

Tesis de Posgrado

La arginina quinasa de Trypanosoma cruzi : Estudio de su regulación y utilización de modelos transgénicos

Alonso, Guillermo Daniel

2002

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

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

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

Cita tipo APA:

Alonso, Guillermo Daniel. (2002). La arginina quinasa de Trypanosoma cruzi : Estudio de su regulación y utilización de modelos transgénicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3441_Alonso.pdf

Cita tipo Chicago:

Alonso, Guillermo Daniel. "La arginina quinasa de Trypanosoma cruzi : Estudio de su regulación y utilización de modelos transgénicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3441_Alonso.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

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

**La arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi*:
Estudio de su regulación y utilización de modelos transgénicos**

Autor: Lic. Guillermo Daniel Alonso
Director: Dra. Mirtha M. Flawiá

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología
Molecular (INGEBI-CONICET)

-2002-

3 4 4 1

RESUMEN

La arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi*: estudio de su regulación y utilización de modelos transgénicos.

Resumen

La arginina quinasa cataliza la transferencia reversible de un grupo fosfato entre el ATP y la L-arginina. En este trabajo se reporta modelos de sobre-expresión exitosos para una enzima endógena, como es el caso de la arginina quinasa. Se obtuvieron 60 veces de sobre-expresión, utilizando el vector de expresión de alta eficiencia pTREX-A. La población transfectada con la arginina quinasa presentó un aumento en la densidad celular y en la tasa de replicación, sugiriendo que los fosfágenos podrían estar involucrados en la división celular. Además, la actividad arginina quinasa aumento continuamente durante la fase exponencial de crecimiento. Se observó una correlación entre la tasa de crecimiento, la actividad arginina quinasa y los niveles de enzima. En el rango de tiempo de cultivo estudiado, los niveles de ARNm mostraron solo cambios menores. La sobre-expresión de la arginina quinasa presentó una cinética de degradación a lo largo de la curva de crecimiento coincidente con el aumento de la enzima endógena y de la actividad, indicando una posible regulación por proteólisis.

La incorporación de arginina fue estudiada en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* durante las fases del cultivo *in vitro*. La incorporación de arginina disminuyó continuamente desde el 3^{ro} al 14^{to} día. Estas variaciones pueden ser reproducidas utilizando medio condicionado o medio fresco. El ayuno de arginina, la densidad celular y la disponibilidad de Fuentes de carbono, también afectaron la incorporación. En tripomastigotes, el estadio infectivo no replicativo, la actividad y expresión arginina quinasa fueron 2.2 veces superior a la correspondiente a epimastigotes del 7^{mo} día, y la incorporación de arginina fue al menos 30 veces menor en tripomastigotes que en epimastigotes del 7^{mo} día. Además una disminución reversible del 40 % de la arginina incorporada fue observado cuando células del día 3 fueron tratadas con el agente antimetabólico, hidroxí urea. Estos resultados sugieren una relación entre la incorporación de arginina, la tasa de duplicación celular, y el aumento en la actividad arginina quinasa.

Palabras clave: fosfágenos / arginina quinasa / *Trypanosoma cruzi* / guanidino quinasa / fosfoarginina / transporte de arginina / incorporación de arginina/.

Trypanosoma cruzi arginine kinase: study of its regulation and use of transgenic models.

Abstract

Arginine kinase catalyzes the reversible transphosphorylation between ATP and L-arginine. This work reports one of the first successful over-expression models of an endogenous enzyme, such as arginine kinase. Thus, it was obtained a 60-fold over-expression using the high-efficiency expression vector pTREX-A. The cells transfected with arginine kinase showed an increase in cell density and replication rate, suggesting that phosphagens could be involved in cell division. Furthermore, the arginine kinase activity was increased continuously during the exponential phase of growth. A correlation between growth rate, enzyme-specific activity and enzyme protein was observed. In the whole range of the culture time mRNA levels showed minor changes. Overexpressed arginine kinase has a degradation kinetics along the parasite growth curve coincident with the increment of the endogenous enzyme protein and activity, indicating that arginine kinase activity might be regulated by proteolysis.

Arginine uptake was measured in *Trypanosoma cruzi* epimastigote cells along the in vitro culture growth phases. Arginine uptake decreased continuously from the 3rd to the 14th day. These fluctuations could be resembled using conditioned or fresh medium. Arginine starvation, cell density and carbon source availability also affect the arginine uptake. In trypomastigote cells, the infective and non-replicative stage, arginine kinase activity and expression were 2.2-fold higher than 7th-day epimastigote activity, and arginine uptake was at least 30-fold lower in trypomastigote than 7th-day epimastigote forms. Moreover, a reversible 40% decrease of the arginine uptake was observed when 3rd-day cells were treated with the antimitotic hidroxyurea. These results suggest a correlation between arginine uptake, the cell replication rate, and the increase in the arginine kinase specific activity.

Keywords: phosphagen / arginine kinase / *Trypanosoma cruzi* / guanidino kinase / phosphoarginine / arginine transport / arginine uptake /.

Dedicado a Sabrina, Gracias a quien, tengo el título mas importante al que jamás aspiré:

PADRE.

Agradecimientos:

Es sumamente difícil completar esta sección, y no es por orgullo, sino por que realmente llegar a este momento no se logra sin el apoyo y la ayuda incondicional de un montón de gente y es una gran responsabilidad no omitir a nadie.

Pero, en particular hay agradecimientos que apuntan mas allá del mero hecho de responder con gratitud a una ayuda, hay agradecimientos que son por dar una enseñanza, o por ser un pilar, cosas sin las cuales no se avanza. Este agradecimiento, comienza con mi familia toda, mi señora Andrea, mi hija Sabrina, mis Padres Susy y Oscar, mi hermano Gustavo, y también mis padres y hermano políticos, Adriana, Mario y Adrián. Pero no se terminan con ellos el agradecimiento especial, sino que se extiende a aquellas personas que de alguna manera brindaron algo especial. Mirtha, gracias por haberme ofrecido formar parte de un grupo humano que me dio mucho, Doc., gracias por enseñarme que la ciencia debe ser divertida, que es algo que se debe hacer con entusiasmo, Cris, vos me ayudaste a dar los primeros pasos hacia una enzima, que momento!!

Claudio, gracias por darme todo! Y por haberme invitado al cuarto de cultivo para darle de comer arginina a quienes pasaron a ser algo así como una mascota, casi como tener la pecera.

Y ahora es cuando se complica, la lista es interminable, incluye gente que ya siquiera esta entre nosotros, otros que se fueron al exterior, y los que día a día mas cerca o mas lejos están a mi lado.

Hay gracias laborales, por soluciones prestadas, por lugares de trabajo prestados, por tiempo que no es lo menos.

Para toda esa gente que la sabrá escuchar, que sabe que no es por no nombrarlos, que saben que realmente no quiero dejar a nadie sin nombrar y por eso dejo este

Gracias a todos!!

Guillermo.

INTRODUCCION

1. ENFERMEDAD DE CHAGAS O TRIPANSOMIASIS AMERICANA

1.1. Formas de transmisión y control de la enfermedad de Chagas

1.1.i. Transmisión vectorial, 2

1.1.ii. Transmisión por transfusión sanguínea, 6

1.1.iii. Transmisión congénita, 6

1.1.iv. Transmisión por trasplante de órganos, 6

1.1.v. Transmisión accidental, 7

1.2. Patología de la infección y desarrollo de la enfermedad

1.2.i. Período agudo, 7

1.2.ii. Período indeterminado, 8

1.2.iii. Período crónico, 8

1.2.iv. Respuesta inmunológica a la infección, 9

1.3. Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Chagas

1.3.i. Técnicas diagnósticas, 10

1.3.ii. Tratamiento, 11

1.4. Situación actual de la Enfermedad de Chagas, 11

2. EL *TRYPANSOMA CRUZI* Y OTROS TRIPANOSOMÁTIDOS DE IMPORTANCIA SANITARIA

2.1. Los tripanosomátidos, 13

2.2. Importancia sanitaria de los tripanosomátidos, 13

2.3. Ubicación taxonómica, 15

2.4. Ciclo de vida y estadios evolutivos del *T. cruzi*, 16

3. ALGUNOS ASPECTOS DESTACABLES DE LA BIOLOGÍA DEL *TRYPANSOMA CRUZI*

3.1. Estructura celular, 20

3.2. Metabolismo energético: glucólisis, 20

3.3. Mitocondria y respiración, 21

3.4. Traducción de señales en tripanosomátidos, 21

3.4.i. Transducción de señales mediada por AMPc en tripanosomátidos, 22

3.4.ii. La *via* de los fosfoinosítidos en tripanosomátidos, 23

3.5. Genoma, 23

4. METABOLISMO DE ARGININA

4.1. La arginina, características químicas e importancia para los seres vivos, 25

4.2. La arginina y su metabolismo en tripanosomátidos., 29

5. LOS FOSFÁGENOS Y LAS FOSFÁGENO (GUANIDINO) QUINASAS

5.1. Los fosfágenos, 32

5.1.i. Distribución de los fosfágenos en el Reino Animal, 33

- 5.1.ii Biosíntesis de los compuestos guanidino aceptores, 34
- 5.2 Las fosfágeno (guanidino) quinasas, 35
 - 5.2.i. Propiedades moleculares, 36
 - 5.2.ii. Propiedades catalíticas, 37
- 5.3. Rol fisiológico de los sistemas de fosfágenos.
 - 5.3.i. Las fosfágeno quinasas como tampones temporales de ATP., 38
 - 5.3.ii. Los fosfágenos como tampones espaciales de ATP., 39
- 5.4. La arginina quinasas de *Trypanosoma cruzi*., 41

- 6. TRANSPORTE DE SOLUTOS A TRAVÉS DE LA MEMBRANA
 - 6.1. Generalidades de los sistemas de transporte, 46
 - 6.2. Transporte de aminoácidos, 48
 - 6.2.i. Especificidad de los sistemas de transporte de aminoácidos., 48
 - 6.3. Sistemas de transporte de solutos en tripanosomátidos., 50

Materiales y Métodos

- 1. Reactivos generales., 52

- 2. Medios y soluciones generales., 53
 - 2.1. Medios.

 - 2.2 Soluciones.

- 3. Técnicas electroforéticas., 55
 - 3.1. Geles de agarosa nativos.

 - 3.2. Geles de agarosa con formaldehído.

 - 3.3 Geles de poliacrilamida desnaturalizantes para secuenciación de ADN.

 - 3.4 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida Desnaturalizantes (SDS-PAGE).

- 4. Parásitos: cultivo y preparación de extractos., 56
 - 4.1.i. Cultivo de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

 - 4.1.ii. Tripomastigotes de la cepa Y provenientes de cultivos de células

 - 4.1.iii. Cultivo de formas procíclicas de *Trypanosoma brucei brucei*.

 - 4.2. Preparación de extractos proteicos de epimastigotes.

- 5. Células, 57

6. Cepas Bacterianas de *E. coli* Utilizadas., 57
7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)., 57
8. Manipulación de ácidos nucleicos., 58
 - 8.1. Purificación fenólica y precipitación alcohólica de ácidos nucleicos.
 - 8.2. Cuantificación de ADN, ARN y oligonucleótidos.
 - 8.3. Digestión de ADN con enzimas de restricción.
 - 8.4. Secuenciación de ADN.
9. Amplificación de secuencias para ser subclonadas., 59
 - 9.1 Amplificación del gen de la arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
 - 9.2. Amplificación de una secuencia anti-sentido pequeña (ASp) del gen de la arginina quinasa por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
 - 9.3. Amplificación del gen de la arginina quinasa de *Trypanosoma brucei* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
10. Purificación del ADN de la agarosa., 62
11. Subclonado de los productos de PCR en el vector de expresión (pTREX-A), 63
 - 11.1. Preparación del vector de clonado.
 - 11.2. Defosforilación de los extremos 5' del vector.
12. Subclonado de los productos de PCR en el vector pGEM-T EASY, 65
13. Ligación de extremos adhesivos, 65
14. Preparación de bacterias competentes, 66
15. Transformación de células competentes, 66
16. Extracción de ADN plasmídico ("mini-preps"), 67
17. Minipreparación de alta pureza para secuenciación (PEG), 67
18. Identificación de los plásmidos recombinantes, 68

- 19. Transfección celular, 69
 - 19.1. Recuento de células.
 - 19.2. Selección de parásitos resistencia a G418.
- 20. Determinación de proteínas, 70
- 21. Ensayos de actividad arginina quinasa, 70
- 22. Ensayos de “Western Blot”, 70
 - 22.1. Tinción de geles de poliacrilamida con Coomassie Blue,
 - 22.2. Transferencia de proteínas para Western-blot
 - 22.3. Revelado del “Western Blot”.
- 23. Extracción de ADN y ARN de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, 72
 - 23.1. Extracción de DNA - Protocolo Breve
 - 23.2. Extracción de DNA - Protocolo estándar
- 24. Preparación de ARN total de epimastigotes de *T. cruzi*, 73
- 25. Técnicas de Hibridación de ácidos nucleicos, 73
 - 25.1. “Southern Blot”.
 - 25.2. “Northern Blot”.
 - 25.3. Fraccionamiento de cromosomas por PFGE ("Pulse Field Gel Electrophoresis").
- 26. Determinación de glucosa y amonio, 75
- 27. Obtención de medios condicionados (MCs), 76
- 28. Ensayos de incorporación de L-arginina, 76
- 29. Sincronización de cultivos por el método de la hidroxIUrea, 76
- 30. Diferenciación *in vitro* de epimastigotes de *T. cruzi* en condiciones químicamente definidas, 77
- 31. Infección de células susceptibles, 77

32. Recuento de amastigotes en células infectadas, 77

33. Análisis de las secuencias y estudios por computadora, 78

RESULTADOS

Capítulo 1

Generación de epimastigotes transfectados que sobre-expresen o tengan suprimida funcionalmente la arginina quinasa. ETAPA I.

1.1. Obtención de las construcciones a ser transfectadas

1.1.i. Amplificación del gen de la arginina quinasa, 80

1.1.ii. Subclonado de los productos de amplificación en el vector de expresión pTREX, 81

1.1.iii. Análisis de los clones obtenidos mediante mapas de restricción, 82

1.2. Transfecciones estables de epimastigotes con los vectores pT-AS y pT-SE, 83

1.3. Análisis funcional de las poblaciones de parásitos transfectados

1.3.i. Ensayo de actividad arginina quinasa, 85

1.3.ii. Estudio de los niveles de arginina quinasa mediante ensayos de “Western Blot”, 86

1.3.iii. Estudio de los niveles de ARNm de arginina quinasa mediante ensayos de “Northern Blot”, 88

1.4. Estudio de la zona de inserción en el genoma del parásito para las poblaciones transfectadas con los vectores pT AS, pT SE y pT GFP, 89

Generación de epimastigotes transfectados que sobre-expresen o tengan suprimida funcionalmente la arginina quinasa. ETAPA II.

1.5. Obtención de una construcción anti-sentido pequeña del gen de la arginina quinasa (pT-ASp)

1.5.i. Amplificación de la región a ser subclonada, 93

1.5.ii. Subclonado del fragmento obtenido en la reacción de PCR (ASp) en el vector de expresión pTREX, 94

- 1.5.iii. Análisis de los recombinantes obtenidos mediante enzimas de restricción, 95
- 1.6. Transfecciones estables de epimastigotes con los vectores pT-ASp y pT-SE, 96
- 1.7. Análisis funcional de las poblaciones de parásitos transfectados.
 - 1.7.i. Ensayo de actividad arginina quinasa, 97
 - 1.7.ii. Estudio de la cinética de crecimiento poblacional, 99
 - 1.7.iii. Estudio de los niveles de arginina quinasa mediante ensayos de “Western Blot”, 101
 - 1.7.iv. Estudio de los niveles de ARNm de arginina quinasa mediante ensayos de “Northern Blot”, 101
- 1.8 Estudio de la zona de inserción en el genoma del parásito para las poblaciones transfectadas con los vectores pT SE y pT GFP, 103
- 1.9. Estudio de la capacidad de diferenciación e invasión de los parásitos que sobre-expresan la arginina quinasa obtenidos en la etapa 1.
 - 1.9.i. Estudio de diferenciación celular, 106
 - 1.9.ii. Ensayos de invasión de células susceptibles, 106

Capítulo 2

Variación de los niveles de arginina quinasa durante las fases de crecimiento.

- 2.1. Actividad arginina quinasa durante las diferentes etapas de la curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*, 109
- 2.2 Estudio de los distintos puntos de control en la expresión de la arginina quinasa.
 - 2.2.i. Estudio de los niveles de ARNm de arginina quinasa durante las distintas etapas del cultivo, 111
 - 2.2.ii. Estudio de los niveles de arginina quinasa durante las distintas etapas del cultivo, 112
 - 2.2.iii. Estudio de la actividad específica de la arginina quinasa durante las distintas etapas del cultivo, 113
 - 2.2.iv. Determinación de la regulación de los niveles intracelulares de arginina quinasa mediante la degradación de proteína, 115

2.3. Crecimiento celular y condiciones del medio de cultivo.

2.3.i. Variaciones en la concentración de Glucosa y amonio, así como también en los niveles de pH., 117

Capítulo 3

Variación en los niveles de incorporación de arginina durante las fases de la curva crecimiento.

3.1. Variaciones en la incorporación de arginina a lo largo de la curva de crecimiento., 120

3.2. Efecto de las variaciones en el medio de cultivo sobre la incorporación de arginina., 122

3.3. Cinética de incremento en la incorporación de arginina al realizar un pasaje de parásitos de día 14 a un medio de cultivo fresco., 122

3.4. Influencia de la densidad celular sobre la incorporación de arginina., 123

3.5. Estudio del efecto de los componentes del medio de cultivo en la incorporación de arginina por epimastigotes., 124

3.6. Efecto de la privación (ayuno) de arginina sobre su incorporación., 125

3.7. Relación entre la incorporación de arginina y la actividad arginina quinasa durante la curva de crecimiento y el ciclo de vida de los parásitos., 126

3.8. Efecto de agentes anti-mitóticos sobre el transporte de arginina, 127

Capítulo 4

Estudio de la arginina quinasa y el transporte de arginina en *Trypanosoma brucei*.

4.1. La arginina quinasa de *Trypanosoma brucei*.

4.1.i. Caracterización bioquímica de la arginina quinasa de *Trypanosoma brucei*., 131

4.1.ii. Clonado de la arginina quinasa de *Trypanosoma brucei*., 132

4.1.iii. Comparación de aminoácidos de la arginina quinasa de *Trypanosoma brucei* contra otros taxones., 135

4.2. Posible transportador de aminoácidos catiónicos de *Trypanosoma brucei*.

4.2.i. Clonado del hipotético gen de un transportador de aminoácidos de *Trypanosoma brucei* , 138

4.2.ii. Estudios de hidropatia del hipotético transportador de aminoácidos de *Trypanosoma brucei*., 140

4.2.iii. Demostración de la función del hipotético transportador de aminoácidos de *Trypanosoma brucei*., 142

DISCUSIÓN, 143

Conclusiones, 155

REFERENCIAS.

INTRODUCCION

1. ENFERMEDAD DE CHAGAS O TRIPANOSOMIASIS AMERICANA

La enfermedad de Chagas es una parasitosis, cuyo agente etiológico es el protozoario *Trypanosoma cruzi*. En nuestro país es transmitido principalmente por las deyecciones de un insecto hematófago que recibe el nombre científico de *Triatoma infestans*, y que popularmente es llamado por su nombre vulgar de origen quechua, vinchuca. Otra *via* importante de transmisión de la enfermedad la constituyen las transfusiones sanguíneas con sangre de personas infectadas, especialmente en áreas urbanas donde no se realizan controles de la sangre a transfundir (Amado Neto, 1968). Además se han descrito otras *vias* de infección, como la congénita, que se produce por *via* transplacentaria (Schmuñiz y Szarfman, 1977), y la accidental por contaminación con heces de triatominos, con parásitos de cultivo o bien con sangre de animales inoculados en el laboratorio (Brener, 1990).

Esta enfermedad es estrictamente americana siendo los límites de su extensión los paralelos 42 norte y 46 sur que comprenden áreas endémicas ubicadas en la región sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta Argentina y Chile. Cabe destacar que su distribución geográfica coincide con la de los insectos vectores de hábitos domiciliarios (Romaña, 1963), siendo mas marcada su incidencia en las regiones rurales ya que las viviendas precarias otorgan un hábitat que facilita la proliferación de la vinchuca.

Se ha considerado a la Enfermedad de Chagas como una enfermedad socioeconómica típica inseparable de la pobreza y el subdesarrollo (Marsden, 1988). También se ha vinculado a la enfermedad con alteraciones ecológicas producidas por desmontes masivos y a una ubicua adaptación de los insectos hospedadores no solo en los domicilios sino también en los peridomicilios.

La Organización Mundial de la Salud (WHO/OMS) considera a la Enfermedad de Chagas como una de las endemias mas importantes del continente sudamericano, es la tercera causa de muerte luego de la malaria y la Schistosomiasis y genera pérdidas económicas anuales de hasta 6.500 millones de dólares. El número de enfermos chagásicos reportados hasta el año 1996 fue de 16-18 millones y la población de riesgo de 100 millones; a su vez la tasa anual de mortandad producto de la citada enfermedad es de 60.000 personas. En esta área el número total de enfermos crónicos se estima que asciende a 5-6 millones.

Informes provenientes de la TDR-WHO (Tropical Disease Research, World Health Organization) indican que, desde 1991, cuando los gobiernos de los países del cono sur decidieron tomar medidas para eliminar la transmisión de esta

enfermedad, la prevalencia de la infección se redujo más del 75 % en Argentina, Brasil, Chile y Uruguay. Se calcula también que para el año 2003 la incidencia en toda Latinoamérica se reducirá más de un 70%.

En este momento la situación mas apremiante se encuentra en Centroamérica y el grupo denominado "Andino" formado por Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela. (UNDP/World Bank/WHO, Tropical Diseases Research, 1991,94 y 97).

1.1. Formas de trasmisión y control de la enfermedad de Chagas

1.1.i. Transmisión vectorial

La enfermedad de Chagas puede ser transmitida por diversos mecanismos, sin embargo numéricamente el mas importante, es la transmisión vectorial con mas de un 80% de toda la transmisión del *T. cruzi* a humanos (J.C.P. Diaz & C.J. Schofield, 1999). Esta forma de transmisión se lleva a cabo en el ciclo domestico, en el que participan como fuente parasitaria, el hombre y otros mamíferos, y el vector triatomino, que en nuestro país es principalmente, el *Triatoma infestans* (Isola, E. L. D. y Gonzalez Cappa S. M., 1994).

Existen mas de 122 especies de insectos del orden hemiptera, familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae* que pertenecen a los géneros *Pastrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius*, potencialmente capaces de actuar como vectores en la transmisión de la enfermedad de Chagas. Casi todas las especies de triatominos se distribuyen geográficamente desde la ciudad de Salt Lake City, a 41° de latitud N, en los E.E.U.U., donde se ha notificado la presencia de *Triatoma protracta*, hasta la Patagonia, donde se ha hallado el *Triatoma patagonica* a los 46° de latitud Sur. Figura 1.

Todas las especies conocidas de triatominos son vectores potenciales del *T.cruzi* pero siete tienen una importancia epidemiológica especial en América del Sur: *Triatoma infestans*, *T.brasiliensis*, *T.dimidiata*, *T.sordida*, *T. pallidipennis*, *Panstrongylus megistus* y *Rhodnius prolixus*. Figura 2. Una octava especie juega un papel importante en América Central y Panamá, *Rhodnius pallescens* (OMS, 1991).

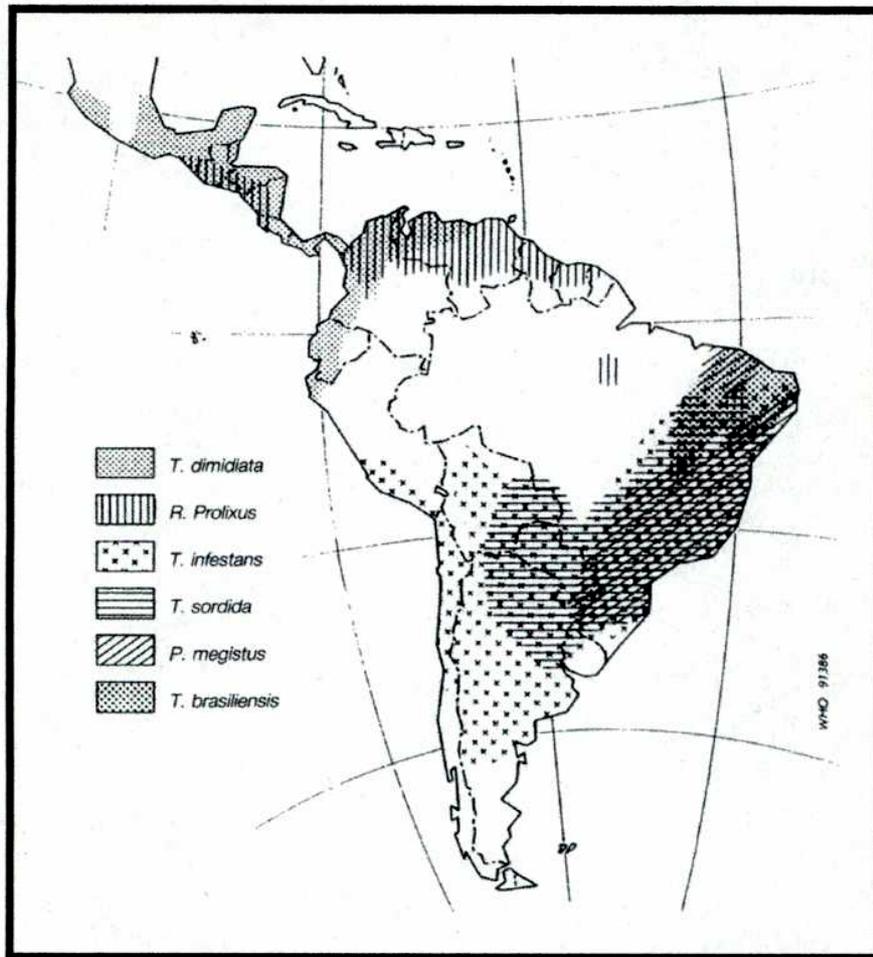


Figura 1. Distribución geográfica de los principales vectores triatominos en América.

Figura obtenida de la página <http://www.who.ch/tdr/workplan/chagasdist.htm> (WHO, 1991).

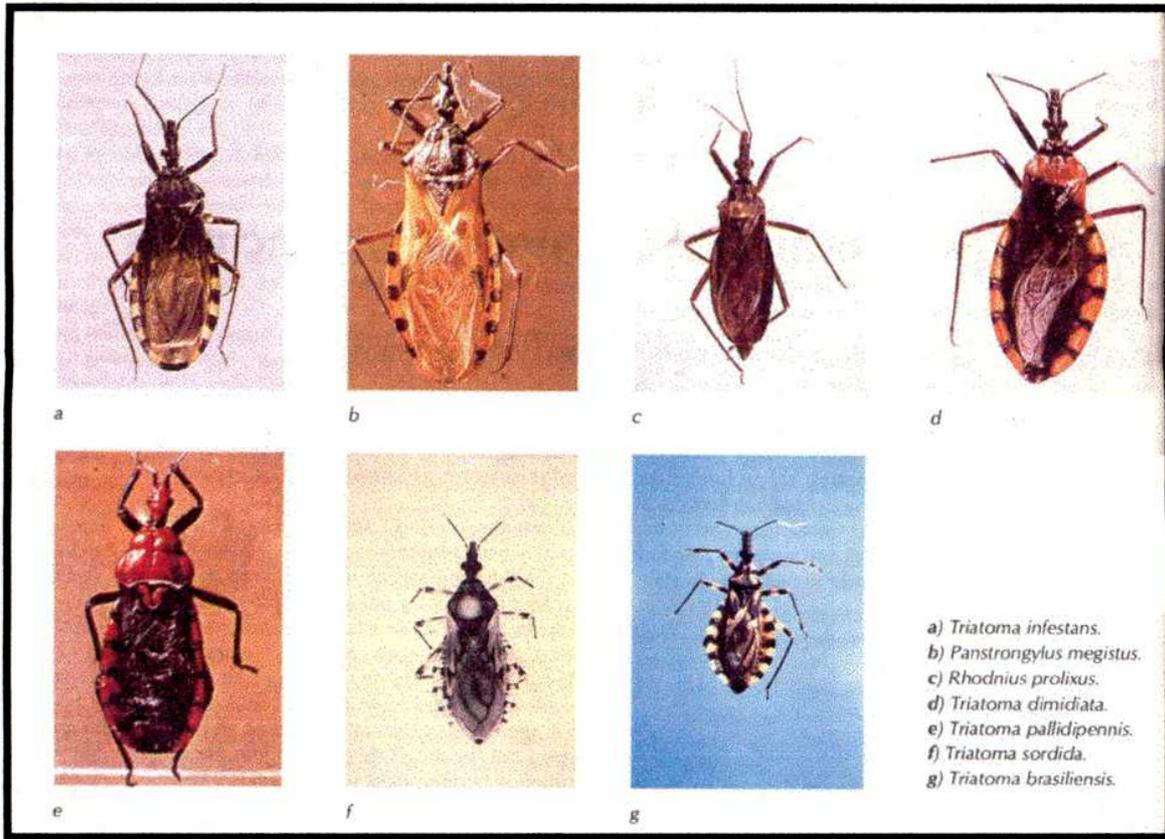


Figura 2. Especies de triatominos que mas frecuentemente intervienen en la transmisión de la endemia chagásica en América.

Figura obtenida del libro: "Enfermedad de Chagas", Storino R. y Barragan H.

Entre las medidas aplicadas con cierto éxito al control de la transmisión vectorial está el tratamiento de las viviendas con insecticidas (Storino R. y Barragan H., 1994).

Durante las décadas de los 60s y los 70s, una serie de diferentes técnicas de control fueron estudiadas, pero el uso de insecticidas fue el mas efectivo y eficiente de los controles (WHO, 1991). La aparición de los piretroides sintéticos en la década de 1980 fue el mayor avance en el control de los triatominos domésticos. Estos insecticidas actúan rápidamente, proveen un control sobre otros insectos domésticos y además son mas seguros que sus antecesores (2500 veces menos toxico para los mamíferos en comparación a los organoclorados).

De todas las especies de triatominos la mas importante es sin lugar a duda el *T. infestans*, responsable por la mayoría de los casos de enfermedad de Chagas en el continente. Afortunadamente el *T. infestans*, tiene al menos cuatro características biológicas que lo hacen factible de ser controlado: a) limitado rango de hábitat,

con estadios confinados a las casas y algún animal cercano al peri domicilio; b) baja tasa de desarrollo poblacional, y consecuentemente baja tasa de re-arreglos genéticos; c) extrema especialización con baja tasa de variabilidad genética y consecuentemente un limitado repertorio genético que le permita desarrollar adaptaciones (incluyendo resistencia a insecticidas), y, d) completa susceptibilidad a los modernos insecticidas piretroides (J.C.P. Diaz & C.J. Schofield, 1999).

Luego de la fumigación es necesario realizar controles periódicos, manteniendo una continua vigilancia en la cual es de gran importancia la participación de la comunidad local la cual debe ser debidamente instruida.

Siguiendo este esquema, los resultados han sido muy satisfactorios en Brasil, Uruguay, Chile, y en numerosas regiones de Argentina, Venezuela y partes de Bolivia y Paraguay. Donde el control de vectores fue implementado satisfactoriamente, los casos agudos han disminuido considerablemente, y los estudios serológicos hechos a niños, nacidos luego de implementadas las medidas de control, mostraron tasas de infección extremadamente bajas (Dias, 1993; Schmunis, 1996; WHO, 1997). La tabla 1, muestra la reducción de los seropositivos antes y después del Programa de Iniciativas del Cono Sur.

La consolidación del control vectorial de manera exitosa depende de dos puntos primordiales aplicables a diferentes situaciones epidemiológicas, a) eliminar aquellos focos residuales que podrían actuar como punto de partida para nuevas colonizaciones, y b) mantener el compromiso con continuidad temporal, haciendo participar a la comunidad en la vigilancia, utilizando distintos sistemas de detección de triatominos. Un abandono de las acciones podría implicar un retorno de la zona a iguales condiciones epidemiológicas en las que se hallaba antes del tratamiento (Storino R. y Barragán H., 1994).

País	1981-1985	1993-1995	Observaciones
Argentina	4.8	1.2	Reclutas de 18 años del servicio militar
Brasil	4.5(a)	0.2(b)	(a)Población general, (b) 7-14 años
Chile	5.4	1.4	Menores de 10 años
Paraguay	9.2	4	Reclutas de 18 años del servicio militar
Uruguay	2.4	0.2	Menores de 12 años

Tabla 1. Seroprevalencia (en %) de infección por *T. cruzi* en 5 países del cono sur encuestados antes y después del Programa de Iniciativas del Cono Sur. (Schofield & Dias, 1999).

1.1.ii. Transmisión por transfusión sanguínea

La transfusión sanguínea es considerada el segundo en importancia de los mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas contando con aproximadamente un 15% del total de la transmisión (J.C.P. Diaz & C.J. Schofield, 1999). Los métodos requeridos para el control de la transmisión por transfusión están disponibles desde los años 1950s, pero han sido adoptados de manera masiva a partir de la aparición del HIV en los años 1980s.

Hay tres estrategias básicas para el control de acuerdo a la situación epidemiológica (Wendel, 1992). En regiones con alta seroprevalencia para infección con *T. cruzi* entre los donantes de sangre (20% o mas) o donde no es posible realizar controles, la mejor medida es agregar cristal violeta como medida preventiva a todas las bolsas de sangre. En áreas con baja seroprevalencia de infección con *T. cruzi* la medida mas recomendable es estudiar todas las muestras de donantes potencialmente infectados usando al menos dos técnicas serológicas. La tercera medida es recomendada para áreas no endémicas y se basa en realizar un cuestionario para determinar si el donante pudo haber estado en contacto con el *T. cruzi*, y de ser necesario continuar con los estudios serológicos.

1.1.iii. Transmisión congénita

La transmisión congénita del *T. cruzi*, pese a ser numéricamente baja es la tercera en importancia en la transmisión de la enfermedad de Chagas. Mas del cuatro por ciento de los nacimientos de madres infectadas pueden resultar niños infectados debido a que el parásito puede atravesar la placenta (Schmunis, 1991) sugiriendo que mas de 5000 nuevas infecciones por año pueden deberse a esta ruta de transmisión.

Desafortunadamente, la transmisión congénita no puede ser prevenida durante el embarazo ya que las drogas disponibles son toxicas y teratogénicas, por lo que el mejor tratamiento consiste en el pronto diagnostico del recién nacido seguido por el tratamiento correspondiente con benzimidazol (8-10 mg/kg/dia durante 60 días).

1.1.iv. Transmisión por trasplante de órganos

Teóricamente, la transmisión del *T. cruzi* puede ocurrir por el trasplante de cualquier órgano desde un donante infectado a un receptor susceptible. Sin embargo, la mayoría de los casos documentados son el resultado de trasplantes

de riñón, como unos pocos casos atribuidos a trasplantes de corazón, páncreas, y médula ósea (J.C.P. Diaz & C.J. Schofield, 1999). Para prevenir esta vía de transmisión se aconseja estudios serológicos del donante y el receptor, siendo obligatoria esta práctica en áreas endémicas o en casos donde alguno de los dos tuviera posibilidad de haber estado en contacto con el parásito. Sin embargo en casos de trasplantes de urgencia, se debe hacer el trasplante teniendo la precaución de tratar al donante infectado (benzimidazol 5-7 mg/kg/día) durante 10 días antes de la cirugía y luego tratar de igual modo al receptor. El tratamiento del receptor también es aplicado en aquellos casos donde el donante es sano y el receptor está infectado ya que es posible la reactivación de la etapa aguda por el uso de inmunosupresores durante la operación (Ferreira, 1997).

1.1.v. Transmisión accidental

La transmisión accidental de *T. cruzi* es, lamentablemente, frecuente en los laboratorios y más de 50 casos han sido documentados, generalmente como resultado de pinchazos con agujas infectadas o salpicando con heces de triatomíneos contaminadas o material de cultivo (Brener, 1987). Este problema se puede resolver otorgando un buen entrenamiento al personal y manteniendo una rigurosa atención a los procedimientos de laboratorio.

En el supuesto caso de un accidente donde una persona tenga posibilidades de haberse infectado con *T. cruzi*, se le debe aplicar un tratamiento usando benzimidazol (5-7 mg/kg/día) por al menos 10 días.

1.2. Patología de la infección y desarrollo de la enfermedad

1.2.i. Período agudo

La aparición de los síntomas en la enfermedad de Chagas tiene características particulares que dificultan su diagnóstico y tratamiento. La infección aguda es diagnosticada sólo en el 1-2% de los pacientes (WHO 1991). Durante esta etapa de la infección los tripomastigotes pueden encontrarse en sangre periférica y también en fluido cerebroespinal (Hoff, 1978).

La sintomatología, cuando se observa, es inespecífica. El signo más específico que puede desarrollarse es una lesión inflamatoria en el sitio de entrada del parásito, conocida como "chagoma de inoculación". El proceso inflamatorio se dispersa regionalmente, y puede evidenciarse una linfadenopatía focal. Dentro de las células del sistema reticuloendotelial ocurren ciclos asincrónicos de multiplicación

del parásito, destrucción celular y reinfección. Otras manifestaciones observables en la fase aguda pueden incluir fiebre, hepatoesplenomegalia, náuseas, vómitos, diarrea y anorexia (Tanowitz, 1992).

Un número pequeño de los pacientes con enfermedad de Chagas aguda desarrolla miocarditis severa. Ésta puede ser clínicamente evidente y puede incluir taquicardia y falla cardíaca congestiva (Shikanai-Yasuda M, 1990). La anemia, la trombocitopenia, la leucocitosis con predominancia de linfocitos, la función renal anormal, y los elevados niveles de enzima cardíaca, están entre las anomalías chagásicas más comúnmente reportadas por el laboratorio clínico (Tanowitz, 1992).

La mayoría de los pacientes con enfermedad aguda se recupera completamente dentro de los 3 o 4 meses y la mayor parte de ellos no es consciente de estar atravesando una enfermedad aguda. Un pequeño porcentaje muere debido a complicaciones asociadas a miocarditis o meningoencefalitis aguda. En estos casos, es fácilmente demostrable la presencia de amastigotes en células cardíacas, esqueléticas y de tejido blando, así como también en células gliales (Tanowitz, 1992).

1.2.ii. Período indeterminado

Pasados 2-3 meses a partir del momento de la infección el individuo ingresa en el período indeterminado sin sintomatología clínica aparente (Milei, 1994). Aproximadamente un 60-65% de los individuos infectados no presentan síntomas evidentes, permaneciendo en esta fase de la infección durante el resto de su vida. Sólo un 30-40% de estos pacientes presentarán diferentes alteraciones clínicas después de 10 o 20 años de haberse infectado (WHO 1991).

1.2.iii. Período crónico

La enfermedad crónica puede manifestarse con cuadros clínicos diferentes, dependiendo de los órganos y/o tejidos afectados. La forma cardíaca de la enfermedad de Chagas, manifestada en aproximadamente el 27% de los infectados (WHO 1987), consiste en una miocardiopatía congestiva con lesiones irreversibles miocárdicas y del sistema de conducción, pudiendo presentar arritmias u otros trastornos electrocardiográficos, dilatación ventricular, aneurisma de punta, tromboembolismo o falla cardíaca (Oliveira J. et al. 1983). Se estima que los pacientes mueren dentro de los 6 años después de diagnosticárseles cardiopatía chagásica severa (Carlomagno, 1989). También se

ha reportado el infarto de miocardio (De Moraes C, 1989), que se cree se debe a la embolización a partir de un aneurisma apical izquierdo. Asimismo se ha demostrado la existencia de arteriosclerosis y arteriolitis necrotizante (Okumara M, 1962).

Los trastornos del aparato digestivo (megacolon/megaesófago) se originan por destrucción neuronal de los ganglios parasimpáticos intramurales del tubo digestivo (Rezende J. y Luquetti A. 1994). Los individuos con megavísceras pueden presentar diversos grados de lesiones cardíacas.

