extensamente estudiado en *T. brucei* (Masterson *et al.*, 1990, Buxbaum *et al.*, 1994, 1996, Webovetz & Englund, 1997; Morita *et al.*, 2000) no hay publicaciones sobre este mecanismo de remodelamiento en *T. cruzi*.

ACTIVIDAD DE INOSITOLFOSFOCERAMIDA-ACIL HIDROLASA Y ACIL-TRANSFERASA

En la incubación de las IPC radioactivas con las membranas de *T. cruzi* también se observa, al igual que para el PI, liberación de ácido graso (Fig. 42B). Aunque el sustrato no pudo purificarse completamente del PI, la radioactividad de éste no puede dar cuenta de todo el ácido graso libre encontrado.

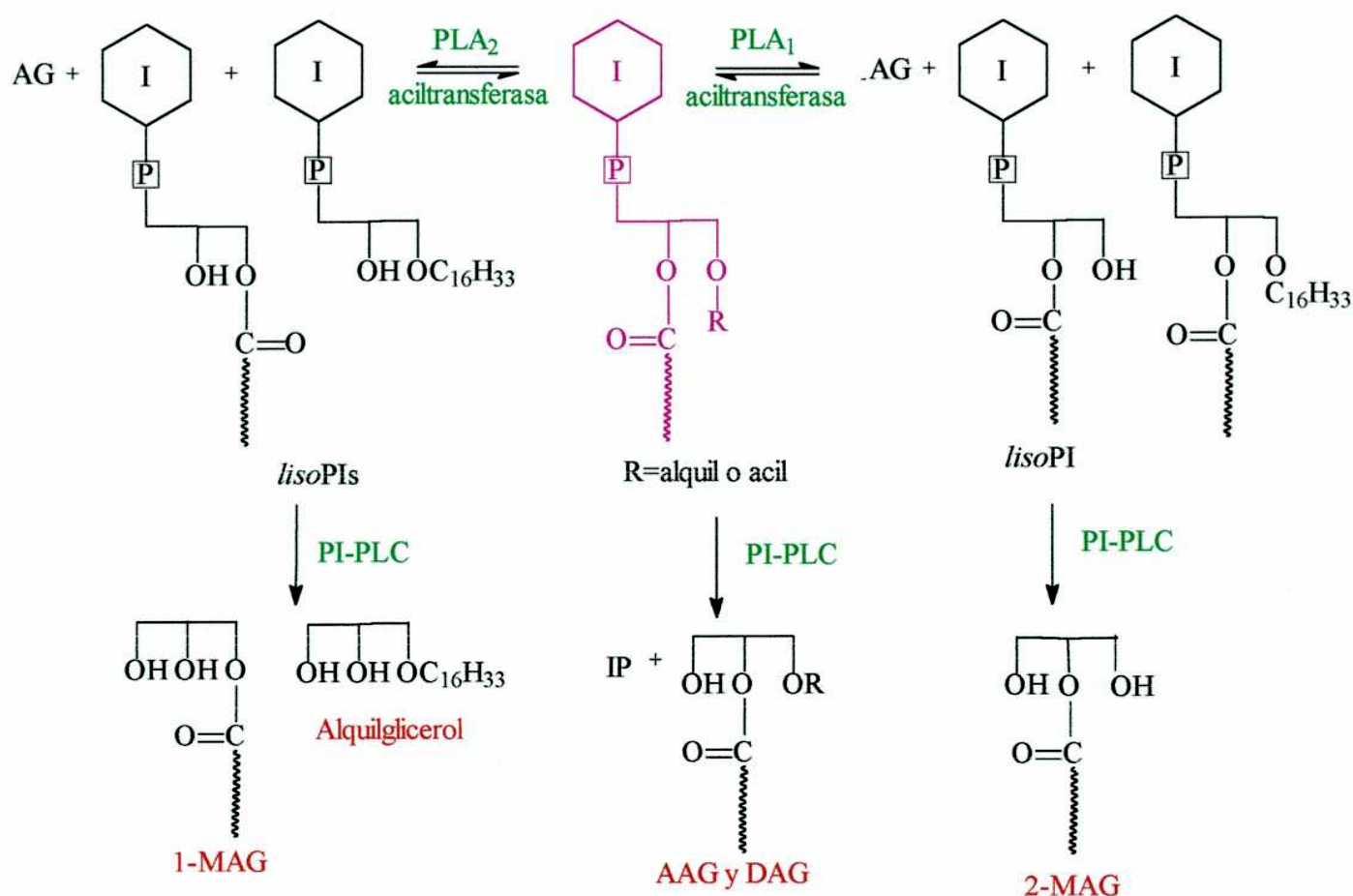
El compuesto que comigró con el testigo de ácido graso (AG Fig. 42B) fue eluído, se lo metiló y se analizó por RPTLC en el solvente S antes y después de hidrogenarlo catalíticamente (Figura 47, canales 3 y 4 respectivamente). Como puede observarse en esa Figura, no hubo una variación significativa del perfil con la hidrogenación. Cuando la mancha superior del canal 3 fue eluída e hidrogenada sólo se detectó una pequeña cantidad de ácido esteárico (canal 7), indicando la presencia de muy poco ácido oleico. Este podría provenir de la pequeña contaminación de la IPC con PI, (palmitico y esteárico se habían encontrado como ácidos grasos en las IPC, Bertello *et al.*, 1995).

La relación de radioactividad para la **base de cadena larga/ácido graso** es de 1,4 en la IPC original mientras que en la ceramida liberada por la IPC-PLC endógena

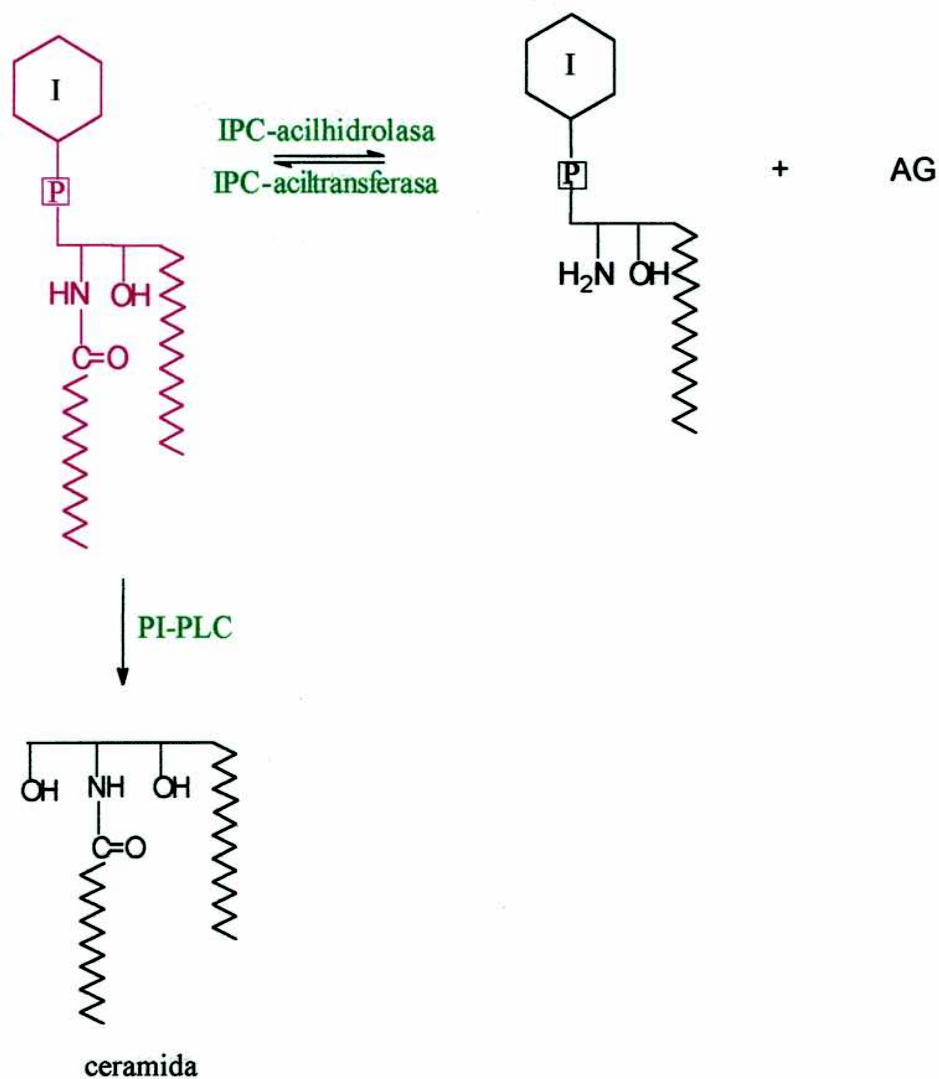
es de 4,8. La menor radioactividad encontrada en el ácido graso de la ceramida liberada en la incubación sugiere una actividad de aciltransferasa que introduce ácido graso frío.

Estas enzimas podrían ser responsables de una reacción de remodelamiento que introduzca ácido lignocérico, adquirido del medio, en el LPPG, ya que este ácido graso no se encontró en las IPC.

En los Esquemas 7 y 8 se da un resumen de las distintas actividades de fosfolipasas en membrana de *T. cruzi* activas sobre PI e IPC respectivamente y los productos generados por las mismas.



Esquema 7 – Fosfolipasas en membranas de *T. cruzi* activas sobre PI (AG, ácido graso)



Esquema 8 – Actividades de fosfolipasas en membranas de *T. cruzi* activas sobre IPC.

ACTIVIDAD DE DAG/AAG Y CERAMIDA LIPASAS

Para evaluar la presencia de deacilasas que liberen ácido graso de lípidos neutros se realizaron dos experimentos independientes incubando [^3H]-DAG/AAG y [^3H]-ceramida con membranas. Como se puede ver en la Figura 51, la generación de ácido graso a partir de estos lípidos neutros es lenta en comparación a la formación de ácido graso a partir de los IPLs correspondientes. Sólo una traza de ácido graso es liberada de los glicerolípidos y ceramida a la primer hora de incubación (canales 1 y 4 respectivamente), mientras que una mayor cantidad se detecta a las 18 horas (canales 2 y 5).

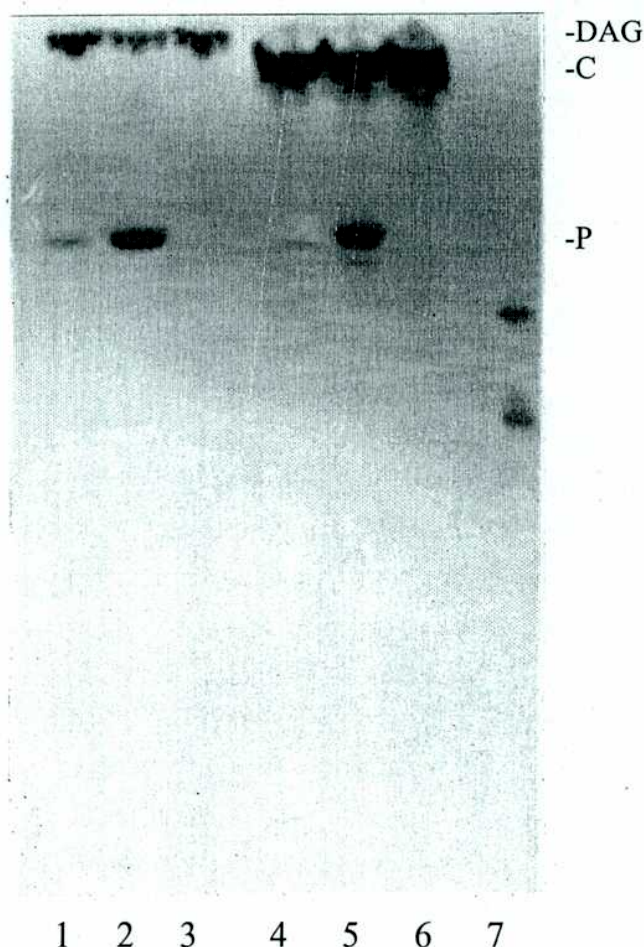
En la Figura 42 se puede observar, por otra parte, que el ácido graso se genera antes de que sean detectadas cantidades significativas de lípidos neutros, y que la presencia de inhibidores de la fosfolipasa C durante la incubación, no afecta la liberación del ácido graso de los fosfolípidos. Estos datos confirman que las actividades de PLA están involucradas en la generación de los ácidos grasos, aunque no se puede excluir una pequeña contribución de las lipasas que actúan sobre los lípidos neutros.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO 8

Biosíntesis de glicoinositolfosfolípidos en Trypanosoma cruzi.

Incorporación de [^3H]-GlcNAc en sistema in vitro

**Figura 51 - Actividad de lipasa sobre DAG/AAG y ceramida**

DAG/AAG (200 000 cpm) o ceramida (500 000 cpm) marcados con [^3H]-ácido palmítico obtenidos a partir de los IPLs se incubaron con las membranas de *T. cruzi* durante 1h y 18 h (canales 1 y 2 para el DAG/AAG; canales 4 y 5 para la ceramida). Los lípidos se extrajeron como se describe en la Figura 42. Se realizaron controles incubados 18 h sólo con el buffer (DAG/AAG, canal 3 y ceramida, canal 6). La TLC se desarrolló en cloroformo : metanol : NH_4OH 2,5M (15:10:2). En el canal 7 se muestra un testigo de IPLs de *T. cruzi* radioactivos. Testigos: C, ceramida; DAG, diacilglicerol; P, ácido palmítico.

BIOSÍNTESIS DE GLICOINOSITOLFOSFOLÍPIDOS EN *TRYPANOSOMA CRUZI*. INCORPORACIÓN DE [³H]-GlcNAc EN SISTEMA *IN VITRO*

La forma más frecuente de unión de las proteínas a la membrana en el *T. cruzi* es a través de un ancla GPI (Fig. 4). Dado que el parásito depende de interacciones célula-célula para la supervivencia en el vector o el huésped mamífero, es probable que una droga que interfiera en el metabolismo de los GPI y por lo tanto en la inserción de las proteínas en la membrana, pueda ser utilizada exitosamente en quimioterapia.

La biosíntesis de GPI fue ampliamente estudiada en *T. brucei* (Masterson *et al.*, 1989; Doering *et al.*, 1989; Menon *et al.*, 1990a, 1990b; Morita *et al.*, 2000) y en células de mamífero y levaduras (Stevens & Raetz, 1991; Sugiyama *et al.*, 1991; Hirose *et al.*, 1991, 1992; Costello & Orlean, 1992; Urakaze *et al.*, 1992; Stevens, 1993; Stevens & Zhang, 1994; Doerrler *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997), y los resultados obtenidos se compilaron en varias publicaciones (Stevens, 1995; Ferguson, 1999; Ferguson *et al.*, 1999).

En el *Trypanosoma cruzi*, son muy pocos los estudios realizados (Heise *et al.*, 1996). En este parásito, se analizaron los productos formados por incorporación de manosa a partir de GDP-[³H]Man utilizando un sistema de membranas, pero los precursores obtenidos no fueron caracterizados en detalle. Tampoco se definió el primer paso de biosíntesis, o sea, la incorporación de GlcNAc.

Distintos tipos de lípidos están presentes en las anclas GPI de distintos organismos. En el *T. cruzi* la situación es peculiar ya que se pueden encontrar dos tipos de lípidos muy distintos, ceramida y AAG. Muchas veces estos lípidos en el GPI difieren de la composición lipídica de los IPLs que se presentan como los puntos de partida naturales para la biosíntesis de GPI (Bütikofer *et al.*, 1992; McConville & Ferguson, 1993; Patnaik *et al.*, 1993; Doering *et al.*, 1994; Acosta Serrano *et al.*, 1995). Esta diferencia, puede deberse a la especificidad de la GlcNAc transferasa que inicia la biosíntesis de los GPI transfiriendo la GlcNAc al IPL. En ese caso, seleccionaría una población de IPLs que podría no ser la más abundante.

En el caso del *T. cruzi*, donde se han encontrado muchas anclas con ceramida, resulta interesante investigar en cuál etapa de la biosíntesis ésta es introducida.

Este mecanismo de introducción de la ceramida se estudió intensamente en *Saccharomyces cerevisiae*, donde se encontró ceramida en las anclas de GPI de glicoproteínas maduras pero no en los precursores (Conzelmann *et al.*, 1992; Sipos *et al.*, 1994, 1997; Reggiori *et al.*, 1997; Reggiori & Conzelmann, 1998). En este caso, se llegó a la conclusión, de que tiene lugar un proceso de remodelamiento que reemplaza, en el GPI unido a la proteína, el glicerolípido por una ceramida sintetizada “*de novo*” (Reggiori & Conzelmann, 1998).

Hasta este momento no se habían realizado estudios sobre los primeros pasos de la biosíntesis del GPI en *T. cruzi*, que aclararían si la IPC, tan abundante en este parásito, puede ser aceptora del primer azúcar, que es la GlcNH₂, o si la ceramida entra por un proceso de remodelamiento.

Por este motivo, en este trabajo se procedió al estudio del primer paso de la biosíntesis de GPI en el *T. cruzi*, o sea, la incorporación de GlcNAc a partir de UDP-[³H]-GlcNAc.

INCORPORACION DE GlcNH₂ A PARTIR DE UDP-6-[³H]-GlcNAc

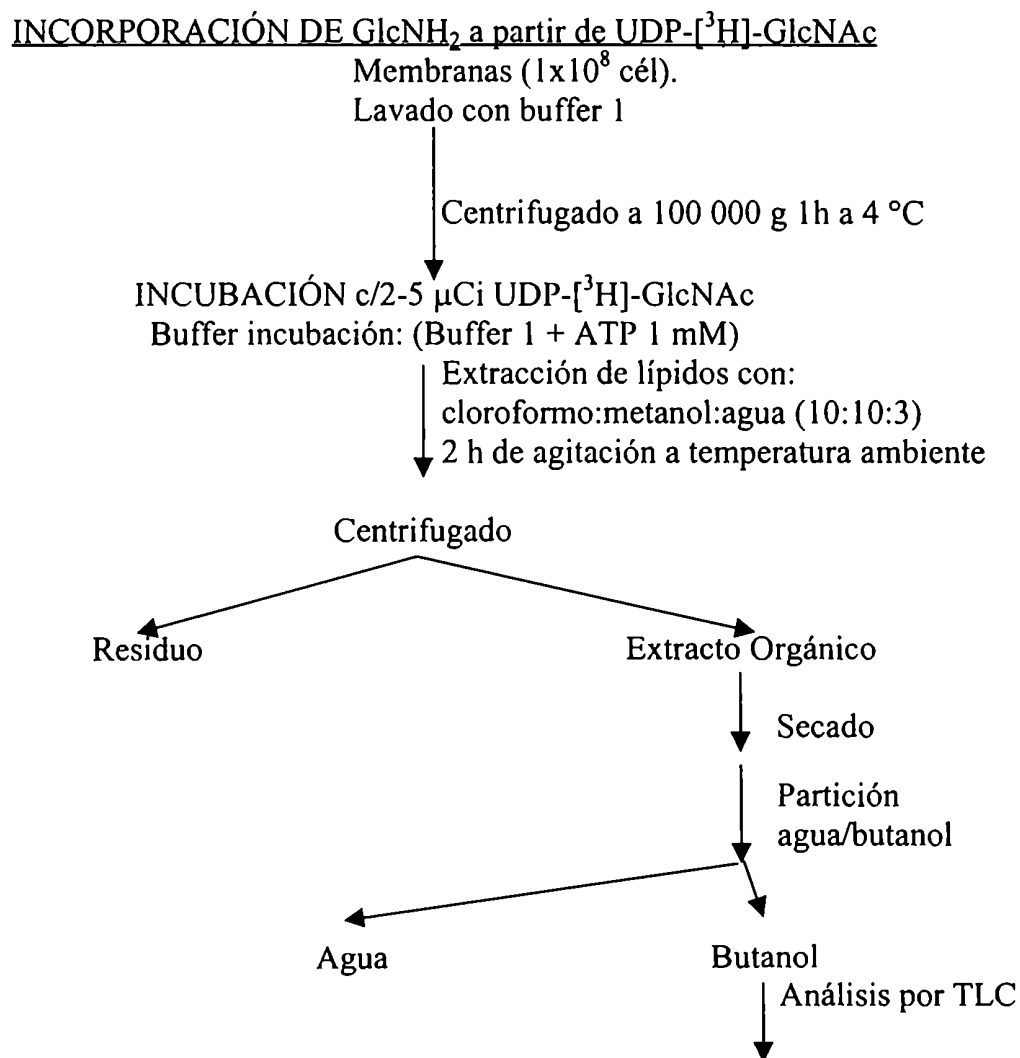
Para estudiar esta primera etapa del camino biosintético de los GPI, se utilizó un sistema de membranas, que permite la incorporación de azúcares radioactivos a partir de los nucleótidos (como la UDP-6-[³H]-GlcNAc), para los cuales las células vivas son impermeables. Esto posibilita la síntesis *in vitro* de precursores radioactivos de estas anclas.

Las membranas utilizadas en estos experimentos fueron preparadas por lisis hipotónica de células epimastigotes de *T. cruzi*, en forma similar a lo descrito para *T. brucei* (Masterson *et al.*, 1989, Menon *et al.*, 1990a).

Las incubaciones se realizaron en presencia de inhibidores de proteasas y de ATP.

En los casos que se indican, se incubaron los parásitos previamente con tunicamicina, para impedir la incorporación de la [^3H]-GlcNAc en oligosacáridos involucrados en la *N*-glicosilación de proteínas.

Luego de la incubación, los glicolípidos radioactivos se extrajeron con cloroformo:metanol:agua (10:10:3), de acuerdo a lo descripto en la parte experimental (Esquema 9) y se analizaron por TLC en el solvente A y posterior autorradiografía (Figura 52).



Esquema 9

Buffer 1: Hepes 50mM pH 7,4, MnCl_2 5mM; MgCl_2 5mM; KCl 25mM; DTT 0,5mM, TLCK 0,1mM y leupeptina $1\mu\text{g/ml}$

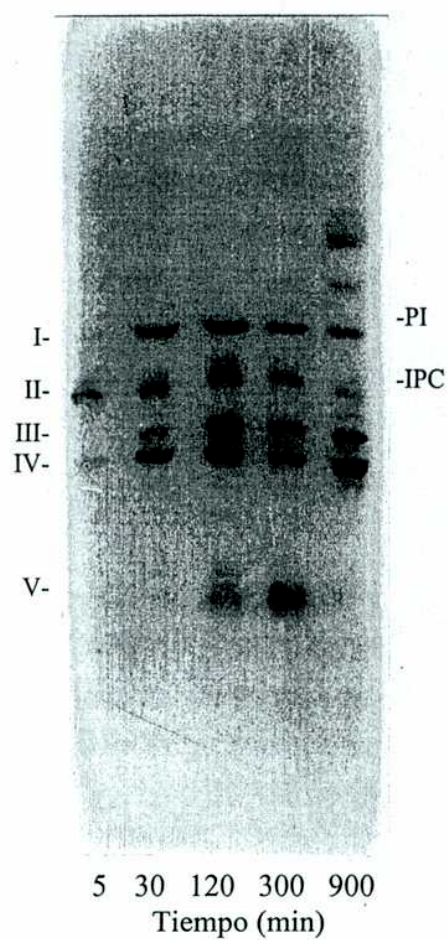


Figura 52 - Incorporación de glucosamina en precursores endógenos, en presencia de membranas de *T. cruzi*.

Las membranas de *T. cruzi* se incubaron con UDP[^3H]GlcNAc a distintos tiempos. Los glicolípidos radioactivos se extrajeron y analizaron por TLC y fluorografía utilizando cloroformo:metanol: NH_4OH (15:10:2) como solvente de desarrollo.

CARACTERIZACION DE POSIBLES PRECURSORES DE GPI

En la Figura 52 se observan los productos formados a distintos tiempos, por incorporación de [^3H]-GlcNH₂ en aceptores endógenos presentes en las membranas del parásito.

Los cinco compuestos detectados (I-V) se eluyeron de la sílica y en primer lugar se los trató con PI-PLC para identificar los precursores de GPI. Luego del tratamiento con PI-PLC se extrajo con butanol y se contó la radioactividad de la fase acuosa y la fase orgánica. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 9 - Distribución de la radioactividad, luego del tratamiento con PI-PLC y extracción con butanol de los posibles precursores GPI marcados con [^3H]-GlcNH₂.

Compuesto	Radioactividad fase acuosa (cpm)	Radioactividad fase orgánica (cpm)
I	1050	130
II	560	2500
III	3270	350
IV	1800	4200
V	5000	250

Estos datos indican que los compuestos I, III y V son sensibles al tratamiento con PI-PLC, ya que al liberarse la porción lipídica, el glicano que contiene la GlcN radioactiva queda soluble en agua. Por lo tanto, estos compuestos son precursores de anclas GPI. Los compuestos II y IV, resistentes a la PI-PLC, se identificaron como glicolípidos intermediarios en la *N*-glicosilación de proteínas. Sin embargo, puede notarse que con el compuesto IV cocromatografía otro compuesto, IV', que sería sensible a la PI-PLC y responsable de la radioactividad encontrada también en la fase acuosa. Con estos resultados se procedió a la caracterización de estos cinco compuestos.

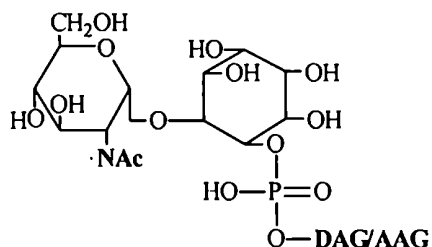
Compuesto I

Este compuesto se saponificó y luego de extraer la fase acuosa con butanol se comprobó que la radioactividad quedaba repartida entre ambas fases (Esquema 10).

Las cuentas de la fase acuosa, debidas a [^3H]-GlcN, debían provenir de un glicolípido con un lípido totalmente saponificable (DAG o MAG). Las cuentas que permanecieron en el butanol debían provenir de un glicolípido que no se saponifica o que al saponificarse conserva una porción hidrofóbica que lo retiene en la fase orgánica (ceramida o alquilglicerol en el primer caso, AAG en el segundo).

La movilidad cromatográfica de este compuesto, muy poco menor que el PI y mayor que la IPC, nos permite sugerir, que el componente lipídico debe ser un diglicérido, DAG y AAG.

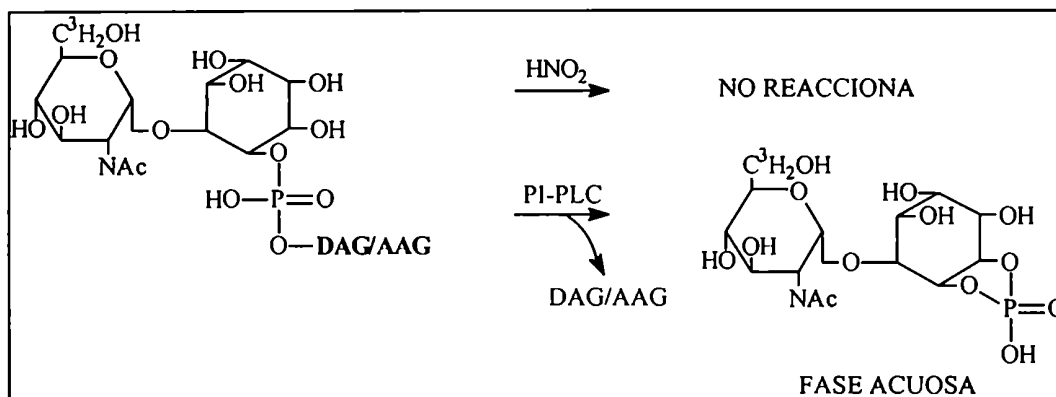
El compuesto I por otra parte, no fue sensible al tratamiento con HNO_2 . Por lo tanto, en lugar de tener la GlcNH_2 libre la tiene *N*-acetilada. La estructura propuesta para el mismo es:

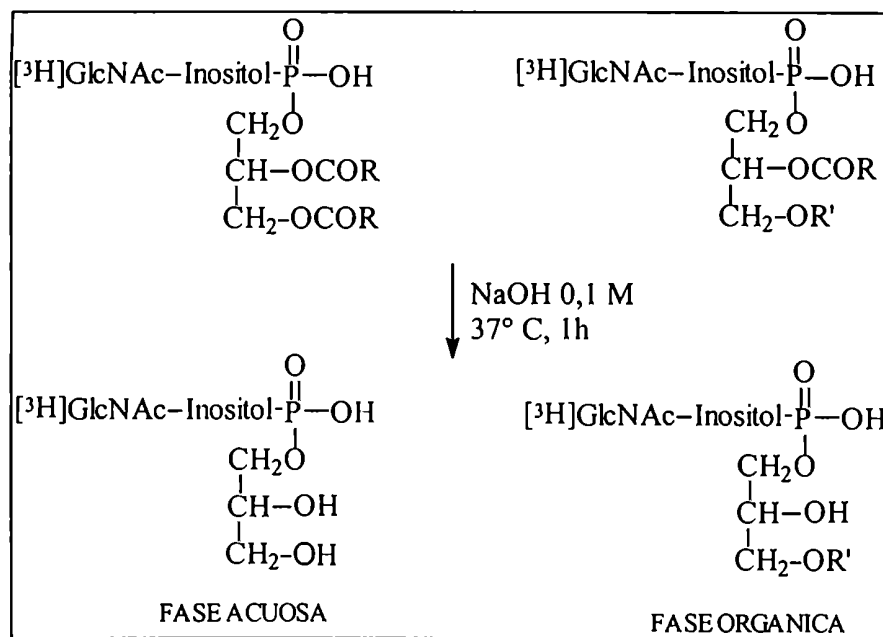


GlcNAc-Inositol-P-DAG/AAG

I

Esta es la primera estructura glicosilada determinada en la biosíntesis del ancla de la VSG de *T. brucei*.