El compromiso del sistema nervioso periférico cursa en general sin manifestaciones clínicas, ya que la denervación es compensada por un proceso reinervatorio (Sica R, 1994).

1.2.iv. Respuesta inmunológica a la infección

La resistencia a la infección resulta de un equilibrio huésped-parásito en el que el huésped desarrolla mecanismos defensivos y el parásito mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica. Se alcanza una infección crónica cuando se induce una inmunidad de tipo concomitante al parásito, es decir que es capaz de resistir la reinfección pero no de impedir que persista la población de *T. cruzi* en el huésped infectado (Scott M. y Snary D. 1982). Tanto la inmunidad humoral como la celular tienen un papel en la resistencia a la infección por *T. cruzi* en el mamífero (Trischman T, 1983).

El curso de la primoinfección con *T. Cruzii* es, a primera vista, semejante a la de cualquier infección con microorganismos susceptibles de control inmune. En la mayoría de los casos, hay una fase aguda asociada a la parasitemia que, en general, es paulatinamente controlada cuando emerge la respuesta inmunológica. Luego se establece una infección crónica donde es difícil la detección de parásitos en circulación, aunque éstos nunca son eliminados totalmente del organismo. De acuerdo a los estudios que se han realizado en humanos, existiría una respuesta celular y humoral específica contra el parásito (Scott M. y Snary D. 1982).

Los anticuerpos contra el *T. cruzi* aparecen en el humano siempre a las pocas semanas de la infección, aún en individuos asintomáticos. Dichos anticuerpos se mantienen durante toda la vida, excepto en el caso de la cura parasitológica del paciente con drogas tripanocidas durante la primoinfección temprana (Cerisola J, 1977).

La respuesta inmunológica juega un papel fundamental en la patología de la enfermedad de Chagas. Se ha demostrado que existen fenómenos inflamatorios

inducidos por la lisis de células parasitadas y posiblemente mecanismos auto inmunes (Andrade, 1991), que provocarían daño tisular.

1.3. Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Chagas

Tanto los estudios diagnósticos como los epidemiológicos en relación con la infección con *T. cruzi*, presentan complicaciones particulares en áreas co-endémicas con organismos filogenéticamente relacionados, tales como el *Trypanosoma rangeli* (Guhl F., 1987). Estos parásitos presentan morfología y huéspedes, vertebrados e invertebrados, similares además de dar reacciones cruzadas en los ensayos serológicos (Greig S., 1990). También pueden observarse reacciones serológicas cruzadas con otros microorganismos responsables por otras infecciones, tales como leishmaniasis, sífilis, o fiebre reumatoidea, afectando de este modo la confiabilidad en la interpretación de los resultados.

1.3.i. Técnicas diagnósticas

Para el diagnóstico de la enfermedad se cuenta con diferentes métodos. En primer lugar podemos mencionar a los parasitológicos, que incluyen los métodos directos de observación del parásito en sangre y los indirectos que pasan por un paso de amplificación por cultivo. Las preparaciones utilizadas en los métodos directos pueden ser o no coloreadas, también existen algunas técnicas como la de Strout, que consiste en aumentar la concentración de los parásitos a partir de una muestra de sangre aumentando la probabilidad de detección microscópica. Los métodos denominados indirectos incluyen el xenodiagnóstico que consiste en alimentar triatomíneos con sangre del paciente y luego se analizan las heces en busca de parásitos. Otro método indirecto es el cultivo sanguíneo para amplificar el número de parásitos. Los métodos directos tienen entre un 60-100 % de efectividad en la fase aguda y menos de un 10 % en la fase crónica, mientras que los métodos indirectos tienen un 100 % de efectividad en la fase aguda y entre un 20-50 % en la fase crónica.

Otro grupo está conformado por los métodos de diagnóstico serológico que se basan en la detección de anticuerpos generados contra antígenos parasitarios. Entre las diversas pruebas disponibles dentro de este grupo las más difundidas son las pruebas de fijación de complemento o Machado Guerrero, la hemoaglutinación indirecta o HAI, la inmunofluorescencia indirecta o IFI, prueba de aglutinación directa o AD y el inmunoensayo enzimático o ELISA. Estos métodos son más fiables pero a la vez más costosos.

1.3.ii. Tratamiento

Actualmente se dispone de dos drogas para el tratamiento de la infección por *T. cruzi*. El nifurtimox manufacturado por Bayer bajo el nombre comercial de Lamprit® es administrado en una dosis de 10–15 mg/kg/día, en tanto que el benzimidazol manufacturado por Roche bajo el nombre comercial de Radamil®, Rochagan® o Ragonil®, es administrado en dosis menores, 5–7 mg/kg/día. El tratamiento con estas drogas esta indicado en la etapa aguda o en infecciones recientes y en casos congénitos con una alta probabilidad de una cura radical. Las infecciones agudas son tratadas durante 60 días mas hay evidencias que indican que infecciones recientes no agudas son tratadas con éxito durante un período de 10 días siempre y cuando el tratamiento sea dado a las pocas horas de la infección inicial. Los tratamientos abreviados tienen la ventaja de reducir los efectos secundarios que usualmente se inician luego de 8–10 días de iniciado el tratamiento. En general, los niños muestran una tolerancia mayor que los adultos. Se han reportado estudios en los que se describen tratamientos con allopurinol a pacientes con enfermedad de Chagas crónica. El allopurinol, un inhibidor de la hipoxantina oxidasa, es activo contra el *T. cruzi* en cultivos de células de mamíferos y en ratones (Avila H. y Avila A. 1981). Según los autores resultó tan efectivo como el benzimidazol y el nifurtimox en la supresión de las parasitemias, al ser medido por xenodiagnóstico, y en provocar la negativización con los ensayos serológicos convencionales (Gallerano R., 1990). La ventaja del allopurinol sería su relativa falta de efectos colaterales (Tanowitz H., 1992). Para los pacientes en fase crónica, se ha visto que el tratamiento con las drogas antes descritas no produce beneficio alguno al paciente por lo que solo se realizan tratamientos sintomáticos, tendientes a mejorar las condiciones de salud del paciente.

1.4. Situación actual de la Enfermedad de Chagas

Actualmente, Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay están implementando programas para la eliminación de *T. infestans*, como la mejor manera de alcanzar el mínimo nivel de transmisión de la enfermedad. En la tabla 2, se muestra un resumen de la situación en la que se encuentran distintos países o regiones.

País/región	Prevalencia (%)		Infestación %	Vector Principal	Control de Sangre
	(A)	(B)			
Argentina	1.9	4.4	<5.0	<i>T. infestans</i>	>90.0
Bolivia	30.0	5-55.0	>20.0	<i>T. infestans</i>	<5.0
Brasil	0.17	<0.8	<3.0	<i>T. basiliensis</i>	>80.0
Chile	1.1	0.9	<1.0	<i>T. infestans</i>	>90.0
Paraguay	5.0	5.7	>5.0	<i>T. infestans</i>	~30.0
Perú	NA	0.4	NA	<i>T. infestans</i>	<20.0
Uruguay	<1.0	0.62	<1.0	<i>T. infestans</i>	100.0
Colombia	NA	1.2	NA	<i>R. prolixus</i>	NA
Ecuador	NA	0.2	NA	<i>T. dimidiata</i>	NA
Venezuela	<0.3	0.7	NA	<i>R. prolixus</i>	>70.0
Guayanas	<1.0	NA	NA	?	NA
Panamá	NA	<3.0	NA	<i>R. pallescens</i>	NA
C. Rica	NA	2.5	NA	<i>T. dimidiata</i>	NA
Nicaragua	NA	<1.0	NA	<i>T. dimidiata</i>	NA
Honduras	NA	1.2	>10.0	<i>T. dimidiata</i>	<50.0
Guatemala	NA	>5.0	>10.0	<i>T. dimidiata</i>	<50.0
El Salvador	NA	1.9	NA	<i>T. dimidiata</i>	NA
Belizo	NA	<2.0	NA	<i>T. dimidiata</i>	NA
México	NA	<5.0	NA	<i>T. pallidipennis</i>	<20.0
U.S.A.	NA	<0.05	<0.005	<i>T. protracta</i>	<5.0
Caribe	NA	<0.1	NA	?	NA

(A): niños (%); (B): donantes de sangre (%); NA: dato no disponible.

Tabla 2. Situación general de la Enfermedad de Chagas en diferentes países o regiones (Schofield & Dias, 1999).

2. EL *TRYPANOSOMA CRUZI* Y OTROS TRIPANOSOMÁTIDOS DE IMPORTANCIA SANITARIA

2.1. Los tripanosomátidos

El género *Trypanosoma* (Familia: Trypanosomatidae; Orden: Kinetoplastida) comprende flagelados unicelulares capaces de parasitar toda clase de vertebrados. Las morfologías características, compartidas por todos los tripanosomas, son los tripomastigotes observados en la sangre y los tejidos de los hospedadores vertebrados, y los epimastigotes que se encuentran en los vectores invertebrados (Haag, 1998). Por las razones antes mencionadas no es de extrañar que sean un grupo de organismos muy diverso y heterogéneo dentro del cual vamos a encontrar al *T. cruzi* y otros tripanosomas poco emparentados, como ser *T. brucei* debido a que comparten algunas características morfológicas y características de transmisión (Hoare, 1972). Mas aún, el *T. cruzi* presenta importantes variaciones a nivel intraespecífico. De hecho, ya en su primer trabajo Carlos Chagas describió un dimorfismo en los tripomastigotes sanguíneos (formas delgadas y formas gruesas) (Chagas C., 1909). Otras propiedades biológicas sobre las cuales se han observado diferencias a nivel intraespecífico (además de la morfología de los tripomastigotes sanguíneos) son: la cinética de crecimiento, la virulencia, la capacidad de inducir lesiones, la susceptibilidad o resistencia a drogas quimioterapéuticas y la infectividad a células en cultivo (Brener, Z. 1980). En relación con estas características se ha observado la existencia de cepas con comportamientos biológicos opuestos entre sí. En virtud de esto se las ha denominado cepas polares. Tal es el caso de las cepas Y y CL (Brener Z., 1977) o RA y CA1 (Gonzalez Cappa , 1980).

2.2. Importancia sanitaria de los tripanosomátidos

Las enfermedades más importantes producidas por tripanosomátidos son: la enfermedad del sueño causada por las especies africanas, la Enfermedad de Chagas cuyo agente etiológico es el *Trypanosoma cruzi*, y un amplio número de infecciones conocidas como Leishmaniasis, producidas por distintas especies del género *Leishmania*.

Un resumen de las características de estas enfermedades y el impacto que tienen sobre las poblaciones afectadas se muestra en la Tabla 3.

	Tripanosomiasis humanas africanas, enfermedad del sueño.	Enfermedad de Chagas.	Leishmaniasis.
Agente etiológico	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> , <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> .	<i>Trypanosoma cruzi</i> .	<i>Leishmania sp.</i>
Vector (género)	Mosca tsetse: <i>Glossina</i> .	Triatomíneos: <i>Triatoma</i> , <i>Rhodnius</i> , <i>Panstrongylus</i> .	Flebótomos: <i>Phlebotomus</i> , <i>Lutzomyia</i> .
Transmisión	Picadura de <i>Glossina</i> infectada.	Contaminación con heces infectadas. Transfusión de sangre.	Picadura de flebótomo infectado.
Area endémica	Países africanos de la región sub-sahariana.	América Central y América del Sur.	Todas las áreas tropicales y subtropicales del globo excepto el Sudeste Asiático y Oceanía.
Impacto sanitario	55 millones en riesgo. 36 países. 25-50.000 nuevos casos reportados en 1996.	90 millones en riesgo. 19 países. 16 millones de infectados.	350 millones en riesgo. 88 países. 119 millones infectados.
Estrategia de control	Vigilancia, tratamiento, control del vector.	Control del vector, tratamiento de los casos agudos, control de los bancos de transfusión.	Vigilancia y tratamiento de las formas viscerales, vacunación de militares en zona de riesgo, control limitado del vector.
Drogas.	Pentamidina y suramina en casos tempranos. Melarsoprol, poca disponibilidad. Eflornitina, muy caro. Todos los tratamientos requieren internación. Efectos colaterales para todas las drogas, excepto eflornitina, principalmente melarsoprol.	Nifurtimox para los casos agudos, disponibilidad limitada y toxicidad alta. Benznidazol.	Antimoniales. Pentostam y Glucantim, muy tóxicas. Paromomicina (aminosidina) para los casos cutáneos. AmBisona (nueva).

Tabla 3. Enfermedades producidas por tripanosomátidos. (datos extraídos de Molineux, 1997).

A partir de los datos presentados en esta tabla se concluye que existen más de 130 millones de personas infectadas por tripanosomátidos patógenos, para quienes no existe un tratamiento accesible sin efectos colaterales. La población de riesgo es de 500 millones de personas, para quienes no existe la posibilidad de una vacunación. Observando la distribución de las áreas endémicas y considerando los modos de transmisión, se desprende que estas enfermedades afectan principalmente a los habitantes de áreas rurales de los países en vías de desarrollo de la franja tropical-subtropical.

2.3. Ubicación taxonómica

La familia Trypanosomatidae se caracteriza por poseer un flagelo y un kinetoplasto únicos. En el género *Trypanosoma* están comprendidos parásitos digenéticos que tienen en uno de sus estadios de desarrollo la forma tripomastigote. Este género (Hoare, 1972) se divide en dos secciones: salivaria y estercolaria. En la primera están comprendidos *Trypanosomas* patógenos que se multiplican en el estadio tripomastigote en el mamífero, completan el desarrollo en la parte anterior del vector, y son transmitidos por inoculación. En la segunda se agrupan especies no patógenas (con la excepción de *T. Cruzi*). Se multiplican en el mamífero como amastigotes o como epimastigotes en el insecto, completando su desarrollo en la parte posterior del vector y son transmitidos por contaminación. En esta clasificación existen excepciones: el *Trypanosoma equiperdum* perteneciente a la sección salivaria, que se transmite directamente de mamífero a mamífero; y el *Trypanosoma rangeli*, perteneciente a la sección estercolaria, que completa su desarrollo en la parte anterior del vector y es transmitido por inoculación. En cuanto al subgénero *Schizotrypanum*, sólo se encuentra en el hemisferio occidental. Infecta a más de cien especies de mamíferos, pertenecientes a los órdenes Marsupialia, Edentata y Rodentia y también a los Primates, Carnívora, Lagomorpha, Artiodactyla y Chiroptera (Brenner, 1979); y pueden transmitirlos más de ochenta especies de triatomíneos. En Argentina el vector principal es el *Triatoma infestans*, popularmente llamado "vinchuca" (Mazza, 1943).

La figura 3, muestra la ubicación taxonómica de *Trypanosoma cruzi* y la de los tripanosomátidos *Leishmania mexicana*, *Leishmania major*, *Crithidia fasciculata*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma congolense* (Hoare, 1972).

- Tipo: ***Protozoa***
Subtipo: ***Sarcomastigophora***
Clase: ***Zoomastigophora***
Subclase: ***Mastigophora***
Orden: ***Kinetoplastida***
Suborden: ***Trypanosomatina***
Familia: ***Trypanosomatidae***
Género:
- ***Leishmania***
 - Leishmania*** (subgénero)
 - Leishmania major***
 - Leishmania mexicana***
 - ***Crithidia***
 - Crithidia fasciculata***
 - ***Trypanosoma***
 - Schizotrypanum*** (subgénero)
 - Trypanosoma cruzi***
 - Trypanosoon*** (subgénero)
 - Trypanosoma brucei***
 - Nannosonas*** (subgénero)
 - Trypanosoma congolense***

Figura 3. Clasificación taxonómica de los tripanosomátidos mas estudiados.

2.4. Ciclo de vida y estadios evolutivos del *T. cruzi*

Durante su ciclo de vida, el *T. cruzi* pasa por distintos estadios evolutivos distinguibles según las características del flagelo y la posición relativa del kinetoplasto respecto al núcleo celular (Brenner, 1973). El epimastigote es la forma flagelada replicativa que se encuentra en el intestino medio del insecto vector. El flagelo emerge de la región lateral anterior respecto a la dirección del movimiento del organismo y el kinetoplasto es anterior al núcleo celular. El tripomastigote es la forma flagelada no replicativa dentro de ambos hospedadores. El flagelo emerge del extremo apical posterior y el kinetoplasto es posterior al núcleo

celular. Se denominan tripomastigotes sanguíneos a las formas circulantes en el mamífero y tripomastigotes metacíclicos a las formas diferenciadas en el insecto, que son las infectivas. Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar macrófagos por un evento fagocítico (Zingales, 1985) y otros tipos celulares por un mecanismo dirigido por el parásito y en el que participan receptores de membrana (Ortega-Barria, 1991). El amastigote es la forma no flagelada, de localización intracelular en vacuolas ácidas (Ulyses de Carvalho y col., 1989) y replicativa en el citoplasma del hospedador (Ley, 1990). En las figuras 4 y 5 se pueden observar fotos de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*, pertenecientes a la cepa CL 14.

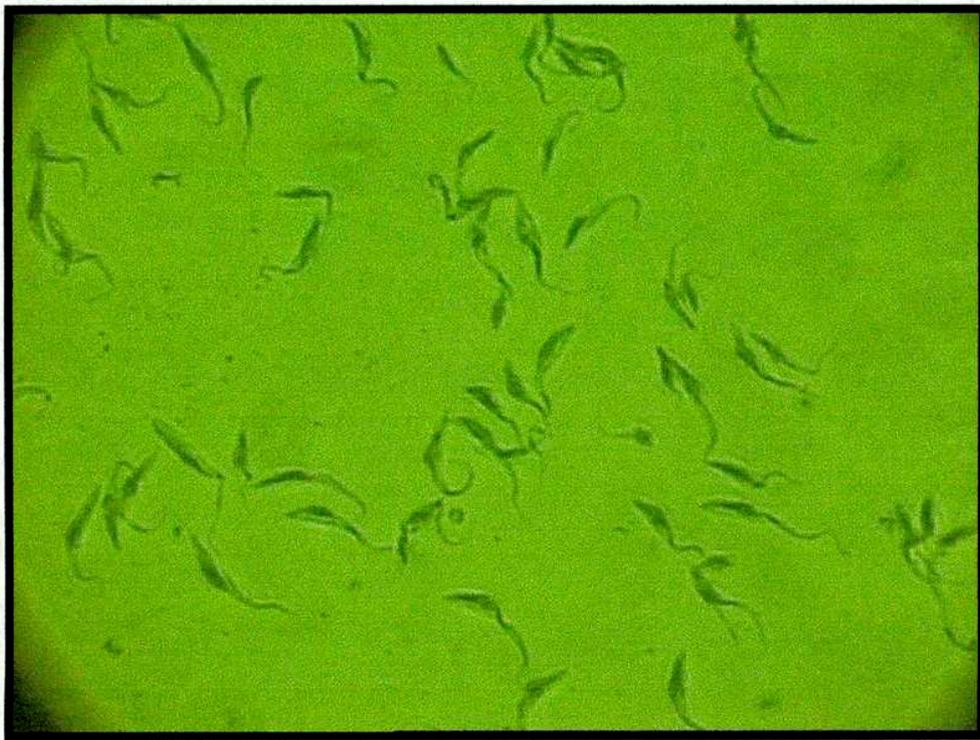


Figura 4. Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* de la cepa CL 14.



Figura 5. Tripomastigotes y amastigotes de *Trypanosoma cruzi* de la cepa CL 14.

El *Trypanosoma cruzi* presenta un ciclo de vida complejo que involucra el desarrollo dentro de dos organismos: un hospedador mamífero y un insecto vector intermediario. El ciclo se inicia cuando el insecto vector se alimenta sobre un mamífero y elimina, en las cercanías de la lesión producida por la picadura, materia fecal conteniendo tripomastigotes metacíclicos que son infectivos para el huésped mamífero. Estas formas eliminadas con las heces pueden penetrar a través de pequeñas lesiones o de las mucosas hasta llegar a la circulación sanguínea (De Souza W., 1984). Una vez en el interior de su huésped, los tripomastigotes metacíclicos deben replicarse para poder sobrevivir y establecer la infección y por esto invaden células del huésped mediante un proceso complejo que es en parte desconocido. El ciclo intracelular dura alrededor de 4 – 5 días y comienza dentro de las primeras 2 horas de la invasión, cuando los tripomastigotes escapan de la vacuola que los contiene hacia el citosol, probablemente mediante la acción de un factor hemolítico (Ley V, 1990, Andrews N, 1990), y se diferencian hacia la forma amastigote, único estadio replicativo en el huésped mamífero. Luego de un período aproximado de 20 horas los amastigotes comienzan a dividirse por fisión binaria multiplicándose exponencialmente cada 12 horas; de este modo, cada parásito que es

originariamente internalizado genera alrededor de 500 nuevas unidades infectivas (Dvorak J., 1975). Una vez completado el período replicativo, los parásitos se diferencian hacia la forma tripomastigote, y son liberados nuevamente al torrente sanguíneo por lisis de la célula huésped. Cuando los tripomastigotes llegan a la sangre pueden invadir células de otros tejidos del huésped o ser ingeridos por el insecto vector, en cuyo tracto intestinal se diferencian a epimastigotes, única forma replicativa en el insecto. Aproximadamente al quinto día de la ingesta, los epimastigotes se ubican en la porción terminal del tubo digestivo, donde se diferencian a la forma tripomastigotes metacíclicos. El ciclo se cierra cuando estos tripomastigotes encuentran un nuevo huésped susceptible e invaden células del huésped para poder replicarse (Brener Z., 1973). Figura 6.

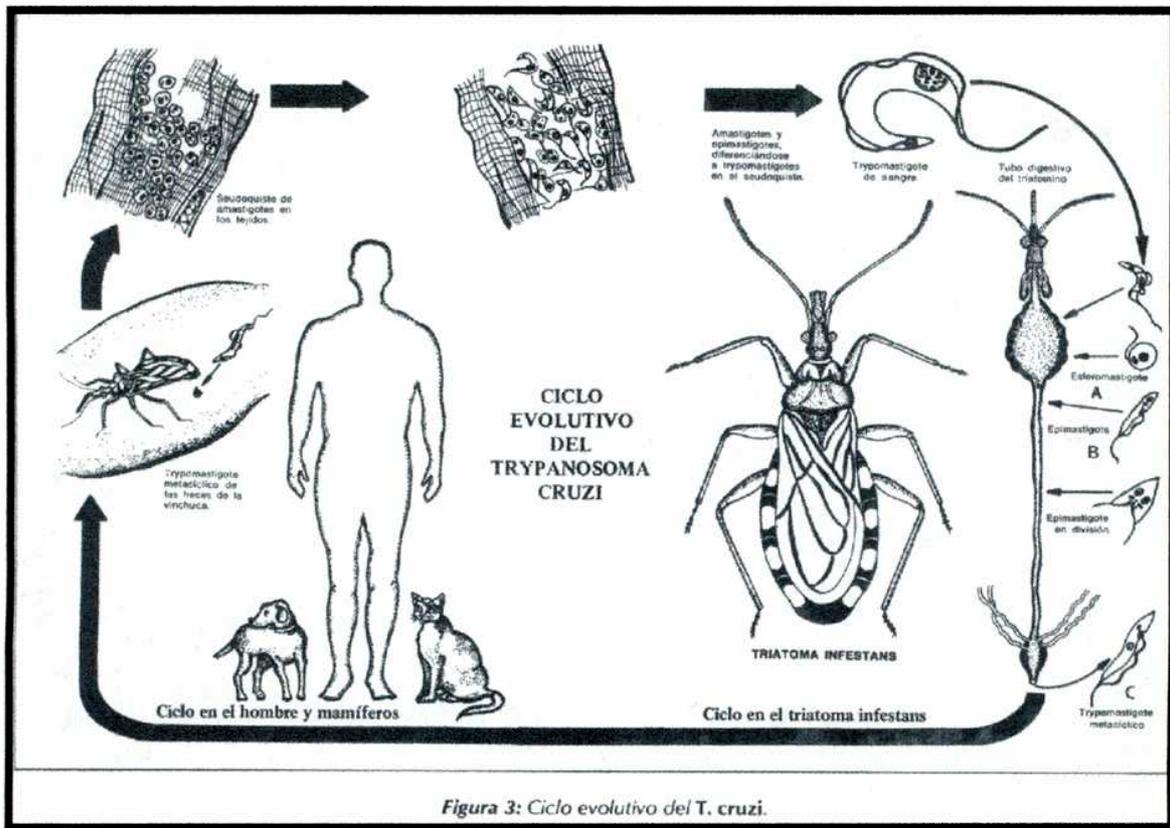


Figura 6. Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*. Figura obtenida del libro: "Enfermedad de Chagas", Storino R. y Barragan H.

3. ALGUNOS ASPECTOS DESTACABLES DE LA BIOLOGÍA DEL *TRYPANSOMA CRUZI*

3.1. Estructura celular

Los organismos del orden Kinetoplastida poseen como característica diferencial una única mitocondria en forma de tubos que recorre toda la célula, y una región de la misma separada del citoplasma por la doble membrana mitocondrial llamada kinetoplasto, que presenta un contenido particularmente alto de ADN (K-DNA). El K-DNA constituye entre un 20 y un 30% del ADN total de la célula y presenta una organización particular: el mismo está distribuido en 5000 a 10000 círculos menores o minicírculos y 25 a 50 círculos mayores o maxicírculos encadenados entre sí (Vickerman K., 1976). En una región próxima al kinetoplasto se encuentra el cuerpo basal o axonema, estructura cilíndrica constituida por nueve tripletes de microtúbulos conectados con el único flagelo. El mismo emerge de la célula a partir de una invaginación de la membrana citoplasmática llamada bolsillo flagelar y está separado del citoplasma por un tabique o "septum". La estructura del flagelo está constituida por nueve pares de microtúbulos periféricos longitudinales y un par central (estructura 9 + 1) conectados con el cuerpo basal. Paralelos a los microtúbulos se encuentran filamentos longitudinales unidos entre sí por filamentos oblicuos que conforman una banda estriada delgada. Esta estructura está envuelta en una vaina que es una prolongación de la membrana citoplasmática. El conjunto conformado por el flagelo y el cuerpo basal constituye el aparato de locomoción del parásito (De Souza W. 1984, 1999). Otra característica estructural de estos parásitos es la ausencia de un verdadero citoesqueleto. En su lugar existe un tramado de microtúbulos subyacentes a la membrana citoplasmática (microtúbulos periplásticos) que actúan como refuerzo mecánico de la misma, y participan en la conformación de la morfología celular (Seebeck T, 1990).

3.2. Metabolismo energético: glucólisis

En los tripanosomátidos la glucólisis también presenta características únicas. En los estadios sanguíneos en el huésped mamífero, la energía es tomada de la glucosa sérica. Los parásitos no presentan efecto Pasteur (regulación inhibitoria de la glucólisis por presencia de oxígeno). A diferencia de otros eucariotas, la maquinaria enzimática necesaria para la conversión de esta glucosa en energía en forma de ATP está compartimentalizada entre una organela llamada

glicosoma, el citoplasma y la mitocondria. La alta concentración de las enzimas responsables de los pasos iniciales de la glucólisis en los glicosomas hace de éste un proceso altamente eficiente y rápido. En esta organela ocurre la vía glucolítica desde hexoquinasa hasta fosfoglicerato quinasa. El NADH generado durante este proceso es reoxidado por las enzimas glicosomales malato dehidrogenasa y α -glicerofosfato dehidrogenasa. La alimentación de este ciclo reconvirtiendo los productos enzimáticos nuevamente en sustratos se da en citoplasma (donde el ácido málico es procesado a fosfoenol piruvato, y luego en los glicosomas es convertido en oxalacetato, sustrato de la malato dehidrogenasa) y en la mitocondria parasitaria (donde el α -glicerofosfato es convertido en dihidroxiacetona fosfato y vuelve a entrar en los glicosomas como sustrato de la α -glicerofosfato dehidrogenasa). El malato generado en los glicosomas puede además ser procesado en la mitocondria, donde puede entrar en el ciclo de los ácidos tricarbónicos y terminar en la cadena respiratoria (Boothroyd J. C. 1990, Cazzulo, 1994, Gonzalez Cappa S. M. e Isola E. L. D. 1994).

3.3. Mitocondria y respiración

Como se mencionó anteriormente, los tripanosomátidos poseen una única mitocondria. El rol principal de las mitocondrias en organismos eucariotas es el de generar ATP sobre la base del proceso de respiración oxidativa. En los tripanosomátidos, este proceso está regulado en el desarrollo. Por lo general, en las formas sanguíneas de los tripanosoma, no se han detectado citocromos ni generación de ATP asociado a la actividad mitocondrial. Morfológicamente, la mitocondria en este estadio consiste en un sistema de tubos largos y estrechos. La membrana interna presenta pocas o ninguna cresta. En los estadios presentes en el insecto vector en cambio, las mitocondrias se vuelven más activas, aparecen las crestas de la membrana interna y se observa un incremento en la expresión de citocromos y enzimas necesarias para llevar a cabo la fosforilación oxidativa (Boothroyd J. C. 1990, Cazzulo J. J. 1994, Gonzalez Cappa S. M. e Isola E. L. D. 1994).

3.4. Traducción de señales en tripanosomátidos

En nuestro laboratorio se ha trabajado intensamente en el estudio de los procesos de transducción de señales en eucariotas inferiores (Flawiá M, 1997; Torres H, 1999). Hasta el momento se han hallado una gran variedad de evidencias que permiten concluir la existencia de delicados mecanismos de

señalización desde y hacia el parásito que le permiten mantener una estrecha relación con el medio que lo rodea y responder rápidamente a los cambios ambientales a los que se ve sometido durante su ciclo de vida complejo. Como ejemplos, a continuación hago una breve descripción de dos de las rutas metabólicas más estudiadas.

3.4.i. Transducción de señales mediada por AMPc en tripanosomátidos

La transducción de señales mediada por AMPc, es sin lugar a dudas uno de los caminos más estudiados y del que más información se dispone. Hasta el momento se han descrito en tripanosomátidos, adenilil ciclasas, numerosas proteínas G y quinasas de proteínas dependientes de AMPc. Además hay numerosas evidencias que vinculan la variación en los niveles intracelulares de AMPc con los procesos de diferenciación.

Genes que codifican para adenilil ciclasas se han clonado en numerosos eucariotas inferiores, como por ejemplo, en *T. brucei* (Paindavoine, 1992), *T. equiperdum* (Ross, 1991), *Leishmania donovani* (Sánchez, 1995), y *T. cruzi* (Montagna, comunicación personal). Todas estas enzimas poseen una gran similitud con la familia de proteínas con actividad de guanilil ciclasa encontradas en eucariotas superiores (Alexandre, 1990). La actividad adenilil ciclasa de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, puede ser estimulada por acción de un péptido que deriva de la proteólisis parcial de la α -globina en el intestino del insecto vector (Fraindenraich, 1993). En el estadio de tripomastigote, también en el *Trypanosoma cruzi*, se puede observar un incremento en los niveles intracelulares de AMPc, en presencia de péptidos derivados de la proteólisis parcial de la fibronectina (Ouaisi, 1992).

Proteínas G, se han identificado putativas subunidades α y β , en *Trypanosoma brucei* (Coulter, 1995). En *Trypanosoma cruzi*, se han caracterizado funcionalmente subunidades α_i y α_s (Coso, 1992; Eisenchlos, 1986) y en *Leishmania* se ha descrito una proteína G del tipo de las transducinas (Cassel, 1991).

Siguiendo río abajo en este camino metabólico, fue caracterizada una proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), en *Trypanosoma cruzi*, cuya holoenzima pudo ser separada en sus subunidades catalíticas (C) y regulatorias (R), las cuales parecen asociarse para formar el tetrámero C₂R₂ (Ulloa, 1988; Ochat, 1993).

3.4.ii. La *via* de los fosfoinosítidos en tripanosomátidos

Se han acumulado evidencias acerca de la presencia funcional del camino metabólico en el que participa el inositol fosfato y el diacilglicerol en *Trypanosoma cruzi* (Docampo, 1991; Racagni, 1992), aunque hasta el momento, no hay suficientes datos de esta ruta de señalización.

Es importante destacar, que la movilización de calcio intracelular, ha sido observada en procesos de importancia como ser el momento de la invasión de la célula huésped por tripomastigotes ((Moreno, 1994).

Como evidencia adicional, sobre la existencia de una ruta metabólica que involucre al calcio, se ha caracterizado en *Trypanosoma cruzi*, una actividad de proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina (Ogueta, 1994), y con relación a la quinasa de proteínas dependiente de calcio (PKC), se obtuvieron mediante esquemas de purificación, fracciones con tales características en *T. cruzi* y en *T. brucei* (Gomez, 1989; Keith, 1990).

3.5. Genoma

Los tripanosomátidos presentan un genoma esencialmente diploide cuyo tamaño total está en el orden de 10^7 pares de bases (Castro C. et al. 1981). El genoma está organizado en cromosomas de diferente tamaño que no condensan durante la mitosis. Aproximadamente una década atrás se atribuía la falta de condensación a la, hasta el momento, ausencia de la histona H1. (Boothroyd J. C. 1990). Trabajos posteriores, demostraron no tan solo la presencia y actividad funcional de esta proteína, sino que además se clonó el gen que la codifica (Burri M, 1995; Recinos R, 2001; Marques Porto R, 2002). La expresión de los genes nucleares presenta también aspectos diferenciales respecto de otros organismos eucariotas. Los transcritos primarios son sintetizados como moléculas de ARN policistrónicas a partir de genes arreglados en tandem. Dentro de cada gen no se han encontrado intrones, aunque los transcritos primarios presentan secuencias espaciadoras no codificantes que son eliminadas mediante un proceso único: el trans-splicing. Durante este evento particular las distintas regiones codificantes del transcrita primario son separadas. Cada fragmento individual es unido al extremo 3' de una secuencia no codificante de 39 nucleótidos, que está en el extremo 5' de un transcrita de aproximadamente 140 bases. Esta secuencia que es agregada en forma universal a todos los ARN mensajeros, es rica en nucleótidos modificados cuya función sería análoga a la del "cap" en los mensajeros de otros eucariotas (Simpson L. y Show J. 1989).

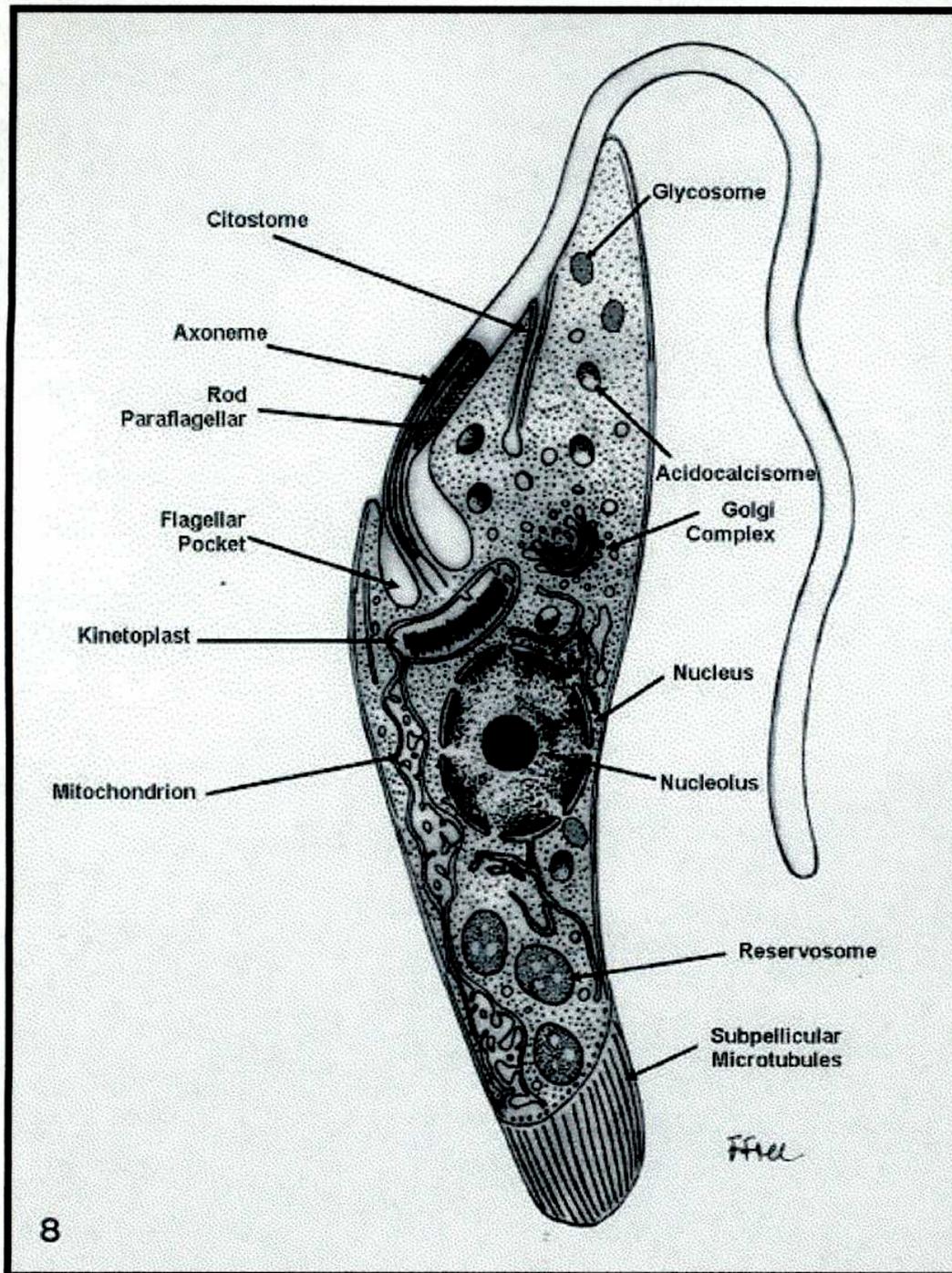


Figura 7. Representación esquemática, basada en información obtenida con el microscopio electrónico de transmisión donde se muestran varias estructuras presentes en la forma epimastigote del *Trypanosoma cruzi*. (Figura obtenida de Wanderley de Souza, 1999)

4. Metabolismo de arginina

4.1. La arginina, características químicas e importancia para los seres vivos

La arginina es un aminoácido alifático, esencial y de características básicas, químicamente se lo conoce como ácido L-2-amino-5-guanidino valérico; ($C_6H_{14}N_4O_2$); PM: 174.2 y se encuentra cargado positivamente a pH: 6. Figura 8.

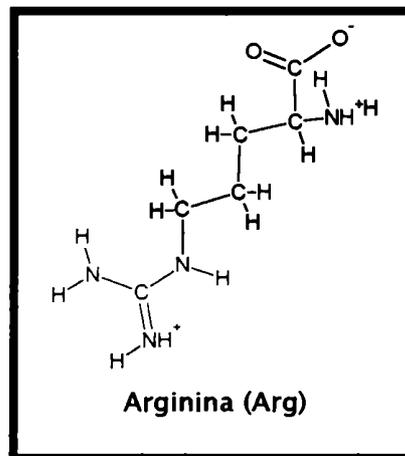


Figura 8. Estructura de la arginina. Obsérvese en la región más distal de su cadena lateral el grupo guanidino, constituido por tres nitrógenos unidos a un átomo de carbono (Átomos marcados en rojo).

Debido a su estructura química, la arginina es un aminoácido particularmente versátil, ya que puede actuar como precursor en la síntesis no solo de proteínas, sino también en la producción de urea, prolina, glutamato, agmatina, poliaminas, óxido nítrico, además de derivados N-fosforilados, como la fosfoarginina (P-arginina) (Wu, G. 1998; Hird, F. 1986). La figura 9, muestra de modo gráfico algunos de los posibles destinos del metabolismo de la arginina. Es importante notar que tres de los productos derivados de la arginina son moléculas de señalización celular: NO, glutamato, y agmatina.

Por sus características básicas la arginina, junto con la lisina juegan un importante papel como constituyentes de proteínas que interactúan con ADN como por ejemplo histonas y factores de transcripción. Además posee un grupo altamente hidrofílico, capaz de formar puentes de hidrógeno, por lo que su cadena lateral puede jugar un importante rol en la determinación de la estructura secundaria de las proteínas (Hird, 1986).