Esquema 10

Compuesto II

A este compuesto, resistente al tratamiento con PI-PLC, se lo sometió a una hidrólisis ácida muy suave. Se lo trató con HCl 1N : propanol (1:1), 15 minutos a 50°C, tratamiento que hidroliza la unión glicosídica-fosfato de los dolicoles fosfato-azúcar (Menon *et al.*, 1990a).

Luego de extraer con butanol se detectó la radioactividad en la fase acuosa. Esta fase acuosa se cromatografió en capa delgada con testigos de GlcNAc, GlcNH₂ y *N,N*-diacetilquitobiosa. Como puede observarse en el perfil de radioactividad obtenido al contar la sílica de la TLC (Figura 53), se encontró GlcNAc.

La estructura propuesta para este compuesto, es entonces la de uno de los precursores de la *N*-glicosilación de proteínas (Parodi & Leloir, 1979):

GlcNAc-P-P-dolicol

II

Los dolicoles se describieron inicialmente en tejidos de mamífero. Son familias de poliisoprenoles que pueden variar en el largo de la cadena. En la Figura 54 se puede observar la estructura de un glicosil-fosforil-dolicol. En parásitos protozoarios se han encontrado de 11 a 13 residuos de isopreno (Parodi & Quesada Allué, 1982; Quesada Allué & Parodi, 1983).

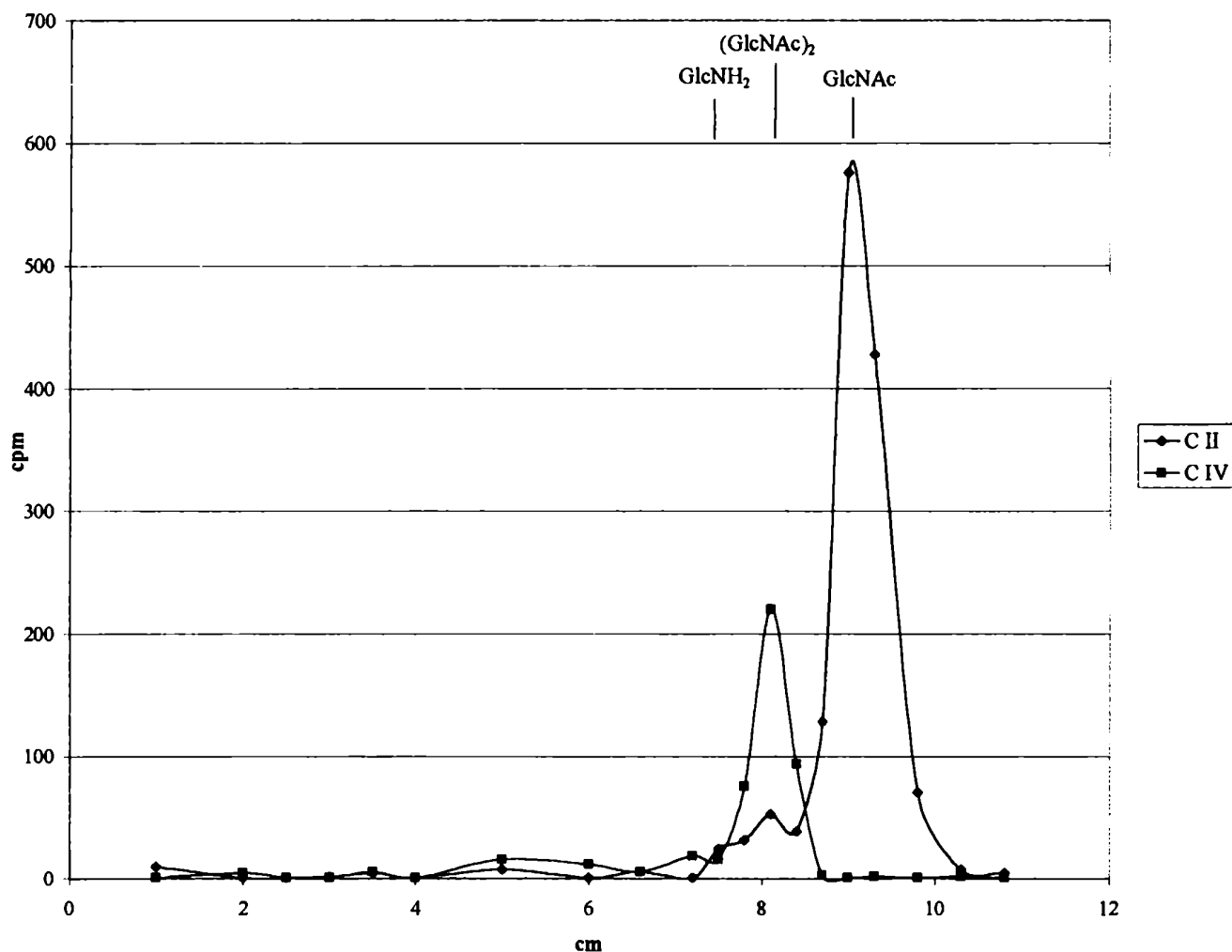


Figura 53 - Los compuestos II y IV de la Figura 52 se sometieron a hidrólisis ácida suave y sus fases acuosas se analizaron por TLC en el solvente N. La sílica se raspó de la placa y se contó la radioactividad. C II, compuesto II; C IV, compuesto IV.

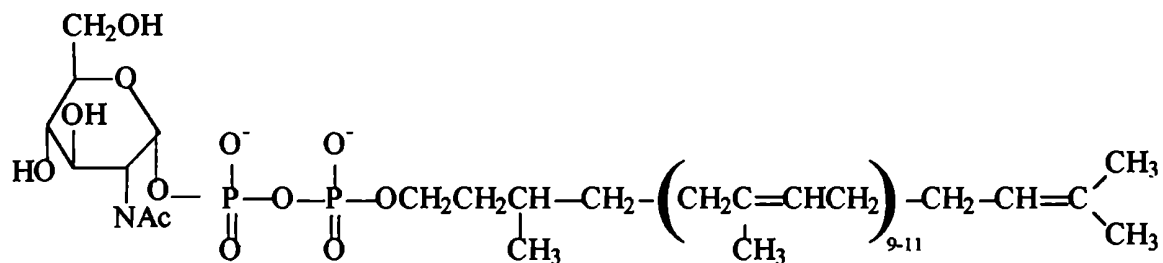


Figura 54 - Estructura del dolicolpirofosfato unido a *N*-Acetilglucosamina.

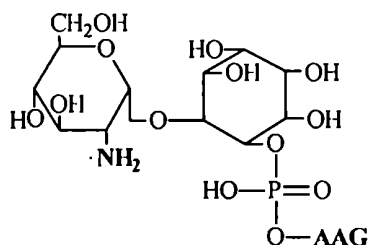
Compuesto III

Este compuesto, sensible al tratamiento con PI-PLC, se sometió a condiciones de saponificación; y a diferencia de lo ocurrido con el compuesto I, en este caso luego de la extracción, la radioactividad se recuperó mayormente en la fase orgánica (Esquema 11). Sólo un 10% de la radioactividad quedó en la fase acuosa. Esto nos permitió descartar al DAG o al MAG como principales lípidos de este compuesto. Únicamente hay una pequeña proporción de alguno de ellos.

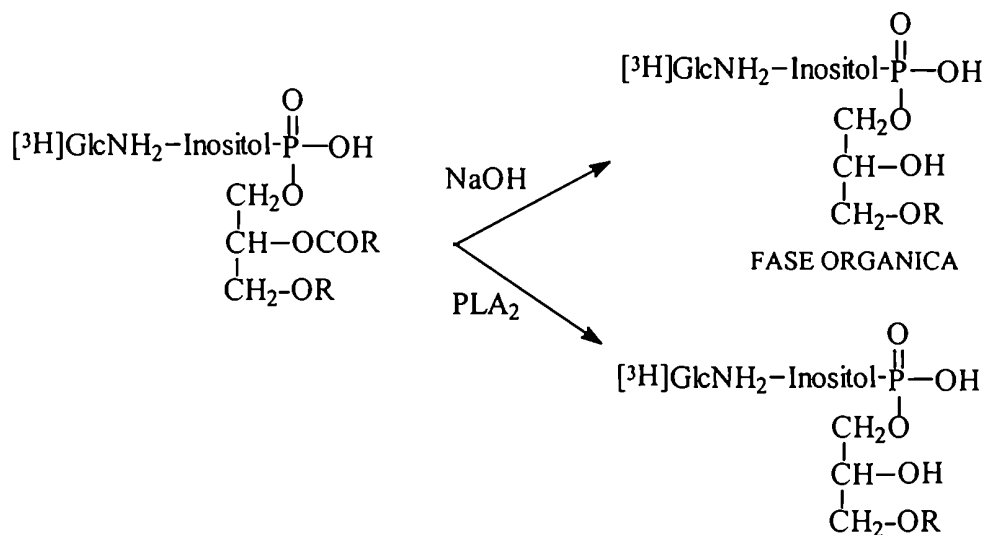
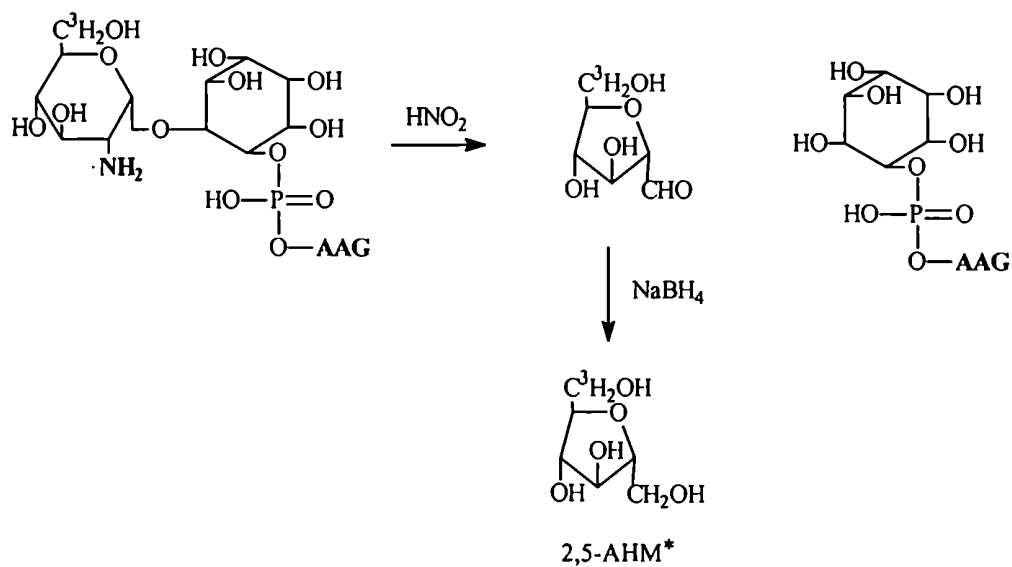
Para obtener mayor información, el compuesto III se trató con PLA₂. Como se puede observar en la Figura 55, la variación de la movilidad cromatográfica producida por este tratamiento (canales 1 y 2) confirmó la presencia de un glicerolípido con un ácido graso acilando la posición 2. Por lo tanto, el lípido presente en este compuesto es principalmente un AAG y sólo hay una pequeña cantidad de DAG.

Por tratamiento del compuesto III con HNO₂ y posterior reducción con NaBH₄, se obtuvo AHM radioactivo, como es de esperar cuando tenemos GlcNH₂ radioactiva no *N*-acetilada.

La estructura propuesta para este compuesto es:



GlcNH₂-Inositol-P-AAG
III



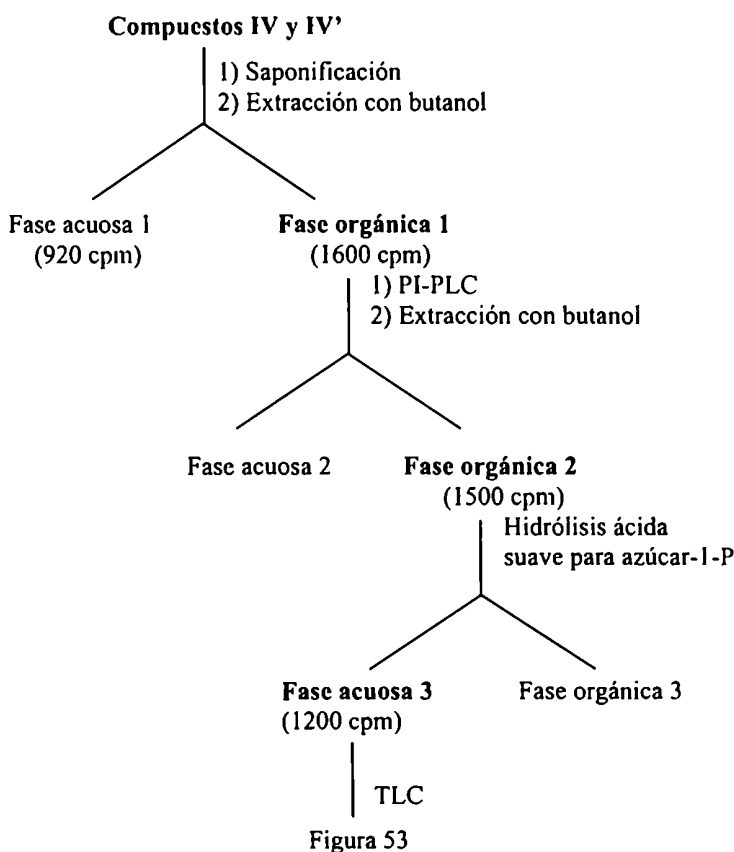
Esquema 11

Compuestos IV y IV'

La resistencia parcial de este compuesto a la PI-PLC, sugiere que está constituido por dos componentes distintos que llamamos IV y IV'. Esto, también se ve reflejado en la forma de doble banda que presenta en la TLC (Fig. 52).

Luego de su saponificación y extracción con butanol, la radioactividad también quedó repartida en las dos fases como ocurrió luego del tratamiento con PI-PLC, (fase orgánica: 1600 cpm, fase acuosa: 920 cpm).

El producto extraído en la fase orgánica se volvió a tratar con PI-PLC, de acuerdo a lo que se muestra en el Esquema 12, para descartar la presencia de un precursor GPI con el inositol acilado, resistente a PI-PLC. Luego de este tratamiento, toda la radioactividad volvió a recuperarse en la fase butanólica, lo que permitió descartar esta alternativa.



Esquema 12

El compuesto IV recuperado en la **fase orgánica 2**, se sometió a hidrólisis ácida suave para detectar la presencia de dolicol-fosfato-azúcar. Se utilizaron dos tratamientos alternativos, HCl 1M : propanol (1:1) 15 minutos a 50°C (Menon *et al.*,

1990b) o HCl 0,1N, 10 minutos a 100°C (Masterson *et al.*, 1989). En ambos casos la radioactividad se recuperó en la fase acuosa. Para identificar el producto de la reacción, éste se cromatografió en capa delgada en el solvente N.

En la Figura 53, se puede observar el perfil de radioactividad obtenido al raspar y contar la sílica de la placa. La muestra mostró la movilidad de la *N,N'*-diacetilquitobiosa (GlcNAc-(β 1-4)GlcNAc).

Por otra parte, el tratamiento con PLA₂ no afectó la movilidad de este compuesto, lo que se puede observar en la Figura 55, canales 3 y 4.

Con estos datos y teniendo en cuenta que uno de los precursores en la biosíntesis de glicoproteínas es **Dol-P-P-GlcNAc-GlcNAc** (Parodi & Leloir, 1979) proponemos esta estructura para el compuesto IV.

El compuesto IV' sensible a PI-PLC sería un precursor GPI. Dada la poca cantidad de este compuesto obtenida y su alta impurificación con el derivado del dolicol, no se confirmó esta estructura. Como se comentará más adelante en este capítulo podría ser un precursor del compuesto V.

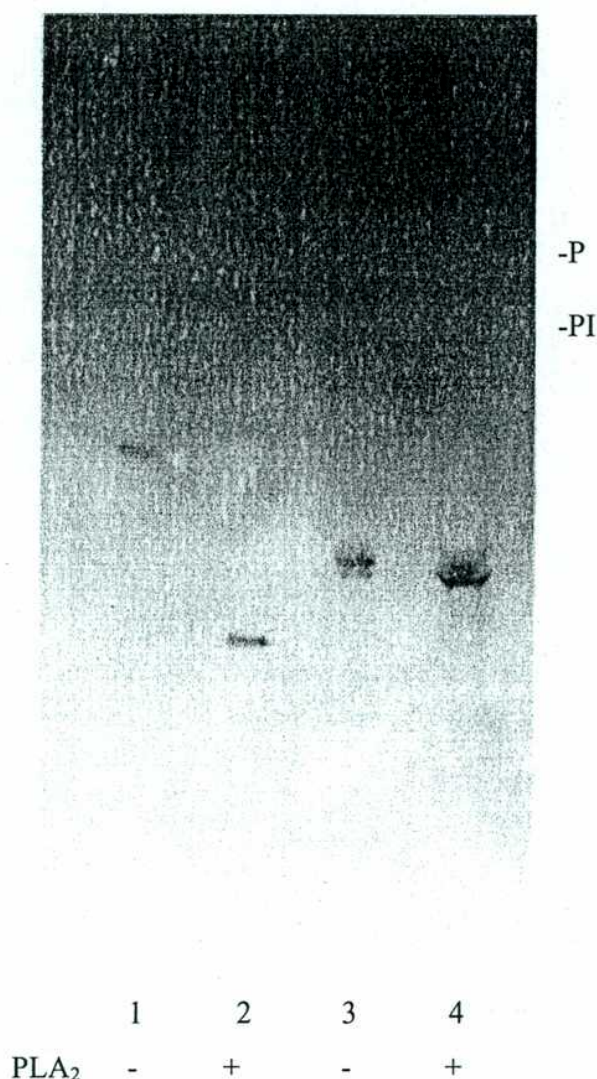


Figura 55 - Tratamiento con PLA₂ de los compuestos III y IV (Fig. 52).

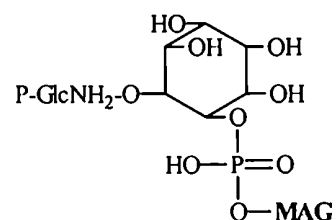
Luego del tratamiento con PLA₂, se extrajo con butanol y este extracto se analizó por TLC (solvente A) y posterior autorradiografía. Los compuestos III y IV se analizaron antes y después del tratamiento con PLA₂ de acuerdo a lo que se indica en la Figura. Compuesto III (canales 1 y 2) y compuesto IV (canales 3 y 4). Testigos: P, ácido palmítico; PI, fosfatidilinositol.

Compuesto V

Este compuesto, sensible a la PI-PLC, fue también totalmente saponificable. Dado que el tratamiento con PLA₂ no afectó su movilidad cromatográfica podemos concluir que la porción lipídica de este precursor es un MAG.

Una vez hidrolizado el lípido del compuesto V por tratamiento con PI-PLC o por saponificación, se trató la fracción soluble en agua con HNO₂ y posteriormente se redujo con NaBH₄. Luego de eliminar las sales, el producto obtenido se cromatografió en capa delgada (solvente M) (Figura 56) junto con un testigo de AHM radioactivo (canal 1), preparado a partir de GlcNH₂ por tratamiento con HNO₂ y NaB³H₄. Como puede observarse en el canal 2, la muestra presentó una movilidad menor al AHM.

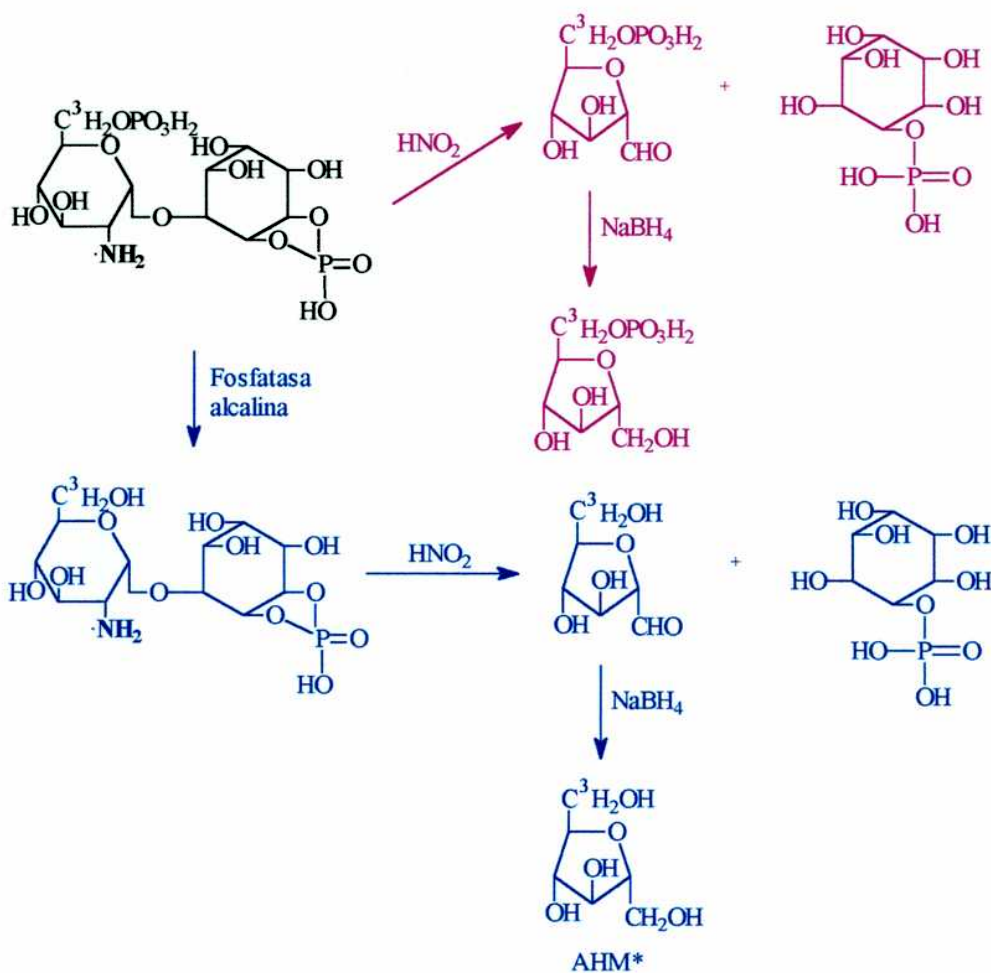
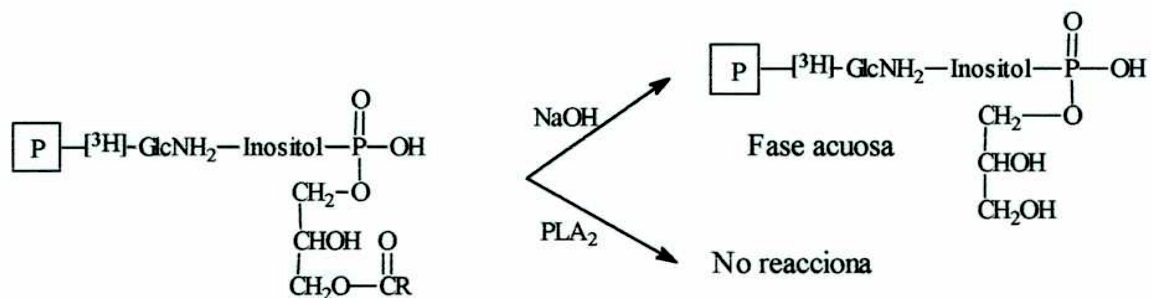
La mayor polaridad de este compuesto sugería que estaría fosfatado, por lo cual, la fase acuosa obtenida luego del tratamiento con PI-PLC, se trató con fosfatasa alcalina, seguido de desaminación reductiva (Esquema 13). Como se puede observar en el canal 3, luego de este tratamiento, la muestra presentó el mismo R_f que el testigo de AHM. Con todos estos datos se asignó para el compuesto V la estructura:



P-GlcNH₂-Inositol-P-MAG
V

La presencia de un grupo fosfato unido a la glucosamina en el compuesto V, sugiere su relación con el LPPG, muy abundante en epimastigotes, el cual posee un grupo aminoetilfosfónico (AEP) unido a esa GlcNH₂ (Fig. 5) (Lederkremer *et al.*, 1991). Es posible que *in vivo* la GlcNH₂ se sustituya directamente por AEP a partir del dador adecuado.

No se determinó la posición del fosfato en la glucosamina. Es posible que esté en la posición -6 ya que en el LPPG el aminoetilfosfónico se encuentra sustituyendo esa posición.



Esquema 13

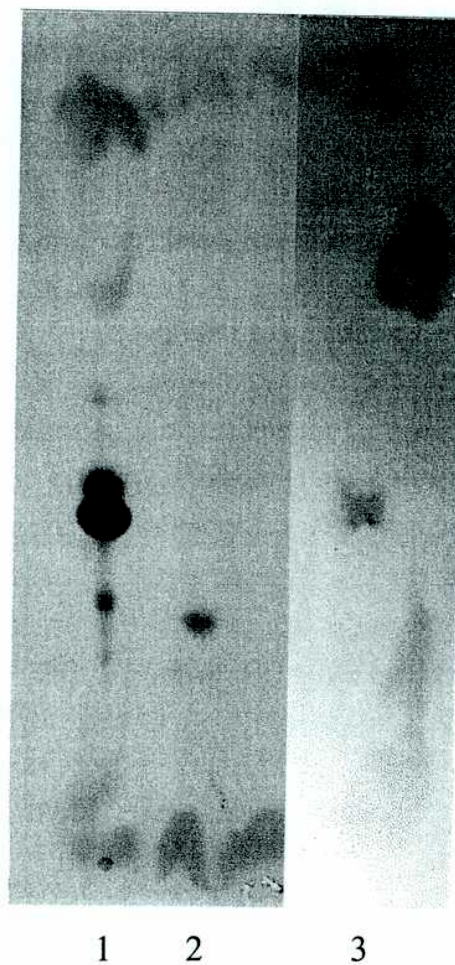


Figura 56 – TLC y autorradiografía del compuesto V tratado con $\text{HNO}_2/\text{NaBH}_4$ (canal 2) y tratado con fosfatasa alcalina y $\text{HNO}_2/\text{NaBH}_4$ (canal 3). En el canal 1 se muestra el testigo de anhidromanitol radioactivo. Solvente de desarrollo: propanol: NH_4OH :agua (7:1:2).