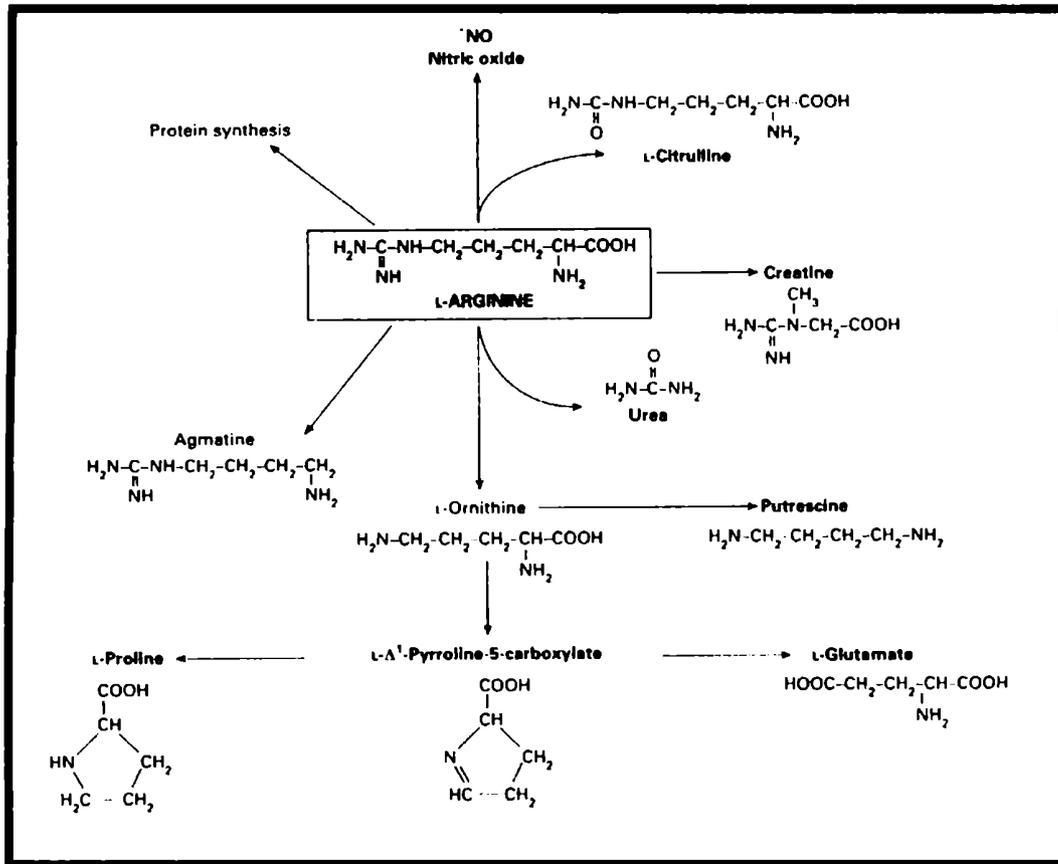


Figura 9. Algunos posibles destinos metabólicos de la arginina en células de mamíferos. Las cinco enzimas sobre las cuales se basan los distintos caminos metabólicos, son (en sentido horario desde la rama superior): oxido nítrico sintasa (NOS), arginina:glicina amidino transferasa, arginasa, arginina decarboxilasa y arginina-tRNA sintetasa. (Figura obtenida de Wu, G., 1998).

Otro destino metabólico posible para la arginina es la ureogénesis que implica la hidrólisis de la arginina para formar ornitina y urea, siendo la arginasa la enzima responsable de dicha reacción (Figura 10). La exaltación de esta ruta metabólica ha permitido que los vertebrados pre-mamíferos acuáticos, como por ejemplo los elasmobranquios, sintetizaran grandes cantidades de urea como osmoregulador y de esta manera lograran colonizar aguas saladas sin deshidratarse. En algunos anfibios la urea continuó jugando, en parte, un rol osmoregulador pero la eliminación de desechos nitrogenados continuó evolucionando hasta llegar a la síntesis de urea mediada por la arginasa y de esta manera se prescindió del medio acuático para la eliminación de desechos con la consecuente conquista de los ambientes terrestres (Hird, 1986).

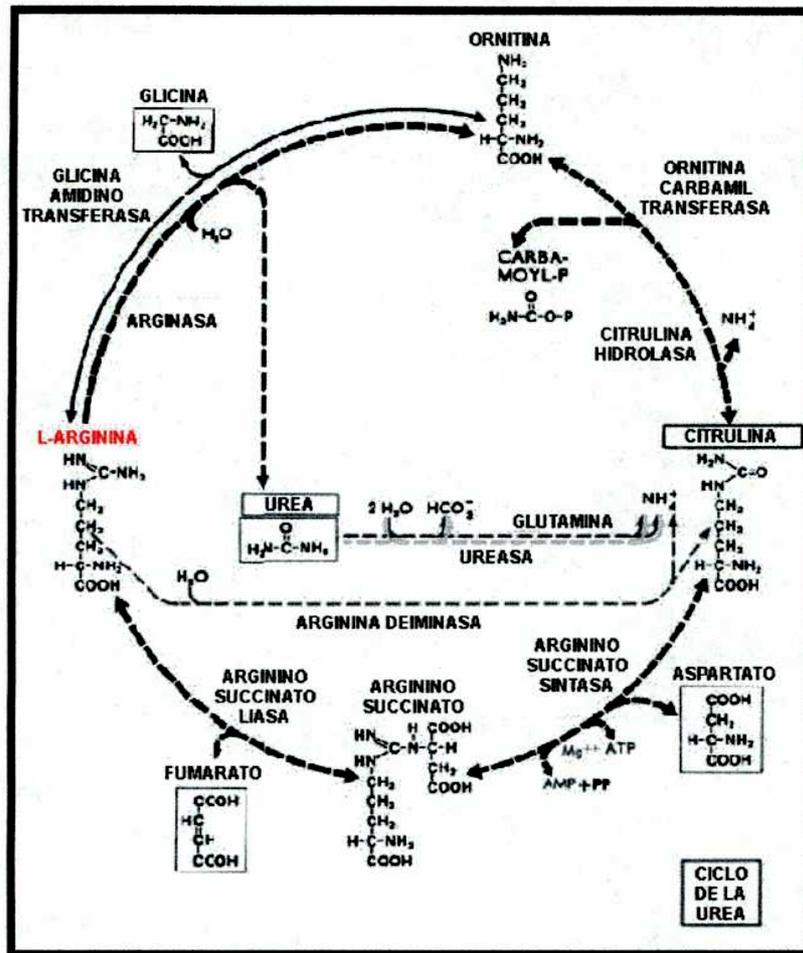


Figura 10. Ciclo de la urea.

Además de las rutas descritas en el párrafo anterior, no debemos olvidar que la ornitina, producida a partir de la arginina puede tener distintos destinos, como por ejemplo, la síntesis de prolina, y además se puede descarboxilar por acción de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) para dar como producto putrescina (una diamina) la cual es la base para la formación de espermina y espermidina. Figuras 11 y 12). Estas poliaminas se encuentran en todas las bacterias y en la mayoría de las células animales. Son factores de crecimiento para ciertos microorganismos y sirven para estabilizar las estructuras de las membranas de las bacterias, así como las estructuras de los ribosomas, de algunos virus y del ADN de muchos organismos.

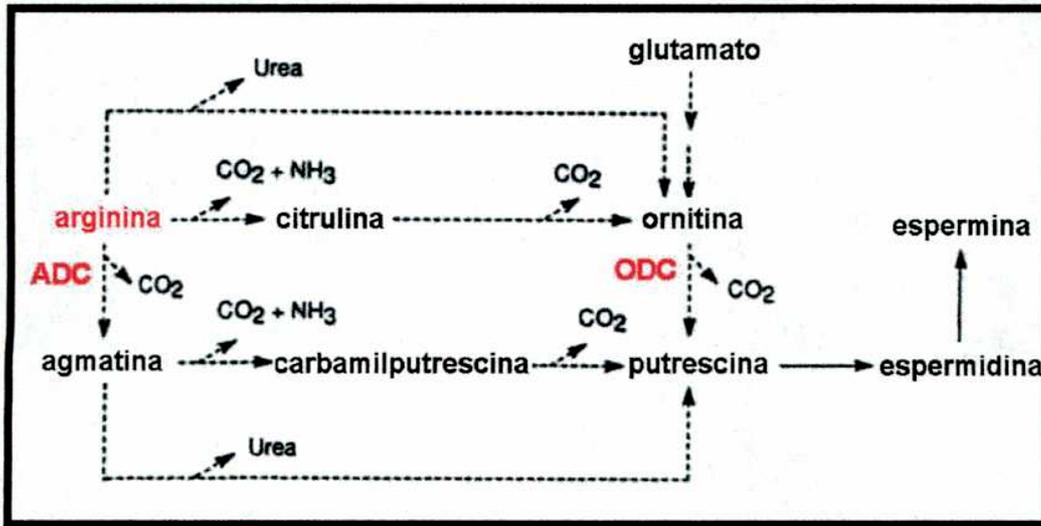


Figura 11. Esquema de la síntesis de poliaminas. ADC: arginina decarboxilasa, ODC: ornitina decarboxilasa.

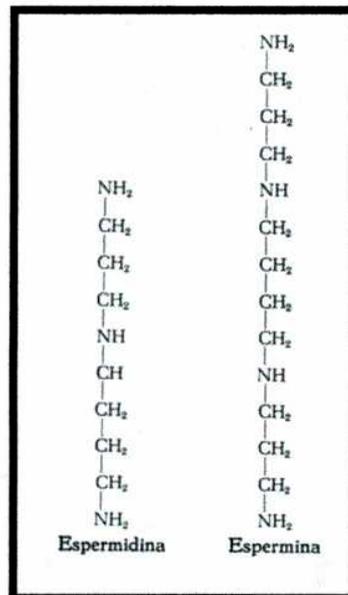


Figura 12. Espermidina y espermina, poliaminas que derivan de la arginina y la metionina. Al pH celular se encuentran en forma de policationes. Esquema obtenido del libro "Bioquímica" de Lehninger.

La producción de óxido nítrico (NO) por acción de la NOS sobre la arginina, con la consecuente liberación de ornitina es otro de los destinos posibles de este aminoácido. Cabe destacar que el NO, es un gas capaz de actuar como mensajero intra e intercelular teniendo funciones en la regulación de procesos biológicos, actuando sobre canales iónicos, proteínas quinasas, fosfatasa, GTPasas y factores de transcripción entre otros (Nathan, 1995; Wu, 1998).

Por último, debido a la estructura química de la arginina, este aminoácido es capaz de formar derivados N-fosforilados como la fosfoarginina (P-arginina), este compuesto posee un elevado potencial energético y junto a la fosfocreatina (P-creatina), la fosfoglicociamina (P-glicociamina), la fosfohipotaurociamina (P-hipotaurociamina), la fosfoofelina (P-ofelina), la fosfolombricina (P-lombricina), la fosfotaurociamina (P-taurociamina), y la fosfotalasemina (P-talasemina), constituyen un grupo de compuestos químicos conocidos como fosfágenos y tienen como función la re-síntesis rápida de ATP durante eventos fisiológicos que demandan un alto consumo de energía. De esta manera los fosfágenos logran mantener constante los niveles de ATP frente a distintas condiciones de demanda energética. Un hecho significativo de los fosfágenos, es que todos ellos contienen arginina o un grupo amidino derivado de este aminoácido. Por esta razón, excepto en el caso de la arginina, la transamidación (transferencia del grupo amidino) a otra amina es un paso esencial en el proceso de síntesis de fosfágenos (Hird, 1983).

4.2. La arginina y su metabolismo en tripanosomátidos.

El metabolismo de arginina en tripanosomátidos, es sumamente variado, principalmente en lo que respecta al catabolismo de este aminoácido. Los grupos amino liberados son excretados como urea, amonio o ambos dependiendo del organismo y de las condiciones del medio. Hay especies amoniotéticas como por ejemplo *Herpetomonas* y *Trypanosoma*, y otras ureotéticas entre las que encontramos, a *Leishmania*, *Leptomonas* y *Critidia*. Este hecho se ve reflejado en la composición enzimática de estos organismos por sobre todo en lo que respecta al metabolismo de ornitina-arginina (Plessmann Camargo, 1978).

Como resumen, la tabla 4, extracta la distribución de algunas enzimas del metabolismo de ornitina-arginina en seis especies de tripanosomátidos. Es importante resaltar que la finalidad principal del metabolismo de ornitina-arginina, no es la misma que se le atribuye en organismos superiores. La eliminación de amonio en forma de urea, no es atribuible al ciclo en *Leptomonas* y *Leishmania* ya que estos organismos, al igual que en otros tripanosomátidos, esta

ausente la ornitina carbamil transferasa (OCT) que actúa como puente entre la eliminación de amonio y el ciclo de la urea. Por lo tanto estas especies excretan urea como resultado de la actividad arginasa (Plessmann Camargo, 1978). Por lo tanto la evidencia obtenida a lo largo de años de investigación en este campo sugiere que la función principal de las enzimas del metabolismo de ornitina-arginina en los tripanosomátidos es proveer arginina (para la síntesis proteica y de fosfágenos) y ornitina (para la síntesis de prolina y poliaminas) y no la excreción del amonio metabólico en forma de urea como ocurre en organismos superiores.

Organismos	Arginasa	CH	AS	AD	OCT
<i>Trypanosoma spp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Leishmania spp.</i>	+	-			
<i>Leptomonas spp.</i>	+	+	-		
<i>Critidia spp.</i>	+	+	+	-	-
<i>Herpetomonas spp.</i>	-	+	+	+	±
<i>Leptomonas samueli</i>	-	+	+	+	+

Tabla 4. Constitución enzimática de varios géneros de tripanosomátidos. CH: citrulina hidrolasa, AS: arginino succinato liasa, AD: arginina deiminasa, OCT: ornitina carbamil transferasa. Tabla obtenida de Plessmann Camargo, 1978.

Las enzimas encargadas de llevar a cabo la transferencia bidireccional del grupo fosfato entre el ATP y el grupo guanidino de la molécula aceptora se denominan genéricamente, adenosina 5´ trifosfato guanidino fosfotransferasas o guanidino quinazas. La reacción de síntesis de fosfágeno a partir de ATP se conoce como "reacción directa" y la síntesis de ATP a partir de fosfágeno se llamo "reacción inversa". (Morrison, 1973, Watts, 1973).

Las guanidino quinazas mas distribuidas en la naturaleza son la arginina quinasa que se encuentra en los phyla: Annelida, Celenterata, Platyhelminthes, Nemertea, Mollusca, Phoronida, Arthropoda, Equinodermata, Hemichordata y Chordata y la creatina quinasa que se encuentra menos representada en los invertebrados (Annelida, Equinodermata, Hemichordata y Chordata) pero en los vertebrados esta ampliamente distribuida hasta llegar a los mamíferos.

En *Trypanosoma cruzi* los aminoácidos también pueden ser utilizados como fuente de energía, ingresando a nivel del ciclo de Krebs para ser catabolizados. En particular, en *Leishmania donovani*, se ha encontrado que la L-arginina es capaz

-Introducción-

de producir un aumento en la tasa respiratoria comparable al que se observa ante el agregado de glucosa. (Bera, 1987).

Además, se puede destacar la biosíntesis en tripanosomátidos de un conjugado de glutatión y espermidina conocido como trypanotión. Este compuesto tiene funciones protectoras y regulatorias ya que mantiene un ambiente intracelular reductor. (Fairlamb, 1997 y 1990). En *Trypanosoma cruzi*, sin embargo no se ha detectado actividad ornitina decarboxilasa (ODC) y una muy baja actividad de arginina decarboxilasa (ADC) en los estadios de tripomastigotes y amastigotes, (Majunder, 1992). Esta incapacidad en la síntesis de poliaminas es compensada por mecanismos de transporte activo de alta afinidad para diaminas en epimastigotes. (Le Quesne, 1996).

5. LOS FOSFÁGENOS Y LAS FOSFÁGENO (GUANIDINO) QUINASAS

Ha sido establecido hace aproximadamente cien años, que los invertebrados contienen distintos compuestos N-fosforilados los cuales son denominados comúnmente como fosfágenos. Las enzimas involucradas en la síntesis de los distintos tipos de fosfágenos pueden ser consideradas como ATP:guanidino fosfotransferasas ya que catalizan la transferencia reversible del grupo fosfato terminal del ATP a un compuesto guanidino. Comúnmente estas enzimas son denotadas con el nombre de quinasa precedido del nombre del compuesto guanidino que actúa como aceptor del grupo fosfato.

5.1. Los fosfágenos

Los fosfágenos son compuestos guanidino fosforilados que están relacionados con el metabolismo energético y los niveles intracelulares de ATP mediante la acción de una fosfágeno quinasa específica que cataliza la siguiente reacción reversible:



Esta reacción funciona como un tampón temporal, regulando los niveles intracelulares de fosfato inorgánico (Pi), los cuales impactan en la degradación del glucógeno y en la regulación de la concentración de protones (H⁺), así como también en el transporte de energía dentro de la célula (Ellington, 2001).

Ocho diferentes fosfágenos (con sus respectivas fosfágeno quinatas) son conocidos y se hallan ampliamente distribuidos en el reino animal. Todos los fosfágenos comparten la presencia de un grupo guanidino pero luego difieren drásticamente en otros aspectos químicos. Estos compuestos van desde la fosfoarginina (PA), un aminoácido natural, hasta la fosfotalasemina (PT), la cual es un compuesto guanidino ampliamente modificado (Figura 13).

La PA y la PT, así como también los otros fosfágenos [fosfocreatina (PC), fosfoglicociamina (PG), fosfotauriciamina (PTc), fosfohipotaurociamina (PHTc), fosfolombricina (PL) y fosfoofelina (PO)] (Figura 13) pueden ser clasificados sobre la base de similitudes químicas y sus rutas de síntesis (Ellington, 2001).

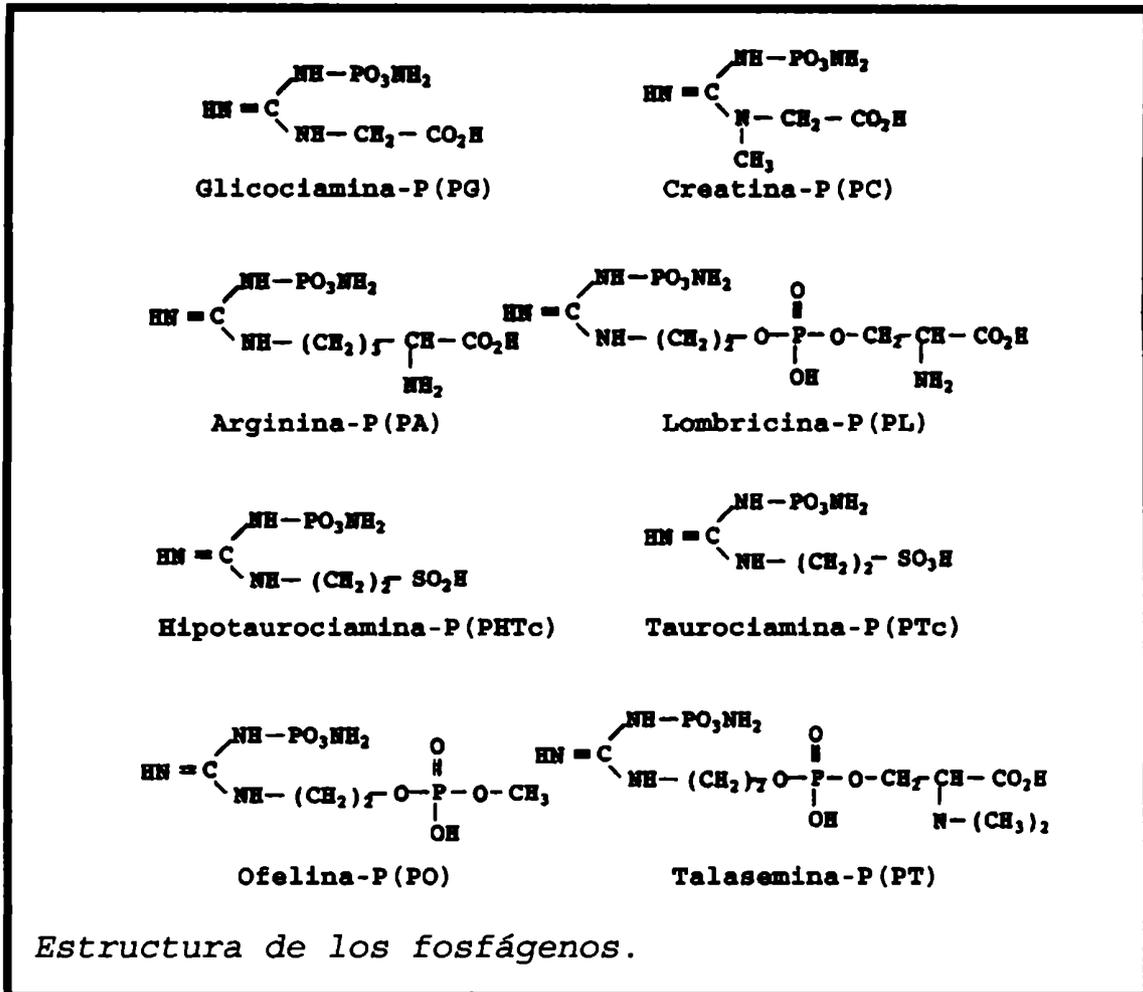


Figura 13. Estructura de los fosfágenos.

5.1.i. Distribución de los fosfágenos en el Reino Animal

La fosfocreatina y la fosfoarginina, fueron los primeros fosfágenos en ser descubiertos en la década de 1920. Inicialmente se pensó que la fosfocreatina era el fosfágeno de los vertebrados, pero este compuesto junto a la enzima quinasa correspondiente fue posteriormente hallado en tejidos de invertebrados, así como también en algunos cordados. Al resto de los fosfágenos junto a sus quinastas se los descubrió luego, exclusivamente en tejidos de varios tipos de gusanos (Robin, 1964).

La fosfoarginina es el fosfágeno mas ampliamente distribuido, hallándose en varios grupos de invertebrados, hemicordados, y tunicados, por lo que es considerado generalmente como el fosfágeno mas relacionado con el antecesor a todos los grupos conocidos (Suzuki, 1997).

Algunos taxones como los moluscos y los gusanos planos contienen solo fosfoarginina, en tanto que otros tienen una gran diversidad de fosfágenos, siendo destacable el caso de los anélidos poliquetos que llegan a tener siete fosfágenos distintos. Por último podemos destacar que la fosfocreatina es el único fosfágeno presente en vertebrados.

Se conocen también casos en los que se puede observar múltiples sistemas de fosfágenos en un mismo tejido (plurifosfágenos). Este fenómeno se observó por primera vez en músculo de equinodermos, que mostró tener tanto fosfoarginina como fosfocreatina (Needham, 1932), pero luego se vio también en poliquetos donde se reportaron casos de hasta tres fosfágenos distintos coexistiendo en el mismo tejido (Robin, 1964).

5.1.ii Biosíntesis de los compuestos guanidino aceptores

Con la única excepción de la L-arginina, los otros sustratos guanidino que participan en la formación de los fosfágenos existen con el solo propósito de ser sustratos de la guanidino quinasa correspondiente, por lo que se puede considerar la adquisición tanto del sustrato como de la enzima como eventos co-evolutivos (Ellington, 2001).

La arginina, además de tener un papel evidente en la formación de fosfoarginina, también participa en la formación de los otros compuestos guanidino aceptores mediante reacciones de transamidación (Hird, 1983, 1986). Las transamidaciones son catalizadas por amidinotransferasas (AMT) específicas. La biosíntesis de creatina (Figura 14), talasemina, y ofelina, además requieren de la participación de guanidina metiltransferasas (GMT). La figura 15 Muestra de modo esquemático las rutas biosintéticas de los distintos guanidino aceptores.

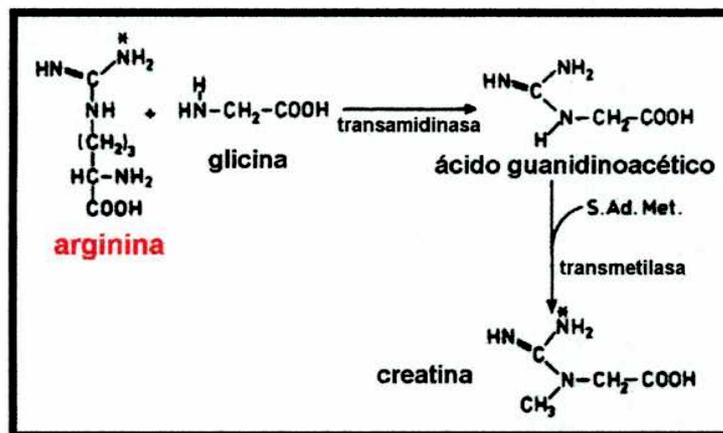
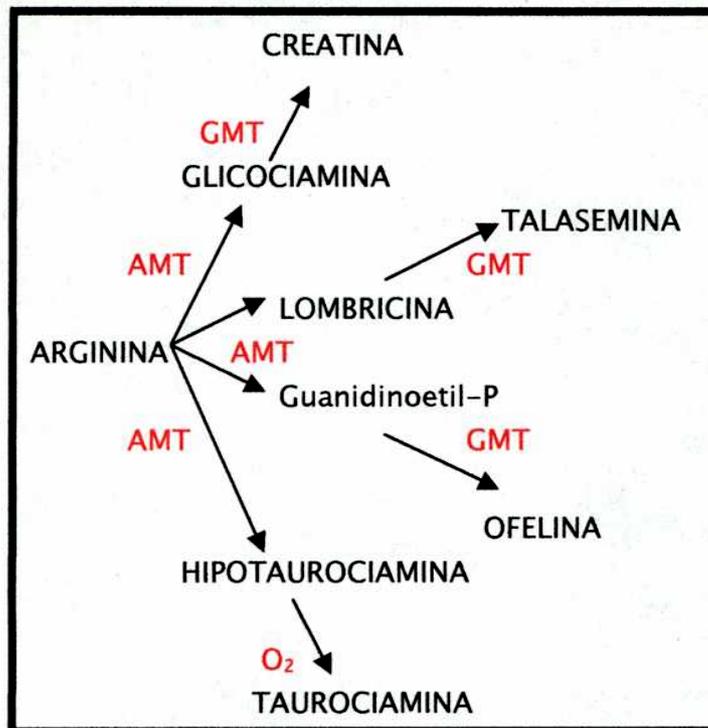


Figura 14. Reacciones implicadas en la biosíntesis de creatina. (Hird, 1982).



AMT: amidinotransferasa



GMT: guanidina metiltransferasa



Figura 15. Esquema de los caminos biosintéticos de los compuestos guanidino aceptores. Nótese el papel central que desempeña la arginina como dador del grupo amidino.

5.2 Las fosfágeno (guanidino) quinazas

Las enzimas involucradas en la síntesis de los distintos fosfágenos pueden ser consideradas como ATP:guanidino fosfotransferasas ya que catalizan la transferencia reversible de un grupo fosfato entre el ATP y un compuesto guanidino. Por convención se denomina "reacción directa" a la formación del fosfágeno con consumo de ATP y reacción inversa a la síntesis del nucleótido trifosfato a partir del fosfágeno (Morrison, 1973, Watts, 1973).

Cada fosfágeno tiene una guanidino quinasa asociada, de este modo las guanidino quinazas conocidas hasta el momento son: arginina quinasa (AK), talasemina quinasa (TK), creatina quinasa (CK), glicosiamina quinasa (GK),

taurociamina quinasa (TcK), hipotaurociamina quinasa (HTcK), lombricina quinasa (LK) y ofelina quinasa (OK).

Las CK, GK y AK son extremadamente específicas por sus respectivos sustratos. En contraste, TcK, HTcK, LK, OK, y TK poseen un rango de especificidad mas amplio (Ellington, 2001).

A pesar de las diferencias existentes entre las distintas guanidino quinastas, se ve que forman una familia altamente conservada que además de diferir en los residuos que determinan la especificidad de sustrato, también muestran diferencias que establecen su estructura cuaternaria como así también en las regiones que precisan su ubicación dentro de la célula.

5.2.i. Propiedades moleculares

Al estudiar los pesos moleculares y la composición de subunidades de las distintas guanidino quinastas se las puede agrupar en tres categorías (Ellington, 2001), la primera esta constituida por arginina quinastas con un peso molecular cercano a 40.000 (forma monomérica) presente en artrópodos y moluscos, en tanto que el segundo grupo esta formado por arginina quinastas de mayor peso molecular presentes en equinodermos y anélidos. Los cambios en los pesos moleculares dentro de este grupo son debido a la formación de dímero, trímeros y tetrameros. Por último, el tercer grupo contiene las guanidino quinastas restantes, de composición similar a la creatina quinasa, con peso molecular cercano a los 80.000 y estructura dimérica. Existe una relación entre los pesos moleculares y la estabilidad de las arginina quinastas, ya que las formas de menor peso molecular son menos sensibles, en tanto que las formas multiméricas, son extremadamente lábiles incluso en presencia de agentes reductores.

Al alinear y comparar las secuencias aminoacídicas de las ATP-guanidino quinastas, se destaca una región que las caracteriza. Dicho dominio comienza con una cisteína que juega un papel central en la constitución del sitio activo de la enzima (Bairoch, 1991). La secuencia del mencionado dominio se muestra a continuación:



En relación a las estructuras secundarias encontradas en la creatina quinasa, se observa entre un 25-30% de alfa hélices, y un 15% de láminas plegadas beta, en tanto que la arginina quinasa tiene un 35-40% de alfa hélices.

5.2.ii. Propiedades catalíticas

Las guanidino quinasas de los invertebrados poseen actividad catalítica solo en presencia de iones metálicos bivalentes. En general todas las guanidino quinasas de invertebrados son activadas por Mg^{2+} en tanto que otros iones como el Cu^{2+} , Zn^{2+} , y Cd^{2+} son incapaces de activar arginina quinasa, lombricina quinasa, y o taurociamina kinasa (Morrison, 1973).

Por los datos disponibles hasta el momento, el ión metálico participaría en la formación no enzimática de un complejo metal-nucleótido el cual actúa como sustrato junto con el compuesto guanidino (Morrison, 1973, Zhou, 1998).

Con respecto al pH óptimo, las guanidino quinasas de invertebrados tienen un pH óptimo de 8,4-9,1 para la reacción directa, y para la reacción inversa los valores oscilan entre 6,6 y 7,2. En ambos casos usando Mg^{2+} como ión cofactor.

El efecto de las variaciones en la concentración del ión metálico y del pH, fue cuidadosamente estudiado desde un enfoque termodinámico para la arginina quinasa por el grupo liderado por el Dr. Dobson (Teague, 1999). En su trabajo estudia las variaciones de la constante de equilibrio K' , que define como:

$$K' = \frac{[ATP] [Arg]}{[ADP] [P-Arg]}$$

y encuentran que tanto la arginina quinasa como así también la creatina quinasa responden de manera similar a los cambios de pH y a las variaciones en la concentración de Mg^{2+} . Por ejemplo una caída en el pH de 7.4 a 6.4 incrementa la k'_{AK} 8 veces, en tanto que la k'_{CK} , se ve elevada 7 veces. Similar tendencia se puede ver con el Mg^{2+} , donde se ve que ambas constantes aumentan aproximadamente 3 veces al variar la concentración de Mg^{2+} de 0.1 a 1.5 mM.

Mediante el estudio de la constante de equilibrio también se observa que la fosfoarginina es aproximadamente 10 veces menos eficiente que la fosfocreatina en el almacenamiento de energía, en tanto que el resto de los fosfógenos poseen una eficiencia intermedia. Esto último es consecuencia de la presencia de un grupo metilo en la región del grupo guanidino de la creatina-P (ver figura 13), el cual elimina los posibles estados de resonancia, convirtiendo a su grupo fosfato en el más lábil. En el resto de los fosfógenos, este grupo metilo está reemplazado por un protón. Estas diferencias impactan en la capacidad de actuar como tampones de ATP de los distintos sistemas de fosfógenos.

5.3. Rol fisiológico de los sistemas de fosfágenos.

Típicamente, los sistemas de fosfágenos se encuentran en aquellos tipos celulares que presentan tasa de producción de energía alta y variable.

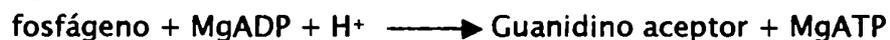
La distribución celular del sistema PC/CK, esta muy estudiada en vertebrados, donde se encuentra principalmente en distintos tipos musculares y células nerviosas, aunque también se lo ha encontrado en una gran variedad de otras células y tejidos, incluyendo espermatozoides, retina, riñón, agallas de los peces, etc.. En el caso de cordados inferiores e invertebrados, el sistema PC/CK, se encontró en músculo y espermatozoides.

Con respecto a los otros sistemas de fosfágenos, el PA/AK, fue el mas investigado en lo que respecta a su distribución y se lo halló principalmente en células musculares y en neuronas aunque también se lo encontró en espermatozoides de moluscos y artrópodos, fotorreceptores de artrópodos, y agallas de cangrejos. El resto de los sistemas de fosfágenos, se los encontró típicamente en músculos, pero su presencia en otros tejidos esta muy poco estudiada.

5.3.i. Las fosfágeno quinasa como tampones temporales de ATP.

La creatina quinasa, al igual que las otras fosfágeno quinasa, actúan como un buffer de los niveles de ATP y ADP mediante las siguientes reacciones:

Fosfágeno quinasa:



ATPasa:



NETO:



Estas reacciones describen el rol mas conocido de los fosfágenos, que fue llamado como "buffer temporal de ATP" por Meyer y colaboradores (Meyer, 1984) y puede ser asemejado al funcionamiento de carga y descarga de un capacitor.

Este efecto se puede apreciar mas gráficamente en la figura 16, que describe las variaciones en los niveles de ATP (línea roja), los de fosfocreatina (cuadrados) y de fosfato inorgánico (círculos). Los primeros cuatro minutos representan el período de estimulación eléctrica que es seguido por una etapa de reposo.

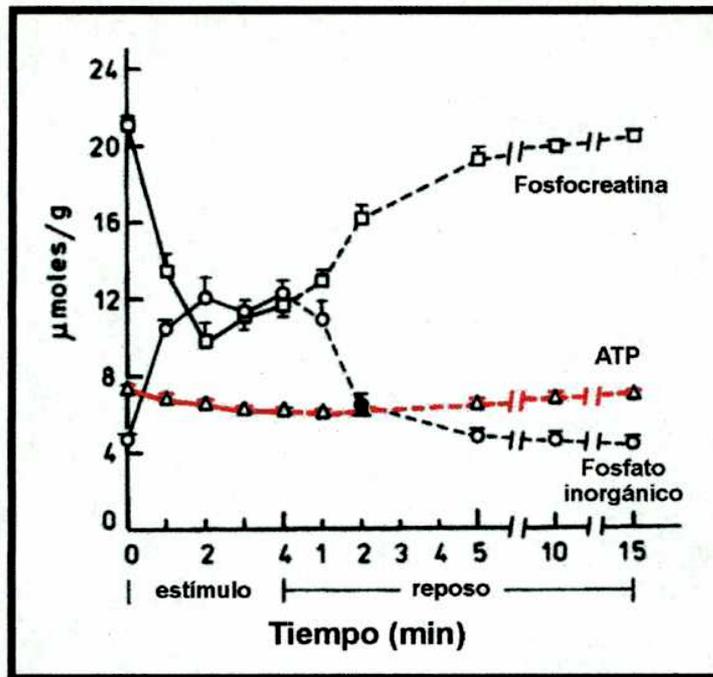


Figura 16. Efecto de "buffer temporal" de ATP ejercido por la fosfocreatina en el músculo de mamíferos. (Hird, 1982).

Como se puede ver en la figura, los niveles de ATP se mantienen constantes en el tiempo ya que van siendo compensados por las variaciones en los niveles de fosfocreatina (Hird, 1982).

Los distintos sistemas de fosfógenos difieren en su capacidad de actuar como búferes de ATP, siendo la fosfocreatina el mas eficiente y la fosfoarginina el de menor capacidad de respuesta. Debido a esto la presencia de fosfoarginina en los invertebrados puede llegar a ser ventajosa, ya que estos organismos se enfrentan a condiciones de estrés donde la hipoxia y la acidosis intracelular son frecuentes y en esas condiciones se agotarían rápidamente las reservas de fosfocreatina (Ellington, 2001).

5.3.ii. Los fosfógenos como tampones espaciales de ATP.

En vertebrados se conocen al menos cuatro isoenzimas de creatina quinasa. Las subunidades que las forman son designadas como M (músculo) y B (cerebro), que al combinarse forman tres isoenzimas diméricas citosólicas denominadas MM, MB y BB. Además existen formas mitocondriales denotadas como Mi-CK.

Estas isoenzimas se encontraron unidas a estructuras subcelulares como membrana plasmática, retículo sarcoplásmico, flagelo del espermatozoide y membranas de células neuronales (Watts, 1973).

La presencia de actividad creatina quinasa en sitios de producción de fosfatos de alta energía (glucólisis y fosforilación oxidativa), como así también la presencia de esta enzima en los sitios de alto consumo energético lleva a proponer un modelo adicional para la creatina quinasa que se representa en la figura 17. De acuerdo con este modelo, la mayor parte de los fosfatos de alta energía son transportados en forma de PC, en lugar de ATP.

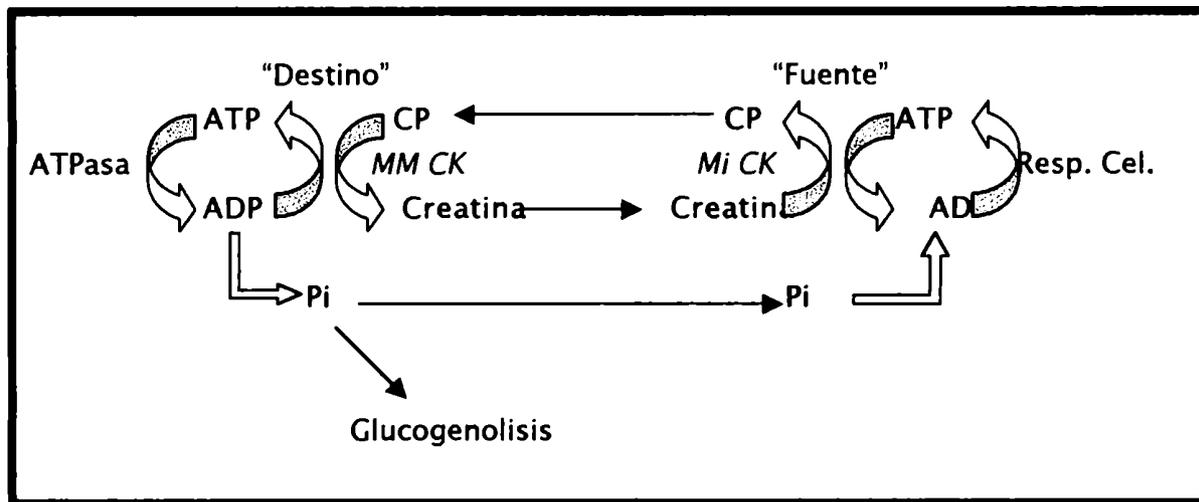


Figura 17. Esquema de la función de "Buffer espacial" de la creatina quinasa. Nótese la transferencia de fosfatos de alta energía entre los sitios de síntesis de ATP ("fuente"), donde se realiza la respiración celular y los sitios de consumo ("destino"), donde hay actividad ATPasa. En esta figura se puede ver la liberación de fosfato inorgánico (Pi), el cual como se explicó anteriormente, actúa regulando la degradación del glucógeno.

En el caso de la arginina quinasa también se describieron formas citosólicas y mitocondriales codificadas en algunos casos por un único gen como se observó en *Drosophila melanogaster* (Wang, 1998). La presencia de AK mitocondriales en ciertos artrópodos ha incitado a especular que en estos casos la PA, podría estar cumpliendo un rol similar (Hird, 1983, 1985), aunque hay evidencias que ponen en discusión esta capacidad (Doumen, 1990) y plantean que la función de los fosfógenos como transportadores de fosfatos de alta energía cobraría importancia en células con una alta tasa de consumo aeróbico en las cuales hay grandes distancias a difundir entre la "fuente" y el "destino" (Meyer, 1984).