El producto de mayor movilidad que puede observarse en los canales 6, 9 y 11 (Fig. 57) podría corresponder a un precursor con el inositol acilado, GlcNH₂-acilPI, como se ha encontrado en levaduras (Orlean, 1990; Conzelmann *et al.*, 1992), pero no ha sido caracterizado.

INCUBACIÓN EN PRESENCIA DE VANADATO DE SODIO

Teniendo en cuenta que el vanadato puede influir en la fosfatación ya que es inhibidor de las ATPasas del tipo P, como las Ca²⁺-ATPasas y la Na⁺/K⁺-ATPasa (Finbow & Harrison, 1997), se llevó a cabo una incubación de las membranas con UDP[³H]-GlcNAc en presencia de vanadato de sodio.

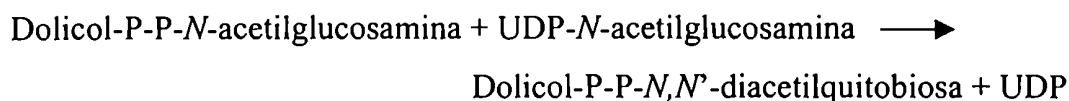
En la Figura 57 se puede observar que la incubación en presencia de vanadato de sodio, (canal 14) disminuye la síntesis del compuesto V. Por otra parte, también se observa paralelamente un aumento del compuesto IV', lo cual sugiere que éste es un precursor del compuesto V. Como se mencionó anteriormente ambos compuestos son saponificables y son insensibles al tratamiento con PLA₂.

INCORPORACIÓN DE GlcNH₂ EN MEMBRANAS TRATADAS CON TUNICAMICINA

Para confirmar las estructuras propuestas para los compuestos II y IV se realizaron nuevas incorporaciones (Figura 57) utilizando membranas de parásitos previamente incubados con tunicamicina, inhibidor específico del primer paso de la síntesis de oligosacáridos unidos a dolicol (Schwarz & Datema, 1982). La tunicamicina es un antibiótico producido por *Streptomyces lysosuperficus* que inhibe específicamente la síntesis de dolicol-P-P-N-acetilglucosamina (Parodi & Leloir, 1979).

La naturaleza de los compuestos II y IV quedó así confirmada, ya que su síntesis se inhibió cuando se utilizaron parásitos incubados previamente con tunicamicina (Figura 57, canales 2, 4, 6 y 9).

Como se puede ver en la Figura 57 el primer compuesto sintetizado a los 5 minutos por las membranas es el dolicol-P-P-GlcNAc. Este disminuye hacia los 30 minutos, tiempo en el que aumenta el dolicol-P-P-GlcNAc₂. Esto está de acuerdo con el origen de este último a partir del compuesto II según esta reacción (Parodi & Leloir, 1979):



Se han descrito enzimas que catalizan la síntesis de dolicol-P-P-N-acetilglucosamina en numerosos tejidos de mamífero, insectos, plantas y en *S. cerevisiae* (Parodi & Leloir, 1979).

La función de estos intermediarios lipídicos en la glicosilación de proteínas fue ampliamente estudiada en el *T. cruzi* por Parodi y col. (Parodi & Quesada-Allue, 1982; Parodi & Cazzulo, 1982; Parodi *et al.*, 1983; Bosch *et al.*, 1988).

En la Figura 57 también se observa a los 120 minutos (canal 11) un aumento en la intensidad de la doble banda correspondiente a los compuestos IV y IV'. A este tiempo, aparentemente se formaría con mayor intensidad el precursor GPI IV', cuya síntesis no es inhibida por la tunicamicina (Fig 57, canal 12).

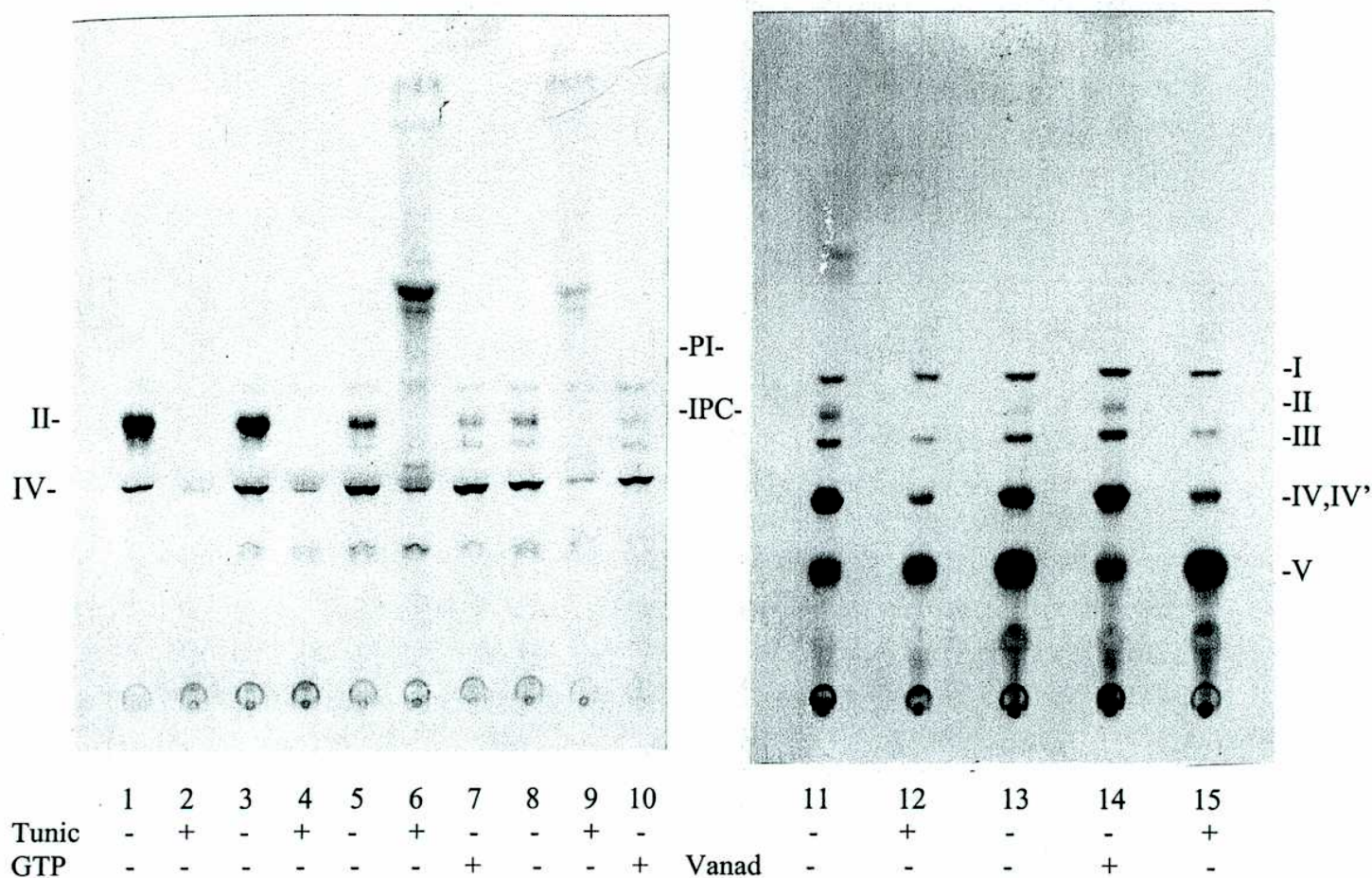


Figura 57 - Incorporación de GlcNH₂ en aceptores endógenos presentes en membranas de *T. cruzi*.

Membranas de *T. cruzi* fueron incubadas con UDP-[³H]GlcNAc a distintos tiempos: 5 minutos (canales 1 y 2), 15 minutos (canales 3 y 4), 30 minutos (canales 5-7), 60 minutos (canales 8-10), 120 minutos (canales 11 y 12) y 5 horas (canales 13-15), en presencia de tunicamicina, GTP o vanadato de sodio de acuerdo a lo que se indica en la Figura. Los glicolípidos radioactivos fueron extraídos y analizados por TLC en el solvente A.

INCUBACIÓN EN PRESENCIA DE GTP

En células de mamífero, Stevens describió el efecto del GTP como estimulante de la desacetilación de GlcNAc-PI (Stevens, 1993). En *T. cruzi*, en nuestras condiciones experimentales no observamos ninguna variación, por el agregado de GTP 1mM, en la formación de los productos respecto del control (Fig. 57, canales 7 y 10).

CONCLUSIONES

En la Tabla 10 se puede ver un resumen de los resultados obtenidos al incorporar UDP-GlcNAc utilizando un sistema de membranas y las estructuras propuestas.

Tabla 10 - SENSIBILIDAD DE LOS INTERMEDIARIOS MARCADOS CON [³H]-GlcNAc A TRATAMIENTOS QUIMICOS Y ENZIMATICOS

Banda	PI-PLC	HNO ₂	PLA ₂	Saponificación	Acido suave	Estructura sugerida
I	+	-		+		GlcNAc(AAG,DAG)PI
II	-	-			+(GlcNAc)	DPPGlcNAc
III	+	+(AHM)	+	+		GlcNH ₂ (AAG)PI
IV	-		-		+(GlcNAc) ₂	DPP(GlcNAc) ₂
IV'	+		-	+		GlcN(<i>lyso</i> acil)PI ?
V	+	+(P-AHM)	-	+		P-GlcNH ₂ -(<i>lyso</i> acil)PI

AAG, alquilacilglicerol; DAG, diacilglicerol; DPP, dolicolpirofosfato, PI, fosfatidilinositol, P, fosfato

Los datos obtenidos hasta el momento, nos permiten descartar a la IPC como aceptora de GlcNH₂ para la formación de anclas GPI con ceramida, en contraposición a la hipótesis postulada por Cardoso de Almeida y col (Heise *et al.*, 1996). La ceramida, de acuerdo a nuestros resultados, debe introducirse en una etapa posterior del camino

biosintético de los GPI por medio de un remodelamiento lipídico, como se describió en *S. cerevisiae* (Conzelmann *et al.*, 1992; Sipos *et al.*, 1994, 1997; Reggiori *et al.*, 1997; Reggiori & Conzelmann, 1998).

Avala esta hipótesis también, el hecho de que en los precursores encontrados en el extracto cloroformo:metanol:agua de células amastigotes, susceptibles al tratamiento con PI-PLC, no se encontró ceramida sino glicerolípidos unidos al glicano (pág. 108).

Aparentemente la GlcNAc transferasa sería selectiva hacia los PI, ya que en el compuesto I tanto AAG como DAG estarían presentes. El hecho de encontrar sólo AAG y MAG en los siguientes intermediarios y sólo trazas de DAG en el compuesto III, podría explicarse considerando la presencia de una PLA₂ que actúe con mayor afinidad por el precursor diacilado.

Es importante recalcar en este punto que no se han encontrado en *T. cruzi* anclas GPI conteniendo DAG en su porción lipídica como es el caso de la VSG, la glicoproteína más importante de *T. brucei* (Ferguson *et al.*, 1985).

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO 9

Síntesis química y enzimática de alquilacilgliceroles

sido utilizado anteriormente para monoacilar alquilglicerol, cuyo mayor beneficio fue la simplicidad del procedimiento; y un método químico que permitió obtener un mayor rendimiento del isómero deseado.

USO DE LIPASAS EN SOLVENTES ORGANICOS

Las enzimas son proteínas altamente especializadas con actividad catalítica. Si se las compara con otros catalizadores, la principal ventaja de éstas es su gran versatilidad, selectividad y eficiencia. Las velocidades de reacción pueden acelerarse en varios órdenes de magnitud aún trabajando en condiciones de reacción suaves, temperatura ambiente y pH cercano al neutro. Las lipasas están entre los biocatalizadores más versátiles y ampliamente empleados en química orgánica (Klibanov, 1990).

En la literatura se puede ver el incremento en los últimos años de la utilización de enzimas como catalizadores en solventes orgánicos (Zaks & Klibanov, 1984, 1985; Kirchner *et al.*, 1985; Klibanov, 1986). El sentido de la reacción de las enzimas hidrolíticas se invierte en un medio orgánico y el equilibrio termodinámico se desplaza, favoreciendo la síntesis por sobre la hidrólisis (Klibanov, 1990; Dordick, 1992).

El reemplazo del agua por un solvente orgánico favorece la solubilidad de los sustratos y productos orgánicos y hace posible llevar a cabo numerosas reacciones que no pueden competir con la hidrólisis, cuando se realizan en medio acuoso. También permite aislar y purificar con mayor facilidad los productos orgánicos y la recuperación de la enzima, que se mantiene insoluble en la mayoría de los solventes.

Aún en un medio orgánico el agua es necesaria, ya que participa en las interacciones no covalentes que mantienen la conformación catalítica activa nativa de la enzima (Gubicza & Szakács-Schmidt, 1994), pero sólo es realmente necesaria la presencia de una monocapa de agua alrededor de la enzima, que se denominó agua

esencial (Klibanov, 1986, 1989). Los solventes de grado analítico son adecuados. Mientras no sean completamente anhidros no es necesario medir el contenido de agua del solvente (Faber & Riva, 1992). En este sentido, los solventes hidrofóbicos, favorecen que el agua esencial permanezca asociada al biocatalizador (Klibanov, 1986).

Como una medida de la hidrofobicidad del solvente se propuso el parámetro $\log P$, coeficiente de partición del solvente entre octano y agua (Laane *et al.*, 1987). En general se observó que la actividad enzimática es alta para solventes con $\log P$ mayor de 4 y baja para los que tienen $\log P$ menor de 2. Si bien este parámetro ha resultado satisfactorio para numerosas reacciones enzimáticas, es un tanto rígido y limitado, ya que no considera las interacciones del solvente con la enzima y el efecto de la constante dieléctrica.

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas) utilizadas en este trabajo, pertenecen al grupo de enzimas hidrolíticas que no requieren de cofactores. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de lípidos formados por glicerol y ácidos grasos, pero al utilizarse en un ambiente carente de agua pueden actuar como enzimas sintéticas catalizando reacciones de esterificación y transesterificación.

Las lipasas aceptan como sustratos no naturales un amplio rango de estructuras (Chen & Sih, 1989) y en solventes orgánicos pueden ser tan activas como en sus entornos biológicamente naturales (Zaks & Klibanov, 1985).

Actualmente hay una gran cantidad de lipasas de diversos orígenes, que han encontrado aplicación a nivel industrial y que son comercialmente accesibles a bajo costo.

Además las lipasas se han utilizado ampliamente en la síntesis e hidrólisis de ésteres de ácidos grasos (Bornscheuer, 1995; Kwon *et al.*, 1995; Millqvist *et al.*, 1994).

En este trabajo utilizamos como sustrato el 1-*O*-hexadecil-*rac*-glicerol para esterificarlo con distintos ácidos grasos. Se sabe que el compuesto que se encuentra en los productos naturales es el isómero *sn*, ópticamente activo. A pesar de esto

A distintos tiempos se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción, las cuales se analizaron por cromatografía gaseosa. Se prepararon los trimetilsililderivados de los compuestos y se analizaron utilizando una columna capilar no polar corta (HP-1, 12 m). Se desarrolló un método en el que se logró una óptima separación de los 2-*O*-acil y de los 3-*O*-acilderivados (condiciones Aii). En los casos en que fue necesario cuantificar los productos, se utilizó el 5 α -colestano como estándar interno. Una corrida cromatográfica típica se puede observar en la Figura 58. La ausencia del 2,3-di-*O*-acil-derivado se controló por TLC pues no se puede detectar por CGL dado su alta retención en la columna.

Como se puede observar en la Figura 58, el isómero 3-*O*-acilado fue el producto principal de la reacción. Ambos isómeros se purificaron en forma preparativa por cromatografía en columna de ácido silícico (Unisil), lo que permitió también recuperar el reactivo utilizado en exceso y reciclarlo.

Los dos isómeros de posición para los derivados monopalmitoilados se caracterizaron por ^1H -RMN (Figura 59) y ^{13}C -RMN y los datos cromatográficos se obtuvieron para todos los análogos preparados (Tabla 11).

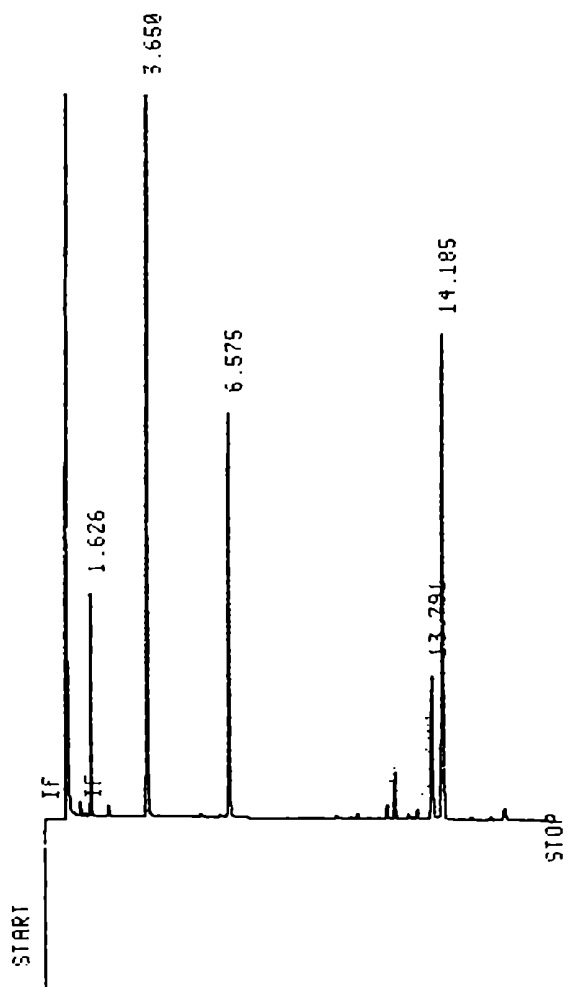


Figura 58– Cuantificación por cromatografía gaseosa capilar de los productos de la síntesis enzimática. Las muestras tomadas a los distintos tiempos de reacción se analizaron como trimetilsilil derivados en una columna capilar HP-1 (12m x 0,20mm). Las condiciones de corrida fueron las siguientes: $T_0=245^{\circ}\text{C}$ (1 min), aumentando a $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 255°C y luego a $9^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 320°C . Los picos corresponden a: ácido palmítico (1,626min), 1-O-hexadecilglicerol (3,650min), 5- α -colestano (6,575min), 1-O-hexadecil-2-O-palmitoilglicerol (13,791min) y 1-O-hexadecil-3-O-palmitoilglicerol (14,185min).

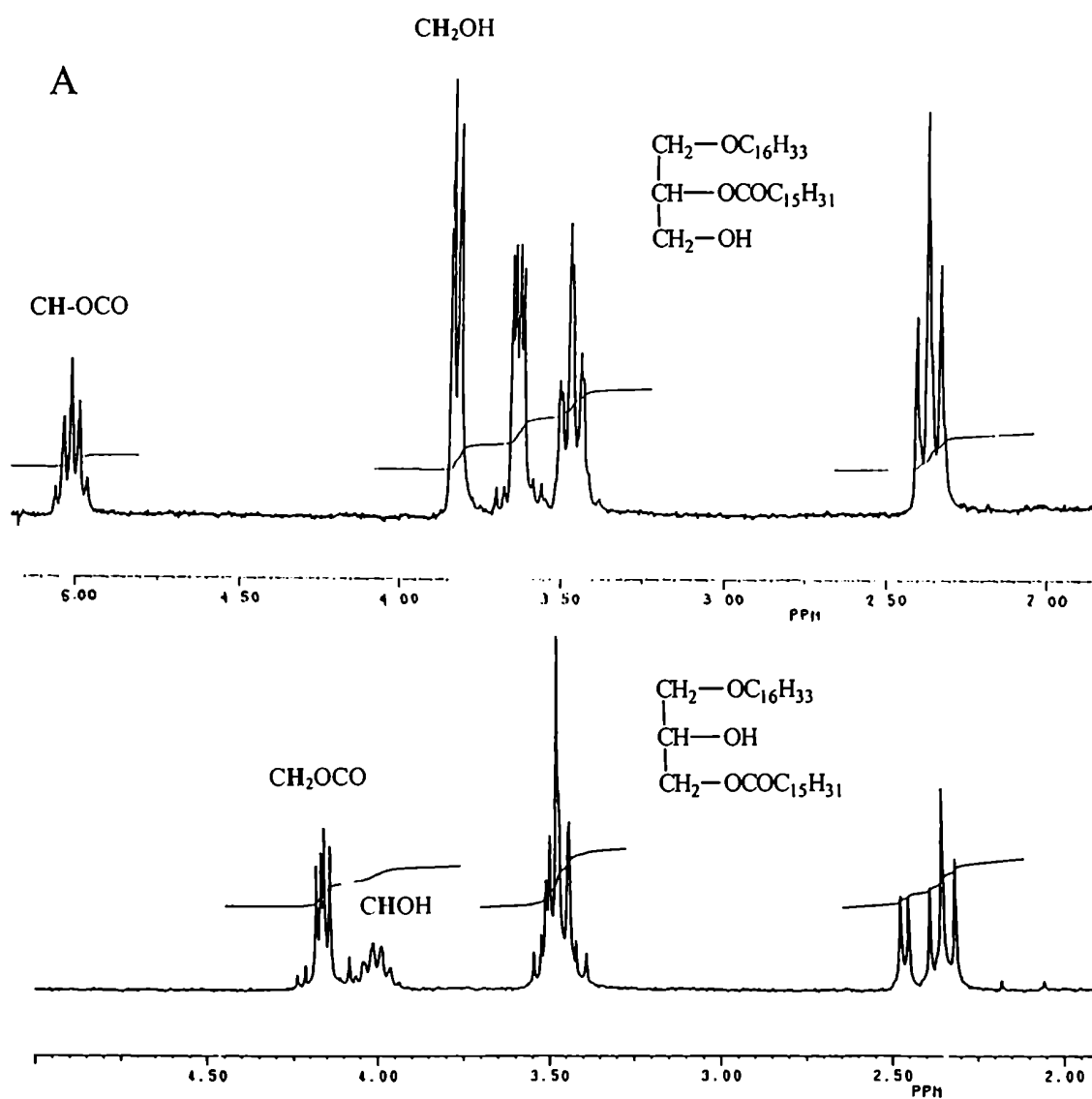


Figura 61 – Espectro de ¹H-RMN del 1-*O*-hexadecil-2-*O*-hexadecanoilglicerol (A) y del 1-*O*-hexadecil-3-*O*-hexadecanoilglicerol (B).

Tabla 11 - Datos cromatográficos de los monoésteres del 1-*O*-hexadecilglicerol

Monoéster del 1- <i>O</i> -hexadecilglicerol ^a	CGL tr (min) ^b	TLC (Rf) ^c	RPTLC (Rf) ^d
2- <i>O</i> -C _{14:0}	13.213	0.50	0.31
3- <i>O</i> -C _{14:0}	13.565	0.63	0.31
2- <i>O</i> -C _{16:0}	15.196	0.50	0.26
3- <i>O</i> -C _{16:0}	15.671	0.63	0.26
2- <i>O</i> -C _{18:2}	17.470	n.d.	0.30
3- <i>O</i> -C _{18:2}	18.115	n.d.	0.30
2- <i>O</i> -C _{18:1}	17.475	n.d.	0.27
3- <i>O</i> -C _{18:1}	18.140	n.d.	0.27
2- <i>O</i> -C _{18:0}	17.798	0.50	0.23
3- <i>O</i> -C _{18:0}	18.455	0.63	0.23

^a 2-*O*-C_{14:0} = 2-*O*-miristoil-1-*O*-hexadecilglicerol, etc.

^b Cromatografía gaseosa (CGL) de los trimetilsilil derivados usando una columna capilar HP-1 (0.2mm x 12 m). Programa de temperatura del horno: 245°C (1 min) hasta 255°C a 3°C/min y hasta 320°C a 9°C/min. tr= tiempo de retención.

^c Cromatografía en capa delgada (TLC) en sílica gel 60 (Merck) usando como solvente hexano/acetato de etilo (4:1, v/v).

^d Cromatografía en capa delgada de fase reversa (RPTLC) en RP-18 F_{254s} (Merck) usando como solvente cloroformo/metanol/agua (40:100:3, v/v/v).

Como se puede ver en la Tabla 11 por TLC en sílica es posible diferenciar los dos isómeros. El 3-*O*-acilderivado siempre presenta mayor movilidad que su isómero 2-*O*-acilado, sin embargo, no es posible diferenciar entre homólogos de distinta longitud de cadena. Esto sí es posible en RP-TLC, donde no es posible diferenciar entre los dos isómeros, o sea, que ambos métodos se complementan. Para caracterizar los derivados insaturados es necesario cromatografiarlos antes y después de su hidrogenación.

Por CGL, en las condiciones utilizadas se logró separar los isómeros de todos los homólogos. Previamente, Rosenberry y col. analizaron por CGL y como trimetilsililderivados, los AAG del ancla GPI de la AChE de eritrocitos bovinos; pero no se informan los tiempos de retención de las distintas especies individuales (Roberts *et al.*, 1988b). En ese caso se encontró 1-estearil-2-estearoilglicerol, 1-estearil-2-oleoilglicerol y 1-oleil-2-estearoilglicerol.

La diesterificación del 1-*O*-alquil-*sn*-glicerol con ácido eicosapentanoico y docosahexadecanoico fue descripta por Haraldsson y Thorarensen (1994). Estos autores utilizaron la lipasa de *Cándida antártica* y en las condiciones experimentales que utilizan no detectaron el 1-*O*-alquil-2-acilglicerol.

El presente, es el primer trabajo en el cual se preparan y caracterizan monoacil derivados de hexadecilglicerol por acción de lipasas (Bertello *et al.*, 1997).

Efecto del solvente

La actividad y selectividad de una enzima pueden ser influenciadas modificando propiedades del solvente.

En la búsqueda de las condiciones más efectivas para la esterificación del 1-*O*-hexadecilglicerol con ácidos grasos, esta reacción se realizó en distintos solventes. Las dos lipasas utilizadas fueron capaces de catalizar la reacción de esterificación con distintos ácidos grasos, pero se utilizó la lipasa de *Pseudomona sp* y el ácido palmítico en los análisis cuantitativos. Los solventes empleados fueron tolueno, diclorometano y diisopropiléter. Los primeros ensayos se realizaron en hexano, pero como no se lograba obtener una buena solubilización del sustrato, a pesar de observarse un alto rendimiento por cromatografía en capa delgada se descartó este solvente para el análisis cuantitativo. La enzima fue capaz de esterificar al sustrato en los tres solventes pero como se puede observar en la Figura 60, resultó ser más efectiva en diclorometano, donde se logró alcanzar un 75% de rendimiento. También se lograron buenos rendimientos en tolueno a 55°C.

En diisopropiléter, no se alcanzaron rendimientos mayores del 30%. Esto estaría de acuerdo con los trabajos que relacionan la polaridad del solvente con una disminución de la actividad enzimática (Miller *et al.*, 1988). Lo que no se puede explicar de esta forma es la mayor actividad en CH_2Cl_2 en comparación con el tolueno. Probablemente en este caso tenga alguna influencia las características del reactivo y su solubilidad.

Klibanov y col. utilizaron la lipasa de *Cándida cylindracea* para esterificar distintos ácidos carboxílicos con butanol. Entre los solventes utilizados, tolueno y hexano fueron igualmente efectivos. En cloroformo, la reacción fue significativamente más lenta y en butiléter más aun (Kirchner *et al.*, 1985).

En concordancia con nuestros resultados, la esterificación del 1-*O*-octadecilglicerol con ácido oleico catalizada por la lipasa pancreática porcina es muy inhibida en dietiléter, y en contraste con nuestros datos, no se produce la esterificación en diclorometano (Meusel *et al.*, 1992). Esto probablemente se deba al corto período de incubación (5h) utilizado por estos autores.

Sin embargo, la lipasa de *Mucor miehei* resultó activa en un solvente clorado. En tricloroetano, la síntesis de miristato de propilo se lleva a cabo con una velocidad inicial comparable a la observada para el benceno o tolueno (Miller *et al.*, 1988). Estos autores observan, que los solventes en los cuales las lipasas son activas son inmiscibles con el agua, mientras que, en los solventes miscibles con el agua no son activas.

Como se dijo anteriormente, el agua mantiene la integridad conformacional de la proteína. Por lo tanto, se puede suponer que al extraer el solvente, el agua esencial de la proteína, se produce un cambio estructural resultando en una conformación no-activa.

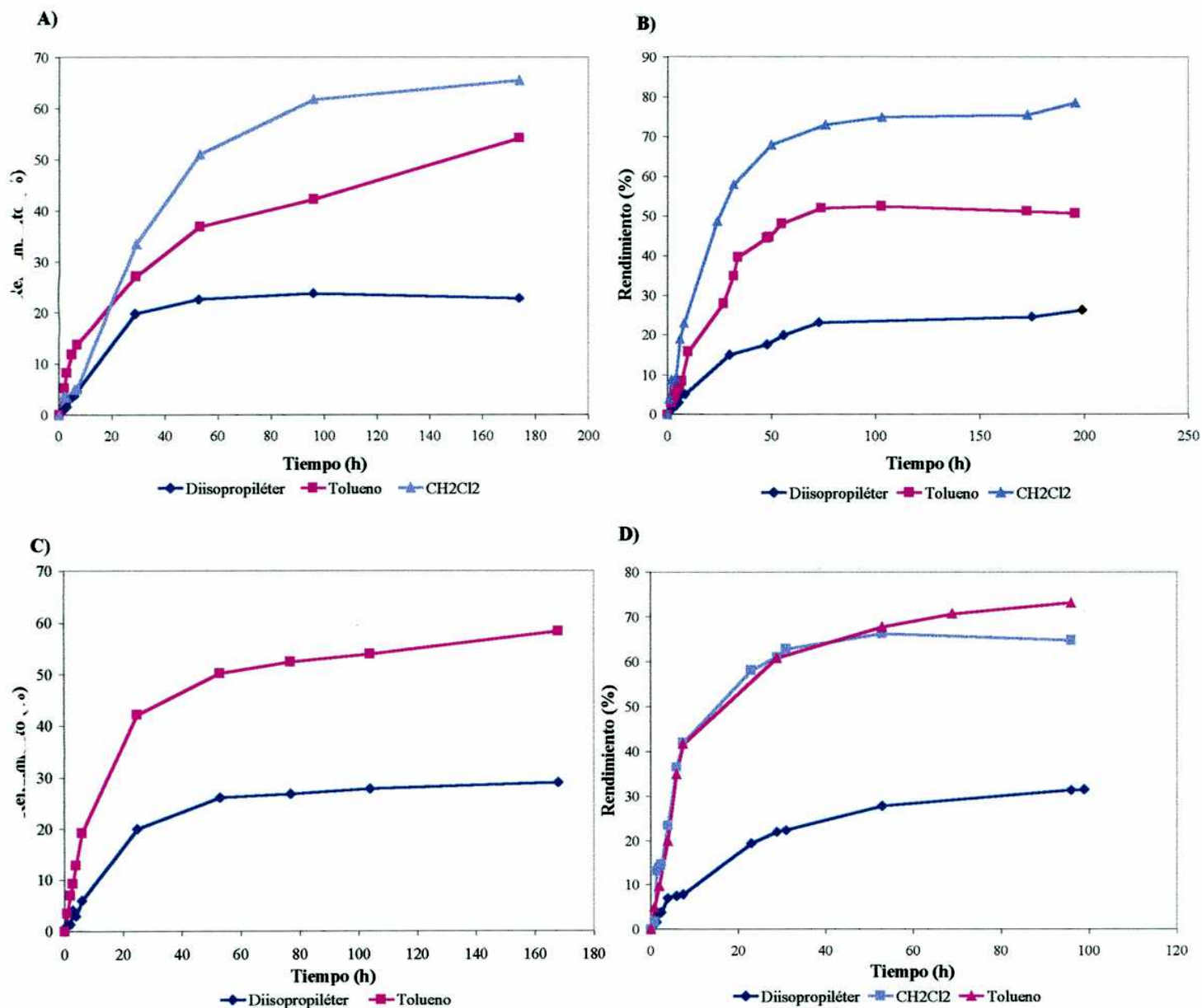


Figura 60 – Influencia del solvente en el rendimiento total de los monopalmitoil-derivados del 1-O-hexadecilglicerol.

La esterificación fue catalizada por la lipasa de *Pseudomona sp* a distintas temperaturas: A) 25°C, B) 33°C, C) 45°C y D) 55°C.

En nuestras condiciones experimentales, luego de 72 horas de reacción con la lipasa de *Pseudomona sp*, se obtuvo una mezcla de los 2- y 3-monoglicéridos en relación 1:5, 1:6 y 1:13 en diisopropiléter, tolueno y diclorometano respectivamente. Esto demostraría la influencia del solvente en la regioselectividad de esta enzima. Gubicza y Szakács-Schmidt (1994) demostraron la influencia del solvente sobre la actividad y la enantioselectividad de una lipasa, en la esterificación de ácidos propiónicos sustituidos en la posición 2. La selección del solvente más adecuado resulta importante entonces, a la hora de optimizar una reacción enzimática.

El rendimiento del 1,3-derivado siempre es mayor que el del 1,2. Esto está de acuerdo con el hecho de que las lipasas normalmente demuestran una fuerte preferencia por alcoholes primarios como sustratos, más que por los secundarios, debido al impedimento estérico. Por lo tanto, la acilación en las posiciones terminales, es considerablemente más veloz que la de las posiciones medias (Haraldsson *et al.*, 1995).

En la Figura 61 se pueden observar los rendimientos parciales de cada isómero a 2 temperaturas y en dos de los solventes utilizados. A pesar de que para la síntesis total se obtiene un mayor rendimiento en CH_2Cl_2 , para la síntesis del isómero 2-*O*-acilado es más favorable el uso de tolueno.

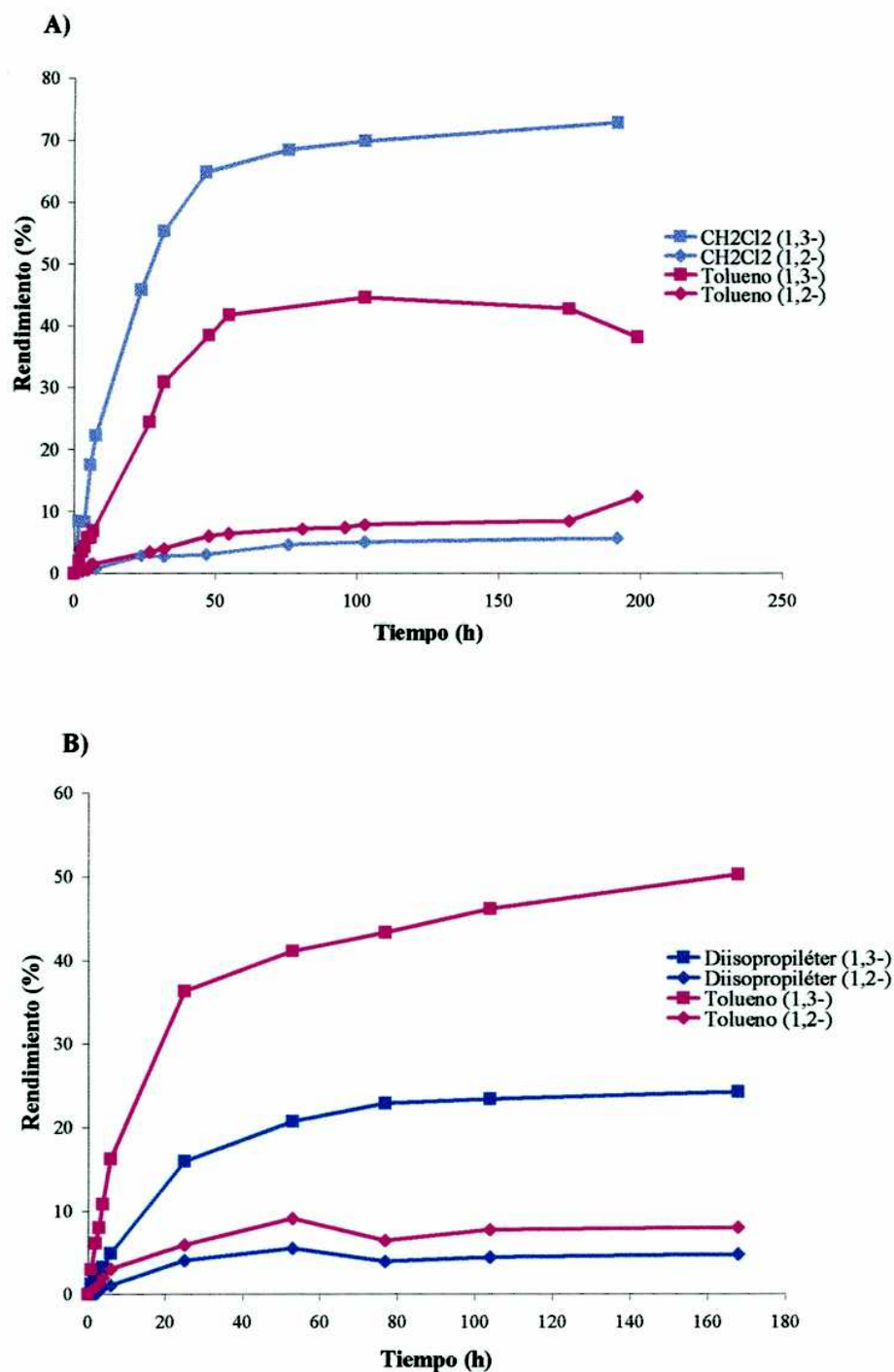


Figura 61 – Rendimientos en 1-*O*-hexadecil-2-*O*-palmitoilglicerol y 1-*O*-hexadecil-3-*O*-palmitoilglicerol en función del tiempo, para la esterificación catalizada por la lipasa de *Pseudomona* sp a distintas temperaturas: **A)** 33°C y **B)** 45°C.

Efecto de la temperatura de reacción

La Figura 62, muestra el efecto de la temperatura de reacción, sobre la esterificación catalizada por la lipasa de *Pseudomonas sp.*, en distintos solventes. Hasta los 55°C, que fue la mayor temperatura utilizada, el rendimiento de la reacción aumentó con la temperatura, excepto en CH₂Cl₂ donde la velocidad inicial es mayor a 55°C pero luego de las 30 horas alcanza su valor de saturación (Figura 62A).

Una característica importante de las enzimas es la gran estabilidad de las mismas en solventes orgánicos, donde los procesos que inactivan las enzimas se ven minimizados (Aldercreutz & Mattiason, 1987). La mayor estabilidad térmica permite operar a temperaturas superiores a las utilizadas en medio acuoso (Zaks & Klivanov, 1984).

En concordancia con nuestros resultados, el rendimiento de la esterificación de glicerol con etil estearato en acetonitrilo o heptano, usando la lipasa de *Cándida antarctica* aumentó con la temperatura, encontrándose entre 60-80°C el rango óptimo de reacción; 80°C para el acetonitrilo y 70°C para el heptano (Pastor *et al.*, 1995).

Klibanov y col., también observaron que las lipasas pueden utilizarse en un amplio rango de temperatura. Para distintas reacciones de transesterificación, utilizando una lipasa pancreática porcina, observaron que la reacción se acelera al aumentar la temperatura de 25 a 60°C (Kirchner *et al.*, 1985).

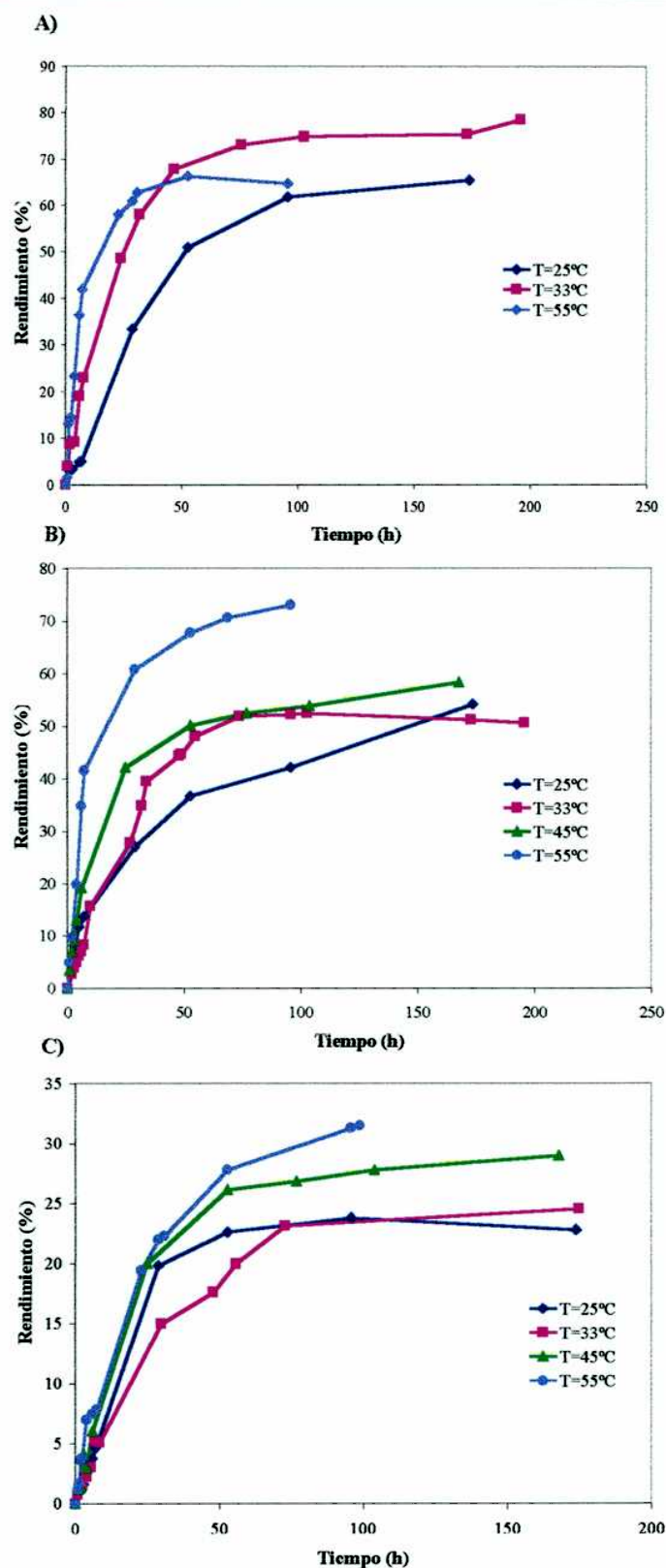
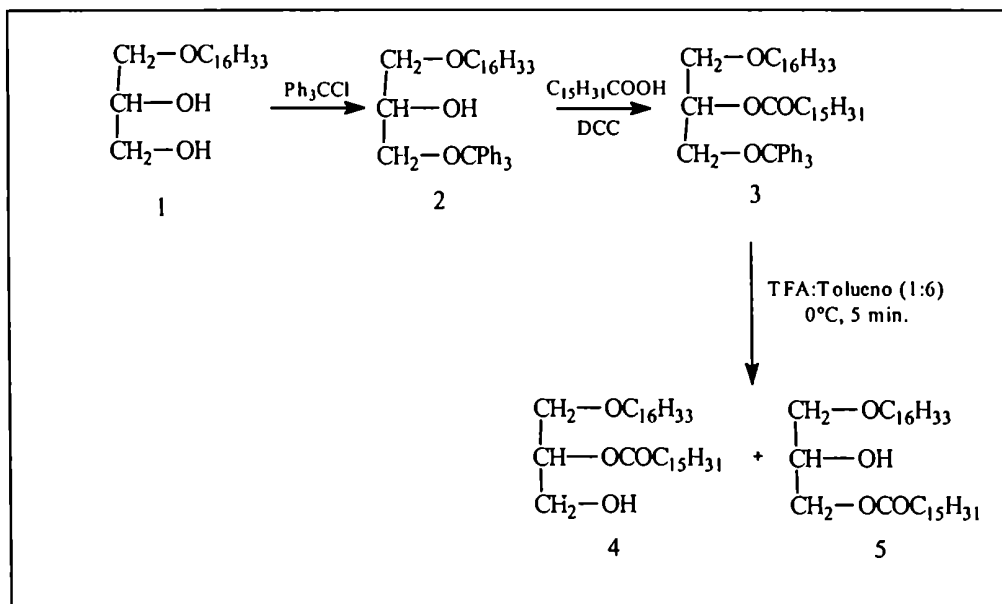


Figura 62 - Efecto de la temperatura de reacción en el rendimiento total de monopalmitoildervados del 1-*O*-hexadecilglicerol. La esterificación fue catalizada por la lipasa de *Pseudomona* sp en distintos solventes **A)** CH₂Cl₂, **B)** tolueno y **C)** diisopropiléter.

SÍNTESIS QUÍMICA DEL 1-*O*-HEXADECIL-2-*O*-HEXADECANOIL-*rac*-GLICEROL Y DEL 1-*O*-HEXADECIL-3-*O*-HEXADECANOIL-*rac*-GLICEROL

Estos compuestos se prepararon de acuerdo al Esquema 16. Como reactivo de partida se utilizó el 1-*O*-hexadecilglicerol al igual que para la síntesis enzimática. En este caso, el alcohol primario fue protegido selectivamente por tritilación con cloruro de tritilo, en trietilamina y 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (4-DMAP) (Chaudhary & Hernandez, 1979).



Esquema 16

Luego de 18 horas no se detectó material de partida por TLC. En el solvente K el compuesto **2** presentó un $R_f = 0,46$. Este derivado tritilado cristalizó en etanol obteniéndose con un 96% de rendimiento. Luego de recrystalizarlo en el mismo solvente, se determinó su punto de fusión (p.f. 48-49°C) y se lo caracterizó por espectroscopía de RMN.

El compuesto **2** se aciló a temperatura ambiente con ácido palmítico en presencia de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4-DMAP (Hassner & Alexanian, 1978). De esta forma se obtuvo el compuesto **3**, amorfo, con un 83% de rendimiento ($R_f = 0,80$, en el solvente K), que también fue caracterizado por espectroscopía de RMN. La acilación enzimática del compuesto **2** no fue efectiva con ninguna de las lipasas utilizadas en este trabajo. Probablemente, esto se deba al impedimento estérico provocado por el voluminoso grupo tritilo. Estos resultados difieren con los obtenidos por Kim y Choi (1992), quienes logran acetilar por transesterificación el derivado 1-tritilado del 3-Cl-1,2-propanodiol, utilizando la lipasa de *Pseudomona sp*, en tolueno. Este caso y el nuestro se diferencian en el tamaño de los sustituyentes del alcohol (CH_2Cl vs $\text{OC}_{16}\text{H}_{33}$) y en el volumen del acilante (acetato vs ácido graso de cadena larga).

Para destritilar el compuesto **3** se intentaron distintos métodos con el fin de minimizar la migración del grupo acilo al alcohol primario, fenómeno bien conocido en la preparación de 2-monoglicéridos (Sjursnes & Anthonsen, 1994). Se utilizó TFA en butanol (1:3), para detener la reacción se diluyó con butanol y luego se evaporó. También se utilizaron resinas de intercambio aniónico débil y fuertemente básicas para llevar a neutralidad (MacCoss & Cameron, 1978).

El mejor rendimiento de 1-*O*-hexadecil-2-*O*-hexadecanoilglicerol (**4**) se obtuvo por tratamiento del compuesto **3** con TFA en tolueno (1:6, v/v) a 0°C. A los 5 minutos se completó la destritilación, obteniéndose una mezcla de los isómeros 1,2 y 1,3 en relación 2 a 1. Esta relación se obtuvo al analizar la mezcla de reacción por CGL.

1-*O*-Hexadecil-2-*O*-hexadecanoil-*sn*-glicerol fue sintetizado por otro método por Ogawa & Horisaki (1983), quienes utilizaron el 3-*O*-bencil-*sn*-glicerol como

compuesto de partida. Este fue tratado con Bu_2SnO a reflujo en tolueno:metanol (10:1) y el producto de esta reacción fue alquilado (71% rendimiento), acilado con cloruro de palmitoilo en piridina y sometido a hidrogenólisis (98% rendimiento). Los desplazamientos químicos, sólo informados para la posición 2 del glicerol (δ_{H} 4,99 (m) y δ_{C} 72,91) son similares a los encontrados para el compuesto 4 en este trabajo de tesis.

1-*O*-Hexadecil-3-*O*-hexadecanoilglicerol fue aislado de un coral (Subrahmanyam *et al.*, 1992). Los datos de espectroscopía de RMN están de acuerdo con nuestros resultados obtenidos para el compuesto 5, aunque los autores no asignan las señales del espectro de ^{13}C -RMN.

El método enzimático como se dijo anteriormente, es un método de un único paso muy sencillo, para lograr la monoesterificación del hexadecilglicerol. Con este método se obtienen, el 2-*O*-acil y el 3-*O*-acil derivado con un alto rendimiento total; sin embargo, en este caso es mucho mayor el rendimiento del derivado no natural (1,3) frente al natural (1,2). Es el método más adecuado cuando se quieren obtener ambos isómeros. De acuerdo a los resultados obtenidos, las síntesis de estos compuestos se realizaron en tolueno a 55°C ya que en estas condiciones, además de tener un buen rendimiento total, se obtuvo una relación del derivado 1,3- a 1,2- más favorable hacia el 1,2- en comparación con lo que ocurre en CH_2Cl_2 .

El método químico desarrollado, permite obtener una mayor proporción del 2-*O*-acil derivado, aunque en un mayor número de pasos. Este método sería más adecuado en el caso que se necesite obtener una gran cantidad del derivado natural.

También desarrollamos en nuestro laboratorio un método quimio-enzimático para la síntesis de estos compuestos, que no se incluye en esta tesis (Salto *et al.*, 1997). En este método se diacila el 1-*O*-hexadecilglicerol en presencia de DCC. Luego, por alcoholólisis enzimática, se remueve selectivamente el ácido graso de la posición 3 utilizando una lipasa 1,3-regioespecífica de *Mucor miehei*. Este método permite obtener el isómero 1-*O*-hexadecil-2-*O*-acilglicerol con mayor rendimiento y en una forma muy sencilla.

Es de señalar que en el aislamiento del compuesto natural que es el 1-*O*-alquil-2-*O*-acilderivado generalmente se detecta también el isómero 3-*O*-acilado que se forma por migración a la posición primaria más favorecida, por lo cual, es útil contar con ambos isómeros para su caracterización.

PARTE EXPERIMENTAL

CAPITULO 10

INSTRUMENTAL UTILIZADO

El instrumental de laboratorio utilizado fue el siguiente:

- La radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido RackBeta (Wallac).
- Las evaporaciones de solventes se llevaron a cabo bajo presión reducida en un evaporador rotatorio, bajo corriente de nitrógeno o en un Speed Vac plus, Savant. Para muestras acuosas también se utilizó un liofilizador Freeze Mobile 6 (Virtis).
- Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Dynac (Becton Dickinson), en una microcentrífuga Microfuge 12 (Beckman), en una centrífuga refrigerada Damon IEC B-20A o en una ultracentrífuga Beckman.
- Los tratamientos enzimáticos y en general las incubaciones a temperatura controlada se realizaron en un baño termostático Electrotem o en un agitador con control de temperatura New Brunswick Science, INNOVA 4000.
- Las hidrogenaciones catalíticas se llevaron a cabo en un equipo PARR, Instrument Company, Inc.
- Los poderes rotatorios se midieron en polarímetros Perkin Elmer 141 o Perkin Elmer 343 en microceldas de 1 dm de longitud a temperatura ambiente utilizando cloroformo como solvente y la concentración que se indica en cada caso.
- Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) y de carbono 13 (RMN ^{13}C) se realizaron utilizando un espectrómetro Bruker AC200. Las constantes de acoplamiento aparentes (expresadas en Hz) se determinaron por medición directa de la separación de las líneas en el espectro de RMN ^1H . Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) respecto del tetrametilsilano (TMS). Los espectros de RMN ^{13}C se adquirieron por desacoplamiento de banda ancha. Todos los espectros se realizaron en Cl_3CD a menos que se indique lo contrario.
- Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

- Para facilitar la disolución o extracción de muestra se utilizó un baño ultrasónico Branson o un vortex Roto Mix Thermolyne.

SOLVENTES

Todos los solventes se purificaron por destilación. Algunos requirieron un tratamiento especial para ser utilizados en determinadas reacciones.

- La piridina se reflujo sobre KOH, se destiló y conservó sobre tamices moleculares de 0,4 nm.
- El tolueno seco se obtuvo por destilación y posterior tratamiento con sodio metálico.
- El diclorometano anhidro se obtuvo por reflujo sobre P_2O_5 y posterior destilación. Se guardó sobre tamices moleculares de 0,4 nm.

Las mezclas de solventes están expresadas en relación de volúmenes (v/v).

SOLUCIONES CENTELLEADORAS

Para la determinación de radioactividad por centelleo líquido se utilizaron las siguientes soluciones centelleadoras:

- Para muestras no acuosas: PPO (2,5-difeniloxazol), 4g; POPOP (1,4-bis[4-metil-5-fenil-2-oxazolil] benceno, 0,1g; tolueno, 1l.
- Para muestras acuosas: PPO, 4g; POPOP, 40 mg; Tritón X-100 o Arcopal X-100, 250 ml; tolueno, 750 ml.

TECNICAS CROMATOGRAFICAS

Cromatografía en capa delgada

Cromatografía de adsorción en fase normal (TLC):

Se utilizaron placas de sílica gel 60 (Merck) sobre soporte de vidrio o de aluminio y los siguientes solventes de desarrollo:

- A. cloroformo : metanol : NH_4OH 2,5M (15:10:2)
- B. cloroformo : metanol (38:3)
- C. cloroformo : metanol : NH_4OH 2,5M (40:10:1)
- D. hexano : acetato de etilo (4:1)
- E. hexano : acetato de etilo (2:1)
- F. cloroformo : metanol : $\text{NH}_4\text{OH(c)}$ (100:10:1)
- G. cloroformo : metanol : $\text{NH}_4\text{OH(c)}$ (300:25:2)
- H. cloroformo : metanol : agua (10:10:3)
- I. hexano : 2-propanol (9:1)
- J. hexano : 2-propanol (93:7)
- K. tolueno : acetato de etilo (20:1)
- L. 1-propanol : NH_3 : agua (5:4:1)
- M. 1-propanol : NH_3 : agua (7:1:2)
- N. 1-propanol : NH_3 : agua (7:3:2)

Cromatografía en fase reversa (RP-TLC)

Se realizó en placas RP-18 F_{254s} (Merck) sobre soporte de aluminio utilizando los siguientes solventes de desarrollo:

- O. cloroformo : metanol : agua (10:25:1)
- P. cloroformo : metanol : agua (20:55:3)
- Q. cloroformo : metanol : agua (40:100:3)
- R. cloroformo : metanol : agua (40:80:1)

S. ácido acético : acetonitrilo (1:1)

Elución de muestras de la sílica

En el caso de las muestras lipídicas la sílica de las placas se extrajo con 1 ml de cloroformo:metanol:agua (10:10:2) o cloroformo:metanol (1:1) según el caso; se sonicó durante 5 minutos y se centrifugó. El sobrenadante se separó y se volvió a repetir el procedimiento. En el caso de las muestras solubles en agua se realizó una primera elución con cloroformo:metanol:agua (1:10:10) y una segunda con metanol : agua (1:1).

Métodos de revelado

Los reveladores utilizados para muestras no radioactivas fueron los siguientes:

- Revelador de Mo/Ce: Se rociaron las placas con este revelador que contiene H_2SO_4 10%; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,04M; $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, 3mM y se calentaron en plancha eléctrica hasta ver la aparición de manchas color azul.
- Vapores de yodo.
- Revelador de anisaldehído / sulfúrico: Las placas se sumergieron en una solución de H_2SO_4 5% - anisaldehído 0,01% en etanol y se calentaron en plancha eléctrica.
- Ninhidrina: Para detectar compuestos aminados se rociaron las placas con una solución de ninhidrina 0,2% en acetona conteniendo 0,2% de piridina. Las placas se secaron a temperatura ambiente bajo campana y se calentaron a 100-110°C durante 10 minutos.
- Para fosfatos: Se preparó una solución disolviendo 3 g de $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de agua. Se agregó 5 ml de HCl 6N y 13 ml de HClO_4 70%. Se pulverizaron las placas con esta solución y se calentaron a 80°C.