5.4. La arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi*.

En nuestro laboratorio se caracterizó bioquímica y molecularmente la arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi* (Pereira, 2000).

La actividad de esta enzima fue determinada tanto en ensayos *in vitro* como así también en ensayos llevados a cabo *in vivo*.

Durante la caracterización bioquímica se determinó, mediante estudios de fraccionamiento subcelular, una localización aparentemente citoplasmática y se calcularon los siguientes parámetros cinéticos: K_m para la arginina = 0.33 mM y K_m para el ATP = 0.31 mM. Además, se purificó parcialmente y se estudiaron sus requerimientos, mostrando una total dependencia de ATP y magnesio, en tanto que otros cationes bivalentes como el manganeso y el calcio, también pueden ser utilizados por la arginina quinasa de *T. cruzi*, en tanto que el zinc y el cobre mostraron tener un efecto inhibitorio sobre la actividad de esta enzima. Como ocurre con la mayoría de las guanidino quinasa, se observó una dependencia del pH.

La caracterización molecular comenzó con el clonado del gen que codifica para esta enzima, su secuenciación y también se secuenciaron las regiones 5' y 3' linderas a su ubicación en el genoma. La secuencia codificante posee 1074 pb, en la región 5' no codificante existe un tracto de polipirimidinas que es requerido para el correcto procesamiento del ARN mensajero.

Mediante ensayos de "Southern" y "Chromosome Blot" se determinó que es un gen de copia única y sus alelos se encuentran distribuidos en un par de cromosomas homólogos de un tamaño aproximado de 830 y 880 kpb.

De la expresión de este gen obtiene una proteína de 357 aminoácidos con un peso molecular de 40.2 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 7.04.

Como puede observarse en la figura 18, la estructura primaria de la arginina quinasa de *T. cruzi* presenta características altamente conservadas entre las arginina quinasa presentes en otros organismos: la región de reconocimiento del grupo guanidino presente en el sustrato, que incluye los aminoácidos Ser63, Gly64, Val65 y Tyr68 los cuales participan en la unión de la arginina a la enzima; cinco argininas (Arg124, Arg126, Arg280, Arg 229 y Arg 309) que mantienen unido el ATP al sitio activo de la enzima; una arginina (Arg193) que participa en la estabilización de la configuración del sitio activo cuando está unido el sustrato y por último dos glutamatos (Glu225 y Glu314) que mantienen unido al sustrato arginina durante la catálisis (Zhou, 1998).

También presenta el motivo CPTNLGT altamente conservado dentro de la familia de las ATP-guanidino fosfotransferasas (Bairoch, 1991) y un posible sitio de unión a actina del tipo actinina.

Al ser comparada con otras guanidino quinasas, la arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi* posee una alta identidad de secuencia aminoacídica con las arginina quinasas de *Apis mellifera* (insecto), *Drosophila melanogaster* (insecto), *Penaeus japonicus* (crustáceo) y con *Caenorhabditis elegans* (nematode): 69.6, 66.9, 71.8 y 58.5 % respectivamente.

Con la creatina quinasa humana de cerebro y músculo la arginina quinasa posee en 39 % de identidad aminoacídica. En tanto que presenta un 38 % de identidad con la lombricina quinasa de *Eisenia fetida* (anélido) y un 36 % con la guanidino acetato quinasa de *Neanthes diversicolor* (anélido) (Pereira, 2000).

Probable tracto de polipirimidinas y sitio aceptor del miniexón

Probable dominio de unión a actina

Consenso de las guanidino quinasas

Región GS (región de reconocimiento del sustrato arginina).

Argininas (Arg¹²⁴, Arg¹²⁶, Arg²⁸⁰, Arg²²⁹ y Arg³⁰⁹) involucradas en la unión del ATP

Glutamatos (Glu²²⁵ y Glu³¹⁴) involucrados en la unión del sustrato arginina

Arginina (Arg¹⁹³) involucrada con la configuración del sitio activo

Figura 18: Secuencia completa del gen de la arginina quinasa de *T. cruzi* incluyendo las regiones 5' y 3' no codificantes (GenBank # AF070451).

6. Transporte de solutos a través de la membrana

Es indudable que los diferentes sistemas de transporte otorgan a las células una gran variedad de funciones.

En primer lugar, permiten el intercambio selectivo de sustancias, no solo a nivel de la membrana plasmática, sino también a nivel de las organelas y el sistema de endomembranas presente en células eucariotas. Mediante esta función posibilitan el ingreso de nutrientes esenciales y fuentes de carbono, y luego de ser metabolizados por la célula, cataliza también la excreción de los productos finales de las distintas rutas metabólicas. Esta función además, asegura el intercambio de especies iónicas que se encuentran diferencialmente distribuidas entre el medio externo y el interior de la célula, logrando mantener concentraciones apropiadas de minerales que actúan como cofactores enzimáticos y que originan un potencial de membrana que es requerido para la generación de bioelectricidad.

En segundo lugar, los sistemas de transporte median tácticas de ataque y defensa en la guerra biológica que liberan la mayoría de los organismos vivientes, por ejemplo secretando antibióticos, agentes antivirales, agentes antifúngicos, y toxinas que brinda al organismo productor ventajas en la lucha por la supervivencia. Además existen proteínas transportadoras que catalizan la expulsión activa de drogas y otras sustancias tóxicas.

En tercer lugar, los transportadores participan en la secreción y captación de moléculas orgánicas las cuales cumplen una variedad de papeles biológicamente importantes en lo que se refiere a la protección contra el daño ambiental y la comunicación entre organismos como así también permitiendo la comunicación entre células brindando la posibilidad de la acción coordinada durante el fenómeno de la multicelularidad.

Por último, los sistemas de transporte permiten el traslado de ácidos nucleicos a través de las membranas de la célula, permitiendo el intercambio genético entre organismos y promoviendo la diversificación de especies (Saier, M.H. Jr., 2000).

Hace más de medio siglo, se comenzó el estudio detallado de los sistemas de transporte biológicos. El principal modelo utilizado fue la permeasa de lactosa de *Escherichia coli*, estudiada por Jacques Monod y su equipo del Instituto Pasteur en Francia. A partir de sus hallazgos se planteó la existencia de proteínas "carriers" específicas que participaban en el transporte de sustratos a través de las membranas biológicas (Cohen, 1957). En un comienzo los procesos de transporte fueron caracterizados desde el punto de vista fisiológico utilizando células intactas o sistemas de "células fantasmas" a las que se le liberaba el contenido

citoplasmático por “shock” osmótico. Estos sistemas proporcionaron detallada información cinética y establecieron la naturaleza proteica de todas las permeasas (Kaback, 1974).

Al ir progresando las técnicas de biología molecular, y en particular la secuenciación de genes, la estructura primaria de permeasas comenzaron a estar disponibles y utilizando análisis de perfiles de polaridad se determinó la naturaleza notablemente hidrófoba de varios tipos de transportadores integrales de membrana (Buchel, D.E., 1980; Lee, C.A., 1983). Actualmente, estudios multidisciplinarios están brindando valiosa información sobre la estructura tridimensional y los mecanismos moleculares de los sistemas de transporte (Kaback HR, 1997).

Al combinar los datos obtenidos de la secuenciación de genes con los datos estructurales, surgen análisis filogenéticos que representan un importante avance. Como es bien sabido, dos proteínas cualesquiera que mostrasen ser homólogas (Ej. que exhiban suficiente similitud de estructura primaria y/o secundaria como para establecer que se originaron de un antepasado común) demostraran, en general, exhibir estructuras tridimensionales notablemente similares. Además, el grado de similitud de estructura terciaria correlaciona bien con el grado de similitud de estructura primaria. Por esta razón, los análisis filogenéticos permiten aplicar técnicas de modelado a proteínas relacionadas a través de la extrapolación de un miembro de estructura conocida a otros de la misma familia de los cuales aun no se ha logrado datos cristalográficos.

Argumentos similares pueden aplicarse a estudios mecanísticos. Así, es probable, que el mecanismo utilizado para el transporte del soluto sea similar para todos los miembros de una misma familia de permeasas y las variaciones en un mecanismo específico será mas grande cuando la divergencia sea mayor.

La capacidad de deducir y extrapolar información estructural y de mecanismos de transporte ilustra el valor de los datos filogenéticos, además del aporte de datos que permiten estimar el tiempo de aparición de una familia, como así también la senda tomada durante la historia evolutiva.

6.1. Generalidades de los sistemas de transporte

Casi todos los procesos de transporte, están mediados por proteínas integrales de membrana, que en algunos casos interaccionan con receptores celulares, con proteínas con actividad regulatória, como así también con dominios proteicos que permiten el acople de energía en aquellos casos en que se requiera

(Higgins CF, 1992). Cada uno de estos complejos proteicos es llamado: sistema de transporte, transportador, sistema de permeasa, o permeasa.

El transporte medido por permeasas puede ocurrir por uno de tres procesos diferentes aunque relacionados. El primero, es la difusión facilitada, o difusión mediada por proteínas, que ocurre a favor de un gradiente de concentración y por lo tanto no requiere de un aporte extra de energía. Se han hallado dos mecanismos de difusión facilitada en los sistemas biológicos: "los canales" y "las proteínas transportadoras" (Carriers). En la difusión facilitada por canales, el soluto pasa de un lado a otro de la membrana mediante un proceso de difusión que esta limitado por las características del canal que brinda un poro de las características de hidrofobicidad compatibles al sustrato que será transportado, mediante la disposición de los residuos de los aminoácidos de las proteínas que lo componen. En la difusión facilitada por proteínas transportadoras, alguna parte del transportador, presuntamente, se moviliza a través de la membrana junto al sustrato que debe ser transportado. Esta presunción aun no se ha podido esclarecer por la falta de datos cristalográficos de este tipo de proteínas. A diferencia de los canales, las proteínas transportadoras presentan estereo especificidad, presentan tasas de transporte que son varios ordenes de magnitud menores a las observadas en los canales y una cinética de saturación claramente diferenciable. Además, en la mayoría de los casos son monómeros en tanto que los canales están formados por complejos oligoméricos. Por último, si es necesario un gasto de energía acoplado al proceso de transporte, estamos en presencia de un transporte activo. Si una fuente primaria de energía (reacción química, absorción de luz, o flujo de electrones) esta directamente acoplada al proceso, será llamado transporte activo primario, en tanto que si utiliza una fuente secundaria de energía (gradiente electroquímico de un determinado ión, como ser la fuerza protón motriz "FPM" o en el caso del sodio, la fuerza sodio motriz "FSM") será llamado activo secundario.

Los sistemas de transporte activo pueden funcionar como "uniport", "simport", o "antiport". Los "uniporters", catalizan el transporte de una única especie de molécula de sustrato, y por lo tanto ocurre independientemente del movimiento de otras especies moleculares. Los "simporters", catalizan el movimiento de dos o mas especies moleculares en la misma dirección, en tanto que los "antiporters" catalizan el intercambio de distintas especies moleculares .

Por último, es importante destacar que unas pocas proteínas transportadoras, modifican al sustrato durante el transporte y por lo tanto a este proceso se lo denotan con el nombre de translocación (Revisado por Saier MH Jr, 2000; Hediger, 1994).

6.2. Transporte de aminoácidos

El transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática, es un proceso de gran importancia fisiológica tanto en células animales, como vegetales. En el estudio del transporte de aminoácidos, al igual que como ocurre con otras proteínas de membrana, es sumamente dificultoso el abordaje mediante técnicas moleculares, tanto es así, que el primer gen de un transportador de aminoácidos en células de mamíferos fue clonado recién en el año 1991.

Las siguientes propiedades generales (McGivan, 1994) fueron establecidas por el estudio exhaustivo de los sistemas de transporte de aminoácidos: primero, son altamente estereo específicos, mostrando una velocidad de transporte varias veces mayor al utilizar aminoácidos de la serie L, en comparación a la velocidad observada al utilizar aminoácidos de la serie D. Segundo, poseen una baja especificidad de sustrato en comparación con las enzimas, un mismo sistema es capaz de transportar diferentes aminoácidos y además la especificidad se superpone, pudiéndose encontrar en una misma membrana celular distintos transportadores para un mismo sustrato. Tercero, los sistemas de transporte de aminoácidos se pueden dividir en dos categorías, los transportadores activos primarios que catalizan el movimiento del aminoácido a través de la membrana con un gasto directo de ATP ("uniporters") y en la otro categoría se encuentran aquellos transportadores que se consideran activos secundarios ya que utilizan el gradiente electroquímico de un determinado ión, como ser el sodio para realizar el transporte ("simporters").

6.2.i. Especificidad de los sistemas de transporte de aminoácidos.

Transportadores de aminoácidos neutros. La mayoría de las células expresan este tipo de transportadores, siendo los mas caracterizados, los sistemas conocidos como A, ASC, y L. El sistema A, cataliza el movimiento de la mayoría de los aminoácidos alifáticos pequeños junto con sodio, utilizando un mecanismo del tipo "simporte". Alanina, serina y glutamina son los aminoácidos mas eficientemente transportados por este sistema. Entre otras propiedades podemos destacar: la capacidad para transportar aminoácido N-metilados, y la sensibilidad al pH verificándose una disminución en el transporte al acidificar el medio. En cuanto a su regulación, es notorio el aumento en el transporte debido a factores tales como, el ayuno de aminoácidos, modulación hormonal, y estrés hiperosmótico (Gazzola, 2001).

El sistema ASC, transporta aminoácidos alifáticos, pero posee preferencia por el transporte de alanina, serina y cisteína. En todos los casos actúa de modo dependiente de sodio. A diferencia del sistema A, no es capaz de transportar aminoácidos N-metilados, es insensible al pH y no es inducible.

El sistema L, cataliza el transporte de aminoácidos de cadena ramificada y aromáticos de manera sodio independiente. Este sistema también puede utilizar mecanismos "antiporte", y en determinadas circunstancias fisiológicas pueden catalizar la liberación del aminoácido, en lugar de su incorporación (McGivan, 1994).

Transportadores de aminoácidos ácidos. Los aminoácidos ácidos, L-glutamato y L-aspartato, son acumulados en algunos tipos celulares por transportadores de alta afinidad llamados X_{AG}^- . Debido a la estequiometría del transporte (una molécula de glutamato por cada dos o tres moléculas de sodio y un protón, en tanto que se incorpora un potasio) se produce un desbalance de cargas, por lo que este sistema de transporte tiene propiedades electrogénicas. Una curiosidad de este sistema de transporte, es su estereoespecificidad anómala, ya que utiliza D-aspartato como sustrato, pero no ocurre lo mismo con el D-glutamato (McGivan, 1994). En tejido neuronal, se encuentra un gran número de transportadores de glutamato con variadas características cinéticas (McGivan, 1994; Malandro, 1996; Slotboom, 1999).

Transportadores de aminoácidos básicos. Tradicionalmente, los sistemas de transporte de aminoácidos, se han clasificado en base a dos criterios básicos: 1) la especificidad de sustrato y 2) la dependencia de sodio para llevar a cabo el transporte. Aplicando este criterio, el transporte de aminoácidos básicos (catiónicos) se dividió en cuatro grupos detallados en la tabla ¿?

Sistema	Dependencia Na^+	Sustrato	Reportado en
γ^+	-	Lys,Arg,Orn	Reticulocitos, Fibroblastos
$b^{o,+}$		Lys,Arg,Leu	Blastocitos
$\gamma^{+,L}$	-	Lys,Arg	Eritrocitos
	+	Leu,Met,Gln	
$B^{o,+}$	+	Lys,Arg,Ala,Val	Blastocitos

Tabla ¿?. Características de los distintos sistemas de transporte de aminoácidos básicos (Deves, 1998).

De los cuatro sistemas detallados en la tabla, solo uno, el sistema γ^+ , es selectivo para aminoácidos catiónicos, en tanto que los otros tres sistemas ($b^{0,+}$, γ^{+L} , $B^{0,+}$) aceptan una amplia variedad de sustratos, incluyendo aminoácidos catiónicos y neutros. Sin embargo, estos sistemas de transporte difieren en su requerimiento por el ión monovalente. El sistema $B^{0,+}$, es dependiente de sodio, el sistema $b^{0,+}$, es independiente de sodio, pudiendo ser reemplazado por sales de potasio, litio o colina. Por último, el sistema γ^{+L} , muestra una compleja interacción con el ión, dependiendo de la sustancia que transporte. En este sistema, el transporte de lisina no se ve afectado al reemplazar el sodio, en tanto que la afinidad por los aminoácidos neutros disminuye notoriamente cuando el sodio es reemplazado por potasio (Deves, 1998).

A medida que se fue ampliando la información disponible en cuanto a la estructura y secuencia de genes pertenecientes al grupo de transportadores de aminoácidos cationicos, se los agrupó en dos familias. La familia CAT (Cationic Aminoacid Transporters) a la que pertenece el sistema γ^+ , son proteínas con un peso molecular de aproximadamente 70 kDa con múltiples pasos transmembrana. La familia BAT (Basic Aminoacid Transporters) en la que se incluyen los sistemas $b^{0,+}$ e γ^{+L} , son proteínas con un peso molecular de 59 y 78 kDa y poseen de uno a cuatro pasos transmembrana (Deves, 1998).

6.3. Sistemas de transporte de solutos en tripanosomátidos.

En tripanosomátidos al transporte de sustancias se lo ha considerado en varias oportunidades como un posible blanco para el desarrollo de drogas.

Uno de los sistemas mas estudiados, es el transporte de purinas, que se caracteriza por su alta afinidad, ya que presenta valores de K_m que están en el rango de micromolar (Cohn, 1997). En *Trypanosoma brucei*, los transportadores de purinas juegan un rol central en la bioquímica del parásito, ya que este protozoario es incapaz de sintetizar purinas *de novo* y por lo tanto las debe incorporar del medio (Sánchez, 1999). El transporte de nucleósidos ha sido implicado en la incorporación de drogas antiparasitarias en *Trypanosoma brucei* y en otros parásitos. En particular se relacionó al sistema de transporte de purinas P2 fue relacionado a la incorporación de la droga antiparasitaria melaminofenil arsénica (Carter, 1995).

Los transportadores de hidratos de carbono, también se han caracterizado exhaustivamente en tripanosomátidos (Benno, 1991; Tetaud, 1996).

En lo referido al transporte de aminoácidos en tripanosomátidos, se ha caracterizado en *Leishmania donovani*, dos sistemas de transporte de aminoácidos neutros, que mostraron dependencia por ATP. En este mismo parásito, también se ha caracterizado un transportador de arginina, el cual mostro poseer características distintivas en relación con lo estudiado en otros organismos (Kandpal, 1995).

En *Trypanosoma brucei brucei*, se ha caracterizado un transportador de L-prolina dependiente de ATP y de alta afinidad (L´Hostis, 1993).

En *Trypanosoma cruzi*, se ha estudiado en profundidad el transporte de diaminas como por ejemplo la putresina y la cadaverina (Le Quesne, 1996), debido al papel que juegan en la síntesis de poliaminas, las que demostraron ser necesarias para la síntesis del tripanotión, un agente reductor que cumple numerosas funciones dentro de la célula. Además, existen dos trabajos, relacionados con el transporte de arginina en *T. cruzi*, realizados en la década del `70 (Hampton, 1971; Goldberg, 1976).

En nuestro laboratorio se describió el transporte de arginina en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Pereira, 1999). Las características mas sobresalientes de este sistema de transporte se detallan a continuación:

- Presenta una alta afinidad por su sustrato ($K_m = 4.16 \mu M$) en comparación con otros sistemas similares.
- Es sumamente específico para la arginina, ya que no se inhibe en presencia de otros aminoácidos naturales, como así tampoco se lo compite con análogos estructurales de la arginina. Solo se observo una disminución significativa en la incorporación de L-arginina en presencia de D-arginina, homoarginina y canavanina.
- Exhibe una cinética saturable por sustrato.
- Es independiente de sodio, pero dependiente de ATP.
- Es afectado en forma específica por el tiempo de ayuno de L-arginina.

MATERIALES Y METODOS

1. Reactivos generales.

El líquido de centelleo utilizado para cuantificar la radioactividad en todos los casos fue UltimaGoldXR (Packard Instrument Co.)

Las resinas de intercambio iónico utilizadas para el ensayo arginina quinasa fueron Dowex AG-1 X4 (mesh 200 - 400) de Bio Rad.

La L-[2,3-³H]-L-arginina fue de DuPont/NEN (New England Nuclear).

Los aminoácidos, inhibidores de proteasas y drogas utilizadas en los tratamientos para los ensayos de transporte y arginina kinasa fueron de Sigma-Aldrich Co.

Los medios de cultivo de parásitos y bacterias fueron preparados con drogas de Difco, Co.

Las enzimas de restricción y las modificadoras fueron de New England BioLabs o Promega según se indique en cada caso.

Los kits de marcación de sondas y purificación de ADN fueron de New England BioLabs o Promega según se indique en cada caso.

Las membranas utilizadas para transferir ADN o ARN fueron Hybond N+.

Las membranas utilizadas para transferir proteínas fueron Hybond C+.

Los reactivos utilizados para los geles de agarosa y poliacrilamida fueron de Sigma-Aldrich Co.

Todos los demás reactivos utilizados en los bufferes y de uso general fueron de Sigma-Aldrich Co.

2. Medios y soluciones generales.

2.1. Medios.

LIT (cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*): (1 litro) disolver 5gr infusión de hígado, 5gr triptosa, 68 ml de 1M NaCl, 5.3 ml de 1M KCl, 22 ml 1M HPO₄Na₂. Autoclavar. Agregar 10 ml 20% glucosa, 1 ml hemina (1gr. en 50 ml 0.2M NaOH), 100 ml de suero fetal bovino (10% final), 100 µg/ml estreptomycin, 100 U/ml penicilina.

LB: 1% p/v bacto-triptona, 0.5% p/v extracto de levaduras, 1% p/v NaCl.

LB-agar: LB + 1.5% p/v bactoagar.

Terrific. (1 litro) disolver 12 gr bacto-triptona, 24 gr extracto de levaduras y 4 ml glicerol en 900 ml de H₂O, autoclavar, y agregar 100 ml de una solución estéril de 0.17 M KH₂PO₄, 0.72 M K₂HPO₄.

Concentración de ampicilina utilizada: 50 µg/ml.

Concentración de IPTG para placas: 0.1M; disolver 120 mg en 5 ml de H₂O.

Agregar 100 µl/placa (concentración final para placas: 0.5 mM)

Concentración de X-Gal para placas: 50 mg/ml, (disolver en dimetilformamida).

Agregar 50 µl/placa (concentración final para placa: 40 µg/ml)

2.2 Soluciones.

TE: 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8.

TBE 10x: (1 litro) 108 gr Tris base, 55 gr ácido bórico, 40 ml 0.5 M EDTA pH 8.

TAE 50x: (1 litro) 242 gr. Tris base, 57.1 ml ácido acético glacial, 100 ml 0.5 M EDTA pH8.

Buffer de siembra para muestras de ADN, 6x: 0.25% p/v azul de bromofenol, 0.25% p/v Xylene Cyanol y 30% v/v glicerol.

Buffer de siembra para muestras de RNA 4x (ARN LB 4x): 1 mM EDTA pH 8, 0.25% p/v azul de bromofenol, 0.25% p/v Xylen Cyanol, 50% v/v glicerol.

Buffer de siembra para geles de secuencia: 80% formamida, 0.2% azul de bromofenol, 0.2% Xylene Cyanol, 1x TBE.

CB (cracking buffer) o Buffer de siembra para muestras de proteínas, 5x: 50% v/v glicerol, 7.7% p/v DTT, 10% p/v SDS, 0.4 M Tris-HCl pH 6.8, 0.002% p/v azul de bromofenol.

Buffer MOPS 10x: 0.2 M MOPS, 0.5 M acetato de sodio pH 7, 0.01 M Na₂EDTA.

Buffer Tris-glicina-SDS 10x: (1 litro) 30.3 gr Tris base, 144 gr glicina y 1% v/v SDS.

TBS 10x: 0.25 M Tris-HCl pH 8, 9% p/v NaCl. // TBS-T: TBS 1x-Tween 0.05%

SSC 20x: 3 M NaCl, 0.3 M Na₃citrato pH 7.

PBS: (1 litro) 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.15 gr Na₂HPO₄, 0.2 gr KH₂PO₄.

Coomassie blue: 0.25% p/v Coomassie R250, 30% Metanol, 10% ácido acético.

Reactivo de Bradford: (1 litro) disolver 100 mg de Coomassie G250 en 50 ml de etanol 95%, agregar 100 ml de ácido fosfórico 85%, completar a volumen con H₂O, filtrar y guardar en frasco oscuro.

Solución de Church. NaHPO₄ 1M pH 7.2, 10 mg/ml BSA, 1 mM EDTA, 5% SDS.

Rojo Ponceau. disolver 2 gr Ponceau S y 30 grs TCA en 100 ml de agua.

Antiproteásicos (concentración final): PMSF 0.5 mM, TLCK 50 µg/ml, inhibidor de tripsina 2 µg/ml, benzamidina 1 mM, aprotinina 25 U/ml.

GTC: 4M isotiocianato de guanidinio, 25 mM citrato de sodio pH 7, 0.5% lauril sarkosyne sodio, 0.1M 2-mercaptoetanol.

PIC: fenol equilibrado con Tris-HCl a pH 8/ cloroformo /alcohol isoamílico (25:24:1)

CHISAM: cloroformo /alcohol isoamílico (24:1)

3. Técnicas electroforéticas.

3.1. Geles de agarosa nativos.

Los geles de agarosa se preparan con buffer TBE 1x o TAE 1x al 0.7–2 % con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizan a 5–10 V/cm. Antes de sembrar, las muestras se resuspenden con el correspondiente volumen de buffer de siembra 6x. Los geles son visualizados y fotografiados mediante el uso de transiluminadores de luz UVC.

3.2. Geles de agarosa con formaldehído.

Se arman geles de agarosa 1–2% con 6% formaldehído en buffer MOPS 1x pH 7. Las muestras se preparan de la siguiente manera: 1 volumen de solución de ARN más 1 volumen de ARN LB 4x más 2 volúmenes de formamida deionizada. Luego se calientan 10 min a 65°C y se colocan en hielo hasta el momento de sembrar. La corrida electroforética se realiza con buffer MOPS 1x conteniendo 6% formaldehído a 5–10 V/cm.

3.3 Geles de poliacrilamida desnaturalizantes para secuenciación de ADN.

Se preparan geles de acrilamida al 6–8 % con 8 M urea en buffer TBE 1x. Se usan geles verticales de 40 x 35 cm. con espaciadores de 0.4 mm. Las muestras se resuspenden en buffer de siembra para ADN con 50% formamida deionizada y se calientan, antes de ser sembradas, a 70°C por 2 min. La corrida se realiza a 60 W de potencia. Finalizada la migración, los geles se secan a 80°C durante 1 hr y se exponen a placas autoradiográficas.

3.4 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida Desnaturalizantes (SDS–PAGE).

Se utiliza el método de Laemmli (1970). Se arman geles desnaturalizantes (0.1 % SDS) discontinuos en celdas BioRad 220. Las muestras analizadas se preparan

agregando los volúmenes correspondientes de CB 5x y calentando por 5 min a 100°C. Como buffer de corrida se usa Tris-glicina-SDS 1x.

4. Parásitos: cultivo y preparación de extractos.

4.1.i. Cultivo de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Se utilizaron principalmente formas epimastigotes del parásito *Trypanosoma cruzi*, de la cepa CL Brener. En ocasiones se utilizó también la cepa Tulahén 2, CL 14 y la cepa Y.

El cultivo de epimastigotes se efectuó en medio LIT a 28°C. Típicamente se inicia un cultivo con 10⁶ células/ml y a los siete días se alcanza la fase exponencial con 10⁸ células/ml aproximadamente.

4.1.ii. Tripomastigotes de la cepa Y provenientes de cultivos de células

En los experimentos que incluyen tripomastigotes se utilizó la cepa Y.

Los tripomastigotes de la cepa Y fueron adicionados a una monocapa confluyente de células LLC-MK2 en medio DMEM suplementado con un 2% de suero fetal bovino. Botellas de cultivo de 36 cm² de superficie crecidas a confluencia fueron infectadas con 1 x 10⁶ tripomastigotes. Los cultivos fueron mantenidos durante 5 días a 37° C con recambio de medio cada 48 horas. Los parásitos obtenidos fueron cosechados en medio DMEM 5 % de suero fetal bovino (Andrews N. W. y Colli W. 1982).

4.1.iii. Cultivo de formas procíclicas de *Trypanosoma brucei brucei*.

Las formas procíclicas de *Trypanosoma brucei brucei*, fueron generosamente cedidas por el Dr. C. Tschudi de la universidad de Yale, donde fueron crecidos en medio SDM-79, suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina: 100 U/ml estreptomina: 100 µg/ml y hemina 5 mg/l.

4.2. Preparación de extractos proteicos de epimastigotes.

En el trabajo se mencionan dos tipos de extractos: extractos S10 y extractos solubles o clarificados (S100).

- I. Se cosechan los epimastigotes y se lavan en PBS.

- II. Luego las células se resuspenden en un pequeño volumen del mismo "buffer H" con antiproteásicos, aproximadamente 100 mg parásitos/ml, y se realiza la ruptura por ciclos de congelamiento/descongelamiento con nitrógeno líquido y baños de agua a temperatura ambiente.
- III. Después de 5-7 ciclos las células se hallan rotas y la muestra se centrifuga 15 min a 10000 xg. El sobrenadante se considera como extracto S10.
- IV. Si a éste lo centrifugamos nuevamente 1 hr a 100.000 gx obtenemos el S100 o extracto soluble clarificado.

Buffer H: Buffer HEPES 25 mM pH 7.3 y suplementado con los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 0.5 mM, leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 25 U/ml, SBTI 0.2 mg/ml y 14 mM 2-mercaptoetanol.

5. Células

En los experimentos de invasión se utilizaron células de la línea LLC-MK2 mantenidas en cultivo en medio MEM con pasajes cada 48 horas.

6. Cepas Bacterianas de *E. coli* Utilizadas.

DH5αF': F'/endA1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (Nal^r) relA1 Δ(lacZYA-argF)_{U169} (m80lacZΔM15). Utilizada de rutina en aquellas técnicas que implicaran el trabajos con plásmidos.

BL21/Lys: F- ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal (DE3) dcm pLysS, (cam^R). Utilizada para expresar la arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi*.

7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los criterios generales que se siguieron en el diseño de los oligonucleótidos se detallan a continuación:

Extremos 3' basados preferentemente en aminoácidos de codón único o que terminen en un triplete incompleto, evitar un excesivo contenido de G + C (>> 50%), temperaturas de desnaturalización superiores a 55 °C, evitar estructuras secundarias, horquillas y formación de dímeros con alta T_m (temperatura de "melting" o fusión) y no exceder las 256 combinaciones en la degeneración de los oligos (Hyde, 1993).

Para ello se utilizó el programa Oligo 4.05 (National Biosciences, Inc.) y la síntesis de oligonucleótidos se realizó en NucleiCo (INGEBI).

La amplificación por la técnica de PCR se realizó en un ciclador térmico Perkin Elmer 480.

8. Manipulación de ácidos nucleicos.

8.1. Purificación fenólica y precipitación alcohólica de ácidos nucleicos.

- I. Los ácidos nucleicos a ser purificados se llevan a más de 200 μ l con H₂O o buffer TE.
- II. Para remover proteínas y lípidos se agrega 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico pH 8 (25:24:1) (PIC), se mezcla con vortex, se separan las fases por centrifugación 2 min a 10.000 xg y se toma la fase acuosa (superior).
- III. Para remover restos de fenol, se agrega 1 volumen de cloroformo:isoamílico (24:1) (CHISAM), se mezcla con vortex, se centrifuga y se toma la fase acuosa.
- IV. Los ácidos nucleicos se precipitan con 1/10 volúmenes de 3 M acetato de sodio pH 5.2 o pH 4.8, o con 1/3 volúmenes de 7.5 M acetato de amonio pH 5.2, con el agregado de 2.5 volúmenes de etanol 100%.
- V. Se deja a -70 °C por 20-30 min y se centrifuga a 10.000 xg por 20 min.
- VI. El pellet se lava con etanol 70%, se deja secar y se resuspende con H₂O o buffer 0.1x TE.

8.2. Cuantificación de ADN, ARN y oligonucleótidos.

Las muestras de ADN, ARN y oligonucleótidos se cuantifican por medición de la absorbancia a 260 nm. Las concentraciones se calculan conociendo que 1 DO_{260nm} de ADN= 50 μ g/ml, 1 DO_{260nm} de ARN= 40 μ g/ml y 1 DO_{260nm} de oligonucleótidos= 33 μ g/ml y teniendo en cuenta el factor de dilución. Muestras de ADN también se pueden cuantificar por gel, comparando las intensidades observadas al UV con las intensidades dadas por un marcador de masa conocida.

8.3. Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Las digestiones de ADN se realizan en los buffers indicadas por el fabricante. Se utilizan de 3 a 5 unidades de enzima por μg de ADN y las incubaciones se hacen a las temperatura recomendadas por el fabricante.

8.4. Secuenciación de ADN.

La secuenciación de ácidos nucleicos se lleva a cabo por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger, 1977). kit fmol (Promega) usado según las instrucciones del fabricante. Como templados se utilizan los plásmidos doble cadena purificados por el método de lisis alcalina/PEG.

9. Amplificación de secuencias para ser subclonadas.

9.1 Amplificación del gen de la arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se ensayaron un amplio rango de condiciones. Como templado se utilizó DNA de *T. cruzi*. El protocolo de ciclado se modificó en cada caso corrigiéndose de acuerdo a los resultados obtenidos y a la secuencia que se deseaba amplificar.

EL gen de la arginina quinasa fue amplificado a partir de ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi*, utilizando oligonucleótidos específicos que presentaban en sus extremos 5' sitios de corte para endonucleasas de restricción con el objeto de darles una orientación sentido o anti-sentido según se desee al subclonarlos en el vector de expresión pTREX.

Para obtener el gen de la arginina quinasa en orientación sentido (5'→3') se utilizaron los siguientes iniciadores:

- SES I (forward) 5' CGG AAT TCA ACT CAG TCA CGA TGG CCT 3' (en el extremo 5' posee un sitio de corte para EcoRI, indicado en negrita).
- ESS I (reverse) 5'CGG TCG ACT CAC CTC GCA GAC TTC TCC 3' (en el extremo 5' posee un sitio de corte para Sall, indicado en negrita).

Para obtener el gen de la arginina quinasa en orientación anti-sentido se utilizaron los siguientes iniciadores:

- ESA I (forward) 5' CGG TCG ACA ACT CAG TCA CGA TGG CCT 3' (en el extremo 5' posee un sitio de corte para Sall, indicado en negrita).
- FINECO (reverse) 5' CGG AAT TCT CAC CTC GCA GAC TTC TCC 3' (en el extremo 5' posee un sitio de corte para EcoRI, indicado en negrita).

Las condiciones de las reacciones fueron las siguientes:

Templado ADN genómico de <i>T. cruzi</i> (100 ng/ μ l)	6 μ l
Oligonucleótidos (100 ng/ μ l)	2 (1 μ l de cada uno)
Buffer Taq 10X (Promega)	5 μ l
dNTPs (10mM)	1 μ l
Mg ⁺² (Cf. 2,5mM)	5 μ l
Taq ADN Polimerasa 2.5 U (promega)	0.5 μ l
H ₂ O	30.5 μ l
<hr/>	
Volumen final	50 μ l

Se realizó un precalentamiento de 5 minutos a 95°C y luego 35 ciclos en las siguientes condiciones:

- 1-2 minutos a 95°C (separación de la doble hebra de ADN)
- 1 minuto a 50-55°C (apareamiento de los iniciadores a las hebras de ADN).
- 1.5 minutos a 72°C (extensión de los iniciadores por la Taq DNA Polimerasa)
- Por último se mantuvo 10 minutos a 72°C para terminar de polimerizar las cadenas incompletas.

9.2. Amplificación de una secuencia anti-sentido pequeña (ASp) del gen de la arginina quinasa por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para amplificar una secuencia correspondiente a el extremo 5' no traducido del gen de la arginina quinasa y los primeros nucleótidos de la región codificante se diseñaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores:

- 5pNC: 5´AGG TTT TTT TTG TAT TCA TT3´
- RevAS: 5´TCA AAC ACC TCC TTC GTG AG3´

Las condiciones de las reacciones fueron las siguientes:

Templado ADN genómico de <i>T. cruzi</i> (100 ng/ μ l)	6 μ l
Oligonucleótidos (100 ng/ μ l)	2 (1 μ l de cada uno)
Buffer Taq 10X (Promega)	5 μ l
dNTPs (10mM)	1 μ l
Mg ⁺² (Cf. 2,5mM)	5 μ l
Taq ADN Polimerasa 2.5 U (promega)	0.5 μ l
H ₂ O	30.5 μ l
<hr/>	
Volumen final	50 μ l

Se realizó un precalentamiento de 5 minutos a 95°C y luego 35 ciclos en las siguientes condiciones:

- 1 minuto a 95°C (separación de la doble hebra de ADN)
- 1 minuto a 58°C (apareamiento de los iniciadores a las hebras de ADN).
- 1.5 minutos a 72°C (extensión de los iniciadores por la Taq DNA Polimerasa)
- Por último se mantuvo 10 minutos a 72°C para terminar de polimerizar las cadenas incompletas.

9.3. Amplificación del gen de la arginina quinasa de *Trypanosoma brucei* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El gen completo de la arginina quinasa de *Trypanosoma brucei*, fue amplificado usando los siguientes oligonucleótidos iniciadores:

- AKTb5´ : 5´ATG GCT ACC CGC GAC GTT GCT G3´
- AKTb3´ : 5´CTA CTT CGA CTT CTC CAG TTT G3´

Las condiciones de las reacciones fueron las siguientes:

Templado ADN genómico de <i>T. cruzi</i> (100 ng/ μ l)	6 μ l
Oligonucleótidos (100 ng/ μ l)	2 (1 μ l de cada uno)
Buffer Taq 10X (Promega)	5 μ l
dNTPs (10mM)	1 μ l
Mg ⁺² (Cf. 2,5mM)	5 μ l
Taq ADN Polimerasa 2.5 U (promega)	0.5 μ l
H ₂ O	30.5 μ l
<hr/>	
Volumen final	50 μ l

Se realizó un precalentamiento de 5 minutos a 95°C y luego 35 ciclos en las siguientes condiciones:

- 1–2 minutos a 95°C (separación de la doble hebra de ADN)
- 1 minuto a 55°C (apareamiento de los iniciadores a las hebras de ADN).
- 1.5 minutos a 72°C (extensión de los iniciadores por la Taq DNA Polimerasa)
- Por último se mantuvo 10 minutos a 72°C para terminar de polimerizar las cadenas incompletas.

En todos los casos se utilizó aceite mineral para prevenir la evaporación.

Se realizaron controles negativos con uno solo de los oligonucleótidos y también reacciones sin templado.

El producto de la PCR se corrió en un gel de agarosa 1% y la banda correspondiente al gen de la arginina quinasa se purificó.

10. Purificación del ADN de la agarosa.

La extracción del ADN de la agarosa se realizó utilizando el kit Prep-A-Gene DNA Purification Systems (Bio-Rad, EEUU).

El protocolo del kit se basa en la disolución de la agarosa (por calor y el uso de un agente caotrópico), la liberación del ADN al medio acuoso y el pegado del mismo a una matriz de sílica, seguido por lavados para extraer sales y la posterior elución del ADN de la sílica.

Se sembró en un gel de agarosa una alícuota de la solución en la que se encuentra el ADN disuelto para corroborar su purificación y para cuantificarlo.

11. Subclonado de los productos de PCR en el vector de expresión (pTREX-A)

11.1. Preparación del vector de clonado.

Como vector de clonado se utilizó el vector de expresión específico de *T. cruzi* pTREX (M.Vazquez y M.Levin, 1999) de 6262 pares de bases (figura M.1).