Autorradiografías

Las placas conteniendo muestras radioactivas se rociaron con EN³HANCE (NEN), se expusieron a films de rayos X (Kodak-X-Omat AR) en la oscuridad y se mantuvieron a -70°C de 2 a 30 días de acuerdo a la cantidad de radioactividad presente.

Para su revelado las placas fotográficas se sumergieron durante 2-3 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad sucesivamente en:

- (a) Solución reveladora: Na₂SO₃, 72 g; Metol, 2,2 g; hidroquinona, 8,8 g; KBr, 4g; Na₂CO₃ (anhidro), 48 g; agua destilada, 1l.
- (b) Solución de lavado: ácido acético 2% en agua.
- (c) Solución fijadora: Se utilizaron soluciones fijadoras comerciales Romek o Kodak.
- (d) Lavado final en agua y agua destilada.

Cuantificación de las muestras radioactivas

La muestra a cuantificar se eluyó de la sílica, se tomó una alícuota del material eluído, éste se mezcló con la solución centelleadora adecuada y se sometió a conteo. También se contó directamente la sílica raspándola de la placa en porciones de 0,2-0,5 cm. Esta se soncó con la solución centelleadora antes del conteo.

Como alternativa se realizó una densitometría de las autorradiografías.

Cromatografía en columna

Acido silícico o sílica

Se utilizó ácido silícico UNISIL (200-325 mesh, Clarkson Chem. Co., South Williamsport, PA, USA) o sílica (200-400 mesh, Aldrich) como fases de separación para el fraccionamiento de los lípidos ácidos y la purificación de los alquilacilgliceroles. Los solventes de elución se indican en cada caso.

Columnas de fase reversa C18

Se utilizaron pequeñas columnas (1 ml) de fase reversa (Worldwide Monitoring, PA, USA o Supelclean de Supelco) para desalar la fracción de lípidos ácidos eluída de la columna de DEAE Sephadex. La muestra suspendida en agua se pasó a través de estas columnas. Luego de lavar con agua para eliminar las sales, los IPLs que quedaron retenidos se eluyeron con metanol y cloroformo:metanol (1:1).

Cromatografía de intercambio iónico

Como resinas de intercambio iónico se utilizaron:

- **DEAE-Sephadex A-25** (Pharmacia), de capacidad total 3-4 mmol/g de peso seco, para la separación de lípidos ácidos y neutros. La fase se equilibró por agitación durante 20-30 minutos con 50-100 ml de metanol:cloroformo:NaAcO 0,8M (30:15:4). Esta solución se renovó 4 veces durante un período de 18 horas. Luego se reemplazó el sobrenadante por una solución de metanol:cloroformo:agua (30:15:4). Se hicieron 3 lavados con esta solución, se deaereó y se empacó en una columna de vidrio. En la columna la fase se continuó lavando hasta comprobar la eliminación completa de NaAcO libre (Leeden & Yu, 1982).
- **AG-50 (H⁺)** (Bio Rad) para descationizar. La muestra disuelta en agua se pasó por una columna de entre 0,4 – 1 ml de resina. Tanto el lavado previo de la fase como la elución de la muestra se realizó con agua.
- **Resina mixta Amberlite MB3**. Se utilizó para desalar algunas muestras provenientes de hidrólisis. La muestra se sembró y se eluyó con agua.

Cromatografía gaseosa capilar (cgl)

Las cromatografías gaseosas se realizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890, equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador Hewlett-Packard 3395. Se utilizó nitrógeno como gas portador.

Las columnas y condiciones utilizadas fueron las siguientes:

- A. Para la separación de alquilacilglicerol, diacilglicerol y ceramidas se utilizó una columna capilar HP-1 (0,20 mm x 12 m) con los siguientes programas de temperatura del horno:
 - i. T inicial, 250 °C; gradiente, 6°C/min; T final, 320 °C
 - ii. T inicial, 245 °C (1 minuto); gradiente, 3°C/min hasta 255°C y 9°C/min hasta 320 °C.
- B. Para el análisis del alquilglicerol, de las bases esfingosínicas y los ácidos grasos sililados o metilados se utilizó una columna capilar HP-5 (0,32 mm x 50 m) con el siguiente programa de temperatura: T inicial, 219°C (7 minutos); gradientes, 1°C/min hasta 230°C y 5°C/min hasta 250°C.
- C. La presencia de inositol se analizó en una columna capilar SP-2330 (0,25 mm x 30 m) a 230°C.

Cromatografía gaseosa / espectrometría de masa (cgl-em)

Se utilizó un equipo TRIO-2VG MASSLAB a 70 eV en las siguientes condiciones:

- D. Columna capilar HP-1 (0,20 mm x 12 m) con la siguiente programación de temperatura del horno: T inicial, 140 °C (2 minutos); gradiente, 20°C/min; T final, 310°C.
- E. Columna capilar DB-5 (0,25 mm x 30 m) con la siguiente programación de temperatura del horno: T inicial, 180°C (5 minutos); gradiente, 2°C/min hasta 230°C y 5°C/min hasta 250°C.

PREPARACIÓN DE DERIVADOS

Trimetilsilil derivados: Las fracciones lipídicas conteniendo alquilglicerol, bases esfingosínicas o ácidos grasos se analizaron por CGL como trimetilsilil derivados. Como reactivo sililante se utilizó bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA). Las muestras se llevaron a seco y se derivatizaron por agregado de BSTFA:piridina (1:2) calentando durante 10 minutos a 70°C.

Metilación: Los ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon por tratamiento de las muestras disueltas en 200 µl de tolueno anhidro, con 200 µl de BF₃ 14% en metanol bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se calentó a 80°C durante 45 minutos en tubo cerrado. Luego se agregaron 0,5 ml de agua y los lípidos se extrajeron con tolueno (3 x 0,5 ml) (Manku, 1983).

Acetatos de alditos: Los azúcares neutros se analizaron como acetatos de alditos. La muestra se llevó a seco y se redujo con NaBH₄ (1-2mg) en NH₄OH 0,2 M durante 16 horas a 4°C. El exceso de reductor se destruyó luego por agregado de ácido acético 10% hasta pH 5 y las muestras se evaporaron sucesivas veces con agregados de metanol. Estas se secaron y se acetilaron con 0,5 ml de anhídrido acético:piridina (1:1)

durante 1 hora a 80°C. Los agentes acetilantes se eliminaron por sucesivas evaporaciones con metanol y tolueno y los acetatos de alditoles se disolvieron en cloroformo para su análisis.

HIDRÓLISIS BASICAS

Saponificación

Los lípidos se hidrolizaron con NaOH 0,1 M en 90% de metanol o etanol durante 60-90 minutos a 37°C. Luego de neutralizar con AcOH 10% o HCl 0,2N, se extrajo con tolueno o se llevó a seco y el residuo se resuspendió en agua. Los lípidos se extrajeron con éter etílico o butanol para ser analizados.

Tratamiento con NaOH 1M a 105°C

Este tratamiento alcalino fuerte se utilizó para hidrolizar ceramida. Las muestras se trataron con NaOH 1 M (0,5 ml) durante 24 horas a 105°C en tubos cerrados de Teflon. La muestra de reacción se neutralizó con HCl 2N y los lípidos se extrajeron con éter etílico.

Tratamiento con propanol/NH₃

Los IPLs se trataron con propanol 40% : NH₃ 13M (1:1) 18 horas a 37 °C (condiciones que no hidrolizan la ceramida). Luego se evaporó en corriente de nitrógeno y la muestra se disolvió en cloroformo:metanol (1:1) para su análisis por TLC en el solvente A.

NH₄OH 9M

La muestra fue tratada con 200 µl de NH₄OH 9M durante 40 min a 45°C. Luego se hicieron agregados de agua y se llevó a sequedad repetidas veces. Finalmente la muestra se disolvió en cloroformo:metanol (1:1) para su análisis.

HIDRÓLISIS ACIDAS

HCl 4N

Esta hidrólisis ácida se utilizó para confirmar la presencia de inositol en los IPLs. La fase acuosa obtenida luego del tratamiento enzimático de los IPLs con PI-PLC se hidrolizó en tubo cerrado con HCl 4N durante 18 horas a 105°C. El ácido se eliminó por sucesivas evaporaciones a presión reducida con agregados de agua y las sales se eliminaron pasando la muestra por una resina de intercambio iónico MB3. El inositol se eluyó con agua, se llevó a seco y se acetiló para su análisis por CGL.

Metanólisis

Para confirmar la presencia de ceramida y analizar las bases esfingosínicas los lípidos se hidrolizaron con HCl (c):metanol:agua (3:29:4) durante 18 horas a 70-78°C en un tubo cerrado (Weiss *et al.*, 1958). Se realizaron sucesivas evaporaciones bajo corriente de nitrógeno con agregados de tolueno hasta eliminar todo el ácido, el residuo se resuspendió en agua y se extrajo con éter etílico. Alternativamente, se neutralizó con NaOH 1M hasta pH 9 y se extrajo con éter etílico.

Hidrólisis ácida suave para azúcares-1-fosfato

La muestra se calentó a 50°C durante 15 min con 200µl de HCl 1N:propanol (1:1) (Menon *et al.*, 1990b). Luego se agregó agua, se evaporó el propanol bajo corriente de N₂ y se realizó una partición agua/butanol.

Alternativamente, la muestra se hidrolizó con HCl 0,1N, 10 min a 100°C y luego se extrajo con butanol (Masterson *et al.*, 1989).

Tratamiento con HNO₂

La muestra se disolvió en 30 µl de buffer acetato de sodio 0,1M, pH 4,0 y se trató con 30 µl de NaNO₂ 0,5 M, 3 horas a 37°C. En los casos en que se trató el glicolípido completo (sin la eliminación previa de la porción lipídica) se agregaron

también 40 μ l de Zwittergent 0,1%. A cada hora se repitieron los agregados de buffer y de NaNO_2 . Luego de la desaminación se agregaron 135 μ l de H_3BO_3 0,4 M y se alcalinizó con NaOH 1M hasta pH 10. Las muestras radioactivas se redujeron con NaBH_4 durante 18 horas a 4°C. Para las muestras no radioactivas se utilizaron 18,5 MBq (500 μ Ci) de NaB^3H_4 . Luego de 2-4 horas se agregó NaBH_4 frío, el cual se dejó 18 h a 4°C, para asegurar la completa reducción de la muestra. En ambos casos el exceso de NaBH_4 se destruyó por agregado de ácido acético y el Na^+ se eliminó por pasaje a través de 0,4-0,6 ml de resina AG 50. La muestra se eluyó con 3 ml de agua, se llevó a seco y se realizaron sucesivas evaporaciones con agregados de ácido acético al 5% en metanol (2 x 0,5 ml), metanol (2 x 0,5 ml) y tolueno (3 x 0,5 ml) con el fin de eliminar el borato y el ácido (Ferguson, 1993).

Tratamiento con HF

Las muestras secas se suspendieron en 50 μ l de HF 50% en agua y se mantuvieron a 4°C durante 72 horas (Mayor *et al.*, 1990a). La reacción se detuvo por agregado de solución saturada fría de LiOH hasta neutralidad. El precipitado de LiF se eliminó por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 minutos. Tanto el precipitado como el sobrenadante se extrajeron con éter para obtener los lípidos liberados en la hidrólisis.

HIDRÓLISIS ENZIMATICAS

Tratamiento con fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC)

Muestras de IPL secas se resuspendieron en 100 μ l de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 conteniendo 0,1% de desoxicolato de sodio y se incubaron con 0,35 unidades de PI-PLC de *Bacillus thuringiensis* durante 90 minutos a 37°C. Los lípidos liberados se extrajeron con éter etílico o butanol (4 x 0,5 ml). Los lípidos radioactivos se analizaron

por TLC mientras que las muestras frías se analizaron como trimetilsilil derivados por CGL y CGL-EM.

Tratamiento con fosfolipasa A₂ (PLA₂)

Las muestras secas se resuspendieron en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 conteniendo 0,1% de desoxicolato de sodio y CaCl₂ 2,5 mM; y se incubaron con 25 unidades de fosfolipasa A₂ de veneno de *Apis mellifera* (Sigma, 1200 U/mg de sólido, 1350 U/mg de proteína) durante 2 a 4 horas a 37°C. Luego de la incubación la mezcla de reacción se extrajo con *n*-butanol.

Tratamiento con fosfatasa alcalina

La muestra a ser tratada se incubó con 0,5 U de fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* (Sigma, Tipo III, 60 U/mg de proteína) a 30°C durante 3 horas, en buffer Tris-HCl 0,1M, pH 8. Se realizó un control de la enzima y de las condiciones de incubación utilizando *p*-nitrofenilfosfato como sustrato.

Tratamiento con α -manosidasa

La muestra a tratar se incubó durante 17 horas a 37°C, con 1U de α -manosidasa de *Jack bean* en 50 μ l de buffer acetato de sodio 0,1M, conteniendo 0,1% de desoxicolato de sodio. Luego de extraer con éter etílico (2 x 250 μ l) la fase acuosa se extrajo con cloroformo:metanol (2:1) (3 x 200 μ l). Los extractos orgánicos se analizaron por TLC en el solvente A.

HIDROGENACION CATALITICA

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos radioactivos se sometieron a hidrogenación, con el fin de confirmar o descartar la presencia de insaturaciones. A las

muestras disueltas en 0,5 ml de acetato de etilo, se les agregó 1-2 mg del reactivo de Pd sobre carbón activado (Aldrich, contenido de Pd 10%). Estas se sometieron a una presión de 3 atm durante 4-5 horas a temperatura ambiente y con agitación. Luego de la hidrogenación las muestras se extrajeron del carbón con acetato de etilo y cloroformo. Como control de la reacción se utilizó una muestra de linoleato de metilo ($C_{18:2}$) comprobando su completa transformación en ácido esteárico $C_{18:0}$ por RP-TLC.

PREPARACION DE [3H]-2,5-ANHIDROMANITOL

Este testigo se preparó por tratamiento de una muestra de $GlcNH_2$ con HNO_2 de acuerdo a la técnica descripta. La reducción se realizó por agregado de NaB^3H_4 .

PARASITOS

Formas epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Y y cepa CL, fueron cultivadas en medio LIT (Castellani *et al.*, 1967). Las células en la fase exponencial (2 días) o en la fase estacionaria de crecimiento (4 días) se colectaron por centrifugación a 6000 rpm. El sedimento se lavó 3 veces con solución salina tamponada PBS, (fosfato de sodio 0,01M, pH 7,2; NaCl 0,15M). Estos parásitos fueron cultivados en el laboratorio del Dr. W. Colli (USP, Brasil).

Para el análisis de los lípidos durante el proceso de diferenciación de trypomastigotes a epimastigotes, se utilizaron formas trypomastigote de la cepa Y mantenidas en monocapas de células LLC-MK₂. Estas células epiteliales se incubaron en placas de vidrio a una densidad de 2×10^4 células/cm², en medio DME conteniendo 10% de suero fetal bovino. Luego de 24 horas de incubación a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ las células fueron expuestas a una suspensión de 5×10^6

trypomastigotes/ml en DME conteniendo 2% de suero fetal bovino. A las 3 horas las placas fueron lavadas 3 veces con HBSS y en medio DME conteniendo 2% de suero fetal bovino. Los trypomastigotes liberados de las células infectadas, obtenidos por centrifugación en el sobrenadante, se incubaron en medio LIT a 37°C durante 24-72 horas para su diferenciación extracelular en amastigotes y luego en epimastigotes. Los trypomastigotes y sus formas diferenciadas fueron obtenidos por la Dra. Norma Andrews (Yale University, USA).

INCORPORACIONES METABOLICAS DE PRECURSORES RADIOACTIVOS

Los epimastigotes de *T. cruzi*, luego de cultivados dos días en medio LIT, fueron transferidos a medio TAU-3AG (Contreras *et al.*, 1985), conteniendo 0,2% de suero fetal bovino (BSA) (8×10^7 - 2×10^8 células/ml). Los parásitos se mantuvieron con agitación durante 6 horas a 28°C en este medio y a continuación se agregó ácido [9,10- ^3H]-palmítico (1,11-1,85 MBq/ml (30-50 $\mu\text{Ci/ml}$); 1998 GBq/mmol (54 Ci/mmol)) y se agitó durante 18 horas más. Los parásitos se centrifugaron y lavaron 2 veces con NaCl 0,9% y luego de filtrar el medio por membrana Millipore fueron liofilizados. Por observación microscópica se confirmó la viabilidad de los parásitos luego de la incorporación.

Para el análisis de los lípidos durante el proceso de diferenciación de trypomastigotes a epimastigotes los parásitos (2×10^8) fueron lavados en medio RPMI e incubados durante 2 horas a 37°C en 0,8 ml de RPMI conteniendo 7,4 MBq (200 μCi) de ácido [9,10 ^3H] palmítico (NEN Research Products, 1443 GBq/mmol (39 Ci/mmol)), previamente complejoado con BSA deslipidado. Los parásitos fueron lavados 4 veces en PBS y el sedimento de la centrifugación final fue rápidamente congelado y liofilizado.

INMUNOPRECIPITACION DE LA GLICOPROTEINA Ssp-4 DE FORMAS AMASTIGOTE

Amastigotes marcados con ácido [9,10 ^3H] palmítico fueron lavados y lisados en buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8, conteniendo EDTA 5mM y 1% de SDS a 100°C, condición que inactiva la PI-PLC endógena de *T. cruzi*. Este lisado se sonicó en un baño de agua durante 10 minutos y se diluyó el SDS al 0,02% en el mismo buffer conteniendo 1% de NP-40. El lisado se clarificó por centrifugación a 100 000g durante 5 minutos y se incubó toda la noche a 4°C con 50 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo monoclonal 2C2 anti Ssp-4. La inmunoprecipitación se realizó incubando 1 hora con 20 μl de una suspensión 25 % (p/v) de proteína A-Sepharosa.

EXTRACCION Y PURIFICACION DE INOSITOLFOSFOLIPIDOS (IPLs)

Las células epimastigotes de *T. cruzi* (5×10^9) marcadas metabólicamente con [^3H]-palmítico fueron liofilizadas y extraídas con cloroformo:metanol 2:1, (20 ml) y 1:1, (2 x 20 ml). Los extractos reunidos se llevaron a seco por evaporación a presión reducida y el residuo se redisolvió en 1 ml de metanol:cloroformo:agua (30:15:4), y se sembró en una columna de DEAE-Sephadex A25 (forma acetato). En algunos casos, previamente se realizó una extracción con éter o hexano (2 x 3 ml) para eliminar el exceso de palmítico presente proveniente de la incorporación. Los lípidos neutros se eluyeron con aproximadamente 50 ml de metanol:cloroformo:agua (30:15:4) y los lípidos ácidos con aproximadamente 50 ml de metanol:cloroformo:AcONa 0,8M (30:15:4). La fracción de lípidos ácidos, donde se encuentran los IPLs se evaporó a presión reducida y se desaló por diálisis o pasando la muestra a través de pequeñas columnas de fase reversa C18. La separación de los lípidos ácidos se llevó a cabo por cromatografía en columna de Unisil. Una vez armada la columna, ésta se lavó con cloroformo, y los lípidos ácidos se sembraron y eluyeron primero con

aproximadamente 30 ml de cloroformo:metanol (4:1) y luego con una cantidad similar de cloroformo:metanol (1:1). De esta forma se obtuvieron dos fracciones llamadas Fr1 y Fr2. Cuando no se logró una buena separación por cromatografía en columna, se realizó una purificación final por TLC en el solvente A.

UTILIZACION DE SISTEMAS LIBRES DE CELULAS PARA ESTUDIOS DE BIOSINTESIS DE PRECURSORES DE GPI

Preparación de lisados de membrana

Células epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Y, fueron sometidas a una lisis hipotónica en Hepes, 10mM, pH 7,9; TLCK, 0,1mM; DTT, 0,5mM; EGTA, 1mM y NaHCO₃, 0,5mM durante 15 minutos a 0°C. Para lograr una destrucción completa de las células, éstas se homogeneizaron en un homogeneizador y posteriormente se sonicaron 6 veces durante 10 segundos cada vez, a intervalos de 30 segundos. La lisis de los parásitos fue confirmada por observación microscópica y en algunos casos el homogenato se centrifugó 15 min a 1000 g. El sobrenadante se centrifugó a 80 000 g durante 1h y el sedimento se resuspendió y se almacenó en alícuotas a -70°C en el Buffer 1 (Hepes, 50mM, pH 7,4; MnCl₂, 5mM; MgCl₂, 5mM; KCl, 25mM; DTT, 0,5mM; TLCK, 0,1mM; leupeptina 1µg/ml) con 20% de glicerol. Cuando se utilizaron membranas recién preparadas, el sedimento se resuspendió directamente en el buffer de incubación.

Extracción de los lípidos radioactivos del sistema de membranas

Luego de las incubaciones, las membranas se extrajeron con 0,7 ml de cloroformo:metanol:agua (10:10:3), agitando durante 2 h a temperatura ambiente.

Luego se centrifugó a 10 000 g durante 15 minutos, se separó el sobrenadante y el sedimento se reextrajo de la misma forma con 0,5-1 ml de cloroformo:metanol:agua (10:10:3). Ambos extractos se juntaron para cada tiempo de incubación y se llevaron a seco bajo corriente de nitrógeno o en un evaporador Savant. El residuo se suspendió en agua y ésta se extrajo con butanol saturado en agua (3 x 0,5 ml). El extracto butanol se lavó con agua y se llevó a seco para su análisis por TLC en el solvente A.

Para los estudios de estructura los distintos compuestos se eluyeron de la sílica con cloroformo:metanol:agua (10:10:2).

ESTUDIO DE ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASAS EN MEMBRANAS DE *T. CRUZI*

Los PI e IPC radioactivos, purificados como se describió anteriormente, se utilizaron como sustratos para las incubaciones en presencia de membranas de *T. cruzi*. Alícuotas de membranas fueron descongeladas y lavadas dos veces por centrifugación con 8 ml de buffer 2 (Tris-HCl, 50mM, pH 7,4; TLCK, 0,1mM y leupeptina, 2,5µg/ml) a 100 000 g durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante se descartó y se repitió el lavado. La mezcla estándar de incubación consistió en el sustrato radioactivo (600 000 cpm) y el equivalente a 5×10^7 células de *T. cruzi*, en 100 µl de buffer 2 conteniendo Triton X-100 al 0,1%. El sustrato disuelto en cloroformo:metanol (1:1) se colocó en los tubos de incubación, se llevó a seco bajo presión de N₂ y se agregaron las membranas, suspendidas en el buffer 2. Se agitó y luego de incubar a 30°C la reacción se cortó a distintos tiempos (15, 60, 120 min y 18h) por agregado de 660 µl de cloroformo:metanol (1:1). Se probó la acción de varios reactivos, descriptos como inhibidores o cofactores de fosfolipasas, incubando 18h los sustratos con las membranas en presencia de una concentración 10mM de CMPSA, EDTA, *o*-fenantrolina, CaCl₂ o MgCl₂. Como control, se incubaron 18h los sustratos con el buffer, sin las membranas.

Los lípidos se extrajeron como se indica en el ítem anterior.

INCORPORACION DE UDP-[³H]-GlcNAc EN SISTEMAS LIBRES DE CELULAS

Alícuotas de membranas fueron descongeladas y lavadas dos veces por centrifugación con 8 ml de buffer 1 (sin glicerol) a 100 000 g durante 1 hora a 4°C. El sedimento conteniendo las membranas se suspendió en el buffer 3 (Buffer 1 + ATP 1mM). El equivalente a 1×10^8 - 1×10^9 células de *T. cruzi* se incubó a distintos tiempos en 100µl de buffer 3 conteniendo 0,074-0,185 MBq (2-5 µCi) de UDP-[³H]-GlcNAc (1287,6 GBq/mmol, (34,8Ci/mmol), Du Pont, NEN). La UDP-[³H]-GlcNAc se colocó en los tubos de incubación disuelta en etanol:agua (7:3), se llevo a seco bajo presión de N₂ y se agregaron las membranas suspendidas en el buffer 3. Luego de incubar a 30°C la reacción se cortó a distintos tiempos (5, 15, 30, 60, 120 min, 5h y 18h) por agregado de 660 µl de cloroformo:metanol (1:1).

También se realizaron incubaciones de 30 y 60 min agregando GTP 1mM al medio de incubación; y de 5 horas en presencia de vanadato de sodio 0,2mM.

En los casos en que se indica, se utilizaron para preparar las membranas células previamente incubadas durante 1h con 0,2µg/ml de tunicamicina.

En todos los casos los lípidos se extrajeron de acuerdo a lo descripto anteriormente.

PREPARACION DE ESTANDARES DE ALQUILACILGLICEROL

Esterificación de 1-*O*-hexadecilglicerol por medio de lipasas

Una suspensión de 0,1 mmol de 1-*O*-hexadecil-*rac*-glicerol, 0,05 mmol de ácido graso (ácido mirístico, palmítico, ácido esteárico, ácido oleico o ácido linoleico) y 1 mg de lipasa de *Cándida cylindracea* (905 U/mg de sólido, 4570 U/mg de proteína) o de *Pseudomona sp* se agitó a 37°C en distintos solventes orgánicos. El avance de la reacción se monitoreó por TLC y CGL.

Determinación del solvente y de la temperatura óptima de reacción

A una solución de 0,05 mmoles de 1-*O*-hexadecil-*rac*-glicerol, 0,025 mmoles de ácido palmítico y 0,01 mmol de 5- α -colestano, utilizado como estándar interno, en 1 ml de solvente se le agregó 35 unidades de lipasa de *Pseudomana sp.* La mezcla se agitó a distintas temperaturas y se utilizaron distintos solventes orgánicos como medio de reacción. El avance de la reacción se monitoreó por TLC y CGL.

Purificación de los alquilacilglicerol por cromatografía en columna

Los productos de reacción se purificaron por cromatografía en columna de Unisil o de sílica gel (Merck) eluyendo con hexano:acetato de etilo (9:1).

Síntesis química de 1-*O*-hexadecil-2-*O*-hexadecanoilglicerol (4) y 1-*O*-hexadecil-3-*O*-hexadecanoilglicerol (5) (Esquema 16)

Preparación del tritil derivado del 1-*O*-hexadecilglicerol (2)

Una solución de 1-*O*-hexadecilglicerol (95 mg, 0,3 mmoles), cloruro de tritilo (0,33 mmoles), trietilamina (0,45 mmoles) y 4-DMAP (0,01 mmol) en 2 ml de diclorometano, se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La solución se volcó en agua con hielo y se extrajo 3 veces con diclorometano. El extracto orgánico se lavó con agua y se secó con sulfato de sodio. Luego de remover el solvente, el compuesto **2** cristalizó en etanol (rendimiento 161 mg, 96%) y se recrystalizó en el mismo solvente, p.f.48-49°C, R_f=0,46 en el solvente K. En este solvente el material de partida, 1-*O*-hexadecilglicerol, se mantiene en el punto del origen.

Datos de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (Se omiten los H y C de la cadena alquílica):

¹H RMN (CDCl₃): δ 7,45 (m, 6H, anillo aromático), 7,25 (m, 9H, anillo aromático), 3,95 (m, 1H, -CHOH-), 3,59-3,41 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-), 3,21 (d, J=5,4 Hz, 2H, -CH₂OCPh₃), 2,42 (d, J=4,7 Hz, OH, desaparece al agregar D₂O).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 143,99, 128,77, 127,88, 127,11 (C_5H_6), 86,75 (OCPh_3), 72,14, 71,74, 69,96 (CH , OCH_2R , CH_2O), 64,75 (CH_2OCPh_3).