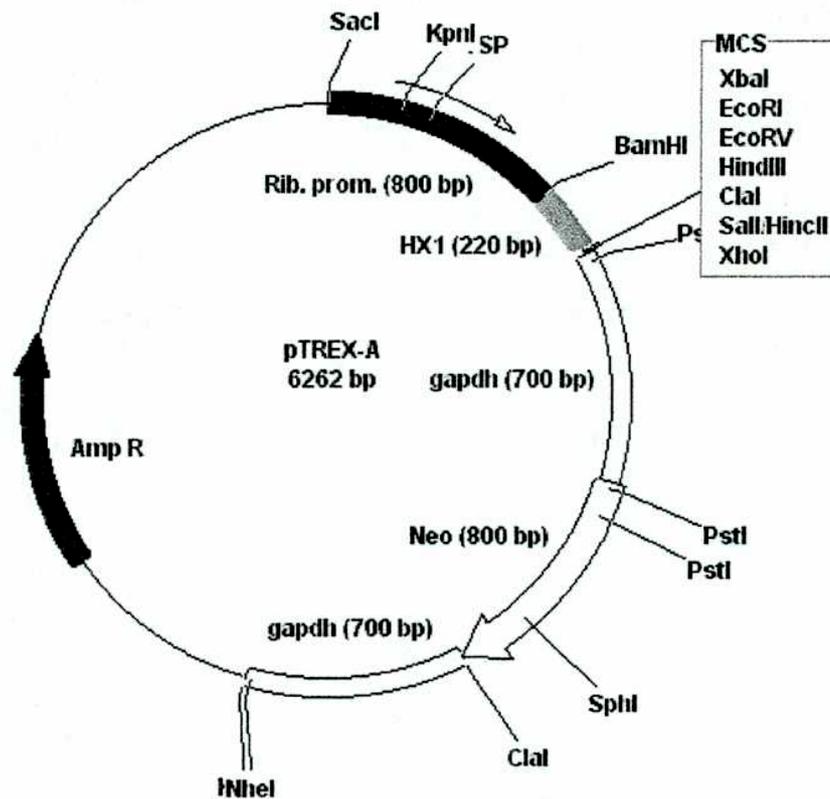


Figura M.1. Vector de expresión en *Trypanosoma cruzi*, pTREX-A. (M.Vazquez y M.Levin, 1999).

Este plásmido deriva del vector de expresión también específico de *T.cruzi* pRIBOTEX, construido a partir de un vector de clonado en bacterias del tipo pBluescript.

El pTREX presenta las siguientes características:

- Río arriba del sitio múltiple de clonado se encuentra la región HXI que pertenece a la porción intergénica localizada río arriba del gen que codifica para la proteína ribosomal TcP2 \square , este fragmento posee las señales de trans-splicing permitiendo la adición del miniexón condición necesaria para la maduración del ARN mensajero. El objetivo que persigue la adición del fragmento HXI es aumentar la expresión de los genes que se clonarán en el vector.
- Río abajo del fragmento HXI se encuentra el promotor ribosomal de la ARN Polimerasa I incluyendo el sitio de inicio de la transcripción. Su presencia permite además de la transcripción de las secuencias nucleotídicas ubicadas río abajo del mismo, la recombinación del vector en el locus ribosomal.
- Río abajo del sitio múltiple de clonado y del "cassette de neomicina" se encuentran secuencias flanqueantes de los genes que codifican para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Estas secuencias aportan las señales de trans-splicing y el sitio de poliadenilación necesarias para la maduración del ARN mensajero.
- Posee un "cassette" con la resistencia a G418 (es un análogo de la neomicina más estable) permitiendo seleccionar positivamente en células eucariotas.
- El pTREX conservó del vector de clonado tipo pBluescript el origen de replicación, el sitio múltiple de clonado y el gen de la \square -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina, permitiendo seleccionar también en procariontes.
- El pTREX fue digerido según la estrategia de subclonado utilizada: con EcoRI y Sall o sólo con EcoRI (los sitios de corte para estas enzimas se

encuentran localizados en el sitio múltiple de clonado del vector). De esta manera el plásmido quedó linealizado y se obtuvieron extremos cohesivos.

El plásmido digerido se precipitó y se resuspendió en 20ml de agua bidestilada, para luego determinar su concentración.

11.2. Defosforilación de los extremos 5' del vector.

En el caso de digerir con una única enzima se eliminaron los grupos 5'fosfatos libres del vector para prevenir eventos de autoligación.

Para ello se utilizó la fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIAP) fabricada por Gibco BRL, por definición 1U de enzima hidroliza 1mmol de p-nitrofenil fosfato en 1 minuto a 37°C. La reacción se llevó a cabo en buffer CIAP, se incubó a 37°C durante 30 minutos, se agregó una segunda alícuota y se continuó la incubación por 30 minutos mas.

Una vez finalizada la reacción se inactivó la CIAP en un baño térmico a 70°C durante 15 minutos.

12. Subclonado de los productos de PCR en el vector pGEM-T EASY:

Los productos de amplificación del gen de la arginina quinasa mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), fueron subclonados en el vector pGEM-T a través del kit "pGEM-T Easy Sistem I" (Promega, EEUU). Este sistema especialmente diseñado para clonar productos de PCR se basa en la ligación de un producto de PCR con el vector (provisto por el kit) digerido con EcoRV en cuyos extremos 3' se adicionó una timidina. Los extremos 3' con una timidina terminal en el sitio de inserción proveen una alta eficiencia de ligación de los insertos en el plásmido, ya que impiden eventos de recircularización del vector y proveen extremos compatibles a los generados por algunas polimerasas termosensibles en los productos de PCR. Estas polimerasas a menudo adicionan una deoxiadenosina en los extremos 3' de los productos de amplificación de una manera templado-independiente, entre estas enzimas se encuentra la Taq Polimerasa que fue utilizada en este trabajo.

13. Ligación de extremos adhesivos.

Se incubó el inserto y el vector en presencia de T4 DNA Ligasa (Bio-Labs, Inglaterra), que cataliza la unión de fragmentos de restricción tanto con extremos cohesivos como romos, utilizando ATP como cofactor.

Para la ligación se utilizó la relación molar inserto:vector de 1:1 y 3:1 y se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

En la reacción de ligación se incubaron 30 ng de vector y la cantidad correspondiente de inserto con 1U de enzima T4 DNA Ligasa (GibcoBRL o BioLabas) en un volumen final de 10 a 15 μ l a 16°C durante 12 a 18 hora.

Como control de ligación se incluyó una reacción de ligado de vector sin inserto (autoligado).

14. Preparación de bacterias competentes.

A partir de una placa fresca se picó una colonia aislada y se inoculó a 7 ml de LB en Erlenmeyer de 125 ml. Se creció con agitación a 37°C hasta una $DO_{550nm}=0.3$. Luego, se pasaron 5 ml de este cultivo a 100 ml de LB en erlenmeyer de 500 o 1000 ml. Alternativamente se inoculó 1 ml de un cultivo en fase estacionaria a 100 ml de LB en erlenmeyer de 500 o 1000 ml. Se creció con agitación a 37°C hasta una $DO_{550nm}=0.48$ y luego se colocó en hielo por 10 min. Se centrifugó a 3000 rpm por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante. El "pellet" se resuspendió cuidadosamente en 40 ml de solución TfbI fría y se dejó en hielo 5 min. Luego se centrifugó a 3000 rpm por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El "pellet" se resuspendió cuidadosamente y siempre en hielo con 4 ml de TfbII preenfriado. Se incubó en hielo por 15 min. Las células se alicuotaron en "eppendorf" estériles en volúmenes de 50 a 200 μ l, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a - 70°C hasta el momento de usar. Por transformación se utilizaron 50 μ l.

Soluciones:

TfbI: 30 mM KAc, 100 mM KCl, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM $MnCl_2$, 15 %v/v glicerol, el pH se ajustó a 5.8 con acético 0.2 M.

TfbII: 10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM KCl, 15% glicerol, el pH se ajustó a 6.5 con KOH.

15. Transformación de células competentes

50 μ l de bacterias competentes se descongelaron en hielo y se mezclaron con 5 μ l de ADN plasmídico (25 ng), todo el procedimiento se realizó en esterilidad.

La mezcla se incubó durante 15 minutos y luego se le dio un golpe de calor, en un baño térmico a 37°C durante 5 min. (el paso de frío a calor desestabiliza la pared

y la membrana bacteriana permitiendo la penetración del ADN), luego se colocaron las bacterias transformadas 2 minutos en hielo, y se incubaron para su recuperación en 500 μ l de LB a 37°C durante 30 minutos. Luego se centrifugaron 5 minutos a 5000 rpm en microcentrífuga, se descartaron 400 μ l de medio, el "pellet" se resuspendió en el volumen sobrante (100 μ l) y se sembró en cajas de Petri con LB-agar-ampicilina (LB, bactoagar 1.5%, ampicilina 100 μ g/ml). Se dejaron en estufa a 37°C durante toda la noche.

16. Extracción de ADN plasmídico ("mini-preps"):

A partir de una colonia aislada se inocularon 5 ml de LB + amp en tubos de vidrio. Se incubó con agitación durante la noche a 37° C y posteriormente se cosecharon las bacterias por centrifugación a 6000 xg por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 300 μ l de solución I (Tris-HCl 25 mM pH 8, glucosa 50 mM, EDTA 10mM) fría y se reuspendió utilizando vortex, inmediatamente se agregó 300 μ l de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 0.1 %) y se mezcló cuidadosamente por inversión e incubó por 3-5 minutos en hielo.

Se añadió 300 μ l de solución III (AcOK 3 M pH 5.2) fría y se mezcló por inversión dejándose en hielo por 15 minutos y luego se centrifugó 15 minutos a 10000 xg (preferiblemente a 4° C).

Al sobrenadante se le agregó ARNasa A (libre de ADNasa) a una concentración final de 50 μ g/ml y se incubó por 30 - 60 minutos a 37° C.

Se añadió 600 μ l de cloroformo y se centrifugó 3 minutos a 10000 xg para quedarse con la fase acuosa, se agregó 1 volumen de isopropanol 100%, se mezcló por inversión y se incubó por 30 minutos (como mínimo) a temperatura ambiente.

Luego se centrifugó a 10000 xg a temperatura ambiente, se secó el precipitado y se resuspendió en 30 μ l de H₂O bidestilada o de buffer TE pH 8.0.

Los plásmidos obtenidos a partir de clones positivos según el criterio de selección se confirmaron por escisión del inserto utilizando enzimas de restricción.

17. Minipreparación de alta pureza para secuenciación (PEG).

Este protocolo no usa fenol y se hace una precipitación con PEG que otorga un ADN muy limpio.

- I. Se parte de 3-5 ml de un cultivo bacteriano crecido durante toda la noche en medio Terrific/ampicilina. Este medio es más rico que el LB y compensa el hecho de que este protocolo no otorga un alto rendimiento.

- II. Se cosechan las bacterias por centrifugación a 4000 rpm durante 5' a temperatura ambiente.
- III. El "pellet" se resuspende en 300 μ l de solución I.
- IV. Se agregan 300 μ l de solución II, preparada en el momento, se mezcla suavemente y se deja 5 min en hielo.
- V. Se agregan 300 μ l de solución III, se mezcla suavemente y se deja en hielo 5 min.
- VI. Se centrifuga a máxima velocidad por 10 min y se toma el sobrenadante.
- VII. Se agregan 50 μ g/ml de ARNasa A (libre de ADNasa) y se incuba por 30 min a 37°C.
- VIII. Se hacen 2-3 extracciones con 400 μ l de cloroformo.
- IX. Se precipita con el agregado de 1 volumen de isopropanol 100% y centrifugación a máxima velocidad por 10 min a temperatura ambiente.
- X. El "pellet" se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en 32 μ l de H₂O estéril.
- XI. Se agregan 8 μ l de 4 M NaCl y 40 μ l de PEG₈₀₀₀ 13%, se mezcla muy bien y se incuba en hielo por 30 min.
- XII. Se centrifuga a máxima velocidad por 20 min a 4°C.
- XIII. El "pellet" se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en 20 μ l de H₂O.

Soluciones.

Solución I: 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8.

Solución II: 0.2 N NaOH, 1 % SDS.

Solución III: 3 M acetato de potasio pH 4.8 o 3 M acetato de sodio pH 5.2.

18. Identificación de los plásmidos recombinantes.

Si los controles del vector sin inserto son alentadores, entiéndase que nos dan 1/3 o menos de las colonias que hay en las placas correspondientes al vector con inserto, se procedió la preparación de ADN plasmídico y digestión con enzimas de restricción para estudiar la presencia y la integridad del inserto.

19. Transfección celular.

La técnica de transfección utilizada para introducir las distintas construcciones en los epimastigotes de *T. cruzi* fue el método de electroporación. Para ello se colectaron 10^8 parásitos a 2000–3000 rpm (1200 xg) en centrífuga Sorvall GLC–4 durante 15 minutos. El “pellet” se lavó con PBS 1X y se resuspendió en una concentración de 10^8 parásitos /0.35 ml en buffer de transfección (PBS 1X, Cl_2 Mg 0.5 mM/ Cl_2 Ca 0.1 mM).

Luego la suspensión de parásitos se mezcló con 50 μ g de ADN (2.5 μ g/ml), además de un control de transfección usando buffer TE (Tris–HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) y se mantuvo en hielo durante al menos 15 minutos.

La electroporación se llevó a cabo en cuvetas 0.2 cm de ancho (Bio–Rad, EEUU) utilizando un electroporador “Gene Pulser” (Bio–Rad, EEUU), bajo las siguientes condiciones: un único pulso de 400 V 500 μ F y los tiempos variando entre 3.8 y 4.5 segundos. Estas condiciones permiten obtener una mayor eficiencia de transfección, aunque bajo estas circunstancias la mortalidad de parásitos es alta. Finalizada la electroporación se mantuvo la suspensión de parásitos a temperatura ambiente durante 15 minutos para su recuperación y posterior observación de mortalidad al microscopio, finalmente se transfirió la misma a 10 ml de medio LIT sin presión de selección por aproximadamente 48 horas.

19.1. Recuento de células.

Para el recuento de parásitos y la determinación de su viabilidad, se realizó la dilución adecuada de la suspensión de parásitos y se colocó 10 μ l de la misma en una cámara de Neubauer. El conteo se realizó al microscopio óptico, para ello se usaron los cuadrados que forman el cuadrado central de la cámara y el número de células totales se calculó por la siguiente fórmula:

$$\text{células /ml} = \text{N}^\circ \text{ de células promedio por cuadrante} \times \text{factor de dilución} \times 10^4$$

19.2. Selección de parásitos resistencia a G418.

Finalizado el período período de recuperación (aprox. 48 horas post–transfección) se realizó un cultivo de $1\text{--}2 \cdot 10^6$ parásitos/ml al que se le añadió el antibiótico G418 (análogo de la Neomicina) en una concentración 500 μ g/ml. Durante el período de selección los cultivos de parásitos se repicaron cada 7 días en presencia del antibiótico en la misma concentración y partiendo siempre de inóculos de $1\text{--}2 \cdot 10^6$ parásitos/ml. La selección de los parásitos transfectantes se monitorió por conteo al microscopio de fluorescencia de parásitos que expresaban GFP sobre el número total de parásitos.

20. Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se llevó a cabo mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976).

21. Ensayos de actividad arginina quinasa.

Los ensayos se realizaron utilizando una mezcla de reacción conteniendo ATP 2 mM, 2-Mercaptoetanol 10 mM, acetato de magnesio 5 mM, L-arginina 1 mM (200.000 cpm por ensayo), HEPES 25 mM pH 7.3 y cantidades variables de fuente enzimática, según se indique en cada caso, en un volumen final de 200 μ l. Se incubaron durante 10 minutos a 30°C y posteriormente se detuvo con 1 ml de buffer de detención frío (HEPES 25 μ M pH 7.3, L-arginina 10 mM, EDTA 5 mM). Los productos de la reacción se resolvieron mediante el pasaje a través de columnas de 1 ml de resina Dowex AG1-X4 (200-400 mesh) forma Cl- previamente equilibradas con 5 volúmenes de buffer de detención.

Luego de sembradas, las columnas se lavaron con 3 ml de buffer de ensayo (HEPES 25 mM, pH 7.3) y luego fueron eluidas con 2 ml de solución de elución (NaCl 1M, HCl 0.1 N). La radioactividad se cuantificó en contador de centelleo líquido.

En todos los casos las determinaciones de actividad fueron hechas al menos por triplicado.

El método que se describió para medir conversión de arginina en fosfoarginina, se basa en la diferencia en la carga entre ambas moléculas, lo cual permite resolverlas utilizando una resina de intercambio aniónico. Esta técnica fue enteramente desarrollada en nuestro laboratorio.

22. Ensayos de "Western Blot".

Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes (SDS-PAGE). Luego se procedió a la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa, para el posterior revelado. Además, en la mayoría de los casos se realizó un gel en paralelo para observar por tinción con Coomassie Blue las condiciones del extracto.

22.1. Tinción de geles de poliacrilamida con Coomassie Blue

La tinción de los geles se realizó sumergiendo el gel en una solución de Coomassie

Brilliant Blue R250 0.25g en 100 ml de Metanol:Agua:Acido acético (5:4:1 V/V) durante 15 minutos con agitación suave. Luego se destiñó con la misma solución sin el colorante hasta obtener la intensidad bandas deseada. Por último, se transfirió a un papel de cromatografía Whatmann 3 MM (Whatmann, Alemania), se lo cubrió con polietileno y se secó a 80°C con vacío durante al menos 1 hora.

22.2. Transferencia de proteínas para Western-blot

Se utilizó una membrana de nitrocelulosa, Hybond C+ a través del método de electrotransferencia semiseca.

Para ello se utilizó el aparato de transferencia Trans-Blot® SD Semi-dry Transfer cell (Bio-Rad, EEUU), sobre el gráfico anódico del mismo se colocaron 6 papeles Whatmann 3 MM humedecidos en buffer anódico 1 (Tris 300 mM, Metanol 20% V/V, pH 10.4), sobre éstos se colocaron otros 3 papeles Whatmann humedecidos en buffer anódico 2 (Tris 25 mM, Metanol 20% V/V, pH 10.4) y por encima la membrana de nitrocelulosa prehumedecida en el último buffer. Luego se apoyó el gel sobre la membrana y se colocaron sobre el mismo 6 papeles de cromatografía 3 MM (Whatmann, Alemania) humedecidos con buffer catódico (Tris 25 mM, Acido 6-n-Hexanoico 40 mM, Metanol 20% V/V, pH 9.4) y por último se colocó el gráfico catódico y se cerró el dispositivo. La transferencia se realizó a corriente constante 0.8 mA/cm² durante una hora a temperatura ambiente.

Para comprobar que la transferencia fue exitosa se hizo una tinción de la membrana con el colorante rojo Ponceau el cual luego se lava fácilmente con agua.

22.3. Revelado del "Western Blot".

la membrana de nitrocelulosa fue tratada con una solución TBS-T con 5% de leche descremada, con agitación a temperatura ambiente durante al menos 1 hora (bloqueo).

Luego se realizaron 3 lavados de 15 minutos con TBS-T, y se incubó durante 1 hora en agitación con el anticuerpo primario anti-arginina quinasa (suero de ratón inmunizado con arginina quinasa). Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-T y se incubó durante 1 hora con el segundo anticuerpo (anti IgG de ratón), el cual estaba acoplado a la peroxidasa de rabanito. El segundo anticuerpo y la solución de revelado fue provista por el kit Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (NEN™ Life Science Products Inc., EEUU).

Se repitieron los lavados con TBS-T.

Los tiempos de exposición fueron variables dependiendo de la intensidad de la señal.

23. Extracción de ADN y ARN de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

23.1. Extracción de DNA – Protocolo Breve

Se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm en microcentrifuga, 1-2 ml de parásitos crecidos en medio LIT, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 1 ml de PBS 1X, luego se centrifugó durante 5 minutos en microcentrifuga a 3000 rpm recuperándose el pellet. Se añadió 1 ml de solución de lisis (contiene EDTA que es un quelante de iones bivalentes para inhibir las DNAsas y SDS que ayuda a desestabilizar las membranas).

Posteriormente se realizó una extracción con fenol – cloroformo (no mezclar con vortex para no romper el ADN genómico), se centrifugó durante 1 minuto a 13200 rpm en microcentrifuga conservando la fase acuosa, repitiéndose este tratamiento por segunda vez. Por último se realizó una última extracción con cloroformo- isoamílico, se centrifugó durante 1 minuto a 13200 rpm en microcentrifuga y se conservó la fase acuosa. El ADN se precipitó añadiendo 1 volumen de isopropanol, mezclando suavemente por inversión e incubando por 30 minutos a temperatura ambiente, para completar la precipitación se centrifugó a 13200 rpm en microcentrifuga por 15 minutos.

Se descartó el sobrenadante, el pellet se lavó con 1 volumen de etanol 70%, se centrifugó durante 5 minutos a 13200 rpm en microcentrifuga, el precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 200 µl de agua bidestilada.

La eficiencia del método se verificó corriendo el DNA en un gel de agarosa 0.8 % para constatar la integridad de la muestra.

23.2. Extracción de DNA – Protocolo estándar

Se resuspendió 1 gramo de peso húmedo de parásitos en 20 volúmenes de buffer (Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, SDS 0.5%, NaCl 0.1 M, EDTA 25 mM), posteriormente se agregó proteinasa K (100 µg/ml final) y se incubó toda la noche a 37°C.

Se extrajo una vez con fenol-cloroformo y luego dos con cloroformo.

Se precipitó el ADN con etanol 30 minutos a -20°C se centrifugó 20 minutos a 10.000 xg y luego se lavó una vez con etanol 70%, se secó al vacío y se resuspendió en 10 ml de buffer TE (Tris-HCl 10mM a pH 7.6, EDTA 1mM).

Se llevó la solución a una concentración de CsCl 0,83 g/ml y de BrEt 0.01%.

Se ultracentrifugó con rotor de ángulo fijo 50Ti a 40.000 rpm 36 horas a 18°C y se recuperó la banda de DNA lineal.

Se extrajo el BrEt siete veces con 2-butanol. Se repitió la precipitación con etanol como se explicó anteriormente.

Se guardó el DNA disuelto en buffer TE a una concentración de 1 mg/ml.

Ambos métodos fueron utilizados para obtener ADN para los ensayos de Southern Blot como así también de PCR.

24. Preparación de ARN total de epimastigotes de *T.cruzi*

El ARN total de parásitos se extrajo utilizando el kit "RNAagents®" (Promega, EEUU).

Para garantizar la calidad de las preparaciones de ARN se utilizó material de vidrio esterilizado por horneado, agua bidestilada estéril y material de plástico nuevo y autoclavado.

La extracción del ARN total de epimastigotes se realizó a partir de cultivos de parásitos que se hallaban en una concentración de 10^8 células/ml. Las células se colectaron centrifugando a 1000 xg por 5 minutos, luego se realizó un lavado con PBS 1X estéril, se repitió la centrifugación, se descartó el sobrenadante y luego se continuó con las indicaciones presentadas en el kit.

25. Técnicas de Hibridación de ácidos nucleicos.

25.1. "Southern Blot".

- I. Enzimas. Se eligieron dos tipos de enzimas, unas con sitio de corte dentro de la sonda y otras sin sitios de corte.
- II. Digestión. Se digiere ADN genómico con 5 unidades de enzima por microgramo de ADN. Para estos ensayos hay que asegurarse que la digestión del ADN sea total. La cantidad de ADN utilizada fue entre 5 y 10 μ g por calle.
- III. Electroforesis. Los fragmentos de digestión se resolvieron en geles de agarosa entre 0,6 y 0,8% p/v.
- IV. Transferencia. Antes de transferir el gel fue tratado de la siguiente manera: se incubó por 20 min en 0.25N de HCl (solución de depuración), se lavó con agua bidestilada y se incubó por 15 min en una solución 0.4N de NaOH. Después se colocó el gel boca abajo sobre un Whatman 3MM y se

armó el dispositivo de transferencia.

- V. Fijación: después de la transferencia O.N. se retiró cuidadosamente la torre de papeles absorbentes y con un lápiz se marcaron las calles. Los filtros se lavan con 2x SSC y se guardan húmedos a 4°C hasta el momento de la hibridación. Se corta la porción que tiene los marcadores de peso molecular.
- VI. Marcación de la sonda. Se utilizó el Kit “random priming” con $\alpha(^{32}\text{P})\text{-dCTP}$ marcado según las instrucciones del proveedor. Para separar la marca incorporada de la marca libre se precipitó tres veces con 2 volúmenes de 100% etanol, 0.4 volúmenes de 7.5 M AcNH_4 y algún “carrier” como acrilamida lineal, ARNt o glicógeno (1–5 μg).
- VII. Hibridación. La hibridación y la prehibridación se hicieron con Solución de Church. Se cambió la solución de prehibridación antes del agregado de la sonda, la cual fue hervida durante 10 min. antes de ser agregada en la solución de hibridación fresca. Se dejó interactuar con la sonda durante toda la noche.
- VIII. Lavados. Los lavados se realizaron con solución SSC cada vez más diluída dependiendo el número y tiempo de cada lavado de la señal percibida al utilizar un contador Geiger.
- IX. Exposición. Se envolvió la membrana en un folio plástico y se selló con calor. Luego se deja exponiendo el tiempo necesario de acuerdo con la señal deseada.

25.2. “Northern Blot”.

- I. Preparación de la muestra. La muestra se preparó del siguiente modo: 1 volumen de muestra más dos volúmenes de formamida deionizada más 1 volumen de ARN LB 4x. Se calentó 10 min a 70°C, se colocó en hielo y se sembró inmediatamente.
- II. Electroforesis. El gel desnaturalizante para ARN fue hecho según se indica en la sección Técnicas electroforéticas (3.2). Al terminar la corrida se enjuagó el gel 20–30 minutos con agua deionizada para sacar un poco de formaldehído.
- III. Transferencia. Se utilizó el mismo dispositivo que para Southern blot. La solución de transferencia para Hybond N+ es NaOH 0.05 N.
- IV. Hibridación igual que para Southern blot.

25.3. Fraccionamiento de cromosomas por PFGE ("Pulse Field Gel Electrophoresis").

El fraccionamiento de cromosomas de *T.cruzi* se realizó mediante una electroforesis en campos pulsados o PFGE. Se utilizó una cuba con una matriz de electrodos dispuestos en forma hexagonal (Bio-Rad, USA). El DNA se corrió durante 16 horas a 6 V/cm, 20 horas a 3 V/cm con pulsos cada 200–500 segundos y 24 horas a 2.7 V/cm con pulsos cada 500–1200 segundos. Junto a las muestra se corrió además, cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* (Gibco BRL) como marcadores de peso molecular. El tratamiento del gel luego de la corrida y las condiciones de transferencia del DNA son idénticas a las utilizadas para los Southern blots.

26. Determinación de glucosa y amonio.

Se preparó para 100 ensayos 50ml de cada una de las siguientes soluciones. Se realizaron las mediciones como se describe a continuación:

Determinación:

- a) Mezclar 0.5ml de muestra con 0.5ml del reactivo de cobre.
- b) Calentar durante 15min a 100°C y dejar enfriar.
- c) Agregar 0.5ml del reactivo de molibdato y agua hasta 2.5ml de volumen final y mezclar.
- d) Leer a 520nm.

Reactivo de Cobre

Este reactivo se obtiene de la combinación de 9 partes de la solución B por cada parte de la solución A.

Solución A: $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 10% en agua.

Solución B: a 1.24g de Na_2HPO_4 en 31ml de agua, agregar 1.78g de tartrato de Na/K, 4.4ml de NaOH 1N y 5.3g de Na_2SO_4 . Volumen final, 40ml. Filtrar y dejar asentar durante 2 días.

Reactivo de Molibdato

A 2.5g de Molibdato de amonio en 45ml de agua agregar 2.1ml de H_2SO_4 y mezclar. Agregar 0.3g de arseniato disodico cristalino disuelto previamente en 2.5ml de agua. Dejar 48hs a 37°C y guardar en botella oscura.

Para la determinación del amonio se utilizó una variante del método colorimétrico del indolfenol que se obtuvo en:

http://ecosystems.mbl.edu/ARC/data_doc/ammonia.html)

27. Obtención de medios condicionados (MCs).

Para la obtención de medios condicionados se crecieron epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en medio LIT, hasta la fecha deseada.

Luego se eliminan los parásitos por centrifugación y el medio se guarda en un recipiente estéril hasta el momento del uso.

28. Ensayos de incorporación de L-arginina.

Un mililitro de cultivo (3×10^7 células) perteneciente al día 5 (fase logarítmica) fue lavado una vez con buffer A (CaCl_2 1.8 mM, MgSO_4 0.8 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, NaCl 154 mM, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 250 μM , D-glucosa 5.5 mM y HEPES 25 mM / NaOH pH 7.3) e incubado en el mismo buffer durante 3 horas para minimizar la concentración de arginina endógena ("ayuno").

Posteriormente se ensayó la incorporación de [^3H]-L-arginina 25 μM (4 $\mu\text{Ci/ml}$) durante 10 minutos con el tratamiento indicado en cada caso. Luego se lavó una vez con buffer A y se lisaron los parásitos resuspendiendo en agua bidestilada (ddH_2O) antes de ser cuantificada la radioactividad incorporada utilizando un contador de centelleo líquido.

La incorporación o unión inespecífica se calculó utilizando arginina 100 mM en los ensayos.

En todos los tratamientos se evaluó la viabilidad de los parásitos en el tiempo de ensayo, por microscopía.

29. Sincronización de cultivos por el método de la hidroxurea.

Se trataron cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* con hidroxurea según Galanti, N. et al 1994. Luego de 24 hs se efectuó la remoción de la hidroxurea. Los epimastigotes se lavaron con PBS y se realizaron las determinaciones correspondientes.

30. Diferenciación *in vitro* de epimastigotes de *T. cruzi* en condiciones químicamente definidas.

La diferenciación de parásitos se realizó utilizando la técnica descrita por Contreras, 1985. Consiste en un medio de diferenciación químicamente definido, compuesto por orina artificial de triatomino (TAU, por sus siglas en inglés) (190 mM NaCl, 8 mM buffer fosfato pH: 6.0, 17 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2mM MgCl₂) suplementado con prolina, el cual permite altos rendimientos de tripomastigotes metacíclicos luego de 72 horas de incubación a 27°C (Contreras, 1985).

31. Infección de células susceptibles

Células de la línea LLC-MK2 fueron cultivadas en microplacas de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos, durante 48 horas. En recuentos de células se estimó una cantidad de 5×10^4 células/cubreobjetos. Los sobrenadantes de estos cultivos fueron aspirados y lavados dos veces con PBS. Luego los cultivos fueron infectados con 1×10^6 tripomastigotes, provenientes de la diferenciación de las distintas poblaciones, por pocillo.

Los experimentos fueron realizados por triplicado. Luego de una hora de incubación los sobrenadantes fueron aspirados y los pocillos fueron lavados dos veces con PBS y adicionados con 0,5 ml de medio de cultivo/pocillo. Luego de una incubación durante la noche, los cultivos fueron fijados con paraformaldehído y teñidos con Hoesch para facilitar la observación y recuento de los amastigotes intracelulares. Los preparados así obtenidos fueron montados sobre portaobjetos en medio de montaje tamponado conteniendo glicerol.

32. Recuento de amastigotes en células infectadas

En primer lugar se realizó un recuento de amastigotes intracelulares para cada unidad experimental en los pocillos control (sin tratamiento) con el objeto de hacer una evaluación preliminar sobre la dispersión de los datos. Dado que la diferencia entre pocillos resultó no significativa, se realizó un recuento de un total no menor a 150 células infectadas provenientes de distintos campos en distintos pocillos para cada ensayo, y los resultados fueron expresados como las medias de este recuento.

33. Análisis de las secuencias y estudios por computadora.

Las comparaciones de secuencias se realizaron utilizando el programa "Advanced BLAST version 2.0" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Los alineamientos de secuencias se hicieron con el programa Clustal W (<http://www.dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>).

Las estructuras 3D de la arginina kinasa se obtuvieron utilizando el programa RasMol (RasWin Molecular Graphics Window Version 2.6) a partir de coordenadas aproximadas utilizando el programa Swiss-Model a partir de la arginina kinasa de *P.japonicus* (PDB# 1BG0).

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR se diseñaron con el programa Oligo 4.05 (national Biosciences, Inc.).

El análisis de las secuencias y otras comparaciones se realizaron con el programa Omiga 1.1.3. (Oxford Molecular Ltd.).

El árbol filogenética se realizó con el programa TreeView versión 1.6.1.

Para los perfiles de hidrofobicidad se utilizaron distintos algoritmos contenidos en el programa Omiga 1.1.3. (Oxford Molecular Ltd.). Y el programa TMAP Instituto Karolinska (<http://www.mbb.ki.se/tmap/index.html>)

Para los estudios estadísticos se utilizó el programa "Graph Pad In Stat" Versión 1.0 (Sacon Computer, USA) mediante el uso del test T para muestras no apareadas. Los valores graficados corresponden a la media de al menos tres determinaciones y las barras de error representan la dispersión de los valores con respecto a la media.

Los estudios de densitometria de bandas se realizó con el programa Scion Image (<http://www.scioncorp.com>)

Bibliografía de consulta permanente: 1) Current Protocols in Molecular Biology (1996). John Wiley & Sons Inc.(Ed.), 2) Maniatis T, Fritsch E & Sambrook J (1989). Molecular Cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. (Ed) 3) Methods in Molecular Biology, Vol. 21: Protocols in Molecular Parasitology (1993). John E. Hyde (Ed.) Humana Press, Totowa, NJ

RESULTADOS

Capítulo 1

Generación de epimastigotes transfectados que sobre-expresen o tengan suprimida funcionalmente la arginina quinasa.

ETAPA I.

Debido a las limitaciones del uso de los métodos genéticos clásicos en estudios llevados a cabo en tripanosomátidos, las técnicas de transfección estable mostraron ser una poderosa herramienta para el estudio de la función biológica de proteínas aún no caracterizadas en un determinado sistema. Aunque en la mayoría de los casos la información que se obtiene empleando esta técnica, se limita a los modelos transgénicos utilizados.

Es el objetivo de este capítulo, generar poblaciones transfectadas establemente que sobre-expresen o que tengan suprimida funcionalmente la arginina quinasa y de esta manera obtener una mayor información a cerca de la función que desempeña en el metabolismo del *Trypanosoma cruzi*.

Desde que fue caracterizada bioquímica y molecularmente por nuestro laboratorio (Pereira, 2000), esta enzima se consideró como un posible blanco terapéutico ya que participa en el metabolismo energético de *T. cruzi* y está ausente en el hospedador humano. Para sustentar la hipótesis de la relevancia de la arginina quinasa en la supervivencia del parásito, la manera más directa es eliminar la actividad enzimática en estudio mediante técnicas de knock-out clásicas o bien trabajando con un ARN anti-sentido.

Además, los resultados obtenidos en este capítulo, representan un importante aporte al empleo de técnicas de transfección estable en tripanosomátidos, para la sobre-expresión o supresión funcional de una enzima endógena, mediante técnicas de ARN anti-sentido, ya que se encuentra entre los primeros que logran su aplicación de modo exitoso.

1.1. Obtención de las construcciones a ser transfectadas.

1.1.i. Amplificación del gen de la arginina quinasa.

Con el objetivo de amplificar, a partir de ADN genómico de *T. Cruzi*, la secuencia codificante del gen de la arginina quinasa, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos específicos, cuya secuencia se describe en “materiales y métodos”:

A. Para obtener la construcción en la que el gen de la arginina quinasa se integre en orientación sentido:

- SES I (forward) que en el extremo 5' posee un sitio de corte para EcoRI.
- ESS I (reverse) que en el extremo 5' posee un sitio de corte para Sall.

B. Para obtener la construcción en la que el gen de la arginina quinasa se integre en orientación anti-sentido:

- ESA I (forward) que en el extremo 5' posee un sitio de corte para Sall.
- FINECO (reverse) que en el extremo 5' posee un sitio de corte para EcoRI.

Los sitios de corte para enzimas de restricción indicados posibilitan el clonado direccional en el vector de expresión pTREX cuyas características se describen en “materiales y métodos”.

Los productos obtenidos luego de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fueron sembrados en un gel de agarosa 1% junto a un control negativo que corresponde a una reacción de PCR en la que se omitió el templado de ADN.

En la figura 1.1, se observa la presencia de una banda de aproximadamente 1 kb en las calles rotuladas como AS (producto de amplificación obtenido con los iniciadores ESA I y FINECO) y SE (producto de amplificación obtenido con los iniciadores SES I y ESS I) se observa un producto de amplificación de aproximadamente 1 kb.

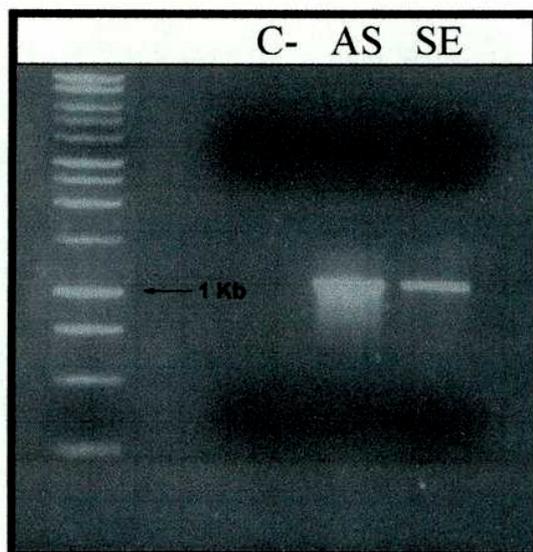


Figura 1.1. Productos obtenidos en la reacción de PCR. En la calle rotulada como SE, se puede observa el producto de amplificación con los oligonucleótidos SES I y ESS I y en la calle rotulada como AS, se observa el producto de amplificación con los oligonucleótidos ESA I y FINECO, en ambos casos usando ADN genómico de *T. cruzi* como templado. La calle rotulada como C-, corresponde al control negativo de la reacción de PCR.

1.1.ii. Subclonado de los productos de amplificación en el vector de expresión pTREX.

Como primer paso se purificó los fragmentos obtenidos en la reacción de PCR, que en adelante llamaremos AK SE, al producto de la amplificación con los oligonucleótidos SES I-ESS I y AK AS, al producto de la amplificación con los oligonucleótidos ESA I-FINECO.

Luego fueron sometidos a una doble digestión con las endonucleasas EcoRI y Sall, al igual que el vector pTREX, al que además se lo defosforiló con la intención de evitar reacciones de autoligado.

Luego de transformar y analizar posibles recombinantes, no se encontraron clones positivos, posiblemente a la baja eficiencia de corte que se obtenía en las dobles digestiones realizadas en los insertos.

Por lo tanto se optó por utilizar otra estrategia, la cual incluyó un paso intermedio, que consistió en clonar los fragmentos AK SE y AK SE en el vector pGEM-T easy (Promega). Este vector posee secuencias de reconocimiento para EcoRI a ambos lados del sitio de clonado, que permiten liberar los fragmentos correspondientes a la AK SE y AK AS utilizando esta endonucleasa.

Los fragmentos AK SE y AK AS fueron entonces ligados con en el vector pTREX, previamente digerido con EcoRI. En estas condiciones el gen de la arginina quinasa puede incorporarse al vector en ambas direcciones, por lo que luego se debe hacer un estudio detallado de los clones obtenidos. Mediante esta estrategia se obtuvieron varias colonias recombinantes a las cuales se las analizó, por digestiones con enzimas de restricción, para distinguir aquellas que hubieran incorporado el gen de la arginina quinasa en posición sentido de aquellas en las que dicho gen se ubicara en posición anti-sentido.

1.1.iii. Análisis de los clones obtenidos mediante mapas de restricción.

Para establecer la orientación del inserto en plásmidos recombinantes, se diseñó un mapeo de restricción que permitió, no solo, reconocer la orientación en la que se encontraba el gen de la arginina quinasa, sino también, descartar algunos clones en los cuales se vio afectada la integridad de la construcción (Figura 1.2).

Las endonucleasas elegidas fueron:

- EcoRI: permite observar la correcta liberación del inserto y corroborar los tamaños de inserto y vector linealizados.
- HindIII: esta digestión brinda información acerca de la orientación del inserto ya que tiene un sitio de corte hacia el 3' del sitio de inserción en el pTREX y además corta de modo asimétrico el gen de la arginina quinasa (posición 865) dando fragmentos de distinto tamaño dependiendo de la orientación (200 pb si el inserto se halla en orientación sentido y 870 pb si el inserto se encuentra en orientación anti-sentido).
- PstI: esta enzima posee tres sitios de corte en el vector, uno sobre la región de procesamiento hacia 3' de la gapdh y los otros dos sobre el gen neo que brinda la resistencia a G418. Además, corta en tres posiciones al gen de la arginina quinasa, por lo que también permite detectar deleciones sobre dicho gen.