Acilación del 1-O-hexadecil-3-O-tritilglicerol

Para la acilación, una solución del compuesto **2** (28 mg, 0,05 mmoles), ácido palmítico (0,055 mmoles), DCC (0,055 mmoles) y 4-DMAP (0,01 mmol) en 1 ml de diclorometano se dejó 18 horas a temperatura ambiente. La *N,N*-diciclohexilurea formada se filtró, el filtrado se lavó con agua y se evaporó la fase orgánica hasta obtener un jarabe que se purificó por cromatografía en columna eluyendo con tolueno:acetato de etilo (49:1). Se obtuvieron 32 mg de 1-*O*-hexadecil-2-*O*-hexadecanoil-3-*O*-tritilglicerol (**3**) con un rendimiento de 83%. El producto resultó homogéneo por cromatografía en capa delgada, $R_f=0,8$ (solvente K).

Datos de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (Se omiten los H y C de la cadena alquílica):

^1H RMN (CDCl_3): δ 7,45 (m, 6H, anillo aromático), 7,3 (m, 9H, anillo aromático); 5,22 (m, 1H, $-\text{CHOCOR}$); 3,61 (m, 2H), 3,44-3,27 (m, 2H), 3,24 (d, $J=4,7$ Hz, 2H), $-\text{CH}_2\text{OCPh}_3$, $-\text{CH}_2\text{-O-CH}_2-$, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2-$; 2,36 (t, $J=7,3\text{Hz}$, 2H, CH_2COO)

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 143,94, 128,75, 127,82, 127,05 (C_5H_6), 86,75 (OCPh_3), 71,73, 71,60, 69,56 (CH , OCH_2R , CH_2O), 62,73 (CH_2OCPh_3).

Destritilación del 1-O-hexadecil-2-O-hexadecanoil-3-O-tritilglicerol (3). Obtención del 1-O-hexadecil-2-O-hexadecanoilglicerol (4) y del 1-O-hexadecil-3-O-hexadecanoilglicerol (5).

Se probaron varios métodos de destritilación con el objeto de minimizar la migración intramolecular. Los mejores resultados se obtuvieron tratando el compuesto tritilado **3** con una solución de ácido trifluoroacético (TFA):tolueno (1:6) durante 5 minutos a 0°C .

La solución se diluyó luego con tolueno y se realizaron sucesivas evaporaciones a presión reducida con agregados de tolueno hasta eliminar el ácido presente.

La destitilación se confirmó por TLC en el solvente D. Luego de 5 minutos no se observó material de partida y se detectaron dos manchas con $R_f=0,5$ (la mayoritaria) y $R_f=0,63$ (la minoritaria) correspondientes a los 2-*O* y 3-*O* acil derivados respectivamente. El último, probablemente formado en este paso de destitilación. La relación entre ambos se estableció por CGL. Una vez purificados por cromatografía en columna se caracterizaron por sus espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. La purificación en columna se realizó en un cuarto frío y los solventes de elución utilizados fueron: tolueno:acetato de etilo (49:1) y (95:5).

El compuesto **4** presentó los siguientes R_f y poder rotatorio: $R_f = 0,1$ (solvente J) y $0,5$ (solvente D); $[\alpha]_D^{20} - 1,2^\circ$ (c,1;CHCl₃). Este dato de poder rotatorio coincide con el informado en la literatura (Ogawa & Horisaki, 1983).

Datos de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (se omiten los H y C de la cadena alquilica):

Compuesto **4**: ^1H RMN (CDCl₃): δ 5,04-4,95 (m, 1H, -CHOCO-), 3,81 (d, $J=4,5$ Hz, 2H, -CH-CH₂OH), 3,65 (dd, $J=10,6$ Hz, $J=4,8$ Hz, 1H, CH₂-OCH₂-), 3,58 (dd, $J=10,6$ Hz, $J=5,1$ Hz, 1H, CH₂-OCH₂-), 3,45 (t, $J=6,6$ Hz, 2H, OCH₂-CH₂), 2,35 (t, $J=7,35$ Hz, 2H, -CH₂-COO-).

^{13}C RMN (CDCl₃): δ 173,70 (C=O), 72,88, 71,93, 70,00 (CH, OCH₂-R, CH₂O), 63,03 (CH₂OH).

Compuesto **5**: ^1H RMN (CDCl₃): δ 4,21 (dd, $J=11,5$ Hz, $J=4,8$ Hz, 1H, -CH-CH₂OCO-), 4,12 (dd, $J=11,5$ Hz, $J=5,0$ Hz, 1H, -CH-CH₂OCO-), 4,07-3,95 (m, 1H, -CHOH-), 3,55-3,38 (m, 4H, -CH₂-OCH₂).

^{13}C RMN (CDCl₃): δ 174,00 (C=O), 71,80, 71,42, 68,93 (CH, OCH₂R, CH₂O), 65,44 (CH₂OCO).

Cuantificación de alquilacilgliceroles.

La cuantificación de los AAG se realizó utilizando 5- α -colestano como estándar interno. Alícuotas de los productos de reacción se llevaron a seco bajo una corriente de nitrógeno, se trimetilsililaron y se analizaron por CGL utilizando las condiciones **Aii**.

RESUMEN

RESUMEN

El anclaje de proteínas a la membrana a través de un glicosilfosfatidilinositol (GPI) es muy utilizado por los parásitos protozoarios y en particular es muy frecuente en *Trypanosoma cruzi*.

Muchas de las glicoproteínas ancladas por GPI están involucradas en procesos de diferenciación celular, en el reconocimiento célula-huésped y también participarían en procesos de adhesión y penetración celular. Este hecho, sugiere que la inhibición del anclaje de estas glicoproteínas a la membrana del parásito es una alternativa atractiva para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas.

Una manera de inhibir el anclaje es interfiriendo la biosíntesis de las anclas GPI. Es necesario, por lo tanto, conocer los caminos biosintéticos y las estructuras de estas anclas y de sus precursores, con el fin de encontrar posibles diferencias entre el parásito y el huésped. Como una contribución en esta dirección, en este trabajo de tesis se realizó un estudio estructural de las distintas especies moleculares de inositolfosfolípidos (IPLs) disponibles para la construcción de las anclas GPI.

Los IPLs extraídos con cloroformo:metanol (2:1) y (1:1) de células epimastigotes de *T. cruzi*, incorporadas metabólicamente con [^3H]-palmítico, se aislaron por cromatografía en columna de intercambio aniónico en la fracción de lípidos ácidos. Por cromatografía en columna de ácido silícico de esta fracción se obtuvieron dos componentes denominados Fr1 y Fr2.

La estructura general de los IPLs se confirmó mediante el tratamiento enzimático con fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC) de *Bacillus thuringiensis*. Los lípidos liberados de esta forma se analizaron por cromatografía en capa delgada de sílica y de fase reversa y posterior fluorografía. Para confirmar los resultados obtenidos se realizaron hidrólisis ácidas y alcalinas y se analizaron los productos de reacción formados.

En el caso de muestras no radioactivas, los lípidos se analizaron por cromatografía gaseosa (CGL) y cromatografía gaseosa – espectrometría de masa (CGL-EM).

Los componentes de Fr1 se caracterizaron como glicerofosfoinositoles (PIs) con dos tipos de glicerolípidos, diacilglicerol (DAG) y alquilacilglicerol (AAG). En las muestras no radioactivas, los ácidos grasos se analizaron por CGL luego de la saponificación de los lípidos. En ambos glicerolípidos se detectaron ácido oleico ($C_{18:1}$) y linoleico ($C_{18:2}$) y en el AAG también se detectó 1-*O*-hexadecilglicerol como único alquilglicerol.

Los componentes de Fr2, en cambio, se identificaron como inositolfosfoceramidas (IPCs). Por CGL-EM se caracterizaron 4 ceramidas distintas, palmitoilesfingosina, palmitoildihidroesfingosina, estearoilesfingosina y estearoildihidroesfingosina. Los espectros de masa fueron comparables con los publicados anteriormente (Samuelsson & Samuelsson, 1969).

En el análisis por RP-TLC de las IPCs marcadas radioactivamente también se detectaron las mismas ceramidas, aunque en distinta proporción. La metanólisis ácida de Fr2 dio como productos de reacción dihidroesfingosina como base mayoritaria y una menor cantidad de esfingosina.

Para ambos compuestos se identificó inositol en la fase acuosa remanente luego del tratamiento con PI-PLC.

En este trabajo se demostró que el *T. cruzi* sintetiza preponderantemente IPC a partir de [3H]-palmítico siendo la palmitoildihidroesfingosina la especie mayoritaria. En la muestra fría se encontró, por el contrario, mayor proporción de la base insaturada, lo que indicaría que el parásito incorpora lípidos del medio. El hecho de que [3H]-palmítico se incorpora en esfingosina y en dihidroesfingosina indica que, por lo menos en parte, las cadenas de bases largas son biosintetizadas por el parásito. En las IPC analizadas no se detectó el ácido graso de $C_{24:0}$, encontrado en la ceramida componente del LPPG, por lo cual este debe ser introducido en una etapa posterior de la biosíntesis.

En este trabajo de tesis se analizaron los distintos lípidos extraídos de células de *T. cruzi* en las diferentes etapas de diferenciación de trypomastigotes a amastigotes y a epimastigotes, con el fin de poder correlacionar posibles diferencias encontradas, con la infectividad y la habilidad para invadir las células huésped.

Para esto, células trypomastigotes incubadas 0, 24, 48 y 72 horas en medio de diferenciación y células epimastigotes se incorporaron metabólicamente con ácido [^3H]-palmitico, se extrajeron con cloroformo:metanol y los extractos se analizaron por TLC en distintos solventes para caracterizar los lípidos encontrados en mayor proporción.

Los ácidos grasos detectados se analizaron como ésteres metílicos por cromatografía en fase reversa e hidrogenación y se identificaron como ácido palmítico ($\text{C}_{16:0}$), palmitoleico ($\text{C}_{16:1}$) y esteárico ($\text{C}_{18:0}$). En amastigotes y epimastigotes el ácido [^3H]-palmitico utilizado como precursor fue principalmente elongado a ácido esteárico y una menor proporción fue desaturado para dar palmitoleico indicando que estas formas celulares tienen las enzimas necesarias para realizar ambas funciones.

Entre los lípidos encontrados, las ceramidas son más abundantes en células obtenidas después de 24 horas de diferenciación, disminuyendo hacia las 72 horas. Esto coincide con la disminución en el porcentaje de amastigotes. Palmitoildihidroesfingosina representó más del 90% de la ceramida libre.

Se encontraron también glicerolípidos (hexadecilglicerol y hexadecilpalmitoilglicerol) pero en mucha menor proporción.

En amastigotes se analizaron los IPLs. La relación PI a IPC fue de 1 a 9. Al igual que la ceramida libre, la IPC está constituida por palmitoildihidroesfingosina y su cantidad disminuye durante la diferenciación de amastigotes a epimastigotes.

También se analizó la porción lipídica del ancla de la glicoproteína Ssp-4. Esta es la glicoproteína mayoritaria de células amastigotes de *T. cruzi* y es un antígeno de superficie específico de este estadio de diferenciación. Se encuentra anclada a la membrana a través de un GPI y es liberada progresivamente durante la diferenciación de amastigotes a epimastigotes. Esta liberación ocurre por acción de una PI-PLC

endógena (Andrews *et al.*, 1988) que cliva el ancla generando en la superficie celular un lípido que puede actuar como segundo mensajero.

El lípido de la Ssp-4 se obtuvo por tratamiento de un inmunoprecipitado de esta glicoproteína con PI-PLC de *Bacillus thuringiensis* y se identificó como ceramida, la palmitoildihidroesfingosina. Este resultado y el aumento en el nivel de ceramida libre que acompaña la diferenciación a amastigotes abren la posibilidad de que la ceramida juegue algún rol en la diferenciación y proliferación celular en *T. cruzi* como se sugirió previamente para mamíferos (Olivera *et al.*, 1992).

Es interesante remarcar, que las proteínas que son activamente liberadas al medio, están ancladas a la membrana por ceramida.

La biosíntesis de GPI fue ampliamente estudiada en *T. brucei*, en células de mamífero y en levaduras (Stevens, 1995; Ferguson, 1999; Ferguson *et al.*, 1999), pero son muy pocos los estudios realizados en *Trypanosoma cruzi* (Heise *et al.*, 1996). En este parásito donde se han encontrado muchas anclas con ceramida, resulta interesante analizar en cuál etapa de la biosíntesis ésta es introducida.

Como parte de los estudios de biosíntesis realizados, se analizó la acción de distintas enzimas de membrana sobre los IPLs radioactivos aislados y caracterizados previamente.

Para los estudios de biosíntesis se utilizó un sistema de membranas preparado por lisis hipotónica de células epimastigotes de *T. cruzi*. Estas membranas se incubaron a distintos tiempos con los PI y las IPC. El análisis de los lípidos extraídos luego de la incubación permitió demostrar la asociación a membrana de por lo menos cinco actividades enzimáticas.

Una fosfolipasa A₁ y una fosfolipasa A₂ que liberan ácido graso de los PI generando los *liso*-PI. Una aciltransferasa responsable de la acilación, con ácido graso frío endógeno, de los monoacil y monoalquilglicerolípidos formados. También se detectaron dos actividades de fosfolipasa C, una que hidroliza las IPC liberando ceramida y la otra hidroliza los PI liberando los glicerolípidos correspondientes.

La actividad de fosfolipasa C fue inhibida por el ácido *p*-cloromercuri-fenilsulfónico de acuerdo a lo publicado para otras PI-PLCs. También se observó una inositolfosfoceramida-ácido graso hidrolasa que libera el ácido graso de las IPC radioactivas.

Estas actividades enzimáticas podrían estar actuando en reacciones de remodelación en las anclas de glicoproteínas de *T. cruzi*.

Por otra parte se incubaron las membranas con UDP-[³H]GlcNAc con el fin de estudiar la primera etapa de la biosíntesis de los GPI, es decir, la adición de GlcNH₂ a los IPLs. Los lípidos extraídos con butanol se purificaron por TLC.

Por tratamiento con PI-PLC bacteriana de los productos formados por incorporación de GlcNH₂ en los precursores endógenos, presentes en las membranas, se identificaron tres precursores de anclas GPI. Estos se caracterizaron como GlcNAc-Inositol-P-DAG/AAG; GlcNH₂-Inositol-P-AAG y P-GlcNH₂-Inositol-P-MAG (P=fosfato), por tratamiento con PLA₂, álcali suave, HNO₂ seguido de reducción con NaBH₄ y fosfatasa alcalina

La incubación en presencia de vanadato de sodio inhibió en gran medida la síntesis del compuesto con la GlcNH₂ fosfatada.

Los datos obtenidos nos permiten descartar a la IPC como aceptora de GlcNH₂ para la formación de anclas GPI con ceramida, en contraposición a la hipótesis postulada por Cardoso de Almeida y col (Heise *et al.*, 1996). La ceramida, de acuerdo a nuestros resultados, debe introducirse en una etapa posterior del camino biosintético de los GPI por medio de un remodelamiento lipídico, como se describió en *S. cerevisiae* (Conzelmann *et al.*, 1992; Sipos *et al.*, 1994, 1997; Reggiori *et al.*, 1997; Reggiori & Conzelmann, 1998).

Aparentemente la GlcNAc transferasa sería selectiva hacia los PI ya que tanto AAG como DAG estarían presentes en los precursores.

También se identificaron dos precursores involucrados en la *N*-glicosilación de proteínas: GlcNAc-P-P-dolicol y GlcNAc-GlcNAc-P-P-dolicol. La naturaleza de estos

precursores se pudo confirmar utilizando membranas previamente tratadas con tunicamicina.

Los testigos de alquilacilglicerol utilizados en este trabajo de tesis se sintetizaron por dos métodos distintos; un método enzimático y uno químico. En el método enzimático se utilizaron lipasas para monoacilar el 1-*O*-hexadecilglicerol en distintos solventes orgánicos y a distintas temperaturas. Por este método se obtienen en un único paso los dos isómeros, el 2-*O*-acil y el 3-*O*-acil derivado, con un alto rendimiento total.

En el método químico se protege selectivamente el alcohol primario del 1-*O*-hexadecilglicerol por tritilación con cloruro de tritilo. Este derivado se acila con ácido palmítico en presencia de DCC y 4-DMAP y por último se desprotege con TFA en tolueno (1:6) a 0°C. Este método permite obtener, con un buen rendimiento, una mayor proporción del isómero natural 2-*O*-acilado, aunque en un mayor número de pasos.

Parte de este trabajo de tesis ha contribuido a las siguientes publicaciones:

- "Structural analysis of inositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms". Bertello, L.E., Gonçalves, M. F., Colli, W. & Lederkremer, R.M. (1995) *Biochem. J.*, **310**, 255-261.
- "Developmentally regulated expression of ceramide in *Trypanosoma cruzi*" Bertello, L.E., Andrews, N. & Lederkremer, R. M. (1996) *Mol. and Biochem. Parasitol.*, **79**, 143-151.
- "Lipase-catalyzed monoesterification of 1-*O*-hexadecylglycerol in organic solvents" Bertello, L. E., Salto, M. L. & Lederkremer, R. M. (1997) *Lipids*, **32**, 907-911.
- "Evidence for phospholipases from *Trypanosoma cruzi* active on phosphatidylinositol and inositolphosphoceramides" Bertello, L. E., Alves, M. J. M., Colli, W. & Lederkremer, R. M. (2000) *Biochem. J.*, **345**, 77-84.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Abuin, G., Couto, A.S., Lederkremer, R.M., Casal, O.L., Galli, C., Colli, W. and Alves, M.J.M. (1996) *Trypanosoma cruzi*: The Tc-85 surface glycoprotein shed by trypomastigotes bears a modified glycosylphosphatidylinositol anchor. *Exp. Parasitol.*, **82**, 290-297.
- Acosta Serrano, A., Schenkman, S., Yoshida, N., Mehlert, A., Richardson, J. and Ferguson, M.A.J (1995) The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27244-27253.
- Aeberhard, E.E., Moretti, E.R., Basso, B., Lema, M.G. and Bronia, D.I.H. (1980) *Medicina Buenos Aires*, **40**, 165-170.
- Affranchino, J.L., Ibañez, C.F., Luquetti, A.O., Rassi, A., Reyes, M.B., Macina, R.A., Åslund, L., Pettersson, U. and Frasch, A.C.C. (1989) Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **34**, 221-228.
- Agusti, R., Couto, A.S., Campetella, O.E., Frasch, A.C.C., Lederkremer, R.M. (1997) The trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* is anchored by two different lipids. *Glycobiology*, **7**, 731-735.
- Agusti, R., Couto, A.S., Campetella, O., Frasch, A.C.C. and Lederkremer, R.M. (1998) Structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchor of the trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote forms. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **30**, 123-131.
- Alcantara A. and Brener, Z. (1978) *Trypanosoma cruzi*: role of macrophage membrane components in the phagocytosis of bloodstream forms. *Exp. Parasitol.*, **50**, 1-6.
- Aldercreutz, P. and Mattiasson, B. (1987) *Biocatalysis*, **1**, 99.
- Alves, M. J. M., Abuin, G., Kuwajima, V. Y. & Colli, W. (1986) Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **21**, 75-82.
- Andrews, N.W. and Colli, W. (1982) Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J. Protozool.*, **29**, 264-269.
- Andrews, N.W., Katzin, A.M. and Colli, W. (1984) Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. *Eur. J. Biochem.*, **140**, 599-604.
- Andrews, N.W., Hong, K.S., Robbins, E. and Nussenzweig, V. (1987) Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.*, **64**, 474-484.

- Andrews, N.W., Robbins, E.S., Ley, V., Hong, K.S. and Nussenzweig, V. (1988) Developmentally regulated, phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.*, **167**, 300-314.
- Antunes, A. and Oliveira, M.M. (1981) Phospholipid metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Phosphate moiety turnover. *Comp. Biochem. Physiol.*, **70B**, 327-330.
- Arnesto, J., Hannappel, E., Leopold, K., Fischer, W., Bublit, R., Langer, L., Cumme, G.A. and Horn, A. (1996) Microheterogeneity of the hydrophobic and hydrophilic part of the glycosylphosphatidylinositol anchor of alkaline phosphatase from calf intestine. *Eur. J. Biochem.*, **238**, 259-269.
- Bangs, J.D., Hereld, D., Krakow, J.L., Hart, G.W. and Englund, P.T. (1985) Rapid processing of the carboxyl terminus of a trypanosome variant surface glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3207-3211.
- Becker, G.W. and Lester, R.L. (1980) Biosynthesis of phosphoinositol-containing sphingolipids from phosphatidylinositol by a membrane preparation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **142**, 747-754.
- Bell, R.M. and Coleman, R.A. (1980) Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 459-487.
- Bell, R.M. (1986) Protein kinase C activation by diacylglycerol second messenger. *Cell*, **45**, 631-632.
- Bell, R.M., Hannun, Y.A. and Merrill, A.H. Jr. (eds) (1993) In: Advances in lipid research: Sphingolipids and their metabolites, vol.25-26, Academic Press, Orlando, FL.
- Benachour, A., Sipos, G., Flury, I., Reggiori, F., Canivenc-Gansel, E., Vionnet, C., Conzelmann, A. and Benghezal, M. (1999) Deletion of GPI1, a yeast gene required for addition of a side chain to the glycosylphosphatidylinositol (GPI) core structure, affects GPI protein transport, remodeling, and cell wall integrity. *J. Biol. Chem.*, **274**, 15251-15261.
- Bertello, L.E., Gonçalves, M.F., Colli, W. and Lederkremer, R.M. (1995) Structural analysis of inositol phospholipids from *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *Biochem. J.*, **310**, 255-261.
- Bertello, L.E., Andrews, N.W. and Lederkremer, R.M. (1996) Developmentally regulated expression of ceramide in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **79**, 143-151.
- Bertello, L.E., Salto, M.L. and Lederkremer, R.M. (1997) Lipase-catalyzed monoesterification of 1-O-hexadecylglycerol in organic solvents. *Lipids*, **32**, 907-911.
- Bielawska, A., Crane, H.M., Liotta, D., Obeid, L.M. and Hannun, Y.A. (1993) Selectivity of ceramide-mediated biology. Lack of activity of *erythro*-dihydroceramide. *J. Biol. Chem.*, **268**, 26226-26232.
- Bordier, C (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol.Chem.*, **256**, 1604-1607.

- Bornscheuer, U. T. (1995) Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 578-586.
- Bosch, M., Trombetta, S., and Parodi, A.J. (1988) Synthesis of dolichol derivatives and protein glycosylation in trypanosomatids. *Biochem. Soc. Trans.*, **16**, 268-271.
- Bowes, A.E., Samad, A.H., Jiang, P., Weaver, B. and Mellors, A. (1993) The acquisition of lysophosphatidylcholine by African trypanosomes. *J. Biol. Chem.*, **268**, 13885-13892.
- Brener, Z. (1977) Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *PAHO Sci Publ.*, **347**, 11-22.
- Brener, Z. (1980) Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.*, **18**, 247-292.
- Brodbeck, U. (1998) Signalling properties of glycosylphosphatidylinositols and their regulated release from membranes in the turnover of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Biol. Chem.*, **379**, 1041-1044.
- Buehrer, B.M. and Bell, R.M. (1992) Inhibition of sphingosine kinase in vitro and in platelets. Implications for signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.*, **267**, 3154-3159.
- Bülow, R. and Overath, P (1986) Purification and characterization of the membrane-form variant surface glycoprotein hydrolase of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.*, **261**, 11918-11923.
- Bülow, R., Griffiths, G., Webster, P., Stierhof, Y.-D., Oppendoes, F.R. and Overath, P (1989) Intracellular localization of the glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell. Sci.*, **93**, 233-240.
- Burleigh, B.A. and Andrews, N.W. (1995) The mechanism of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**, 175-200.
- Burleigh, B.A. and Andrews, N.W. (1998) Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**, 461-465.
- Bütikofer, P., Zollinger, M. and Brodbeck, U. (1992). Alkylacyl glycerophosphoinositol in human and bovine erythrocytes. Molecular species composition and comparison with glycosyl-inositolphospholipid anchors of erythrocyte acetylcholinesterases. *Eur. J. Biochem.*, **208**, 677-683.
- Bütikofer, P. and Brodbeck, U. (1993) Partial purification and characterization of a (glycosyl) inositol phospholipid-specific phospholipase C from peanut. *J. Biol. Chem.* **268**, 17794-17802.
- Bütikofer, P., Boschung, M., Brodbeck, U. and Menon, A.K. (1996) Phosphatidylinositol hydrolysis by *Trypanosoma brucei* glycosylphosphatidylinositol phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, **271**, 15533-15541.
- Buxbaum, L.U., Raper, J., Oppendoes, F.R. and Englund, P.T. (1994) Myristate exchange. A second glycosyl phosphatidylinositol myristoylation reaction in African trypanosomes. *J. Biol. Chem.*, **269**, 30212-30220.

- Buxbaum, L.U., Milne, K.G., Werbovetz, K.A. and Englund, P.T. (1996) Myristate exchange on the *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1178-1183.
- Camargo, M.M., Almeida, I.C., Pereira, M.E.S., Ferguson, M.A.J., Travassos, L.R. and Gazzinelli, R.T. (1997) Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiates the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol.*, **158**, 5890-5901.
- Campbell, D.G., Gagnon, J., Reid, K.B.M. and Williams, A.F. (1981) Rat brain Thy-1 glycoprotein: the amino acid sequence, disulphide bonds and an unusual hydrophobic region. *Biochem. J.*, **195**, 15-30.
- Canivenc-Gansel, E., Imhof, I., Reggiori, F., Burda, P., Conzelmann, A. and Benachour, A. (1998) GPI anchor biosynthesis in yeast: phosphoethanolamine is attached to the alpha1,4-linked mannose of the complete precursor glycopospholipid. *Glycobiology*, **8**, 761-770.
- Capaldi, R. A. (1982) *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 292-295.
- Cardoso de Almeida, M.L. and Turner, M.J. (1983) The membrane form of variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. *Nature*, **302**, 349-352.
- Cardoso de Almeida, M.L. and Heise, N. (1993) Proteins anchored via glycosylphosphatidylinositol and solubilizing phospholipases in *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Res.*, **26**, 285-312.
- Castellani, O., Ribeiro, L.V. and Fernandes, J.F. (1967) Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Protozool.*, **14**, 447-454.
- Chaudhary, S.K., and Hernandez, O. (1979) A simplified procedure for the preparation of triphenylmethylethers. *Tetrahedron Lett.*, **2**, 95-98.
- Chen, C.-S. and Sih, C.J. (1989) General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic media. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 695-707.
- Chen, R., Walter, E., Parker, G., Lapurga, J., Millan, J., Ikehara, Y., Udenfriend, S. and Medof, M. (1998) Mammalian glycoposphatidylinositol anchor transfer to proteins and posttransfer deacylation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **95**, 9512-9517.
- Clayton C.E. and Mowatt, M.R. (1989) The procyclic acidic repetitive proteins of *Trypanosoma brucei*. Purification and post-translational modification. *J. Biol. Chem.*, **264**, 15088-15093.
- Colli, W. (1979) Chagas disease. In: Wallach DFH (ed) The membrane pathobiology of tropical disease. Schwabe. Basel. pp 131-153 (Tropical research Series).
- Contreras, V.T., Morel, C.M. and Goldemberg, S. (1985) Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma* metacyclogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **14**, 83-96.
- Conzelmann, A., Spiazzi, A. and Bron, C. (1987) Glycolipid anchors are attached to Thy-1 glycoprotein rapidly after translation. *Biochem. J.*, **246**, 605-610.

- Conzelmann, A., Puoti, A., Lester, R.L. and Desponds, C. (1992) Two different types of lipid moieties are present in glycosphosphoinositol-anchored membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **11**, 457-466.
- Costello, L.C. and Orlean, P. (1992) Inositol acylation of a potential glycosyl phosphoinositol anchor precursor from yeast requires acyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.* **267**, 8599-8603.
- Cottaz, S., Brimacombe, J.S. and Ferguson, M.A.J., (1995) Parasite glycoconjugates. Synthesis of substrate analogues of early intermediates in the biosynthetic pathway of glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1673-1678.
- Couto, A.S., Lederkremer, R.M., Colli, W. and Manso Alves, M.J. (1993) The glycosylphosphatidylinositol anchor of the trypomastigote-specific Tc-85 glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. Metabolic-labelling and structural studies. *Eur. J. Biochem.* **217**, 597-602.
- Cross, G.A.M. (1990) Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **6**, 1-39.
- Cross, G.A.M. and Takle, G.B. (1993) The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 385-411
- Da Silveira, J.F. and Colli, W. (1981) Chemical composition of the plasma membrane from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta*, **644**, 341-350.
- Davitz, M.A., Hereld, D., Shak, S., Krakow, J., Englund, P.T. and Nussenzweig, V. (1987) A glycan-phosphatidylinositol-specific phospholipase D in human serum. *Science*, **238**, 81-84.
- DeGasperi, R., Thomas, L.J., Sugiyama, E., Chang, H.M., Beck, P.J., Orlean, P., Albright, C., Waneck, G., Sambrook, J.F., Warren, C.D. and Yeh, E.T.H. (1990) Correction of a defect in mammalian GPI anchor biosynthesis by a transfected yeast gene. *Science*, **250**, 988-991.
- de Mesquita, J.F., Paschoalin, V.M. and Panek, A.D. (1997) Modulation of trehalase activity in *Saccharomyces cerevisiae* by an intrinsic protein. *Biochim Biophys. Acta.*, **1334**, 233-239.
- Deschenes, R.J., Resh, M.D. and Broach, J.R. (1990) Acylation and prenylation of proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2**, 1108-
- Dickson, R.C., Nagiec, E.E., Skrzypek, M., Tillman, P., Wells, G.B. and Lester, R.L. (1997) Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 30196-30200.
- Dickson, R.C. (1998) Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison to mammals *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 27-48.
- Dickson, R.C. and Lester, R.L. (1999a) Yeast sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1426**, 347-357.
- Dickson, R.C. and Lester, R.L. (1999b) Metabolism and selected functions of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1438**, 305-321.

- Dobrowsky, R.T. and Hannun, Y.A. (1992) Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 5048-5051.
- Doering, T.L., Masterson, W.J., Englund, P.T. and Hart, G.W. (1989) Biosynthesis of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of the Trypanosome variant surface glycoprotein. Origin of the non-acetylated glucosamine. *J. Biol. Chem.*, **264**, 11168-11173.
- Doering, T.L., Raper, J., Buxbaum, L.U., Adams, S.P., Gordon, J.I., Hart, G.W. and Englund, P. (1991). An analog of myristic acid with selective toxicity for African trypanosomes. *Science*, **252**, 1851-1854.
- Doering, T.L., Pessin, M.S., Hart, G.W., Raben, D.M. and Englund, P.T. (1994) The fatty acids in unremodelled trypanosome glycosyl-phosphatidylinositols. *Biochem. J.*, **299**, 741-746.
- Doerrler, W.T., Ye, J., Falck, J.R. and Lehrman, M.A. (1996) Acylation of glucosaminyl phosphatidylinositol revisited. *J. Biol. Chem.*, **271**, 27031-27038.
- Doery, H.M., Magnusson, B.J., Gulasekharan, J. and Pearson, J.E. (1965) The properties of phospholipase enzymes in staphylococcal toxins. *J. Gen. Microbiol.*, **40**, 283-296.
- Dordick, S.J. (1992) Designing enzymes for use in organic solvents. *Biotechnol. Prog.*, **8**, 259-267.
- Dvorak, J.A. and Crane, M.S. (1981) Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites. *Science*, **214**, 1034-1036.
- Engstler, M., Reuter, G. and Schauer, R. (1992). Purification and characterization of a novel sialidase found in procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **54**, 21-30.
- Esteves, M.G., Gonzales-Perdomo, M., Alviano, C.S., Angluster, J. and Goldenberg, S. (1989) Changes in fatty acid composition associated with differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **59**, 31-34.
- Etges, R., Bouvier, J and Bordier, C. (1986) The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is anchored in the membrane by a myristic acid-labeled phospholipid. *EMBO J.*, **5**, 597-601.
- Exton, J.H. (1990) Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem.*, **265**, 1-4.
- Faber, K and Riva, S. (1992) Enzyme-catalyzed irreversible acyl transfer. *Synthesis*, **10**, 895-910.
- Fankhauser, C., Homans, S.W., Thomas-Oates, J.E., McConville, M.J., Desponds, C., Conzelmann, A. and Ferguson, M.A.J. (1993) Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**, 26365-26374.
- Ferguson, M.A.J. and Cross, G.A.M. (1984) Myristylation of the membrane form of a *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **259**, 3011-3015.
- Ferguson, M.A.J., Haldar, K. and Cross, G.A.M. (1985a) *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein has a *sn*-1,2-dimyristyl glycerol membrane anchor at its COOH terminus. *J. Biol. Chem.*, **260**, 4963-4968.

- Ferguson, M.A.J., Low, M.G. and Cross, G.A.M. (1985b) Glycosyl-*sn*-1,2-dimyristoyl-phosphatidylinositol is covalently linked to *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **260**, 14547-14555.
- Ferguson, M.A.J., Duszenko, M., Lamont, G.S., Overath, P. and Cross, G.A.M. (1986) Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. N-glycosylation and addition of a phosphatidylinositol membrane anchor. *J. Biol. Chem.*, **261**, 356-363.
- Ferguson, M.A.J. and Williams, A.F. (1988). Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 285-320.
- Ferguson, M.A.J., Homans, S.W., Dwek, R.A. and Rademacher, T.W. (1988) Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science*, **239**, 753-759.
- Ferguson, M.A.J (1991) Lipid anchors in membrane proteins. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **1**, 522-529.
- Ferguson, M.A.J. (1993) GPI membrane anchors: isolation and analysis. In: Glycobiology. A practical approach. Ed. Fukuda & Kobata. Oxford University Press.
- Ferguson, M.A.J, Murray, P., Rutherford, H. and McConville, M.J. (1993) A simple purification of procyclic acidic repetitive protein and demonstration of a sialylated glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. *Biochem. J.*, **291**, 51-55.
- Ferguson, M.A.J. (1997) The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **352**, 1295-1302.
- Ferguson, M.A.J. (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell Sci.*, **112**, 2799-2809.
- Ferguson, M.A.J., Brimacombe, J.S., Brown, J.R., Crossman, A., Dix, A., Field, R.A., Guther, M.L., Milne, K., Sharma, D.K. and Smith, T.K. (1999) The GPI biosynthetic pathway as a therapeutic target for African sleeping sickness. *Biochim. Biophys. Acta*, **1455**, 327-340.
- Fernandez, M.A., Muñoz-Fernandez, M.A. and Fresno, M. (1993) Involvement of β_1 -integrins in the binding and entry of *Trypanosoma cruzi* into human macrophages. *Eur. J. Immunol.*, **23**, 552-557.
- Finbow, M. and Harrison, M.A. (1997) The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem. J.*, **324**, 697-712.
- Fishbein, J.D., Dobrowsky, R.T., Bielawska, A., Garrett, S. and Hannun, Y.A. (1993). Ceramide-mediated growth inhibition and CAPP are conserved in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 9255-9261.
- Field, M.C., Menon, A.K. and Cross, G.A. (1991) A glycosylphosphatidylinositol protein anchor from procyclic stage *Trypanosoma brucei*: lipid structure and biosynthesis. *EMBO J.*, **10**, 2731-2739.

- Field, M.C., Medina-Acosta, E. and Cross, G.A. (1993) Inhibition of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Leishmania mexicana* by mannosamine. *J. Biol. Chem.*, **268**, 9570-9577.
- Fouchier, F., Bastiani, P., Baltz, T., Aunis, D. and Rougon, G. (1988) Glycosylphosphatidylinositol is involved in the membrane attachment of proteins in granules of chromaffin cells. *Biochem. J.*, **256**, 103-108.
- Fox, J.A., Duszenko, M., Ferguson, M.A.J., Low, M.G. and Cross, G.A.M. (1986) Purification and characterization of a novel glycan-phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.*, **261**, 15767-15771.
- Furuya, T., Kashuba, C., Docampo, R. and Moreno, S.N.J. (2000) A novel phosphatidylinositol-phospholipase C of *Trypanosoma cruzi* that is lipid modified and activated during trypomastigote to amastigote differentiation. *J. Biol. Chem.*, **275**, 6428-6438.
- Futerman, A.H., Fiorini, R.M., Roth, E., Low, M.G. and Silman, I. (1985a) Physicochemical behaviour and structural characteristics of membrane-bound acetylcholinesterase from *Torpedo* electric organ. Effect of phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem. J.*, **226**, 369-377.
- Futerman, A.H., Low, M.G., Ackerman, K.E., Sherman, W.R. and Silman, I. (1985b) Identification of covalently bound inositol in the hydrophobic membrane-anchoring domain of *Torpedo* acetylcholinesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **129**, 312-317.
- Ganong, B.R., Loomis, C.R. and Bell, R.M. (1986) Specificity and mechanism of protein kinase C activation by *sn*-1,2-diacylglycerols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1184-1188.
- Gerber, L.D., Kodukula, K. and Udenfriend, S. (1992) Phosphatidylinositolglycan (PI-G) anchored membrane proteins. Amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and PI-G attachment in the COOH-terminal signal peptide. *J. Biol. Chem.* **267**, 12168-12173.
- Gerold, p., Striepen, B., Reitter, B., Geyer, H., Geyer, R., Reinwald, E., Risse, H.J. and Schwarz, R.T. (1996) Glycosyl-phosphatidylinositols of *Trypanosoma congolense*: two common precursors but a new protein-anchor. *J. Mol. Biol.*, **261**, 181-194.
- Ghosh, S., Strum, J.C. and Bell, R.M. (1997) Lipid biochemistry: functions of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling. *FASEB J.*, **11**, 45-50.
- Glomset, J.A., Gelb, M.H. and Farnsworth, C.C. (1990) Prenyl proteins in eucaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 139-142.
- Gordon, J.I., Duronio, R.J., Rudnick, D.A., Adams, S.P. and Gokel, G.W. (1991) Protein *N*-myristoylation. *J. Biol. Chem.*, **266**, 8647-8650.
- Griffith, O.H., Volwerk, J.J. and Kuppe, A. (1991) Phosphatidylinositol-specific phospholipases C from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Methods Enzymol.*, **197**, 493-503.

- Gubicza, L. and Szakács-Schmidt, A. (1994) Effects of the reaction conditions on the enantioselective esterification using *Candida cylindracea* lipase. *Biocatalysis*, **9**, 131-143.
- Güther, M.L.S., Cardoso de Almeida, M.L., Yoshida, N. and Ferguson, M.A.J. (1992) Structural studies on the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma cruzi* 1G7-antigen. *J. Biol. Chem.*, **267**, 6820-6828.
- Güther, M.L.S., Masterson, W.J. and Ferguson, M.A.J. (1994) The effects of phenylmethylsulfonyl fluoride on inositol-acylation and fatty acid remodelling in African trypanosomes. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18694-18701.
- Güther, M.L.S. and Ferguson, M.A.J. (1995) The role of inositol acylation and inositol deacylation in GPI biosynthesis in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.*, **14**, 3080-3093.
- Güther, M.L.S., Treumann, A. and Ferguson, M.A.J. (1996) Molecular species analysis and quantification of the glycosylphosphatidylinositol intermediate glycolipid C from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **77**, 137-145.
- Hakomori, S. (1981) Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 733-764.
- Halder, K., Ferguson, M.A.J. and Cross, G.A. (1985) Acylation of a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen via *sn*-1,2-diacylglycerol. *J. Biol. Chem.*, **260**, 4969-4974.
- Halder, K., Henderson, C.L. and Cross, G.A. (1986) Identification of the parasite transferrin receptor of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes and its acylation via 1,2-diacyl-*sn*-glycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8565-8569.
- Hall, B.F., Webster, P., Ma, A.K., Joiner, K.A. and Andrews, N.W. (1992) Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *J. Exp. Med.*, **176**, 313-325.
- Hambrey, P.N., Mellors, A. and Tizard, I.R. (1981) The phospholipases of pathogenic and non-pathogenic *Trypanosoma* species. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **2**, 177-186.
- Hambrey, P.N., Forsberg, C.M. and Mellors, A. (1986) The phospholipase A₁ of *Trypanosoma brucei* does not release myristate from the variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **261**, 3229-3232.
- Hannun, Y.A. and Bell, R.M. (1986) Phorbol ester binding and activation of protein kinase C in Triton X-100 mixed micelles containing phosphatidylserine. *J. Biol. Chem.*, **261**, 9311-9317.
- Hannun, Y.A., Loomis, C.R., Merrill, A. and Bell, R.M. (1986) Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J. Biol. Chem.*, **261**, 12604-12609.
- Hannun, Y.A. and Bell, R.M. (1989) Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science*, **243**, 500-507.

- Hannun, Y.A. (1994) The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.* **269**, 3125-3128.
- Hannun, Y.A. (1997) Sphingolipid second messengers: tumor suppressor lipids. In: Eicosanoids and other bioactive lipids in cancer, inflammation and radiation injury. Ed. Honn *et al.*, Plenum Press, New York.
- Haraldsson, G.G., and Thorarensen, A. (1994) The generation of glyceryl ether lipids highly enriched with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 7681-7684.
- Haraldsson, G.G., Gudmundsson, B.O. and Almarsson, O. (1995) The synthesis of homogeneous triglycerides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase. *Tetrahedron*, **51**, 941-952.
- Hassner, A., and Alexanian, V. (1978). Direct room temperature esterification of carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.*, **46**, 4475-4478.
- Haynes, P.A., Gooley, A.A., Ferguson, M.A.J., Redmond, J.W. and Williams, K.L. (1993) Post-translational modifications of the *Dictyostelium discoideum* glycoprotein PsA. Glycosylphosphatidylinositol membrane anchor and composition of O-linked oligosaccharides. *Eur. J. Biochem.*, **216**, 729-737.
- Heise N., Cardoso de Almeida, M.L. and Ferguson, M.A.J. (1995) Characterization of the lipid moiety of the glycosylphosphatidyl anchor of *Trypanosoma cruzi* 1G7-antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **70**, 71-84.
- Heise, N., Raper, J. Buxbaum, L.U., Peranovich, T.M.S. and Cardoso de Almeida, M.L. (1996) Identification of complete precursors for the glycosylphosphatidylinositol protein anchors of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 16877-16887.
- Henriquez, D., Piras, R. and Piras, M.M. (1981) The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **2**, 359-366.
- Hereld, D., Krakow, J.L., Bangs, J.D., Hart, G.W. and Englund, P.T. (1986) A phospholipase C from *Trypanosoma brucei* which selectively cleaves the glycolipid on the variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **261**, 13813-13819.
- Hernandez-Munain, C., Fernandez, M.A., Alcina, A. and Fresno, M. (1991) Characterization of a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane protein from *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, **59**, 1409-1416.
- Hilley, J.D., Zawadzki, J.L., McConville, M.J., Coombs, G.H. and Mottram, J.C. (2000) *Leishmania mexicana* mutants lacking glycosylphosphatidylinositol (GPI): Protein transamidase provide insights into the biosynthesis and functions of GPI-anchored proteins. *Mol. Biol. Cell.*, **11**, 1183-1195.

- Hirose, S., Ravi, L., Hazia, S.V. and Medof, M.E. (1991) Assembly and deacetylation of *N*-acetylglucosaminyl-plasmanylinositol in normal and affected paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3760-3766.
- Hirose, S., Prince, G.M., Seveler, D., Ravi, L., Rosenberry, T.L., Ueda, E. and Medof, M.E. (1992) Characterization of putative glycoinositolphospholipid anchor precursors in mammalian cells. Localization of phosphoethanolamine. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16968-16974.
- Hirose, S., Knez, J.J. and Medof, M.E. (1995) Mammalian glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and intracellular precursors. *Methods Enzymol.*, **250**, 528-614
- Holder, A.A. and Cross, G.A.M. (1981) Glycopeptides from variant surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **2**, 135-150.
- Holder, A.A. (1983) Carbohydrate is linked through ethanolamine to the C-terminal amino acid of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Biochem. J.*, **209**, 261-262.
- Homans, S.W., Ferguson, M.A.J., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., Anand, R. and Williams, A.F. (1988) Complete structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature*, **333**, 269-272.
- Horvath, A., Sutterlin, C., Manning-Krieg, U., Mova, N.R. and Riezman, H. (1994) Ceramide synthesis enhances transport of GPI-anchored proteins to the Golgi apparatus in yeast. *EMBO J.*, **13**, 3687-3695.
- Hynes, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell*, **69**, 11-15.
- Ikezawa, H., Yamanegi, M., Taguchi, R., Miyashita, T. & Ohyabu, T. (1976) Studies on phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C type) of *Bacillus cereus*. Purification, properties and phosphatase-releasing activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **450**, 154-164.
- Ikezawa, H. and Taguchi, R. (1981) Phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Meths. Enzymol.*, **71**, 731-741.
- Ikezawa, H. (1991) Bacterial PIPLCs-unique properties and usefulness in studies on GPI anchors. *Cell Biol. Int. Rep.*, **15**, 1115-1131.
- Inverso, J.A., Medina-Acosta, E., O'Connor, J., Russell, D.G. and Cross, G.A. (1993) *Crithidia fasciculata* contains transcribed leishmanial surface proteinase (gp63) gene homologue. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **57**, 47-54.
- Jackson, D.G. and Voorheis, H.P. (1985) Release of the variable surface coat glycoprotein from *Trypanosoma brucei* requires the cleavage of a phosphate ester. *J. Biol. Chem.*, **260**, 5179-5183.
- Jacobson, K., Ishihara, A. and Inman, R. (1987) Lateral diffusion of proteins in membranes. *Ann. Rev. Physiol.*, **49**, 163-175.

- James, G. and Olson, E.N. (1990) Fatty acylated proteins as components of intracellular signaling pathways. *Biochemistry*, **29**, 2623-2634.
- Kamitani, T., Menon, A.K., Hallaq, Y., Warren, C.D. and Yeh, E.T.H. (1992) Complexity of ethanolamine phosphate addition in the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24611-24619.
- Kaneshiro, E.S., Jayasimhulu, K. and Lester, R.L. (1986) Characterization of inositol lipids from *Leishmania donovani* promastigotes: identification of an inositol sphingofosfolipid. *J. Lipid. Res.*, **27**, 1294-1303.
- Kim, J.W., Ryu, S.H. and Rhee, S.G. (1989) Cyclic and noncyclic inositol phosphates are formed at different ratios by phospholipase C isozymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 177-182.
- Kim, M.-J. and Choi, Y.K. (1992) Lipase-catalyzed enantioselective transesterification of *O*-trityl 1,2-diols. Practical synthesis of (R)-tritylglycidol. *J. Org. Chem.*, **57**, 1605-1607.
- Kirchner, G., Scollar, M.P. and Klibanov, A.M. (1985) Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 7072-7076.
- Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1980) Activation of calcium and phospholipid dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.*, **255**, 2273-2276.
- Klibanov, A.M. (1986) Enzymes that work in organic solvents. *Chem. Tech.*, **16**, 354-359.
- Klibanov, A.M. (1989) Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 141-144.
- Klibanov, A.M. (1990) Asymmetric transformation catalyzed by enzymes in organic solvents. *Acc. Chem. Res.*, **23**, 114-120.
- Kok, J.W., Nikolova-Karakashian, M., Klappe, K., Alexander, C. and Merrill, A. (1997) Dihydroceramide biology. Structure-specific metabolism and intracellular localization. *J. Biol. Chem.*, **272**, 21128-21136.
- Krakow, J.L., Hereld, D., Bangs, J.D., Hart, G.W. and Englund, P.T. (1986) Identification of a glycolipid precursor of the *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **261**, 12147-12153.
- Krakow, J.L., Doering, T.L., Masterson, W.J., Hart, G.W. and Englund, P.T. (1989) A glycolipid from *T. brucei* related to the variant surface glycoprotein membrane anchor. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **36**, 263-270.
- Kwon, S.J., Han, J.J. and Rhee, J.S. (1995) Production and *in situ* separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipases in *n*-hexane. *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 700-704.

- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. and Veeger, C. (1987) Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 81-87
- Lambeth, J.D. and Ryu, S.H. (1996) Glycerolipids in signal transduction. In: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, ed. DE Vance, JE Vance, pp. 309-339. New York: Elsevier Science.
- Lamont, G.S., Fox, J.A. and Cross, G.A. (1987) Glycosyl-*sn*-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is the membrane anchor for *Trypanosoma equiperdum* and *T. (Nannomonas) congolense* variant surface glycoproteins. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **24**, 131-136.
- Le Bel, D. and Beattie, M. (1988) The major protein of pancreatic zymogen granule membranes (GP-2) is anchored via covalent bonds to phosphatidylinositol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**, 818-823.
- Lederkremer, R.M., Alves, M.J.M., Fonseca, G.C. and Colli, W. (1976) A lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* (epimastigota). Isolation, purification and carbohydrate composition. *Biochim. Biophys. Acta*, **444**, 85-96.
- Lederkremer, R.M., Casal, O.L., Tanaka, C.T. and Colli, W. (1978) Ceramide and inositol content of the lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1268-1274.
- Lederkremer, R.M., Casal, O.L., Alves, M.J.M. and Colli, W. (1980) Evidence for the presence of D-galactofuranose in the lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.*, **116**, 25-29.
- Lederkremer, R.M., Casal, O.L., Alves, M.J.M. and Colli, W. (1985) *Trypanosoma cruzi*: Aminoacid and phosphorus linkages in the lipopeptidophosphoglycan. *Biochem. Int.*, **10**, 89-96.
- Lederkremer, R.M., Lima, C., Ramirez, M.I. and Casal, O.L. (1990) Structural features of the lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* common with the glycoposphatidylinositol anchors. *Eur. J. Biochem.*, **192**, 337-345.
- Lederkremer, R.M., Lima, C., Ramirez, M.I., Ferguson, M.A.J., Homans, S.W. and Thomas-Oates, J. (1991) Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23670-23675.
- Lederkremer, R.M., Lima, C., Ramirez, M.I., Gonçalves, M.F. and Colli, W. (1993) Hexadecylpalmitoylglycerol or ceramide is linked to similar glycophooinositol anchor-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 929-936.
- Lederkremer, R.M., Lima, C. and Vila M.C. (1996) Ceramide 1-phosphate is released from a glycoinositol-phosphoceramide of *Trypanosoma cruzi* by rat blood plasma. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **79**, 219-223.
- Leeden, R.W. and Yu, R.K. (1982) Gangliosides: structure, isolation and analysis. *Methods Enzymol.*, **83**, 139-191.

- Leon, W., Monteiro, A.M., Alviano, C.S., Esteves, M.J.G. and Angluster, J. (1989) Fatty acid composition of amastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, **46**, 131-136.
- Lester, R.L. and Dickson, R.C. (1993) Sphingolipids with inositolphosphate-containing head groups. *Adv. Lipid Res.*, **26**, 253-274.
- Ley, V., Andrews, N.W., Robbins, E.S. and Nussenzweig, V. (1988) Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J. Exp. Med.*, **168**, 649-659.
- Lisanti, M.P., Field, M.C., Caras, I.W., Menon, A.K. and Rodriguez-Boulán, E. (1991) Mannosamine, a novel inhibitor of glycosylphosphatidylinositol incorporation into proteins. *EMBO J.*, **10**, 1969-1977.
- Liscovitch, M. (1992) Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases. *TIBS*, **17**, 393-399.
- Lohman, K.L., Langer, P.J. and McMahon-Pratt, D. (1990) Molecular cloning and characterization of the immunologically protective surface glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8393-8397.
- Low, M.G. and Finean, L.B. (1976) The action of phosphatidylinositol-specific phospholipase C on membranes. *Biochem. J.*, **154**, 203-208.
- Low, M.G. and Finean, L.B. (1977a) Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem. J.*, **167**, 281-284.
- Low, M.G. and Finean, L.B. (1977b) Modification of erythrocyte membranes by a purified phosphatidylinositol-specific phospholipase C (*Staphylococcus aureus*). *Biochem. J.*, **162**, 235-240.
- Low, M.G. and Zilversmit, D.B. (1980) Role of phosphatidylinositol in attachment of alkaline phosphatase to membranes. *Biochemistry*, **19**, 3913-3918.
- Low, M.G., (1981) Phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Staphylococcus aureus*. *Meths. Enzymol.*, **71**, 741-746.
- Low, M.G., Ferguson, M.A.J., Futerman, A.H. and Silman, I. (1986) Covalently attached phosphatidylinositol as a hydrophobic anchor for membrane proteins. *TIBS*, **11**, 212-214.
- Low, M.G. and Prasad, A.R.S. (1988) A phospholipase D specific for the phosphatidylinositol anchor of cell-surface proteins is abundant in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 980-984.
- Low, M.G., Stiernberg, J., Waneck, G.L., Flavell, R.A. and Kincade, P.W. (1988) Cell-specific heterogeneity in sensitivity of phosphatidylinositol-anchored membrane antigens to release by phospholipase C. *J. Immunol. Meths.*, **113**, 101-111.
- Low, M.G. (1989a) The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **988**, 427-454.

- Low, M.G. (1989b) Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins. *FASEB J.*, **3**, 1600-1608.
- MacCoss, M. and Cameron, D.J. (1978) Facile detritylation of nucleoside derivatives by using trifluoroacetic acid. *Carbohydrate Res.*, **60**, 206-209.
- Majerus, P.W., Connolly, T.M., Deckmyn, H., Ross, T.S., Bross, T.E., Ishi, H., Vinay, S.B. and Wilson, D.B. (1986) The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science*, **234**, 1519-1526.
- Malik, A.S. and Low, M.G. (1986) Conversion of human placental alkaline phosphatase from a high Mr form to a low Mr form during butanol extraction. An investigation of the role of endogenous phosphoinositide-specific phospholipases. *Biochem. J.*, **240**, 519-527.
- Maltese, W.A. (1990) Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J.*, **4**, 3319-3328.
- Manku, M.S. (1983) A comparison of GLC and HPLC methods for determining fatty acid composition of evening primrose and soybean oil. *J. Chrom. Sci.*, **21**, 367-369.
- Masterson, W.J., Doering, T.L., Hart, G.W. and Englund, P.T. (1989) A novel pathway for glycan assembly: biosynthesis of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of the Trypanosome variant surface glycoprotein. *Cell*, **56**, 793-800.
- Masterson, W.J., Raper, J., Doering, T.L., Hart, G.W. and Englund, P.T. (1990) Fatty acid remodelling: a novel reaction sequence in the biosynthesis of trypanosome glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Cell*, **62**, 73-80.
- Masterson, W.J. and Ferguson, M.A.J. (1991) Phenylmethanesulphonyl fluoride inhibits GPI anchor biosynthesis in the african trypanosome. *EMBO J.*, **10**, 2041-2045.
- Mathias, S., Dressler, K.A. and Kolesnick, R.N. (1991) Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10009-10013.
- Mayor, S., Menon, A.K., Cross, G.A., Ferguson, M.A.J., Dwek, R.A. and Rademacher, T.W. (1990a) Glycolipid precursors for the membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. I. Glycan structure of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C sensitive and resistant glycolipids. *J. Biol. Chem.*, **265**, 6164-6173.
- Mayor, S., Menon, A.K. and Cross, G.A. (1990b) Glycolipid precursors for the membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. II. Lipid structures of phosphatidylinositol-specific phospholipase C sensitive and resistant glycolipids. *J. Biol. Chem.*, **265**, 6174-6181.
- Mayor, S., Menon, A.K. and Cross, G.A. (1991) Transfer of glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors to polypeptide acceptors in a cell-free system. *J. Cell Biol.*, **114**, 61-71.