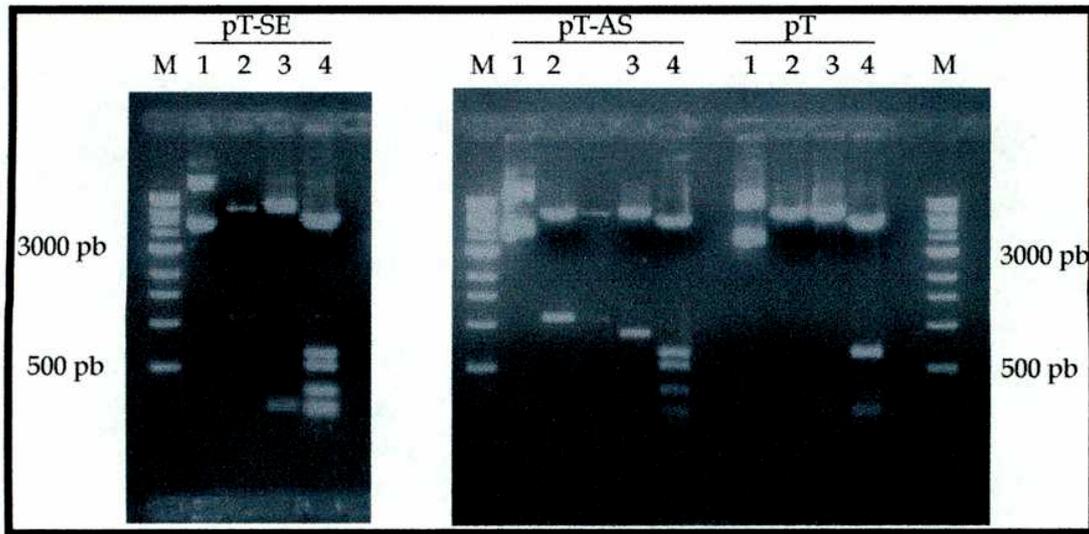


Figura 1.2. Mapa de restricción de los recombinantes obtenidos. Luego de ser digeridos los distintos clones, los productos fueron resueltos en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Tanto el pT-SE sospechado de tener el gen de la arginina quinasa subclonado en orientación sentido (pT-SE), el sospechado de tenerlo en orientación anti-sentido (pT-AS) como el pT-REX utilizado como control (pT), fueron digeridos con EcoRI (calle 2), HindIII (calle 3) y PstI (calle 4); como control en la calle 1 se sembraron alícuotas de los respectivos vectores sin digerir.

1.2. Transfecciones estables de epimastigotes con los vectores pT-AS y pT-SE.

Se utilizaron para la electroporación 10^8 epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* según se detalla en materiales y métodos. Además de las construcciones mencionadas en el punto anterior (pT-AS y pT-SE) un grupo de parásitos fue transfectado con una construcción (pT-GFP) correspondiente al vector pT-REX que lleva en el sitio múltiple de clonado el gen que codifica para la proteína verde fluorescente. La construcción pT-GFP, fue incluida con el objetivo de seguir el proceso de selección con el antibiótico (G418). Por último, como control de la eficiencia de la droga utilizada para seleccionar, se realizó la transfección de un grupo al que sólo se le agregó buffer TE en ausencia de ADN.

Inmediatamente, después de la electroporación se determinó por conteo en cámara de Neubauer la supervivencia de los parásitos al proceso de electroporación, estimándose en un 50%.

Luego de un período de recuperación de 48 horas sin presión de selección se determinó la eficiencia del proceso analizando la población correspondiente a los parásitos que fueron transfectados con la construcción pT-GFP. Para ello se observó al microscopio de fluorescencia la proporción de parásitos que estaban expresando la proteína verde fluorescente. La eficiencia obtenida fue estimada entre un 20-30%.

Luego de esto se comenzó el proceso de selección mediante la adición del antibiótico G418.

Luego de aproximadamente tres meses se dio por concluido el proceso al observar que la totalidad de la población correspondiente a los parásitos transfectados con el pTREX-GFP expresaban dicha proteína.

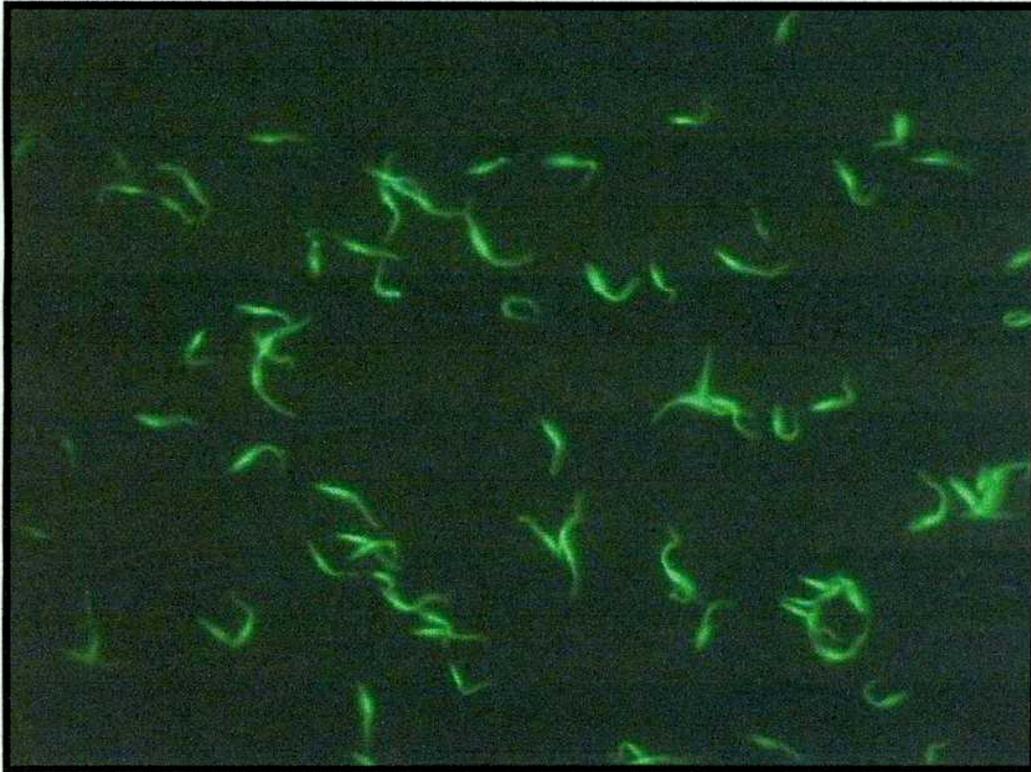


Figura 1.3. Parásitos transfectados con la construcción pT-GFP al ser observados al microscopio de fluorescencia luego del período de selección. Al Observar el mismo campo con luz blanca, se confirma que el 100% de la población posee expresión de GFP.

1.3. Análisis funcional de las poblaciones de parásitos transfectados.

1.3.i. Ensayo de actividad arginina quinasa.

Como primera medida, para estudiar el fenotipo de las distintas poblaciones se realizaron mediciones de la actividad arginina quinasa *in Vitro*. En todos los casos se utilizaron extractos de parásitos (S10) que se encontraban en la fase exponencial tardía de la curva de crecimiento (día 7), colocando entre 5 y 10 μg de proteína por ensayo dependiendo de la actividad específica de cada fracción. Como puede observarse en la figura 1.4, la construcción que lleva el gen de la arginina quinasa en orientación sentido, posee 2.3 veces mas actividad que el control realizado con los parásitos transfectados con el vector pT-GFP, en tanto que los epimastigotes transfectados con la construcción pT AS mostraron tan solo un 30% de disminución en su actividad con respecto al control.

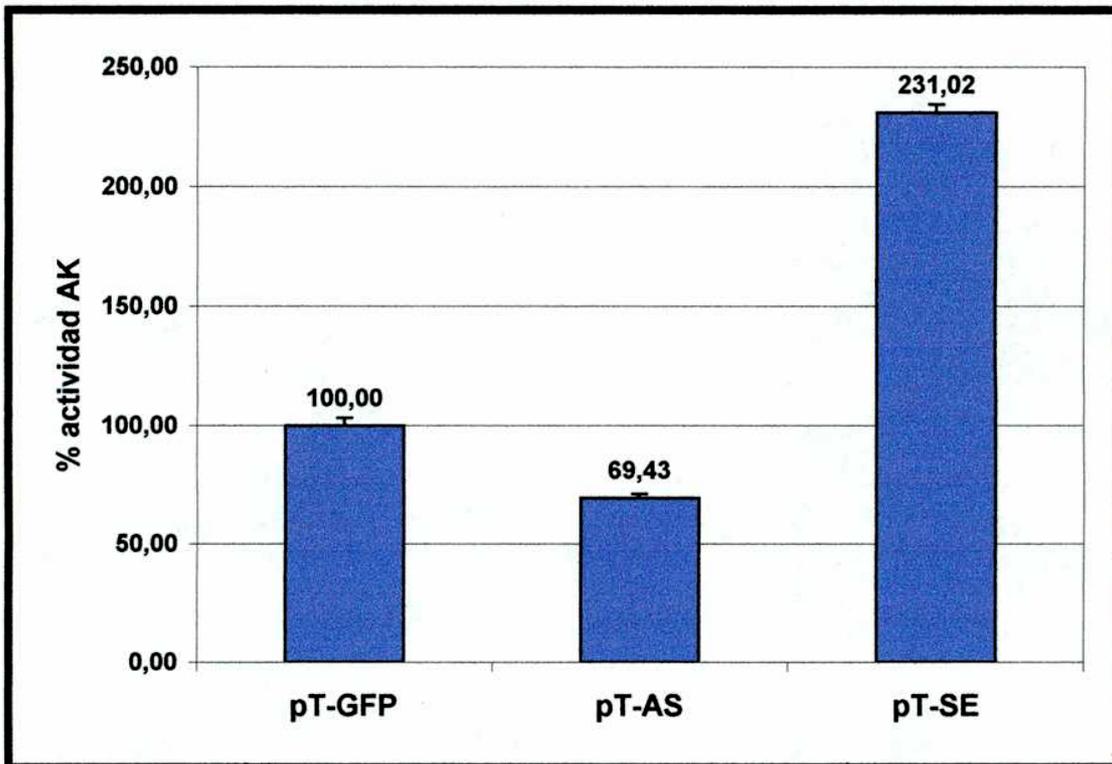


Figura 1.4. Ensayo de actividad arginina quinasa, los resultados fueron expresados como porcentaje con respecto al control realizado con la población que lleva la construcción pT-GFP. Los valores graficados representan la media de triplicados y las barras de error indican el desvió promedio.

1.3.ii. Estudio de los niveles de arginina quinasa mediante ensayos de "Western Blot".

Para determinar si las diferencias de actividad enzimática de las distintas poblaciones se correspondían con una variación en la cantidad de enzima presente en los parásitos, se realizaron ensayos de "Western Blot". Para ello se resolvieron en geles de poliacrilamida extractos de parásitos (30 μ g de proteína por calle) de las distintas poblaciones. Fueron utilizados en paralelo dos geles, uno se tiñó con Coomassie Blue (Figura 1.5) para comparar las cantidades sembradas en cada calle, en tanto que el otro gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa para luego ser revelado con un anti-suero anti arginina quinasa. Como control de carga se utilizó un anti-suero anti tubulina, que permite corregir por variaciones en la carga. En la figura 1.6, puede observarse en todas las calles una banda de aproximadamente 40 kDa correspondiente a la arginina quinasa (AK) y otra de mayor peso molecular correspondiente a la tubulina (ctrl.).

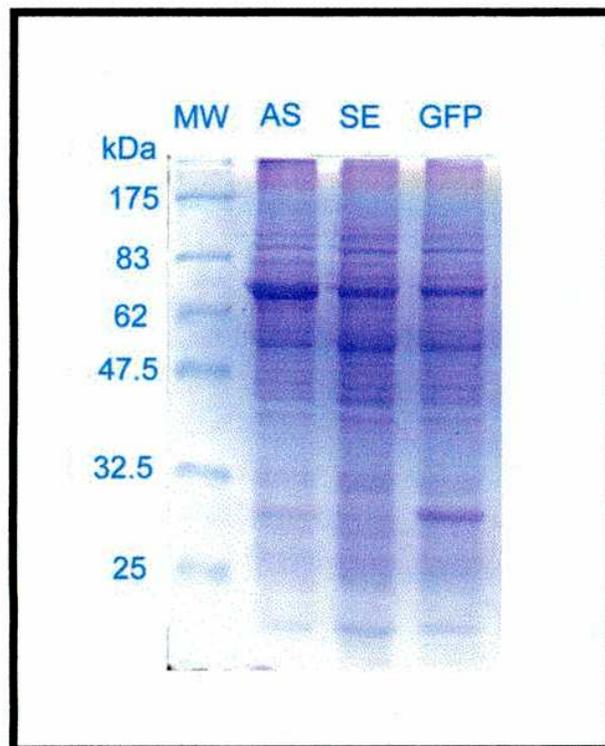


Figura 1.5. Gel de poliacrilamida teñido con Coomassie blue. La banda de aproximadamente 30 kDa presente en la calle rotulada como GFP, corresponde a la expresión de dicha proteína.

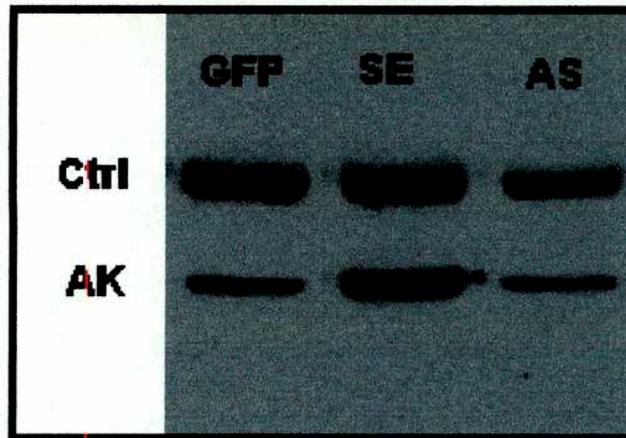


Figura 1.6. Western Blot correspondiente a las distintas poblaciones de parásitos transfectados. Las bandas señaladas como Ctrl Corresponde a la tubulina.

Para cuantificar las diferencias en los niveles de arginina quinasa observados en el Western Blot, se realizó la densitometría de las bandas correspondientes a la arginina quinasa, y se estandarizó por la intensidad de las bandas correspondientes al control. Como resultado, se determinó que el nivel de arginina quinasa presente en los parásitos transfectados con la construcción pT-SE es aproximadamente 2 veces mayor que los hallados en el grupo control, en tanto que en los parásitos transfectados con la construcción pT-AS, se observa una disminución del 30 % en los niveles de arginina quinasa. Estos resultados coinciden con las variaciones observadas para la actividad arginina quinasa.

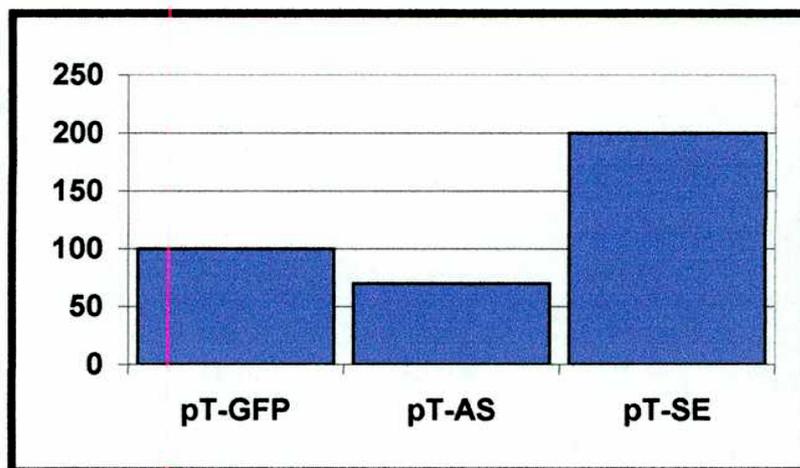


Figura 1.7. Cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a la arginina quinasa en el ensayo de Western Blot corregido por el control de carga.

1.3.iii. Estudio de los niveles de ARNm de arginina quinasa mediante ensayos de "Northern Blot".

Para determinar los niveles del mensajero codificante para la arginina quinasa presente en las poblaciones de parásitos transfectados, se llevaron a cabo ensayos de "Northern Blot" en los cuales se estandarizó la cantidad de ARN total a ser sembrado en cada calle (30 μ g). Para la detección se utilizó como sonda la región codificante del gen de la arginina quinasa.

En la figura 1.8 se puede ver en todas las calles una única banda de aproximadamente 2 kb coincidente con el tamaño previamente reportado para el ARNm del gen de la arginina quinasa (Pereira, 2000). Para cuantificar las diferencias observadas en la intensidad de las bandas se realizó un análisis densitométrico, dando por resultado 2.5 veces de sobre-expresión para la población que lleva la construcción pT-SE y una disminución de 0.35 veces en la población transfectada con el pT-AS, siempre comparando con el control de GFP.

La presencia de una única banda lleva a pensar que el mensajero expresado a partir del locus ribosomal posee un tamaño coincidente al reportado para la expresión del gen endógeno. Aunque la fuerte señal obtenida no permite descartar la presencia de otra banda de tamaño similar.

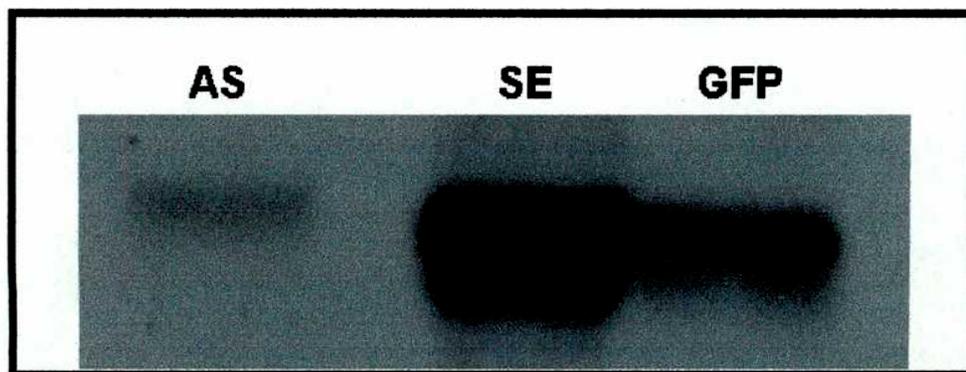


Figura 1.8. Northern Blot correspondiente a las distintas poblaciones de parásitos transfectados. La sonda utilizada en el revelado corresponde a la región codificante del gen de la arginina quinasa. AS: pT AS, SE: pT SE y GFP: pT GFP.

1.4. Estudio de la zona de inserción en el genoma del parásito para las poblaciones transfectadas con los vectores pT AS, pT SE y pT GFP.

Para determinar el lugar de inserción de las distintas construcciones en el genoma del parásito se llevaron a cabo dos estrategias.

La primera se realizó con la intención de determinar la presencia de la copia extra del gen de la arginina quinasa mediante ensayos de "Southern Blot". Además, esta técnica permite detectar posibles re-arreglos estructurales en las regiones de inserción. Las enzimas elegidas permiten no solo detectar la presencia de la copia extra del gen de la arginina quinasa, sino que además brindan información de su integridad y por último permiten distinguir la dirección en la que se encuentra integrado en el genoma del parásito.

Las bandas obtenidas en las calles correspondientes a las poblaciones transfectadas con el pT AS y pT SE, se compararon con el patrón que se observó al cortar con las mismas enzimas ADN genómico proveniente de poblaciones controles como ser: la cepa CL-Brener sin transformar o transformada con la construcción pT-GFP.

Como se puede ver en la figura 1.9, al digerir con Hind III, (posee un único sitio de corte en el gen de la arginina quinasa en la posición 865 y corta en el sitio múltiple de clonado después del sitio de integración) se observa en la calle correspondiente al ADN genómico proveniente de los parásitos transfectados con pT-AS (AS) una banda diferencial poco menor a 1 kb, en tanto que en la calle correspondiente al ADN genómico proveniente de los parásitos transfectados con pT-SE (SE), se ve una banda tenue de aproximadamente 200 pb. Las digestiones con Sac I, (corta en la posición 1046 dentro del gen de la arginina quinasa, y 1020 pb antes del sitio múltiple de clonado en el pTREG) son sumamente útiles para detectar la orientación en la que se halla la copia del gen incorporada en la región promotora del locus ribosomal. En este caso, en la calle correspondiente al AS, se detecta una banda diferencial de un tamaño cercano a los 6 kb, en tanto que en la calle correspondiente al SE, la banda diferencial es cercana a los 2 kb. Por último las digestiones realizadas con Pst I, permiten estudiar la integridad del gen de la arginina quinasa ya que posee tres sitios de corte, en las posiciones 53, 587 y 920. De esta manera se esperan encontrar 2 bandas mayoritarias de aproximadamente 530 y 330 pb .

En todos los casos el resultado obtenido fue congruente con lo esperado de acuerdo al análisis teórico.

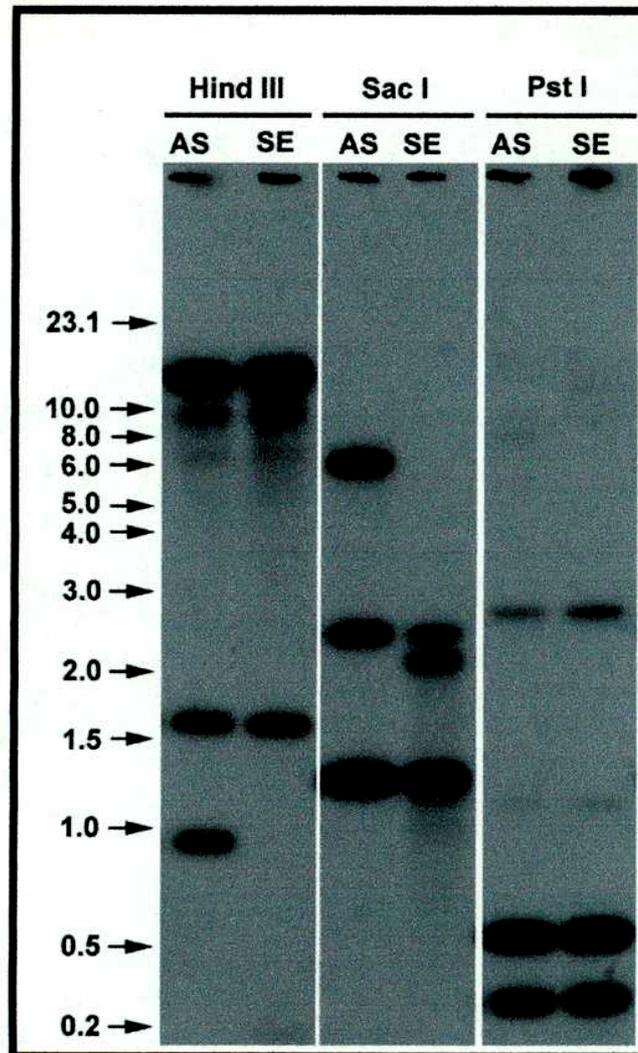


Figura 1.9. Ensayo de "Southern Blot" realizado con ADN genómico obtenido de las distintas poblaciones de parásitos según se indica (AS: parásitos transfectados con el pT AS y SE: parásitos transfectados con el pT SE). En la parte superior de la figura se indican las endonucleasas utilizadas. La sonda utilizada en el revelado corresponde a la región codificante del gen de la arginina quinasa. Sobre el margen derecho se indica con flechas las posiciones de los marcadores de peso molecular en kpb.

La segunda estrategia permitió confirmar la correcta inserción de la copia extra del gen de la arginina quinasa en el locus ribosomal. Para ello se realizaron ensayos de "Chromosome Blot" mediante la separación de los cromosomas de las distintas poblaciones por electroforesis en campos pulsados. Posteriormente se hibridó con una sonda específica de la región codificante del gen de la arginina

quinasa. Como se puede ver en la figura 1.10, en todas las calles se observan dos bandas de 830 y 880 kpb correspondientes a las dos copias endógenas del gen de la arginina quinasa (única copia, en un par de cromosomas homólogos con distinto peso molecular) estando este resultado en coincidencia con lo observado en reportes previos (Pereira, 2000). En las calles correspondientes al pT-SE (SE) y pT-AS (AS), se ve una banda extra de aproximadamente 1000 kpb que representa a las copias del gen que se insertaron en cada uno de los cromosoma del par homologo. Estos resultados están de acuerdo con la posición de inserción esperada para el vector pTRES-A en el locus del promotor ribosomal (Vázquez M and Levin M, 1999).

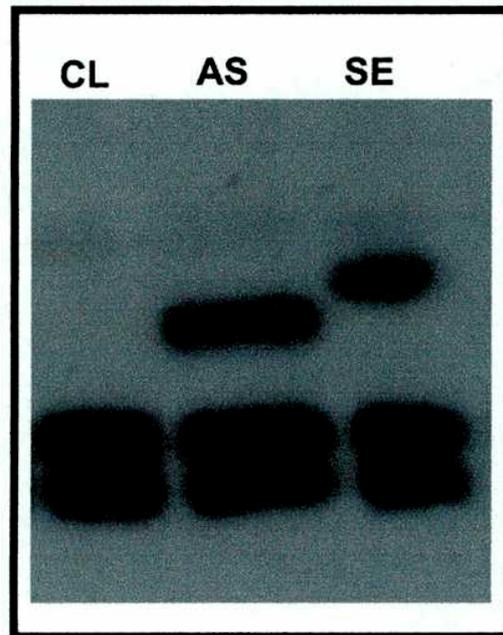


Figura 1.10. "Chromosome Blot" de las poblaciones indicadas. La sonda utilizada corresponde a la región codificante del gen de la arginina quinasa.

Debido a la falta de eficiencia del vector pT-AS, en la supresión funcional de la arginina quinasa, se postuló que posiblemente la longitud del transcripto anti-sentido fuera excesiva y por esa razón resulta muy propenso a la formación de estructuras secundarias y en consecuencia disminuye su eficiencia en la formación de "duplex" con el ARNm endógeno de la arginina quinasa. Para evaluar esta posibilidad se diseñó una nueva construcción de menor tamaño, complementaria al sitio de procesamiento 5' del mensajero de la arginina quinasa, el codón de iniciación de la traducción y los primeros 110 nucleótidos de la región codificante.

Generación de epimastigotes transfectados que sobre-expresen o tengan suprimida funcionalmente la arginina quinasa.

ETAPA II.

En esta etapa se utiliza una nueva construcción con el fin de generar una población de epimastigotes que tengan suprimida funcionalmente la arginina quinasa. Para cumplir con este objetivo se planteo como estrategia la expresión de un ARN anti-sentido mas pequeño, capaz de afectar diferentes regiones funcionales presentes en el ARNm endógeno de la arginina quinasa.

Además, se vuelve a transfectar con la construcción pT-SE y finalmente con las distintas poblaciones obtenidas se inicia el estudio acerca de las posibles funciones que podría estar cumpliendo la arginina quinasa en procesos que impliquen una alta demanda energética como ser la diferenciación celular entre estadíos y la invasión de la célula huésped. De hallarse una relación entre la arginina quinasa y alguno de estos procesos, se potenciaría su importancia como blanco para el desarrollo de drogas para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

La obtención de modelos, en los que se modifica los niveles de expresión de una enzima, son herramientas que en ocasiones permiten realizar hallazgos que no formaban parte del motivo para el cual se los creo. Como se verá en el capítulo 2 de este trabajo de tesis, la población que sobre-expresa la arginina quinasa obtenida en esta segunda etapa, resulto ser una importante herramienta para el esclarecimiento del nivel de regulación al que se halla sujeta la arginina quinasa endógena.

1.5. Obtención de una construcción anti-sentido pequeña del gen de la arginina quinasa (pT-ASp).

1.5.i. Amplificación de la región a ser subclonada.

Para la amplificación de un fragmento de la arginina quinasa que permita generar una construcción de las características buscadas en esta etapa se diseñaron los siguientes oligonucleótidos: 5pNC y RevAS, los cuales no presentan secuencias de corte para enzimas de restricción, y cuyas secuencias se describen en la sección materiales y métodos.

El producto de amplificación posee un tamaño esperado de 162 pb.

Esta secuencia complementa con 52 nts de la región 5' no codificante del gen de la arginina quinasa dentro de la cual se encuentran las señales necesarias para que se lleve a cabo el proceso de trans-splicing descrito en la introducción. Además, bloquea el sitio de inicio de la traducción e ingresa 110 nts en la región codificante.

La figura 1.11, muestra la región que se espera amplificar.

Figura 1.11. Secuencia del ASp.

```
AGGTTTTTTTTGTATTCATTCACTCGGCACAAAACAAGCAACTCAGTCACGATGGCCT  
CCGCGGAAGTTGTCAGCAAACCTTGAGGCGGCGTTCGCCAAACTGCAGAACGCAAGCG  
ACTGCCACTCGCTCCTCAAGAAGTACCTCACGAAGGAGGTGTTTGA
```

Resaltado en amarillo se indican los sitios de unión de los oligonucleótidos utilizados como iniciadores en la reacción de PCR. Y en verde se destaca el codón de inicio de la traducción.

Los productos obtenidos luego de la PCR, en la que se utilizó ADN genómico de *Trypanosoma cruzi* fueron sembrados en un gel de agarosa 1%. En la figura 1.12, se puede observar una banda correspondiente a un fragmento que presenta un tamaño de 160 pb.

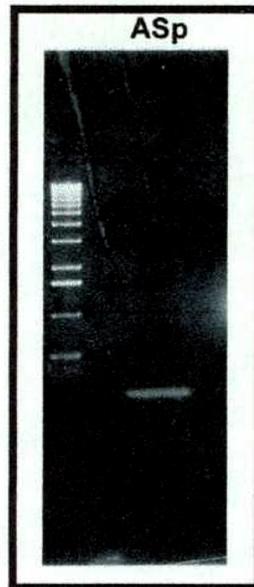


Figura 1.12. Producto de amplificación obtenido en la reacción de PCR, utilizando los primer 5pNC y RevAS, sobre un templado de ADN genómico de *T. cruzi*. El tamaño de la banda obtenida fue del tamaño esperado.

1.5.ii. Subclonado del fragmento obtenido en la reacción de PCR (ASp) en el vector de expresión pTREX.

El fragmento obtenido en la reacción de PCR, fue inicialmente clonado en el vector pGEM-T easy (Promega). Como se describió en la etapa anterior, este vector es específico para clonar productos de PCR y además, permite la liberación del inserto utilizando la endonucleasa EcoRI. Por lo tanto se utilizó esta característica para obtener el fragmento, correspondiente al ASp, con extremos cohesivos para EcoRI, el cual fue subclonado en el vector pTREX, digerido previamente con dicha enzima.

Las colonias obtenidas fueron luego analizadas mediante mapas de restricción para diferenciar la orientación del fragmento incorporado y luego se confirmó la orientación mediante la secuenciación de los clones considerados positivos por el mapeo.

1.5.iii. Análisis de los recombinantes obtenidos mediante enzimas de restricción.

De los clones obtenidos se realizó un primer rastreo en busca de aquellos que mostraran haber incorporado un fragmento del tamaño apropiado. Como resultado se obtuvieron dos clones, a los que se los llamo A1 y A3. Estos clones fueron luego estudiados para determinar la orientación en la que incorporaron el inserto. Para ello, se los sometió a las siguientes digestiones con endonucleasas:

- EcoRI: Libera el inserto. En ambos caso se espera obtener una banda de aproximadamente 180 pb.
- BamHI-PstI: Se espera una banda de 330 pb si se inserto en la dirección del sentido de transcripción y 280 pb si se incorporo en posición anti-sentido.
- XbaI-PstI: Se espera una banda de aproximadamente 110 pb en el caso hallarse en posición sentido y 60 pb de estar anti-sentido.

Luego de la digestión, los fragmentos obtenidos fueron resueltos en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. En la figura 1.13, se muestra el patrón de bandas obtenido.

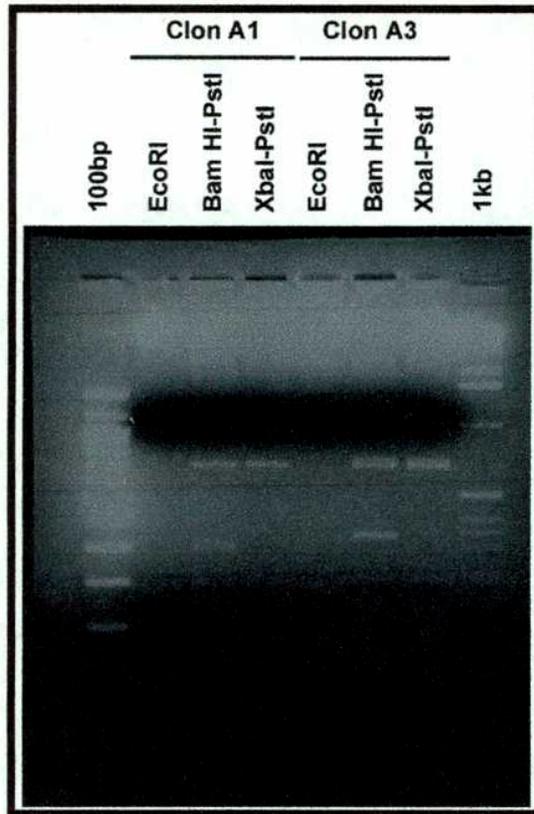


Figura 1.13. Mapa de restricción de los clones A1 y A3. En la parte superior del gel se detallan las enzimas utilizadas con cada clon.

Del análisis de la figura 1.13, se determina que el clon A1 esta orientado en dirección anti-sentido y el A3 esta en orientación sentido.

Estos resultados fueron confirmados por secuenciación de ambos clones.

1.6. Transfecciones estables de epimastigotes con los vectores pT-ASp y pT-SE.

Se electroporaron epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las siguientes construcciones: pT-GFP, pT-SE y pT-ASp y se incluyó como control un grupo que fue sometido al proceso de electroporacion pero al cual no se le agregó ADN.

Del calculo de la mortalidad y la eficiencia de transfección se obtuvieron valores similares a los expresados en la etapa anterior.

Una vez finalizada la selección realizada con el antibiótico (G418), se procedió a caracterizar las nuevas poblaciones.

1.7. Análisis funcional de las poblaciones de parásitos transfectados.

1.7.i. Ensayo de actividad arginina quinasa.

Al analizar la población que lleva el pT-SE, se obtuvieron valores de 60 veces de sobre-expresión respecto al control. En la figura 1.14, se muestra una de las mediciones realizadas en la que el valor de sobre-expresión obtenido fue de aproximadamente 45 veces. Estos valores son muy superiores a los obtenidos durante la primera etapa, posiblemente debido a diferencias en el microambiente de la zona donde se produjo la inserción.

Las mediciones de actividad realizadas con extractos de parásitos provenientes de la población que fue transfectada con la construcción que lleva el ASp, oscilaron entre un 70 y 80 % de disminución de la actividad arginina quinasa, demostrando ser mucho mas eficiente que la construcción utilizada en la etapa I. Sorpresivamente este fenotipo revirtió a las pocas semanas de realizado el ensayo de actividad, posiblemente mediante re-arreglos genómicos que ya se han observado al intentar aplicar las técnicas de ARN anti-sentido para suprimir la actividad tripanotion reductasa en *Trypanosoma cruzi* (Tovar, 1996).

En consecuencia a la población transfectada con el vector pT-ASp no se la pudo seguir caracterizando.

En la figura 1.14, se muestra una de las mediciones realizadas, en la que se comparo la actividad arginina quinasa de los parásitos transfectados con la construcción pT-ASp contra un extracto de parásitos transfectados con el pT-GFP y en cuyo caso se obtuvo aproximadamente un 70 % de disminución de la actividad enzimática.

La cantidad de proteína utilizada en los ensayos de medición de actividad, varió entre 0.3 y 10 µg dependiendo de la actividad específica de cada extracto.

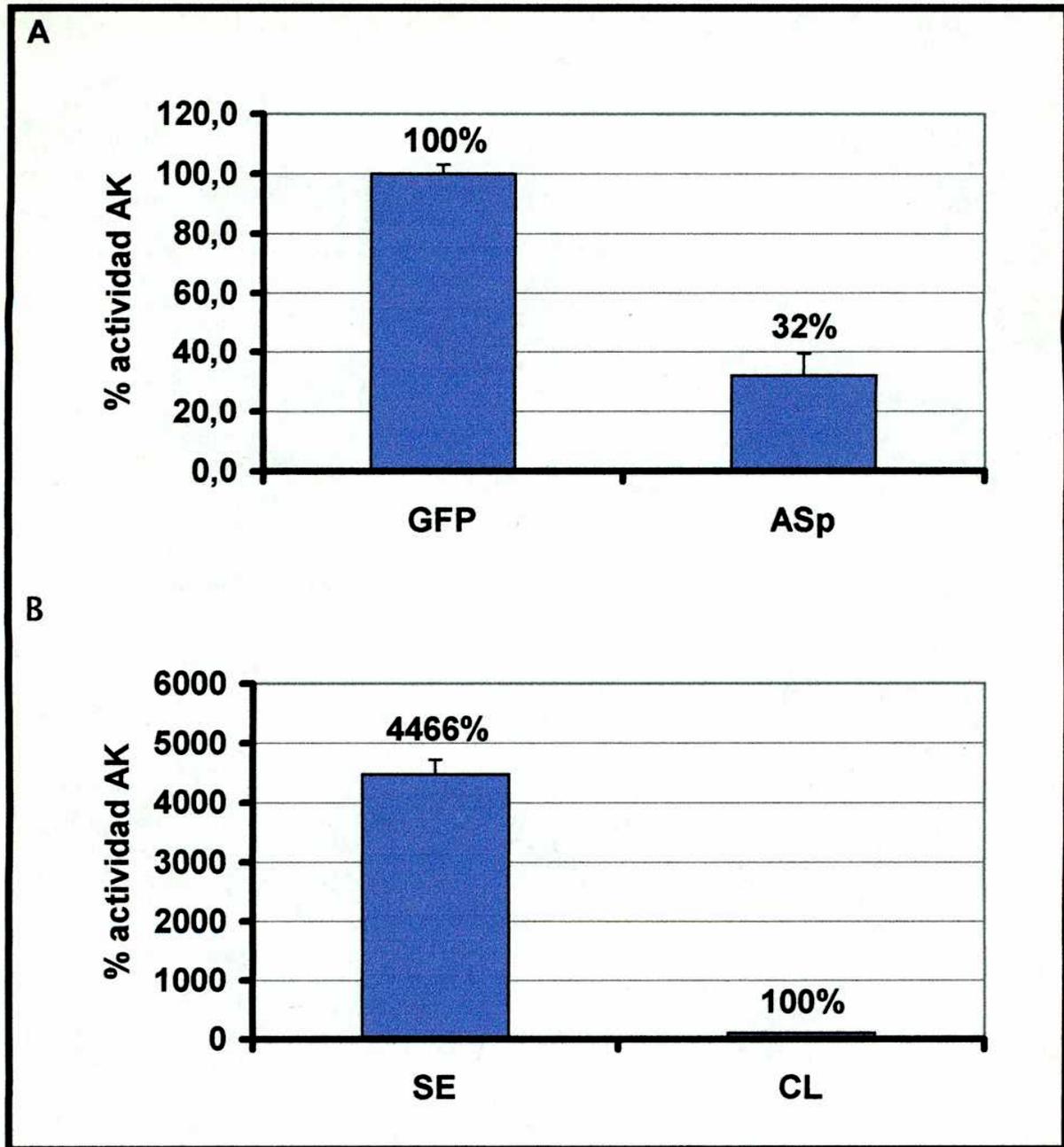


Figura 1.14. Porcentaje de actividad arginina quinasa de las poblaciones transfetadas con el pT-SE (SE) y con el pT-ASp (ASp) con respecto a un control de parásitos sin transfectar (CL) o transfectados con el vector pT GFP (GFP). En el panel A, se observa una disminución en la actividad arginina quinasa de aproximadamente un 70 % en los parásitos transfectados con la construcción pT-ASp, en tanto que en el panel B, se puede observar un aumento de casi 45 veces en la actividad arginina quinasa en la población que lleva la construcción pT-SE.

1.7.ii. Estudio de la cinética de crecimiento poblacional.

Debido a la relación existente entre la arginina quinasa y la formación de reservas (ver introducción pag 38, Rol fisiológico de los fosfágenos) se decidió estudiar la cinética de crecimiento de la población que sobre-expresa esta enzima. Además, debido a que la división celular es un proceso de alta demanda energética, es probable que involucre la utilización de fosfágenos, como la fosfoarginina, que en el caso de los parásitos que sobre-expresan la arginina quinasa sería de esperar que tuvieran elevada su concentración.

De esta manera, se realizó un seguimiento de la población transfectada con el pT-SE hasta el día 19 del cultivo y se fue comparando con el crecimiento observado en el control que expresa la proteína verde fluorescente como así también con parásitos de la cepa CL Brener sin transfectar. De modo periódico se contabilizó la densidad celular utilizando una cámara de Neubauer. Durante el período de tiempo estudiado no se observó diferencia entre las poblaciones que llevaban el pT-GFP al ser comparados con parásitos de la cepa CL-Brener salvajes (datos no mostrados). Pero al estudiar la población de parásitos transfectados con el pT-SE se observó una cinética de crecimiento superior a la de los controles. Se advierte un incremento tanto en la densidad celular como así también en la tasa de replicación. Este efecto podrían deberse a una mayor producción de reservas en forma de fosfoarginina en los parásitos que sobre-expresan la arginina quinasa, de modo tal que logran mantener su crecimiento aun cuando los nutrientes provistos por el medio comienza a escasear. La figura 1.15, en su parte "A" muestra mediante una tabla los valores de densidad celular obtenidos durante el período de tiempo estudiado, como así también la relación entre el número de parásitos observados en cada día (pT-SE/pT-GFP), expresada como porcentaje. En esta columna se puede observar como la población que lleva el pT-SE, progresa más velozmente que el control y en la parte "B" se representan gráficamente los valores de la tabla.

Este ensayo se realizó al menos tres veces, mostrando en todos los casos el mismo comportamiento.

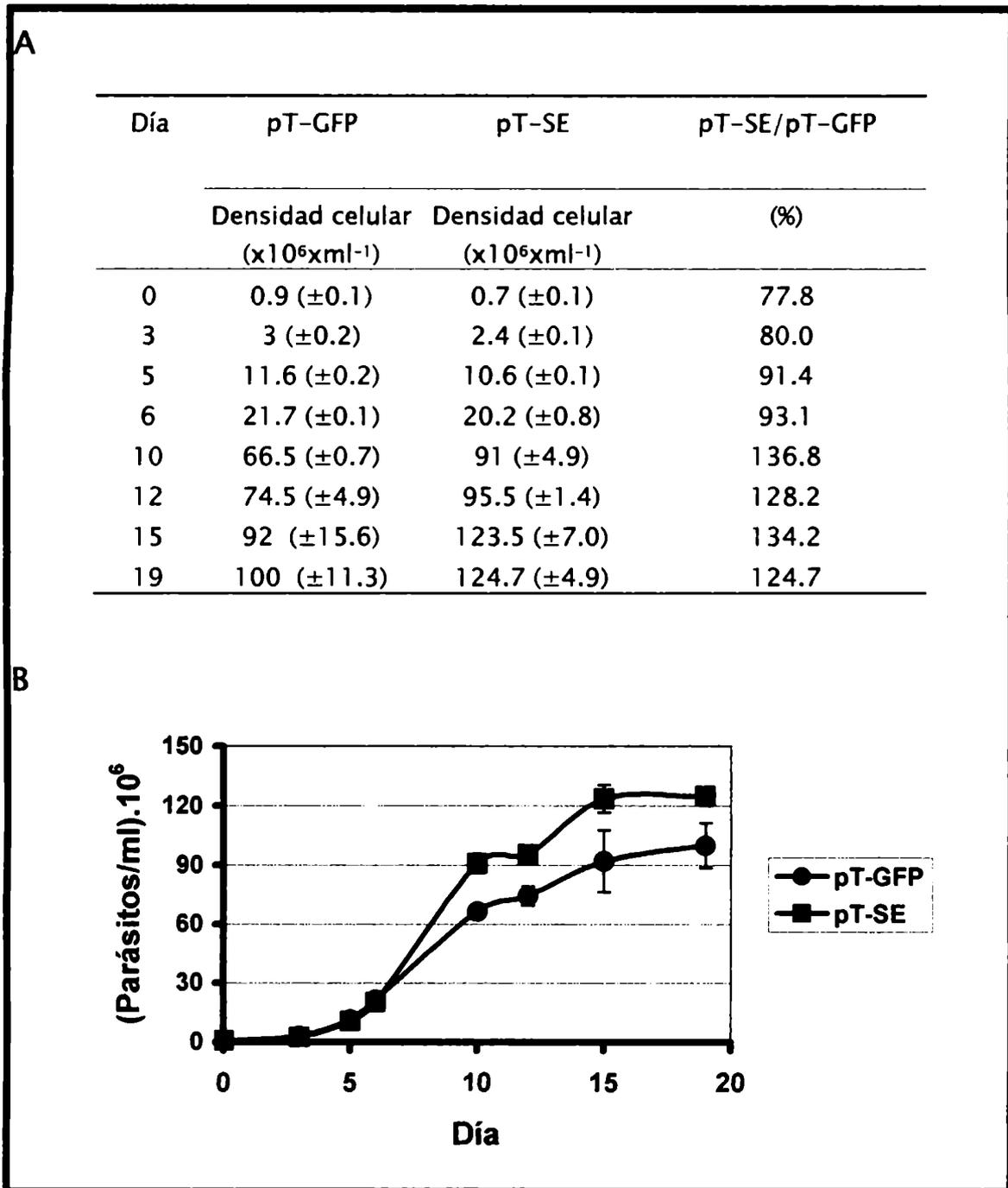


Figura 1.15. Cinética de crecimiento de los epimastigotes transfectados con el pTRES-SE. En la parte A se presentan los resultados en forma de tabla, en tanto que la parte B, muestra el grafico que resulta del procesado de los datos de la tabla.

1.7.iii. Estudio de los niveles de arginina quinasa mediante ensayos de "Western Blot".

Para determinar los niveles de enzima presente en las distintas construcciones, como así también su masa molecular relativa, se realizaron ensayos de "Western Blot", con un anti suero anti arginina quinasa obtenido en ratón. Se incluyeron muestras de la población que sobre-expresa la arginina quinasa, usándose como control parásitos salvajes. En la figura 1.16, se puede ver el alto nivel de expresión de arginina quinasa presente en la población transfectada con el pT-SE. Además, una observación detallada delata la presencia de otra banda de menor peso molecular, en la calle rotulada como SE, que también es reconocida por el anticuerpo y que posiblemente sea un producto de degradación debido a la alta expresión.

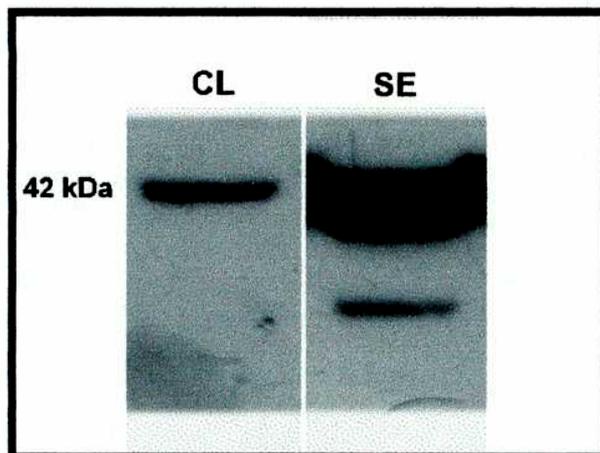


Figura 1.16. "Western Blot" realizado a partir de muestras de parásitos del día 7 de cultivo de las poblaciones CL-Brener salvaje (CL) y la transfectada con la construcción pT-SE (SE). En la calle rotulada como SE, se observa una banda de menor peso molecular que posiblemente sea un producto de degradación.

1.7.iv. Estudio de los niveles de ARNm de arginina quinasa mediante ensayos de "Northern Blot".

Para estudiar si el aumento en la concentración de enzima observado en los ensayos de "Western Blot", se correlaciona con los niveles de ARNm codificante para la arginina quinasa, se realizaron ensayos de "Northern Blot" en los que se resolvieron en un gel de agarosa desnaturizante las muestras de ARN total obtenidas de los distintos grupos. Para la detección, se utilizó como sonda la

región codificante del gen de la arginina quinasa. Como control de la masa sembrada en cada calle, se muestra una foto del gel teñido con bromuro de etidio, previa a la transferencia (Figura 1.17).

En la figura 1.18, se observa en todas las calles una única banda correspondiente al ARNm de la arginina quinasa, siendo notorio el aumento en la expresión de dicha proteína en los parásitos que portan la construcción pT-SE, incluso si se compara la intensidad de los ARNr en la foto del gel teñido con bromuro de etidio (figura 1.17), se nota que la calle rotulada como SE fue desfavorecida en la siembra, por lo que la sobre-expresión es aún mayor. Al igual que lo observado en los ensayos de "Western Blot", en este segundo evento de transfección se ven aumentados los niveles de expresión en relación a la transfección anterior.

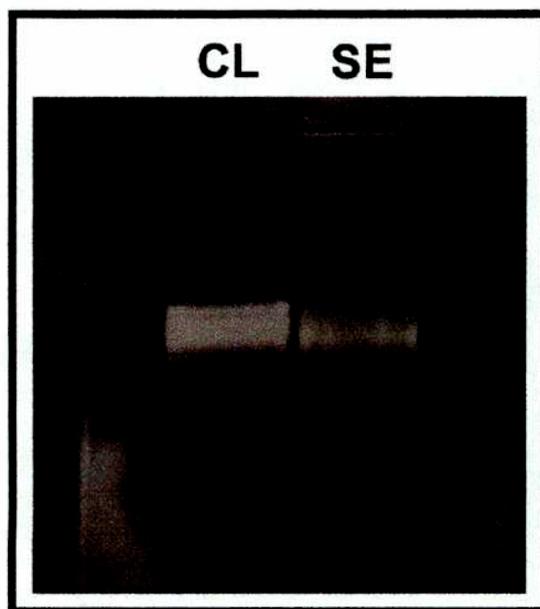


Figura 1.17. Gel de agarosa desnaturizante teñido con bromuro de etidio, utilizado en la transferencia para llevar a cabo el ensayo de "Northern Blot" Las bandas observadas corresponden a los ARNr, y permiten comparar las cantidades sembradas en una y otra calle. En este caso se observa una menor cantidad de ARN en la calle rotulada como SE.

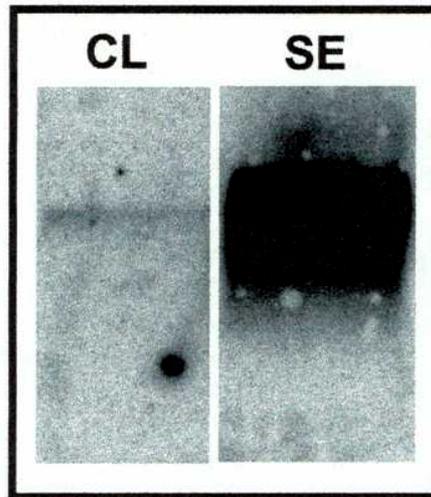


Figura 1.18. Ensayo de "Northern Blot". La banda observada corresponde al ARNm de la arginina quinasa, siendo muy superiores los niveles del ARNm específico presentes en la población que sobre-expresa la arginina quinasa.

1.8 Estudio de la zona de inserción en el genoma del parásito para las poblaciones transfectadas con los vectores pT SE y pT GFP.

Al igual que en la primera etapa se emplearon ensayos de "Southern Blot" y "Chromosome Blot", para llevar a cabo la identificación de la zona en la que se insertó el vector que lleva la arginina quinasa en orientación sentido así como para confirmar que dicha inserción se halla producido en el cromosoma correspondiente.

Para el ensayo de "Southern Blot" se utilizaron endonucleasas que permiten confirmar no solo la orientación del gen de la arginina quinasa incorporada en el locus del promotor ribosomal, sino también la integridad del mismo.

Como se puede ver en la figura 1.19, al digerir con EcoRI, se observa una doble banda de un tamaño aproximado de 6 kb correspondiente a la copia endógena del gen. Además, en la calle correspondiente a la población que sobre-expresa la arginina quinasa, se puede ver una banda de aproximadamente 1 kb, correspondiente a la copia incorporada en el locus del promotor ribosomal, ya que como se describió anteriormente, se utilizó esta endonucleasa para llevar a cabo la construcción con que se transfectó. Las digestiones con HindIII, como así también las realizadas con PstI, mostraron el mismo patrón de bandas observado en la etapa I, confirmando de esta manera que la población transfectada con el pT-SE lleva en su genoma dos copias del gen de la arginina quinasa, una

correspondiente al gen endógeno y otra que corresponde a la incorporación del vector con que se transfectó.

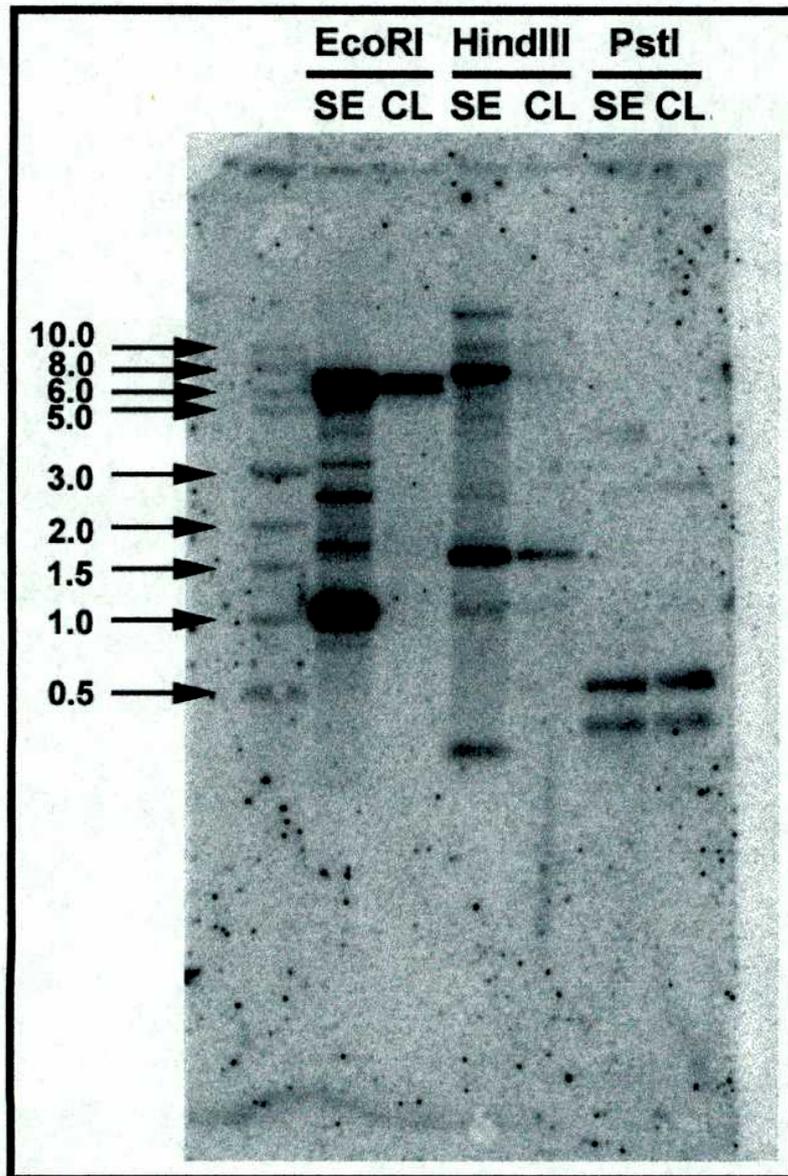


Figura 1.19. "Southern Blot" realizado con ADN genómico obtenido de las poblaciones indicadas. Fue revelado utilizando una sonda correspondiente a la región codificante del gen de la arginina quinasa. Sobre el margen derecho se indica la posición de los marcadores de peso molecular en kpb. Y en la parte superior del gel se indican las endonucleasas utilizadas.

Por último, el "Chromosome Blot" se muestra en la figura 1.20, donde se puede observar la aparición de una banda de aproximadamente 1000 kb, la cual aparece solo en la calle correspondiente a la población que sobre-expresa la arginina quinasa (SE), en tanto que en todas las calles aparecen dos bandas, de 830 y 880 kb correspondientes a los dos alelos del gen endógeno (indicado con flechas negras).

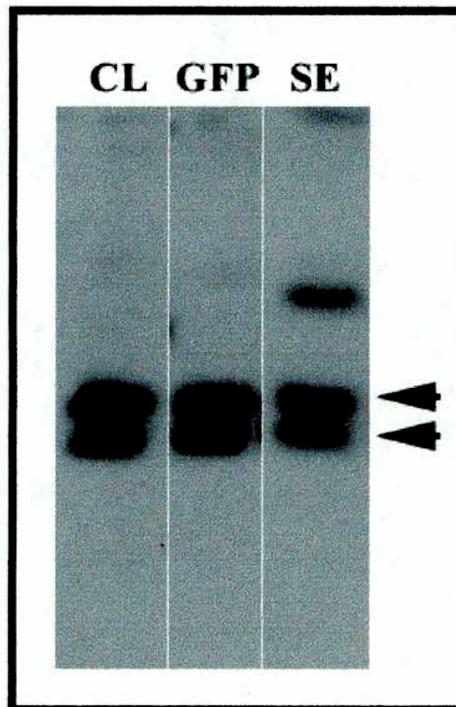


Figura 1.20. "Chromosome Blot" de las poblaciones de parásitos transfectados y de un control. La sonda utilizada, corresponde a la región codificante del gen de la arginina quinasa. Se señala mediante flechas los cromosomas homólogos que poseen los alelos endógenos de dicho gen.

1.9. Estudio de la capacidad de diferenciación e invasión de los parásitos que sobre-expresan la arginina quinasa obtenidos en la etapa 1.

Los ensayos realizados en esta sección los lleve a cabo en el laboratorio del Dr. Walter Colli, en la Universidad de San Pablo, Brasil.

Para la fecha en la que se realizó el viaje, solo se disponía de la población que sobre-expresa la arginina quinasa obtenida en la etapa 1, y que alcanzaba valores de sobre-expresión de aproximadamente 2.5 veces.

1.9.i. Estudio de diferenciación celular

Los estudios de diferenciación celular, se llevaron a cabo incubando epimastigotes en medio TAU, el cual reproduce las condiciones fisicoquímicas de la orina del insecto vector, en presencia de la cual se ha observado que un porcentaje de la población (que es variable entre cepas) muere. Entre los parásitos que sobreviven, un porcentaje de los epimastigotes, diferencian a la forma tripomastigote. El medio TAU, actúa principalmente como un medio de estrés ya que carece de nutrientes, y de la osmolaridad fisiológica.

Los resultados obtenidos, mostraron una supervivencia muy baja y heterogénea de las poblaciones estudiadas al ser crecidas en medio TAU, de modo que no se pudo llegar a resultados concluyentes, por lo que se está trabajando en colaboración para repetir estos ensayos en medio TAU suplementado con medio condicionado, que en otras ocasiones ha aumentado la tasa de supervivencia. Una vez puesto a punto este ensayo se estudiará la capacidad de diferenciación de la población que se obtuvo en la etapa 2, que presenta hasta 60 veces de sobreexpresión y además, se harán nuevas construcciones para lograr la supresión de la arginina quinasa, y así también utilizarla en los ensayos de diferenciación.

1.9.ii. Ensayos de invasión de células susceptibles.

Cultivos de células de la línea LLC-MK2 fueron infectados con 1×10^6 tripomastigotes, obtenidos por diferenciación de las poblaciones de parásitos sin transfectar (CL), transfectados con la proteína verde fluorescente (GFP), o con la construcción pT-SE (SE). Luego de una hora de incubación se realizaron lavados con PBS y se adicionó con 0,5 ml de medio de cultivo/pocillo. Luego de una incubación durante la noche, los cultivos fueron fijados y teñidos con Hoechst para facilitar la observación y recuento de los amastigotes intracelulares. Estos experimentos fueron realizados por triplicado. Figura 1.21 y tabla 1.1.

En primer lugar se realizó un recuento de amastigotes intracelulares para cada unidad experimental en los pocillos control con el objeto de hacer una evaluación preliminar sobre la dispersión de los datos. Dado que la diferencia entre pocillos resultó no significativa, se realizó un recuento de un total de no menos de 200 células infectadas provenientes de distintos campos en distintos pocillos para cada ensayo, y tampoco en este caso se encontraron diferencias significativas. Al igual que los ensayos de diferenciación, los estudios de invasión también se repetirán con las nuevas poblaciones de parásitos.

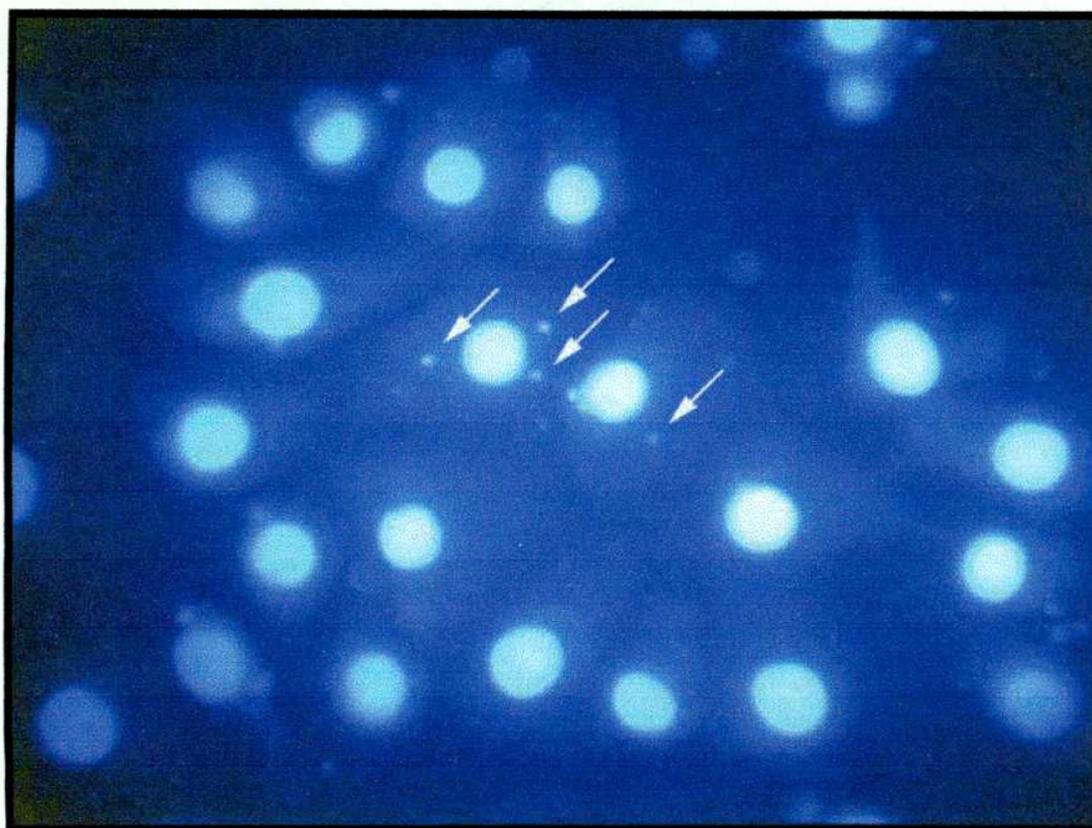


Figura 1.21. Ensayo de invasión a células LLC-MK2. Las flechas señalan los núcleos de amastigotes dentro de las células. La alta señal del colorante permite distinguir los contornos de las células.

	% de células con parásitos	Parásitos (Nro por célula)
CL	29.66 ± 7.39	0.43 ± 0.14
GFP	30.85 ± 4.49	0.42 ± 0.12
SE	33.95 ± 14.32	0.48 ± 0.25

Tabla 1.1. Células de la línea LLC-MK2 fueron infectadas con 1×10^6 tripomastigotes, provenientes de la diferenciación de las distintas poblaciones, por pocillo. Los valores presentados en la tabla corresponden a la media \pm el desvío estándar. Estos valores al ser sometidos a un test T resultaron no tener diferencias significativas.

Capítulo 2

Variación de los niveles de arginina quinasa durante las fases de crecimiento.

Los procesos de mayor demanda energética en tripanosomátidos son la división celular, la motilidad, la diferenciación entre estadios y la invasión de las células huésped (Brener, 1973).

En el *Trypanosoma cruzi*, la relación existente entre la actividad arginina quinasa (AK) y los requerimientos energéticos es un capítulo de importancia que aún está sin resolver.

Estos parásitos soportan un amplio rango de condiciones ambientales durante su ciclo de vida complejo. Por ejemplo en el hospedador mamífero los estadios de tripomastigotes y amastigotes se encuentran en un ambiente constante, incluyendo un aporte permanente de glucosa y aminoácidos. Por el contrario en el insecto vector, los ciclos de alimentación determinan variaciones en la disponibilidad de nutrientes para el estadio de epimastigotes (Kollien, 2000).

Teniendo en cuenta estos hechos y la relevancia de los fosfágenos en las reacciones de transferencia de energía, el presente capítulo pretende dar los primeros pasos en el estudio de la regulación de la arginina quinasa en relación a los cambios en la composición del medio extracelular durante las fases de crecimiento de un cultivo desarrollado *in vitro*.

El estudio de las variaciones en los niveles de la arginina quinasa no solo tiene valor para comprender, los mecanismos de regulación utilizados en su caso particular, sino que además, puede ser utilizado como un modelo que permita el estudio de la expresión de genes en tripanosomátidos.

Parte de los resultados presentados en este capítulo fueron publicados :

Alonso, GD, Pereira, CA, Remedi, MS, Paveto, MC, Cochella, L, Ivaldi, MS, Gerez de Burgos, N, Torres, HN, Flawiá, MM. (2001) Arginine kinase of the flagellate protozoa *Trypanosoma cruzi*. Regulation of its expression and catalytic activity. FEBS Letters 498:22-25.

2.1. Actividad arginina quinasa durante las diferentes etapas de la curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*.

Con el objetivo de estudiar posibles regulaciones de la arginina quinasa de *T. cruzi* se realizó un cultivo de epimastigotes de la cepa CL Brener (cepa de referencia del proyecto genoma de *T. cruzi*) y se lo dejó desarrollar hasta el día 19. Durante este período se tomaron muestras de parásitos a distintos tiempos, según se indica en la figura 2.1, y se procedió a la medición de la actividad específica expresada como μ moles de fosfoarginina formados por minuto por miligramo de proteínas totales. Es importante notar que la actividad medida en ensayos *in vitro*, no es representativa de la función que esta llevando a cabo la enzima dentro de la célula, ya que en las condiciones de ensayo se favorece la reacción de formación de fosfoarginina.

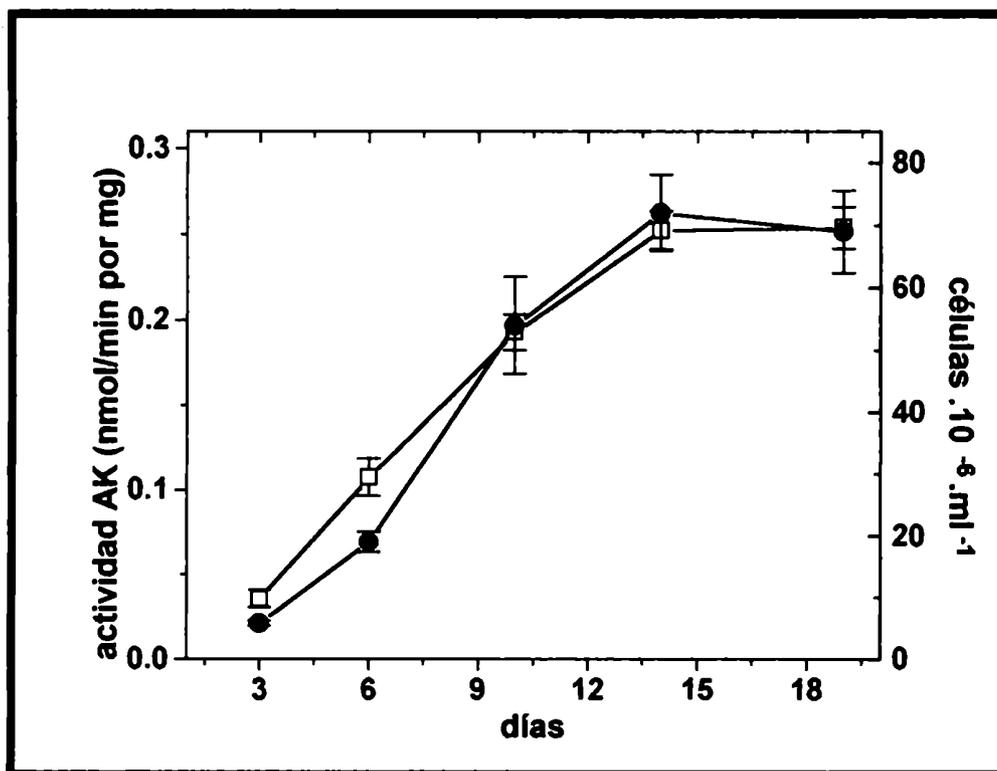


Figura 2.1. Actividad específica arginina quinasa y crecimiento celular en función de los días del cultivo. Extractos solubles procedentes de cultivos de los días 3 a 19, fueron ensayados para su actividad arginina quinasa como se describe en materiales y métodos (cuadrados blancos). Los círculos negros representan el número de parásitos por mililitro en cada día. Los valores graficados representan la media de triplicados y las barras de error, indican el desvío promedio.

Como se puede ver en la figura 2.1, La actividad arginina quinasa aumenta continuamente durante la fase exponencial de crecimiento. Sin embargo, cuando el cultivo alcanza la fase exponencial tardía, la actividad arginina quinasa permanece constante. La diferencia entre las actividades específicas encontradas entre la fase exponencial temprana (día 3) y tardía (día 14) fue superior a las 7 veces, mostrando el máximo aumento entre los días 3 y 6 (aproximadamente 3 veces).

Debido a la similitud del comportamiento de la actividad arginina quinasa y el crecimiento del cultivo, se decidió estudiar el grado de correlación existente entre estas dos variables. El coeficiente obtenido ($R^2 = 0.95$) confirma la relación entre estas variables. En la figura 2.2, se muestra el resultado obtenido.

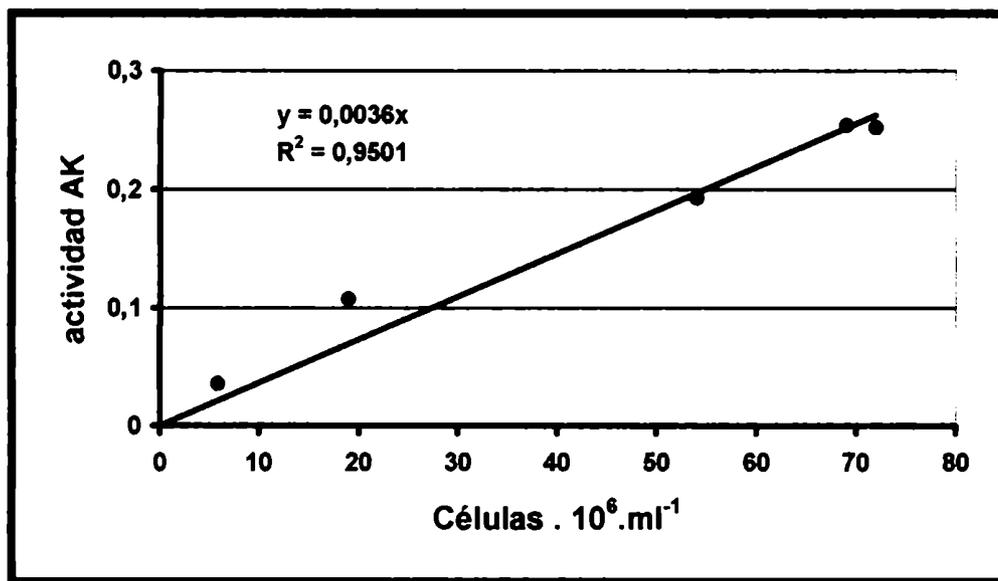


Figura 2.2. Correlación entre la actividad específica arginina quinasa y el número de células.

El aumento observado en la actividad arginina quinasa durante la curva de crecimiento puede deberse a diversos puntos de regulación: 1) control de la transcripción, 2) control del procesamiento del ARNm, 3) control de la estabilidad del ARNm, 4) control de la traducción, 5) control de la actividad enzimática y 6) regulación de la estabilidad de la proteína.

En lo sucesivo será un objetivo de este trabajo esclarecer dentro de lo posible, cual o cuales de estos mecanismos de regulación es o son responsables de las variaciones en la actividad arginina quinasa observada en la figura 2.1.

2.2 Estudio de los distintos puntos de control en la expresión de la arginina quinasa.

2.2.i. Estudio de los niveles de ARNm de arginina quinasa durante las distintas etapas del cultivo.

Con el objetivo de establecer la posible regulación a nivel transcripcional o variaciones en la estabilidad del ARNm correspondiente a la arginina quinasa se llevaron a cabo ensayos de "Northern Blot" en los que se sembró 20 μ g de ARN total obtenido de parásitos de los días 3, 6, 12, 15, y 18. Como se muestra en la figura 2.3, no se observaron variaciones significativas en los niveles de ARNm de la arginina quinasa en los días estudiados. Las intensidades de las bandas se calcularon mediante estudios de densitometría y los valores obtenidos se muestran en la parte inferior de la figura. Este ensayo se realizó tres veces y las variaciones observadas en cada caso no permitieron establecer un patrón que determine una tendencia, por lo que no pueden ser atribuidas a mecanismos de control.

De acuerdo con estos resultados los niveles de arginina quinasa no estarían regulados mediante variaciones en la cantidad de su ARNm específico.

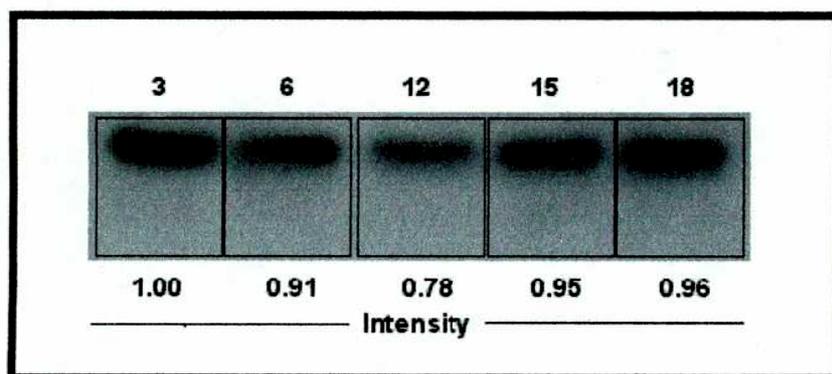


Figura 2.3. Análisis de "Northern Blot" del gen de la arginina quinasa durante las distintas etapas de la curva de crecimiento. En todas las calles se sembró 20 μ g de ARN total y se reveló utilizando la región codificante del gen de la arginina quinasa. Los ARNr, fueron utilizados como control de carga. La cuantificación de las bandas fue llevada a cabo por densitometría usando el programa Scion Image (Scion Corp. USA).

2.2.ii. Estudio de los niveles de arginina quinasa durante las distintas etapas del cultivo.

Para evaluar los niveles de proteína de arginina quinasa, se realizaron ensayos de Western Blot a partir de extractos de parásitos colectados en distintos momentos de la curva de crecimiento. Una única banda correspondiente a un polipéptido de 40 kDa, coincidente con el peso molecular de la arginina quinasa, fue observado en todas las calles. Como se puede observar en la figura 2.4, Los niveles de proteína arginina quinasa van aumentando conforme el cultivo va envejeciendo de un modo comparable al aumento de la actividad específica.

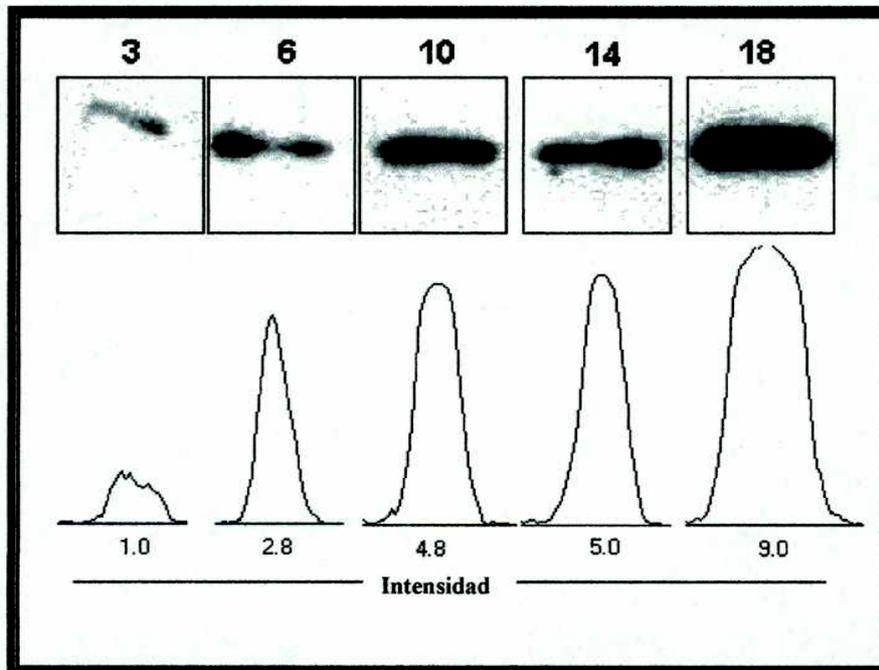


Figura 2.4. Análisis por Western Blot. Extractos de parásitos de los días 3,6,10,14 y 18 fueron sembrados a razón de 30 μ g de proteína por calle. El revelado se llevó a cabo con un antisuero anti arginina quinasa desarrollado en ratón.

La cuantificación de las bandas fue llevada a cabo por densitometría usando el programa Scion Image (Scion Corp. USA).

2.2.iii. Estudio de la actividad específica de la arginina quinasa durante las distintas etapas del cultivo.

Para determinar si además del aumento en los niveles de proteína, existía un componente de regulación de la actividad enzimática responsable de las variaciones observadas durante las distintas etapas de la curva de crecimiento se abordó el problema desde dos frentes.

El primero, consistió en realizar un ensayo de actividad arginina quinasa con muestras provenientes de parásitos de los días 3, 6, 14 y 18 y a partir de los valores obtenidos, se calculo la cantidad de proteína requerida en cada caso para obtener la misma actividad. Este dato, luego se utilizó para realizar un ensayo de "Western Blot" en el que se sembró las muestras ensayadas para actividad de moda tal que en cada calle, hubiera la misma actividad arginina quinasa.

De esta manera, si las variaciones en actividad enzimática solo se debían a un aumento en la cantidad de proteína, al hacer un "Western Blot", normalizado de acuerdo al ensayo de actividad, en todas las calles se debía observar la misma intensidad de la banda. En la figura 2.5, se observa que en todas las calles se obtuvieron bandas de intensidades comparables, por lo que no parecería haber un componente de regulación de la actividad enzimática y las variaciones observadas solo serian atribuibles a las variaciones en la cantidad de enzima presente en cada estadio.