- McConville, M.J., Basic, A., Mitchell, G.F. and Handman, E. (1987) Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8941-8945.
- McConville, M.J. and Ferguson, M.A.J. (1993) The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.*, **294**, 305-324.
- McGovern, U.B., Jones, K.T. and Sharpe, C.R. (1995) Intracellular calcium as a second messenger following growth stimulation of human keratinocytes. *Br. J. Dermatol.*, **132**, 892-896.
- Medof, M.E., Walter, E.I., Roberts, W.L., Haas, R. and Rosenberry, T.L. (1986) Decay accelerating factor of complement is anchored to cells by a C-terminal glycolipid. *Biochemistry*, **25**, 6740-6747.
- Meldrum, E., Parker, P.J. and Carozzi, A. (1991) The PtdIns-PLC superfamily and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta*, **1092**, 49-71.
- Menon, A.K., Schwarz, R.T., Mayor, S. and Cross, G.A.M. (1990a). Cell-free synthesis of glycosylphosphatidylinositol precursors for the glycolipid membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. Structural characterization of putative biosynthetic intermediates. *J. Biol. Chem.* **265**, 9033-9042.
- Menon, A.K., Mayor, S. and Schwarz, R.T. (1990b) Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol lipids in *Trypanosoma brucei*: involvement of mannosyl-phosphoryldolichol as the mannose donor. *EMBO J.*, **9**, 4249-4258.
- Menon, A.K. and Stevens, V.L. (1992) Phosphatidylethanolamine is the donor of the ethanolamine residue linking a glycosylphosphatidylinositol anchor to protein. *J. Biol. Chem.*, **267**, 15277-15280.
- Menon, A.K., Eppinger, M., Mayor, S. and Schwarz, R.T. (1993) Phosphatidylethanolamine is the donor of the terminal phosphoethanolamine group in trypanosome glycosylphosphatidylinositols. *EMBO J.*, **12**, 1907-1914.
- Merrill, A.H. (1991) Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **23**, 83-104.
- Merrill, A.H. and Wang, E. (1992) Enzymes of ceramide biosynthesis. *Methods Enzymol.*, **209**, 427-437.
- Merrill, A.H. and Sweeley, C.C. (1996) In: Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes, ed. DE Vance, JE Vance, pp. 309-339. New York: Elsevier Science.
- Meusel, D., Weber, N. and Mukherjee, K. D. (1992) Stereoselectivity of lipases: esterification reactions of octadecylglycerol. *Chem. Phys. Lipids*, **61**, 193-198.
- Milder, R. and Kloetzel, J. (1980) The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages in vitro. Interaction with host cell lysosomes and host cell fate. *Parasitology*, **80**, 139-145.

- Miller, C., Austin, H., Posorske, L. and Gonzalez, J. (1988) Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 927-931.
- Millqvist, A., Aldercreutz, P. and Mattiasson, B. (1994) Lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides for the preparation of 2-monoglycerides. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 1042-1047.
- Milne, K.G., Field, R.A., Masterson, W.J., Cottaz, S., Brimacombe, J.S. and Ferguson, M.A.J. (1994) Partial purification and characterization of the *N*-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol de-*N*-acetylase of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in African trypanosomes. *J. Biol. Chem.*, **269**, 16403-16408.
- Ming, M., Chuenkova, M., Ortega-Barria, E. and Pereira, M.E.A. (1993) Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and *trans*-sialidase on the trypanosome. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **59**, 243-252.
- Molyneux, D.H. and Ashford, R.W. (1983) The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. Taylor and Francis, eds. Londres.
- Moreno, S.N.J., Silva, J., Vercesi, A.E. and Docampo, R. (1994) Cytosolic free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J. Exp. Med.*, **180**, 1535-1540.
- Morita, Y.S., Acosta-Serrano, A., Buxbaum, L.U. and Englund, P.T. (2000) Glycosyl phosphatidylinositol myristoylation in african trypanosomes. *J. Biol. Chem.*, **275**, 14147-14154.
- Morris, J.C., Lei, P.-S., Shen, T.Y. and Mensa-Wilmot, K. (1995) Glycan requirements of glycosylphosphatidylinositol phospholipase C from *Tyrrpanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 2517-2524.
- Murray, P.J., Spithill, T.W. and Handman, E. (1989) The PSA-2 glycoprotein complex of *Leishmania major* is a glycosylphosphatidylinositol-linked promastigote surgace antigen. *J. Immunol.*, **143**, 4221-4226.
- Myher, J.J., Marai, L. and Kuksis, A. (1974) Identification of monoacyl- and monoalkylglycerols by gas-liquid chromatography-mass spectrometry using polar siloxane liquid phase. *J. Lipid. Res.* **15**, 586-592.
- Nakamura, N., Inoue, N., Watanabe, R., Takahashi, M., Takeda, J., Stevens, V.L. and Kinoshita, T. (1997) Expression cloning of PIG-L, a candidate *N*-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol deacetylase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15834-15840.
- Nishizuka, Y. (1984) Turnover of inositolphospholipids and signal transduction. *Science*, **225**, 1365-1370.
- Nogueira, N and Cohn, Z. (1976) *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.*, **143**, 1402-1420.

- Nozaki, T., Toh-e, A., Fujii, M., Yagisawa, H., Nakazawa, M. and Takeuchi, T. (1999) Cloning and characterization of a gene encoding phosphatidyl inositol-specific phospholipase C from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **102**, 283-295.
- Nwaka, S., Kopp, M. and Holzer, H. (1995) Expression and function of the trehalase genes NTH1 and YBR0106 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 10193-10198.
- Obeid, M., Linardic, C.M., Karolak, L.A. and Hannun, Y.A. (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science*, **259**, 1769-1771.
- Ogawa, T., and Horisaki, T. (1983) Synthesis of 2-*O*-hexadecanoyl-1-*O*-hexadecyl-[α -Glc-6SO₃Na-(1-6)- α -Glc-(1-6)- α -Glc-(1-3)]-sn-glycerol: a proposed structure for the glyceroglucolipids of human gastric secretion and of the mucous barrier of rat-stomach antrum. *Carbohydr. Res.*, **123**, C1-C4.
- Olivera, A., Buckley, N.E. and Spiegel, S. (1992) Sphingomyelinase and cell-permeable ceramide analogs stimulate cellular proliferation in Quiescent Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **267**, 26121-26127.
- Opperdoes, F.R. and Van Roy, J. (1982) The phospholipases of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and cultured procyclics. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **5**, 309-319.
- Orlandi, P.A. and Turco, S.J. (1987) Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J. Biol. Chem.*, **262**, 10384-10391.
- Orlean, P. (1990) Dolichol phosphate mannosyl synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, *O* mannosylation, and *N* glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **10**, 5796-5805.
- Pan, Y.T., Kamitani, T., Bhuvaneshwaran, C., Hallaq, Y., Warren, C.D., Yeh, E.T. and Elbein, A.D. (1992) Inhibition of glycosylphosphatidylinositol anchor formation by mannosamine. *J Biol Chem* **267**, 21250-21255.
- Parodi, A.J. and Leloir, L.F. (1979) The role of lipid intermediates in the glycosylation of proteins in the eukaryotic cell. *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 1-37.
- Parodi, A.J. and Cazzulo, J.J. (1982) Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi*. Partial characterization of protein-bound oligosaccharides labeled *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7641-7645.
- Parodi, A.J. and Quesada-Allue, L.A. (1982) Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi*. Characterization of dolichol-bound monosaccharides and oligosaccharides synthesized *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7637-7640.
- Parodi, A.J., Lederkremer, G.Z. and Mendelzon, D.H. (1983) Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi*. The mechanism of glycosylation and structure of protein-bound oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5589-5595.

- Pastor, E., Otero, C. and Ballesteros, A. (1995) Enzymatic preparation of mono- and di-stearin by glycerolysis of ethyl stearate and direct esterification of glycerol in the presence of a lipase from *Candida Antarctica* (novozym 435). *Biocatalysis and Biotransformation*, **12**, 147-157.
- Patnaik, P.K., Field, M.C., Menon, A.K., Cross, G.A.M., Yee, M.C. and Bütikofer, P. (1993) Molecular species analysis of phospholipids from *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic forms. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **58**, 97-106.
- Patton, J.L., Srinivasan, B., Dickson, R.C. and Lester, R.L. (1992) Phenotypes of sphingolipid-dependent strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **174**, 7180-7184.
- Pereira, M.E., Mejia, J.S., Ortega-Barria, E., Matzilevich, D. and Prioli, R.P. (1991) The *Trypanosoma cruzi* neuraminidase contains sequences similar to bacterial neuraminidase, YWTD repeats of the low density lipoprotein receptor, and type III modules of fibronectin. *J. Exp. Med.*, **174**, 179-191.
- Piras, R., Henriquez, D. and Piras, M.M. (1980) Studies on host-parasite interactions: role of fibroblastic cell surface functions and *Trypanosoma cruzi* forms in the invasion process. In: Host-Invader Interplay, van den Bosche, H. (ed), Elsevier/North Holland Biomedical, Amsterdam, pp 131-134.
- Piras, R., Piras, M.M. and Henriquez, D. (1983) *Trypanosoma cruzi*-fibroblastic cell interaction necessary for cellular invasion. In: Cytopathology of parasitic disease. Pitman, London, pp 31-55 (Ciba foundation symposium 99).
- Pollevick, G. D., Affranchino, J. L., Frasch, A. C. C. & Sánchez, D. O. (1991) The complete sequence of a shed acute-phase antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **47**, 247-250.
- Pollevick, G.D., Di noia, J.M., Salto, M.L, Lima, C., Leguizamón, M.S., Lederkremer, R.M. and Frasch, A. (2000) *Trypanosoma cruzi* surface mucins with exposed variant epitopes. *J. Biol. Chem.* (en prensa)
- Previato, J.O., Gorin, P.A.J., Mazurek, M., Xavier, M.T., Fournet, B., Wieruszkesk, J.M. and Mendonça-Previato, L. (1990) Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 2518-2526.
- Previato, J.O., Jones, C., Xavier, M.T., Wait, R., Travassos, L.R., Parodi, A.J. and Mendonça-Previato, L. (1995) Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. *J. Biol. Chem.*, **270**, 7241-7250.
- Puoti, A., Desponds, C., Fankhauser, C. and Conzelmann, A (1991) Characterization of glycophospholipid intermediate in the biosynthesis of glycophosphatidylinositol anchors accumulating in the Thy-1negative lymphoma line SIA-b. *J. Biol. Chem.*, **266**, 21051-21059.

- Puoti, A. and Conzelmann, A. (1992) Structural characterization of free glycolipids which are potential precursors for glycosylphosphatidylinositol anchors in mouse thymoma cell lines. *J. Biol. Chem.*, **267**, 22673-22680.
- Puoti, A. and Conzelmann, A. (1993) Characterization of abnormal free glycosylphosphatidylinositols accumulating in mutant lymphoma cells of classes B, E, F, and H. *J. Biol. Chem.*, **268**, 7215-7224.
- Quesada-Allue, L.A. and Parodi, A.J. (1983) Novel mannose carrier in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata* behaving as a short alpha-saturated polyprenylphosphate. *Biochem. J.*, **212**, 123-128.
- Racagni, G., García de Lema, M., Domenech, C.E. and Machado de Domenech, E.E. (1992) Phospholipids in *Trypanosoma cruzi*: Phosphoinositide composition and turnover. *Lipids*, **27**, 275-278.
- Ralton, J.E., Milne, K.G., Guthrie, M.L., Field, R.A. and Ferguson, M.A.J. (1993) The mechanism of inhibition of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in *Trypanosoma brucei* by mannosamine. *J. Biol. Chem.*, **268**, 24183-24189.
- Ralton, J.E. and McConville, M.J. (1998) Delineation of three pathways of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Leishmania mexicana* precursors from different pathways are assembled on distinct pools of phosphatidylinositol and undergo fatty acid remodeling. *J. Biol. Chem.*, **273**, 4245-4257.
- Ramirez, M.I., Ruiz, R., Araya, J.E., da Silveira, J.F. and Yoshida, N. (1993) Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infect. Immun.*, **61**, 3636-3641.
- Reggiori, F., Canivenc-Gansel, E. and Conzelmann, A. (1997) Lipid remodeling leads to the introduction and exchange of defined ceramides on GPI proteins in the ER and Golgi of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **16**, 3506-3518.
- Reggiori, F. and Conzelmann, A. (1998) Biosynthesis of inositol phosphoceramides and remodeling of glycosylphosphatidylinositol anchors in *Saccharomyces cerevisiae* are mediated by different enzymes. *J. Biol. Chem.*, **273**, 30550-30559.
- Rhee, S.G., Suh, P.G., Ryu, S.H. and Lee, S.Y. (1989) Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science*, **244**, 546-550.
- Roberts, W.L. and Rosenberry, T.L. (1985) Identification of covalently attached fatty acids in the hydrophobic membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **133**, 621-627.
- Roberts, W.L., Kim, B.H. and Rosenberry, T.L. (1987) Differences in the glycolipid membrane anchor of bovine and human erythrocyte acetylcholinesterases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 608-611.

- Roberts, W.L., Santikarn, S., Reinhold, V.N. and Rosenberry, T.L. (1988a) Characterization of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase by fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, **263**, 18776-18784.
- Roberts, W.L., Myher, J.J., Kuksis A. and Rosenberry T.L. (1988b) Alkylacylglycerol molecular specifies in the glycosylinositol phospholipid membrane anchor of bovine erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **150**, 271-277.
- Rosenberg, I., Prioli, R.P., Ortega-Barria, E. and Pereira, M.E.A. (1991) Stage-specific phospholipase C-mediated release of *Trypanosoma cruzi* neuraminidase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **46**, 303-306.
- Rosenwald, A.G. and Pagano, R.E. (1993) Inhibition of glycoprotein traffic through the secretory pathway by ceramide. *J. Biol. Chem.*, **268**, 4577-4579.
- Ross, C.A., Cardoso de Almeida, M.L. and Turner, M.J. (1987). Variant surface glycoproteins of *Trypanosoma congolense* bloodstream and metacyclic forms are anchored by a glycolipid tail. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **22**, 153-158.
- Rother, J., van Echten, G., Schwarzmann, G. and Sandhoff, K. (1992) Biosynthesis of sphingolipids: dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**, 14-20.
- Ruiz, R., Rigoni, V.L., Gonzalez, J. and Yoshida, N. (1993) The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in cell invasion. *Parasite Immunol.*, **15**, 121-125.
- Salto, M.L., Bertello, L.E. and Lederkremer, R.M. (1997) Chemo-enzymatic synthesis of 1-O-hexadecyl-2-O-palmitoyl-*sn*-glycerol. *Biotech. Lett.*, **19**, 853-855.
- Samuelsson, B. and Samuelsson, K. (1969) Gas-liquid chromatography-mass spectrometry of synthetic ceramides. *J. Lipid Res.*, **10**, 41-46.
- Sandhoff, K. and van Echten, G. (1993) Ganglioside metabolism-topology and regulation. *Adv. Lipid Res.*, **26**, 119-142.
- Schell, D., Evers, R., Preis, D., Ziegelbauer, K., Kiefer, H., Lottspeich, F, Cornelissen, A.W. and Overath, P. (1991) A transferrin-binding protein of *Trypanosoma brucei* is encoded by one of the genes in the variant surface glycoprotein gene expression site. *EMBO J.*, **10**, 1061-1066.
- Schenkman, S., Andrews, N.W., Nussenzweig, V. and Robbins, E. (1988a) *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. *Cell*, **55**, 157-165.
- Schenkman, S., Yoshida, N. and Cardoso de Almeida, M.L. (1988b) Glycophosphatidylinositol-anchored proteins in metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **29**, 141-152.

- Schenkman, S., Robbins, E. and Nussenzweig, V. (1991) Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. *Infect. Immun.*, **59**, 645-654.
- Schenkman, S., Pontes de Carvalho, L. and Nussenzweig, V. (1992) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *J. Exp. Med.*, **175**, 567-575.
- Schenkman, R.P.S., Vandekerckhove, F. and Schenkman, S. (1993a) Mammalian cell sialic acid enhances *Trypanosoma cruzi* invasion. *Infect. Immun.*, **61**, 898-902.
- Schenkman, S., Ferguson, M.A.J., Heise, N., Cardoso de Almeida, M.L., Mortara, R.A. and Yoshida, N. (1993b) Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **59**, 293-304.
- Schmidt, M.F.G. (1989) Fatty acylation of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **988**, 411-426.
- Schmitz, B., Klein, R.A., Duncan, I.A., Egge, H., Gunawan, J., Peter-Katalinic, J. and Dabrowski, U. (1987) MS and NMR analysis of the cross-reacting determinant glycan from *Trypanosoma* MITat 1.6 variant specific glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **146**, 1055-1063.
- Schneider, P., Ferguson, M.A.J., McConville, M.J., Mehlert, A., Homans, S.W. and Bordier, C. (1990) Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the *Leishmania major* promastigote surface protease. *J. Biol. Chem.*, **265**, 16955-16964.
- Schneider, P. and Glaser, T.A. (1993) Characterization of a surface metalloprotease from *Herpetomonas samuelpessoai* and comparison with *Leishmania major* promastigote surface protease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **58**, 277-282.
- Schwarz, R.T. and Datema, R. (1982) Inhibition of the dolichol pathway of protein glycosylation. *Meth. Enzymol.*, **83**, 432-443.
- Shak, S., Davitz, M.A., Wolinsky, m.L., Nussenzweig, V., Turner, M.J. and Gurnett, A. (1988) Partial characterization of the cross-reacting determinant, a carbohydrate epitope shared by decay-accelerating factor and the variant surface glycoprotein of the African *Trypanosoma brucei*. *J. Immunol.*, **140**, 2046-2050.
- Sharma, D.K., Smith, T.K., Crossman, A., Brimacombe, J.S. and Ferguson, M.A.J. (1997) The substrate specificity of the *N*-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol de *N*-acetylase of glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor biosynthesis in African trypanosomes and human cells. *Biochem. J.*, **328**, 171-177.

- Sharma, D.K., Smith, T.K., Weller, C.T., Crossman, A., Brimacombe, J.S. and Ferguson, M.A.J. (1999) Differences between the trypanosome and human GlcNAc-PI de-N-acetylases of glycosylphosphatidylinositol membrane anchor biosynthesis. *Glycobiology*, **9**, 415-422.
- Singh, B.N., Costello, C.E., Beach, D.H. and Holz Jr., G.G. (1988) Di-O-alkylglycerol, mono-O-alkylglycerol and ceramide inositol phosphates of *Leishmania mexicana mexicana* promastigotes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 1239-1246.
- Singh, N and Tartakoff, A.M. (1991) Two different mutants blocked in synthesis of dolicholphosphoryl-mannose do not add glycosylphospholipid anchors to membrane proteins: Quantitative correction of the phenotype of a CHO cell mutant with tunicamycin. *Mol. Cell Biol.*, **11**, 391-400.
- Sipos, G., Puoti, A., and Conzelmann, A. (1994) Glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: absence of ceramides from complete precursor glycolipids. *EMBO J.*, **13**, 2789-2796.
- Sipos, G., Reggiori, F., Vionnet, C. and Conzelmann, A. (1997) Alternative lipid remodelling pathways for glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **16**, 3494-3505.
- Sjursnes, B.J. and Anthonsen, T. (1994) Acyl migration in 1,2-dibutylin. Dependence on solvent and water activity. *Biocatalysis*, **9**, 285-297.
- Skrzypek, M., Lester, R.L. and Dickson, R.C. (1997) Suppressor gene analysis reveals an essential role for sphingolipids in transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **179**, 1513-1520.
- Slein, M.W. and Logan, G.F. (1965) Characterization of the phospholipases of *Bacillus cereus* and their effects on erythrocytes, bone and kidney cells. *J. Bacteriol.*, **90**, 69-81.
- Smith, T.K., Milne, F., Sharma, D.K., Crossman, A., Brimacombe, J.S. and Ferguson, M.A.J (1997) Early steps in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Leishmania major*. *Biochem. J.*, **326**, 393-400.
- Smythe, J.A., Coppel, R.L., Brown, G.V., Ramasamy, R., Kemp, D.J. and Anders, R.F. (1988) Identification of two integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5195-5199.
- Stadler, J., Keenan, T.W., Bauer, G. and Gerish, G. (1989) The contact site A glycoprotein of *Dictyostelium discoideum* carries a phospholipid anchor of a novel type. *EMBO J.* **8**, 371-377.
- Stevens, V.L. and Raetz, C.R.H. (1991) Defective glycosyl phosphatidylinositol biosynthesis in extracts of three Thy-1 negative lymphoma cell mutants. *J. Biol. Chem.*, **266**, 10039-10042.
- Stevens, V.L. (1993) Regulation of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis by GTP. Stimulation of N-acetylglucosamine-phosphatidylinositol deacetylation. *J Biol Chem.*, **268**, 9718-9724

- Stevens, V.L. and Zhang, H. (1994) Coenzyme A dependence of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in a mammalian cell-free system. *J Biol Chem.*, **269**, 31397-31403
- Stevens, V.L. (1995) Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Biochem. J.*, **310**, 361-670.
- Stieger, S. and Brodbeck, U. (1991) Glycosyl-phosphatidylinositol anchored acetylcholinesterase as a substrate for phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Biochimie*, **73**, 1179-1186.
- Subrahmanyam, C., Venkateswara Rao, C., Anjaneyulu, V., Satyanarayana, P., Subba Rao, P.V., Ward, R.S. and Pelter, A. (1992) New diterpenes from a new species of lobophytum soft coral of the South Andaman coast. *Tetrahedron*, **48**, 3111-3120.
- Sugita, M., Williams, M., Dulaney, J.T. and Moser, H.W. (1975) Ceramidase and ceramide synthesis in human kidney and cerebellum. Description of a new alkaline ceramidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 125-131.
- Sugiyama, E., DeGasperi, R., Urakaze, M., Chang, H., Thomas, L.J., Hyman, R., Warren, C.D. and Yeh, E.T.H. (1991) Identification of defects in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in the Thy-1 expression mutants. *J. Biol. Chem.*, **266**, 12119-12122.
- Sundler, R., Alberts, A.W. and Vagelos, P.R. (1978) Enzymatic properties of phosphatidyl-inositol inositol-phosphohydrolase from *Bacillus cereus*. Substrate dilution in detergent-phospholipid micelles and bilayer vesicles. *J. Biol. Chem.*, **253**, 4175-4179.
- Sütterlin, C., Escribano, M., Gerold, P., Maeda, Y., Mazon, M. Kinoshita, T., Schwarz, R. and Riezman, H. (1998) *Saccharomyces cerevisiae* GPI10, the functional homologue of human PIG-B, is required for glycosylphosphatidylinositol-anchor synthesis. *Biochem. J.*, **332**, 153-159
- Sweeley, C.C. (1994) Lipids and the modulation of cell function. *Current Topics in Membranes* **40**, 357-360.
- Taguchi, R. and Ikezawa, H. (1978) Phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Clostridium novyi* Type A. *Archives Biochem. Biophys.*, **186**, 196-201.
- Taguchi, R., Asahi, Y. and Ikezawa, H. (1980) Purification and properties of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 48-57.
- Takami, N., Ogata, S., Oda, K., Misumi, Y. and Ikehara, Y. (1988) Biosynthesis of placental alkaline phosphatase and its post-translational modification by glycophospholipid for membrane-anchoring. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3016-3021.
- Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J.A., Heuser, J.E. and Andrews, N.W. (1992) Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*, **71**, 1117-1130.

- Tardjeux, I., Nathanson, M.H. and Andrews, N.W. (1994) Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic free Ca^{2+} -transients. *J. Exp. Med.*, **179**, 1017-1022.
- Tse, A.G.D., Barclay, N., Watts, A. and Williams, A.F. (1985) A glycopospholipid tail at the carboxyl terminus of the Thy-1 glycoprotein of neurons and thymocytes. *Science*, **230**, 1003-1008.
- Turco, S.J., Hull, S.R., Orlandi, P.A., Shepherd, S.D., Homans, S.W., Dwek, R.A. and Rademacher, T.W. (1987) Structure of the major carbohydrate fragment of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochemistry*, **26**, 6233-6238.
- Turco, S.J., Orlandi, P.A.Jr., Homans, S.W., Ferguson, M.A.J., Dwek, R.A. and Rademacher, T.W. (1989) Structure of the phosphosaccharide-inositol core of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J. Biol. Chem.*, **264**, 6711-6715.
- Turco, S.J. and Descoteaux, A. (1992) The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, **46**, 65-94
- Uhrig, M.L., Couto, A.S., Colli, W. and Lederkremer, R.M. (1996) Characterization of inositolphospholipids in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms. *Biochim. Biophys. Acta*, **1300**, 233-239.
- Uhrig, M.L., Couto, A.S., Alves, M.J.M., Colli, W. and Lederkremer, R.M. (1997) *Trypanosoma cruzi*: Nitrogenous-base-containing phosphatides in trypomastigote forms. Isolation and chemical analysis. *Exp. Parasitol.*, **87**, 8-19.
- Urakaze, M., Kamitani, T., DeGasperi, R., Sugiyama, E., Chang, H.M., Warren, C.D. and Yeh, E.T.H. (1992) Identification of a missing link in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 6459-6462.
- Van Echten, G. and Sandhoff, K. (1993) Ganglioside metabolism. Enzymology, topology and regulation. *J. Biol. Chem.*, **268**, 5341-5344
- Van Veldhoven, P.P. and Mannaerts, G.P. (1993) Sphingosine-phosphate lyase. *Adv. Lipid Res.*, **26**, 69-98.
- Van Voorhis, W.C., Schlekewy, L. and Trong, H.L. (1991) Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F1-160 epitope that mimics man be mapped to a 12-amino acid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5993-5997.
- Vidugiriene, J. and Menon, A.K. (1993) Early lipid intermediates in glycosyl-phosphatidylinositol anchor assembly are synthesized in the ER and located in the cytoplasmic leaflet of the ER membrane bilayer. *J. Cell. Biol.*, **121**, 987-996.
- Vidugiriene, J. and Menon, A.K. (1994) The GPI anchor of cell-surface proteins is synthesized on the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.*, **127**, 333-341.

- Villalta, F. and Kierszenbaum, F. (1983) Role of cell surface mannose residues in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta*, **736**, 39-44.
- Volwerk, J.J., Shashidhar, M.S., Kuppe, A. and Griffith, O.H. (1990) Phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* combines intrinsic phosphotransferase and cyclic phosphodiesterase activities: a ^{31}P NMR study. *Biochemistry*, **29**, 8056-8062.
- Watanabe, R., Kinoshita, T., Masaki, R., Yamamoto, A., Takeda, J. and Inoue, N., (1996) PIG-A and PIG-H, which participate in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, form a protein complex in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.*, **271**, 26868-26875.
- Watanabe, R., Inoue, N., Westfall, B., Taron, C., Orlean, P., Takeda, J. and Kinoshita, T. (1998) The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of PIG-A, PIG-H, PIG-C and GPI1. *EMBO J.*, **17**, 877-885.
- Weiss, S.B., Smith, S.W. and Kennedy, E.P. (1958) The enzymatic formation of lecithin from cytidine diphosphate choline and D-1,2-diglyceride. *J. Biol. Chem.*, **231**, 53-64.
- Werbovetz, K.A. and Englund, P.T. (1997) Glycosyl phosphatidylinositol myristoylation in African trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **85**, 1-7.
- Wertz, P.W. and Downing, D.T. (1990) Free sphingosine in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **94**, 159-161.
- Yoshida, N., Mortara, R.A., Araguth, M.F., Gonzalez, J.C. and Russo, M. (1989) Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, **57**, 1663-1667.
- Zacs, A. and Klibanov, A.M. (1984) Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science*, **224**, 1249-1251.
- Zacs, A. and Klibanov, A.M. (1985) Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3192-3196.
- Zamze, S.E., Ferguson, M.A.J., Collins, R., Dwek, R.A. and Rademacher, T.W. (1988) Characterization of the cross-reacting determinant (CRD) of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Eur. J. Biochem.*, **176**, 527-534.
- Zhao, C., Beeler, T. and Dunn, T. (1994) Suppressors of the Ca^{2+} -sensitive yeast mutant (csg2) identify genes involved in sphingolipid biosynthesis. Cloning and characterization of SCS1, a gene required for serine palmitoyltransferase activity. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21480-21488.
- Zingales, B. and Colli, W. (1985) *Trypanosoma cruzi*: Interaction with host cells, In: Current Topics in Microbiology and Immunology (Hudson, L., ed), The Biology of Trypanosomes, vol 117, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 129-152.



Dr. KUSA M. DE LEDEKREMPER