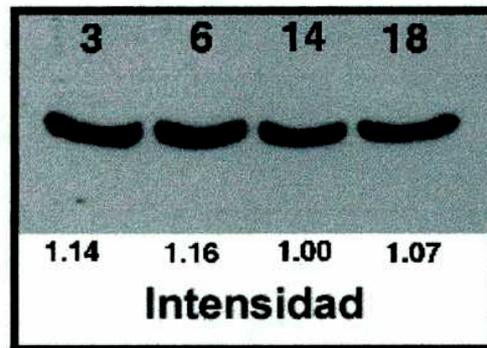


Figura 2.5. Ensayo de "Western Blot", en el que se sembraron muestras de los días indicados, luego de normalizar las cantidades de proteína a utilizar mediante un ensayo de actividad enzimática. El revelado se llevó a cabo con un antisuero anti arginina quinasa desarrollado en ratón.

La segunda estrategia, consistió en calcular la constante de Michaelis-Menten en muestras de los días 5 y 11. Estos días fueron elegidos ya que permiten cubrir un amplio rango de aumento de actividad enzimática.

Como se observa en la figura 2.6, no hay variación en los valores de K_m en los días estudiados, en tanto que la velocidad máxima es mayor en el día 11 indicando una mayor cantidad de enzima en este día, en coincidencia con los resultados obtenidos en los ensayos de "Western Blot".

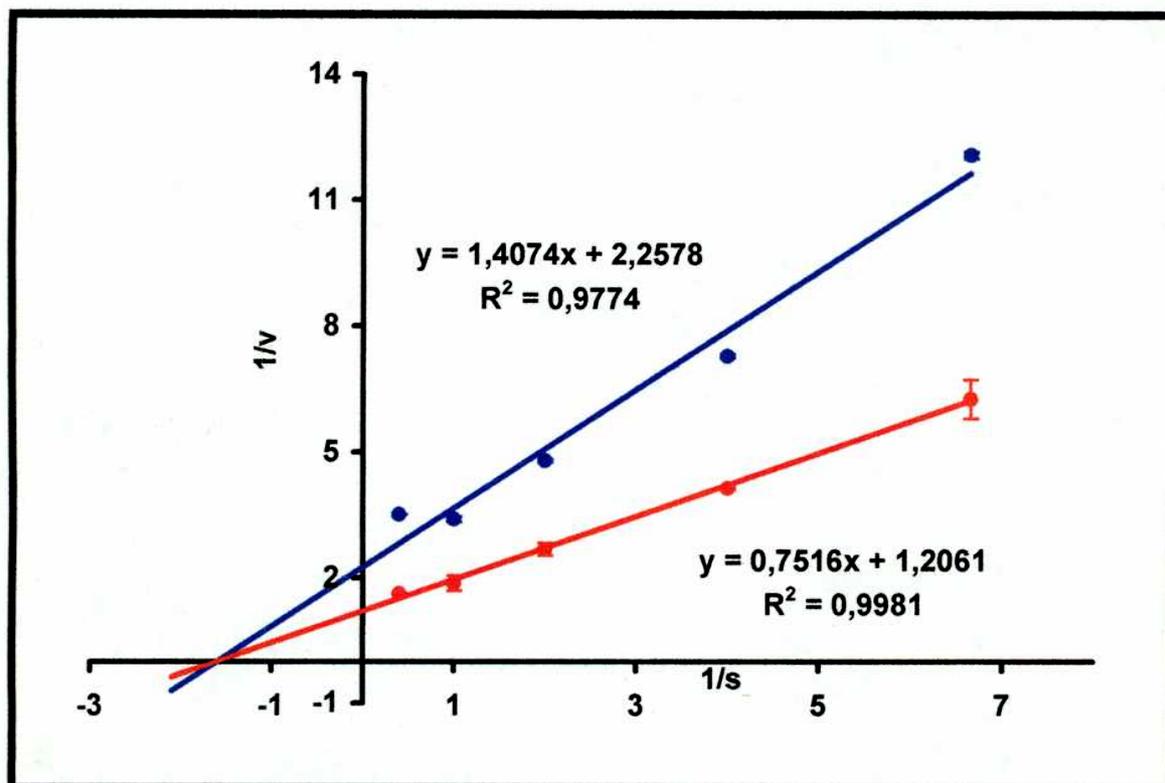


Figura 2.6. Curva de concentración de sustrato, para extractos de parásitos del día 5 (línea azul) y del día 11 (línea roja). Los valores graficados representan la media de triplicados y las barras de error, indican el desvío promedio.

De acuerdo a los datos obtenidos las variaciones en la actividad arginina quinasa solo se deben a un aumento en la cantidad de esta enzima a lo largo de la curva de crecimiento. Por los resultados obtenidos en los ensayos de "Northern Blot", se deduce que el aumento no se debe a una regulación de la transcripción y posiblemente se este regulando a nivel de la estabilidad de la proteína.

2.2.iv. Determinación de la regulación de los niveles intracelulares de arginina quinasa mediante la degradación de proteína.

Para determinar la existencia de mecanismos de regulación a nivel de la estabilidad de la proteína, se decidió estudiar las variaciones en la actividad enzimática y en los niveles de enzima, presentes en la población de parásitos que sobre-expresan, hasta 60 veces, la arginina quinasa (segunda etapa del capítulo 1 de esta tesis).

Utilizando extractos de los parásitos que sobre-expresan la arginina quinasa en ensayos de actividad, no se observó diferencias entre los días 3, 7, y 14, posiblemente por que los mecanismos de regulación se encuentran superados por los altos niveles de sobre-expresión.

Para determinar la existencia de variaciones en la cantidad de arginina quinasa presente en los distintos días del cultivo en aquellos parásitos que sobre-expresan esta enzima, se realizaron ensayos de "Western Blot". Como se puede ver en la figura 2.7, en los parásitos sin transfectar (CL) los niveles de arginina quinasa aumentan con el tiempo del cultivo, en tanto que los parásitos que sobre-expresan la enzima, mantienen una alta expresión independientemente de la edad del cultivo (flecha superior), pero se nota claramente, que en el día 3 existe una gran cantidad de productos de degradación (señalados por las flecha inferiores) que van disminuyendo gradualmente hacia el día 14. Estos datos dan sustento a la hipótesis planteada anteriormente acerca de la estabilidad de la arginina quinasa como punto de regulación.

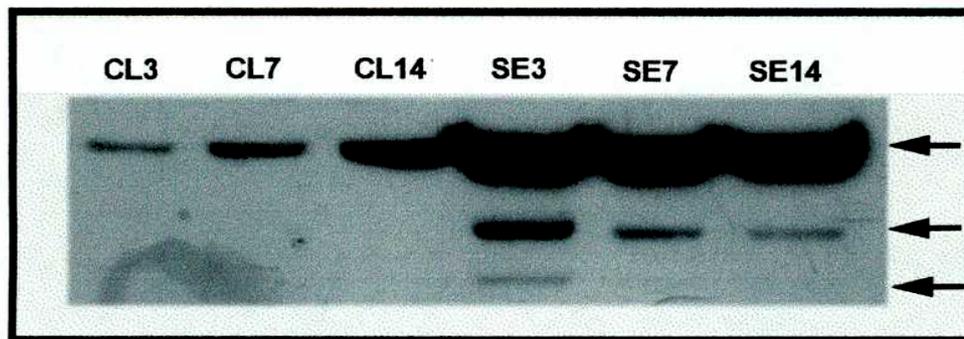


Figura 2.7. "Western Blot" realizado con parásitos sin transfectar (CL) y parásitos que sobre expresan la arginina quinasa (SE). La flecha superior señala la banda correspondiente a la arginina quinasa. Las flechas inferiores señalan los productos de degradación. El revelado se llevó a cabo con un antisuero anti arginina quinasa desarrollado en ratón.

2.3. Crecimiento celular y condiciones del medio de cultivo.

Con el objetivo de estudiar si alguna variación del medio de cultivo era responsable por las variaciones observadas en los niveles de arginina quinasa, cultivos de epimastigotes de día 3 fueron incubados por 24 horas en medio condicionado (MC) obtenido de un cultivo de parásitos de 9 días. Como controles se midió actividad arginina quinasa en extractos provenientes de parásitos que no fueron sometidos a este medio condicionado y a extractos provenientes de cultivos de 9 días. Como se puede ver en la figura 2.8, los parásitos de día 3 al ser tratados con medio condicionado de día 9 muestran un aumento en su actividad arginina quinasa (2.64 veces) comparable a un cultivo de 9 días de antigüedad (2.89 veces).

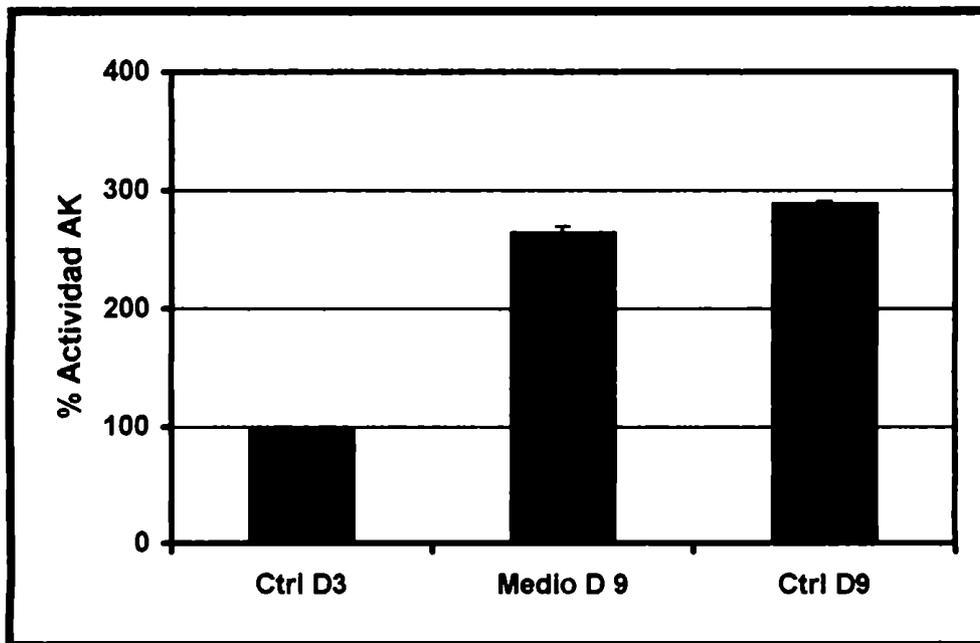


Figura 2.8. Efecto del medio condicionado de cultivos de parásitos de día 9 sobre parásitos de día 3 al ser tratados por 24 horas. Los valores graficados representan la media de triplicados y las barras de error, indican el desvío promedio.

Como se observa en la figura 2.8, fue suficiente realizar un cambio de medios para que parásitos del día 3 alcanzaran los niveles de actividad arginina quinasa que se observan en parásitos del día 9. Estos resultados nos llevaron a plantear dos hipótesis, la primera es que algún componente o parámetro variable del

medio estaría regulando la actividad arginina quinasa. La segunda, postula la existencia de un factor secretado por los parásitos, que estaría presente en el medio condicionado del cultivo del día 9 y que tendría la capacidad de producir un aumento en los niveles de arginina quinasa.

Para estudiar las hipótesis planteadas, se decidió medir la variación de aquellos componentes y parámetros del medio de cultivo que se consideraron mas relacionados con el metabolismo energético y la actividad arginina quinasa.

2.3.i. Variaciones en la concentración de Glucosa y amonio, así como también en los niveles de pH.

Para estudiar la cinética de disminución en la concentración de glucosa, se utilizó un cultivo de epimastigotes crecidos en medio LIT, del cual se retiraron muestras del medio en los días 3, 6, 9, 12, 15, y 18. La determinación de la concentración de glucosa, se realizó

El primer parámetro ensayado, fue las variaciones en la concentración de glucosa, debido a la relación de la arginina quinasa con el metabolismo energético. Como era de esperar la glucosa va disminuyendo llegando a valores casi nulos entre los día 9-11. Por lo tanto, el agotamiento de esta fuente de carbono precede en varios días al inicio de la fase estacionaria y el aumento en la actividad arginina quinasa (Figura 2.9.A).

Coincidentemente con la disminución de la concentración de glucosa, se observa un aumento en la excreción de amonio (día 6), sugiriendo un cambio en la fuente de carbono utilizada por el parásito, posiblemente al aumentar la degradación de compuestos nitrogenados como por ejemplo, aminoácidos (Figura 2.9.B). Por último se midieron las variaciones en el pH del medio de cultivo. Como era de esperar, durante los primero tres días no se observaron variaciones importantes en este parámetro. Entre el día 3 y 6 se produce una fuerte disminución (1.15 unidades), que puede ser atribuida a la secrecion de succinato, lactato y acetato característica de la fermentación aeróbica en tripanosomátidos (Cazzulo, 1992; ter Kuile, 1997; Adroher, 1990). Luego del sexto día, los valores de pH, aumentan linealmente indicando el punto de inicio del metabolismo oxidativo de los aminoácidos (figura 2.9.B).

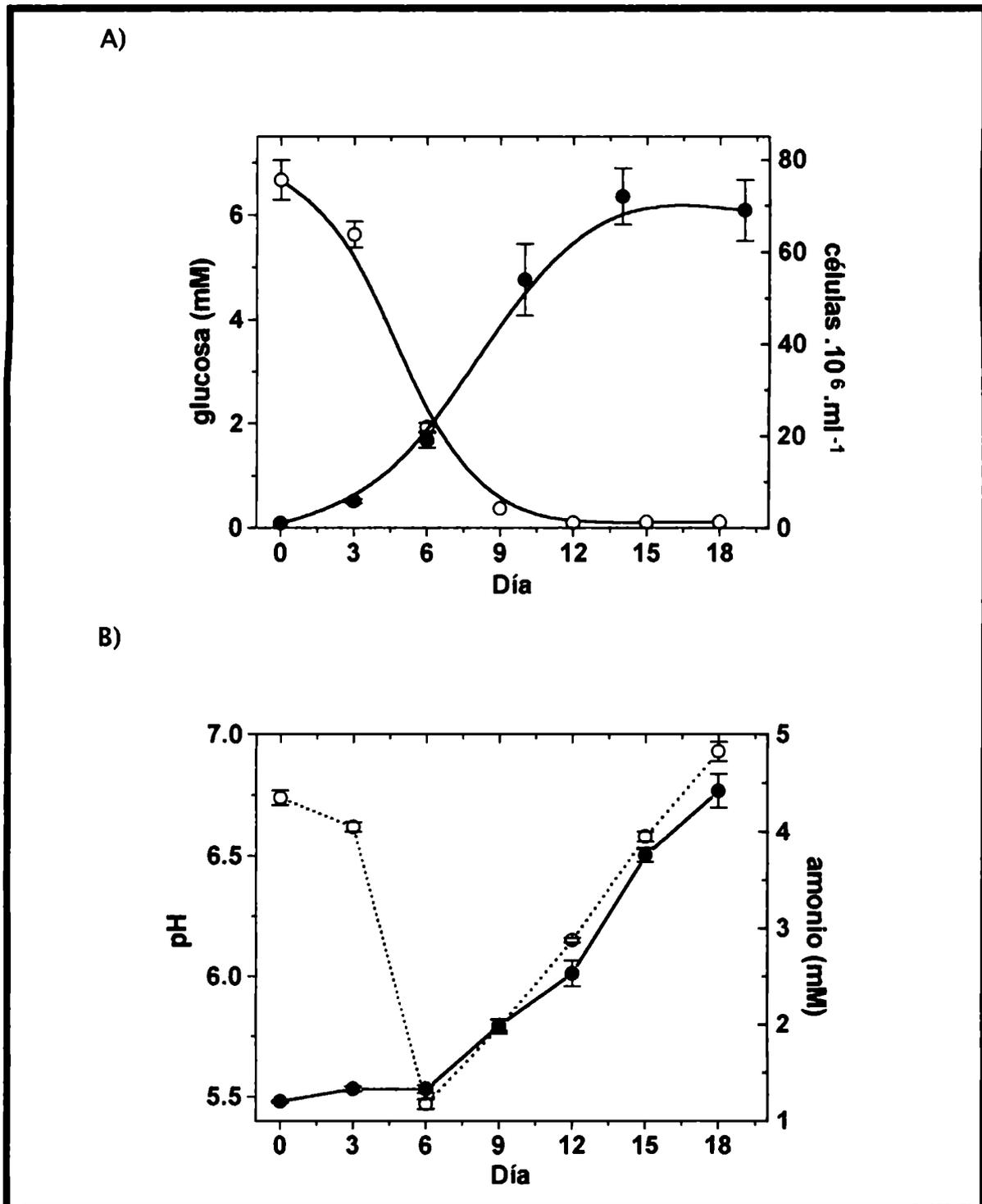


Figura 2.9. Variaciones en la concentración de Glucosa y amonio, así como también en los niveles de pH durante el cultivo de epimastigotes.

Capítulo 3

Variación en los niveles de incorporación de arginina durante las fases de la curva crecimiento.

En base a los resultados obtenidos en el capítulo anterior donde se estudió la regulación de la actividad arginina quinasa, y las evidencias presentes en otros sistemas como por ejemplo en el caso de la oxido nítrico sintaza (NOS) donde la disponibilidad de su sustrato, la arginina, consiste en uno de los puntos de regulación de su actividad (Stathopoulos, 2001; Mori, 2000), se decidió estudiar el transporte de arginina en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* durante las distintas fases de la curva de crecimiento.

En este capítulo, se describen diferentes maneras de regulación del transporte de arginina, como ser variaciones en la composición del medio de cultivo, la densidad celular o la tasa de replicación, y la privación de arginina durante un intervalo de tiempo acotado. Además, se postula la existencia de un factor soluble secretado por los parásitos que posiblemente actúe como señal coordinando estos procesos al detectar el envejecimiento del medio de cultivo o una alta densidad poblacional. Tomando en conjunto los resultados obtenidos, se postula una relación entre la arginina quinasa y el transporte de arginina, que podrían estar actuando de modo conjunto, participando de la regulación de eventos dependientes del ciclo de vida de las células.

Por último el estudio sobre como un determinado parásito incorpora y metaboliza componentes del medio que lo circunda, permite idear estrategias que conduzcan al desarrollo de nuevas drogas.

3.1. Variaciones en la incorporación de arginina a lo largo de la curva de crecimiento.

Para determinar si la incorporación de arginina sufría variaciones durante las distintas fases de la curva de crecimiento, se realizaron mediciones en cultivos de parásitos que se encontraban en la fase exponencial de crecimiento, en la fase estacionaria, y también cuando el cultivo alcanzaba la fase de declinación. Los resultados obtenidos, mostraron una disminución progresiva en la incorporación de arginina desde el día 3 hasta el día 14. Durante este período de tiempo la incorporación de arginina disminuye un total de 21 veces, comparando el día 3 donde se obtienen mediciones de $30.85 \text{ pmol/min.}10^7 \text{ células}$ (± 0.62) contra el día 14 donde la incorporación es de $1.47 \text{ pmol/min.}10^7 \text{ células}$ (± 0.13). En la figura 3.1.A, se muestra la correlación entre la disminución de la incorporación de arginina y el aumento de la densidad celular (aproximadamente 12.5 veces). Además, se calculó la tasa de replicación expresada como número de divisiones por día (figura 3.1.B). La tasa de replicación disminuye desde 1.93 replicaciones por día (valor promedio de los primeros tres días del cultivo) hasta 0.43 replicaciones por día (valor promedio del intervalo comprendido entre los días 12 y 14). Por lo tanto se observa que a medida que aumenta la densidad celular en el cultivo, va disminuyendo la tasa de replicación acompañada con una disminución en la tasa de incorporación de arginina. A partir de este resultado se planteó la hipótesis de una posible relación entre la disminución en la incorporación de arginina, el aumento en la actividad arginina quinasa y la tasa de replicación celular.

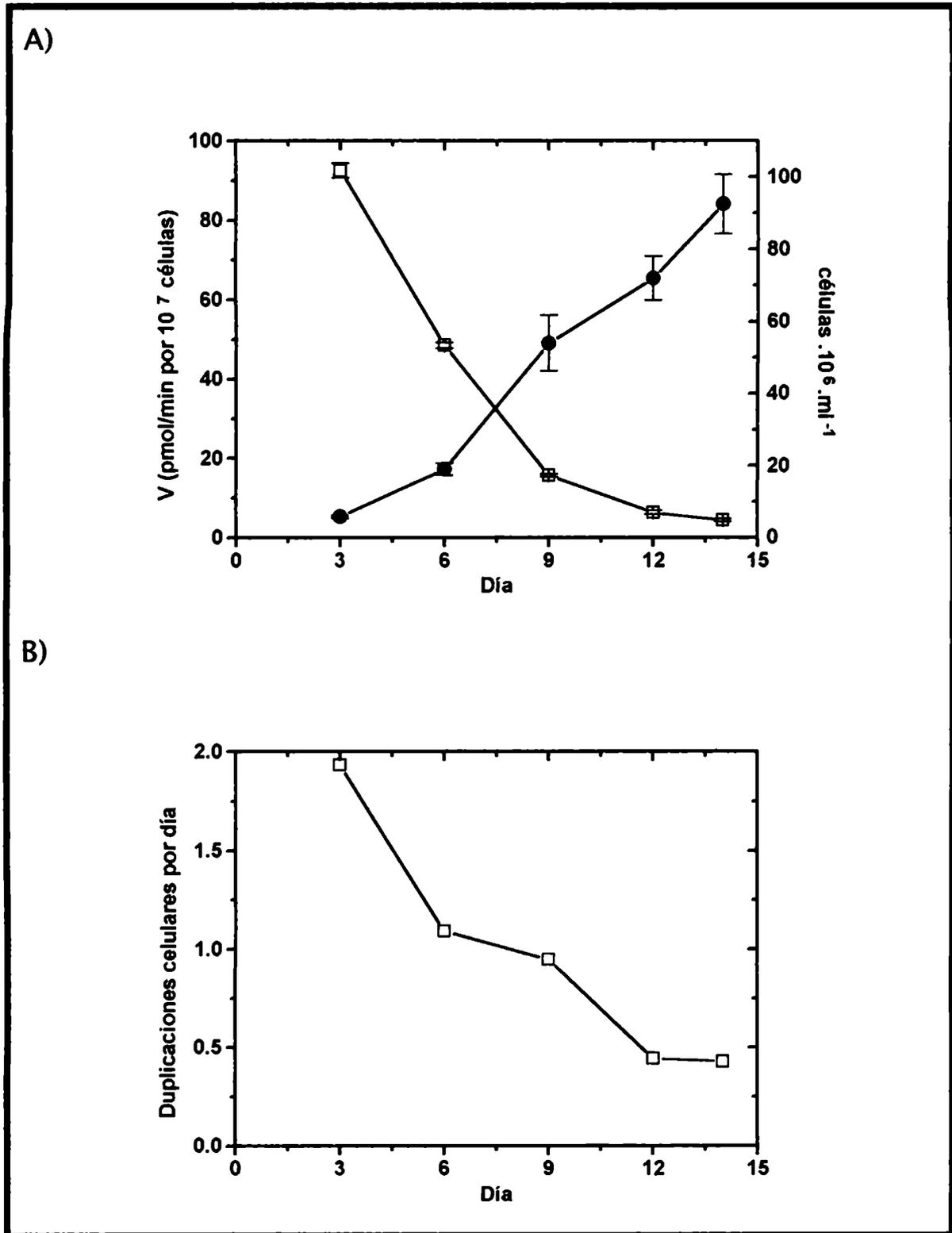


Figura 3.1. Relación entre la incorporación de arginina, la densidad celular y la tasa de replicación.

3.2. Efecto de las variaciones en el medio de cultivo sobre la incorporación de arginina.

Para estudiar si algún componente del medio de cultivo puede influenciar la incorporación de arginina, se sometió a cultivos de epimastigotes de día 3 a 16 horas de incubación con medio de cultivo obtenido de parásitos del día 14 (medio condicionado) y a parásitos del día 14 se los incubó por el mismo período de tiempo en medio fresco. Luego de estos tratamientos se sometió a los distintos grupos a ensayos de transporte. Como se muestra en la tabla 3.1 (ubicada al final del capítulo), los parásitos de día 3 sometidos a la incubación con medio condicionado del día 14 presentaron una disminución de 5.8 veces con respecto al control, en tanto que los parásitos de día 14, al ser incubados con medio fresco mostraron un aumento de 9.7 en la incorporación de arginina.

3.3. Cinética de incremento en la incorporación de arginina al realizar un pasaje de parásitos de día 14 a un medio de cultivo fresco.

Para estudiar la cinética del incremento en el transporte de arginina observado en parásitos del día 14 tratados con medio fresco durante 16 horas, se repitió el ensayo descrito en el punto anterior y se fue midiendo la incorporación de arginina a las 2, 4, 8, y 15 horas. Como se observa en la figura 3.2, una clara respuesta comienza a notarse desde el primer punto estudiado (2 horas). Durante las primeras 8 horas es cuando se produce la mayor parte del incremento en la incorporación de arginina (aproximadamente el 83%), calculándose una tasa de aumento de $1.33 \text{ pmol}/\text{min} \cdot 10^7 \text{ células}$ por hora. De aquí en adelante, el aumento en la incorporación de arginina se va dando más lentamente, a razón de $0.27 \text{ pmol}/\text{min} \cdot 10^7 \text{ células}$ por hora.

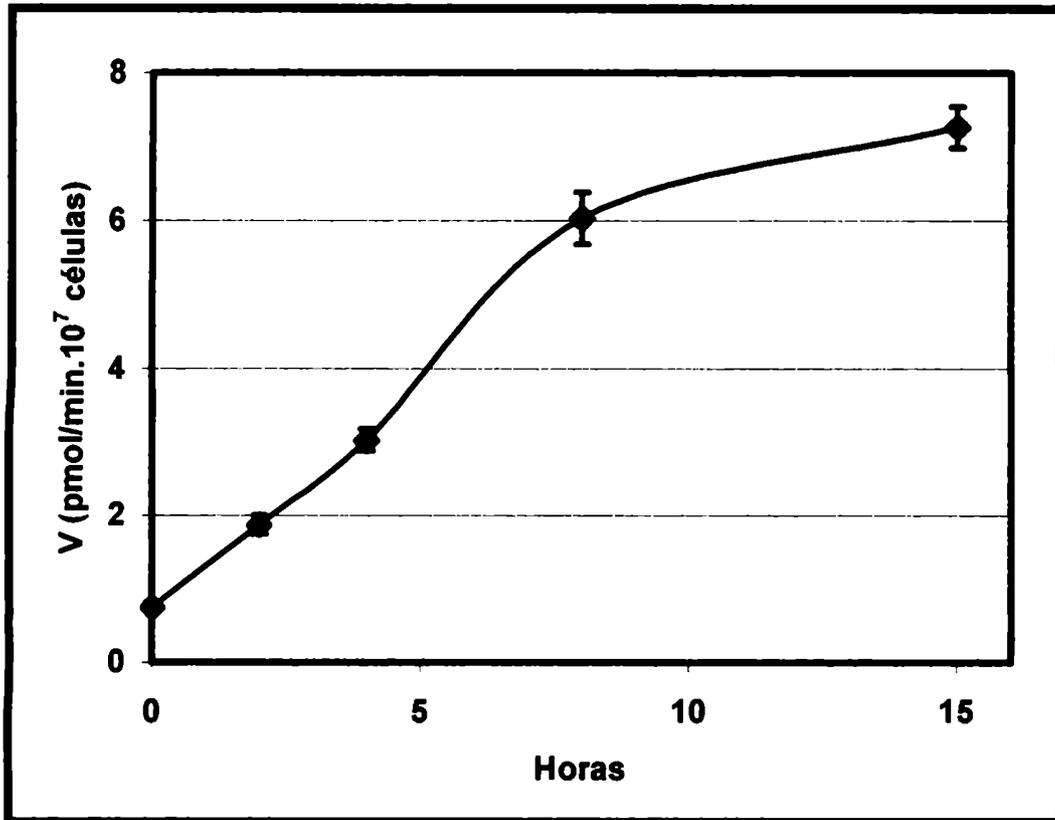


Figura 3.2. Cinética de aumento del transporte de arginina al tratar parásitos del día 14 con medio fresco.

3.4. Influencia de la densidad celular sobre la incorporación de arginina.

Considerando los distintos factores que caracterizan a un cultivo en la fase tardía de la curva de crecimiento (por ejemplo en un día 14), se decidió estudiar si la densidad celular de modo directo o mediante algún factor secretado por los parásitos es capaz de influenciar la incorporación de arginina. Para probar esta hipótesis epimastigotes del día 3 fueron tratados con medio condicionado del día 14 pero a una concentración celular de 5 a 10 veces superior a la correspondiente a un día 3 (10^7 células por mililitro). De modo recíproco, se tomaron parásitos de día 14, y se los incubó en medio fresco, a una concentración 10 veces menor a la que tenían en ese momento (10^7 células por mililitro). Como se muestra en la tabla 3.1, al tratar parásitos del día 3 con medio condicionado a una alta densidad, solo se observa una leve disminución en la incorporación de arginina (32%) si se compara con el tratamiento con medio condicionado en el que no se

varia la densidad celular. Similares resultados se obtuvieron al tratar a los parásitos del día 14 con medio de cultivo fresco a una baja densidad celular, en este caso solo se aumento en 1.9 veces la incorporación de arginina en relación a las 9.7 veces de aumento observadas al no modificar la densidad del cultivo.

3.5. Estudio del efecto de los componentes del medio de cultivo en la incorporación de arginina por epimastigotes.

Para estudiar la posible influencia de algún componente del medio de cultivo sobre la incorporación de arginina, se generaron variantes del medio LIT, en las cuales se omitió la adición de uno o más componentes. Estas variantes se emplearon para tratar parásitos del día 14 durante 16 horas a los que luego se les realizó un ensayo de incorporación de arginina. Todos los tratamientos aumentaron en mayor o menor proporción la incorporación de este aminoácido, del mismo modo que al tratar con medio LIT fresco. Las variantes que más afectaron la incorporación de arginina fueron aquellas en las que se omitió el agregado de fuentes de carbono, como ser la triptosa, el extracto de hígado, la glucosa o el suero fetal bovino, mostrando un comportamiento aditivo (figura 3.3). Además, la falta de hemina también afecta de modo negativo la incorporación de arginina. Debido a los efectos producidos sobre la proliferación celular al modificar el medio de cultivo en todos los casos se normalizo el resultado obtenido teniendo en cuenta el número de parásitos.

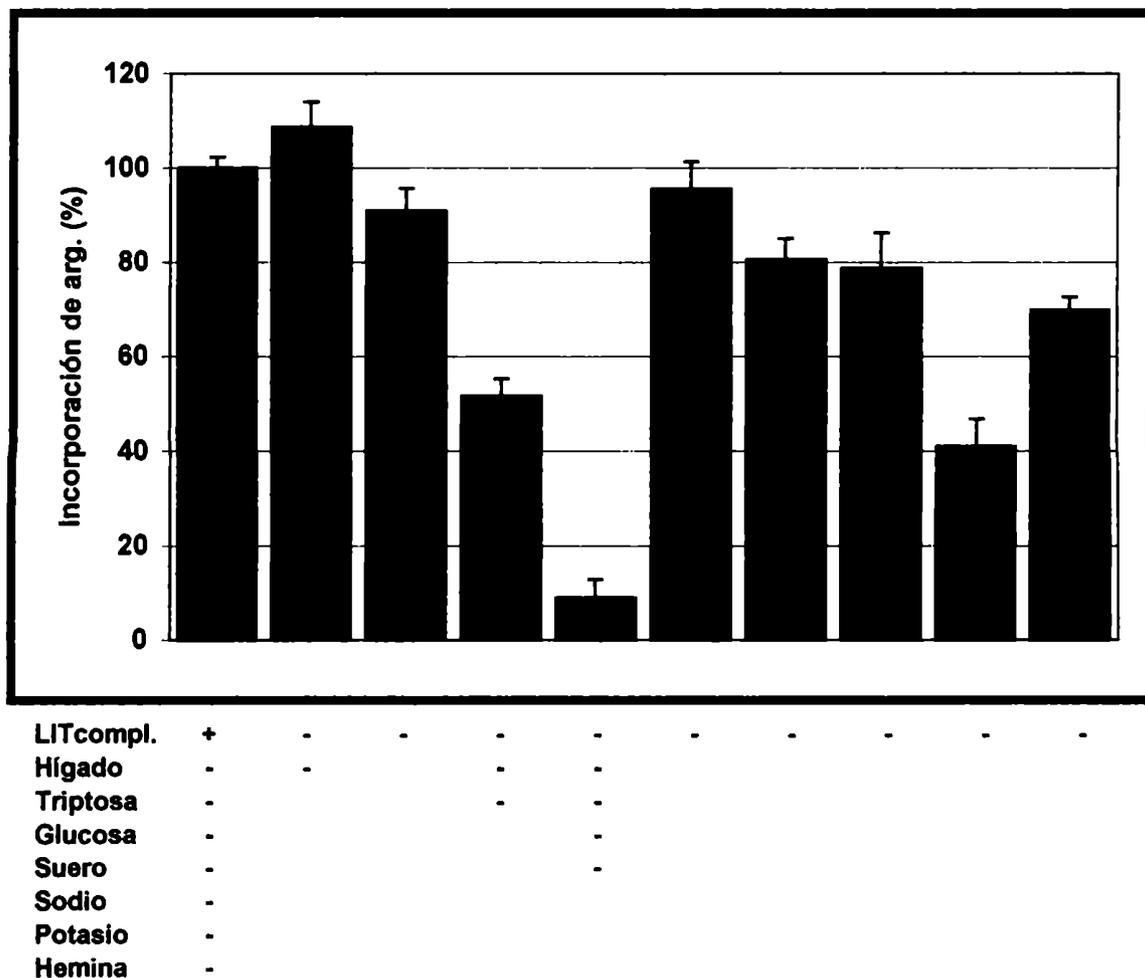


Figura 3.3. Influencia de los componentes del medio de cultivo en la incorporación de arginina. Los valores graficados representan la media de triplicados y las barras de error, indican el desvío promedio. La tabla indica los agregados realizados en cada caso.

3.6. Efecto de la privación (ayuno) de arginina sobre su incorporación.

Para estudiar el efecto en la disponibilidad del sustrato sobre la incorporación de arginina, se preincubaron durante 3 horas, tanto parásitos del día 3 como del día 14 en un tampón mínimo, completamente carente de fuentes de carbono (PBS). Los parásitos correspondientes al día 3 mostraron un aumento de 3.4 veces en la incorporación de arginina, en tanto que los parásitos del día 14 tuvieron el 50% de la respuesta observada en los parásitos jóvenes, con un total de 1.7 veces de aumento (tabla 3.1). Este efecto, es específicamente revertido si al tampón en el que se preincuba, se adiciona a una concentración final de 10 mM

arginina, en tanto que otros aminoácidos no son capaces de revertir este efecto. Este efecto del ayuno de sustrato fue observado anteriormente durante la caracterización de este mismo transportador (Pereira, 1999) y se ha descrito para otros transportadores como por ejemplo, el sistema A, que transporta aminoácidos neutros y responde modificando los niveles de su ARNm (Gazzola, 2001). Los mecanismos moleculares que conducen a estos cambios en el transporte, colectivamente denominados regulación adaptativa (Gazzola, 1972), están muy poco estudiados.

3.7. Relación entre la incorporación de arginina y la actividad arginina quinasa durante la curva de crecimiento y el ciclo de vida de los parásitos.

Como se planteó al comienzo de este capítulo, la hipótesis de trabajo consistía en la existencia de una función del transporte de arginina en la regulación de la actividad arginina quinasa. Además, como se describió en la introducción esta enzima puede actuar sintetizando reservas de fosfoarginina, cuando el parásito se encuentra en un medio de alta disponibilidad de fuentes de carbono, y además es capaz de catalizar la reacción inversa, permitiendo la rápida re-síntesis de ATP, cuando es necesario. Teniendo en cuenta, el mecanismo de acción de la arginina quinasa es de esperar una alta demanda de arginina durante las etapas del cultivo en las que hay una alta concentración de fuentes de carbono, en tanto que esta demanda deja de tener importancia, cuando el parásito se encuentra degradando sus reservas de fosfoarginina. La alta demanda energética en un cultivo en la fase de declinación se debe a un último compromiso con la supervivencia incluyendo la diferenciación entre estadios como una de las posibilidades, siendo dependiente el rendimiento de la diferenciación inducida *in Vitro*, de la edad del cultivo (Contreras, 1985).

Teniendo en cuenta estos datos, en conjunto con lo descrito en el capítulo anterior, se planteó la posible relación de la actividad arginina quinasa y la incorporación de arginina con la capacidad de replicación de las células. Para estudiar esta hipótesis se aprovechó la presencia de un estadio natural en el ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*, el cual no se replica, el tripomastigote.

La actividad arginina quinasa de tripomastigotes obtenidos de células en cultivo, fue 2.5 veces superior que la observada en epimastigotes del día 7. (0.12 nmol/min.mg de proteína). Además mediante ensayos de "Western Blot" se determinó que este aumento en la actividad se correspondía con un aumento en la cantidad de enzima presente en cada uno de los estadios (figura 3.4). Por último, la incorporación de arginina, también mostró diferencia significativa, entre

estos estadios, siendo 30 veces menor en tripomastigotes que en el control realizado con epimastigotes del día 7. Es importante destacar que en el medio LIT en el día 7 el porcentaje de tripomastigotes es menor al 10%.

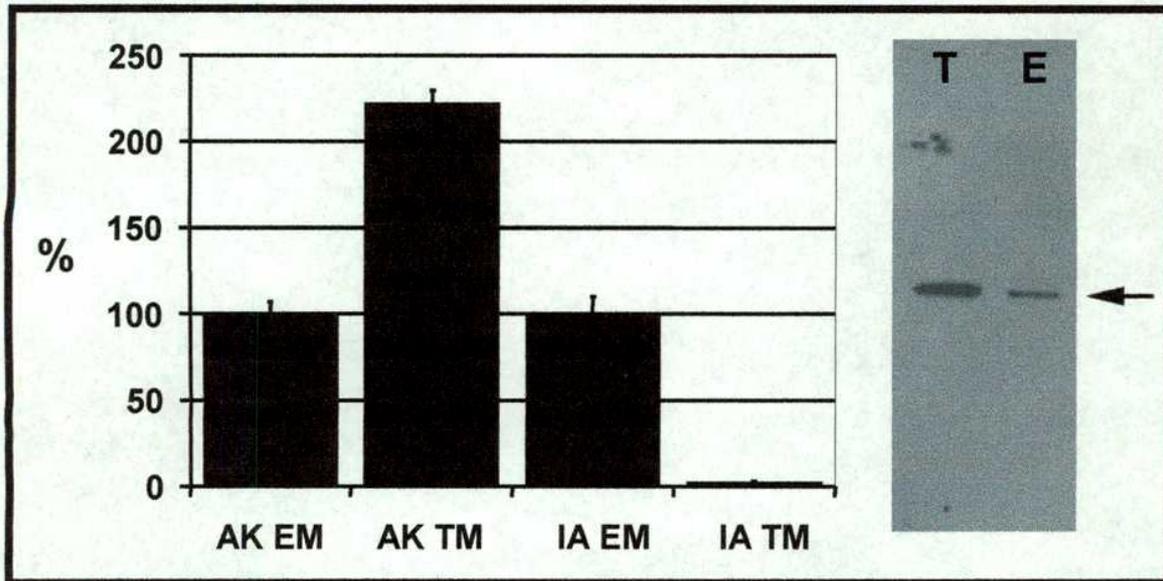


Figura 3.4. Comparación de los porcentajes de actividad, expresión arginina quinasa e incorporación de arginina entre epimastigotes y tripomastigotes. El gráfico de barras muestra las mediciones realizadas de actividad arginina quinasa en epimastigotes y tripomastigotes (AK EM y AK TM, respectivamente), como así también, las mediciones de la incorporación de arginina en epimastigotes y tripomastigotes (IA EM e IA TM, respectivamente). Los valores graficados representan la media de triplicados y las barras de error, indican el desvío promedio. El estudio de expresión de arginina quinasa entre los estadios de epimastigotes (E) y tripomastigotes (T) se muestra sobre el margen derecho de la figura y corresponde a un ensayo de Western Blot en el que se sembró igual cantidad de proteínas en cada calle (30 μ g) y se reveló utilizando un anti-suero anti-arginina quinasa desarrollado en ratón.

3.8. Efecto de agentes anti-mitóticos sobre el transporte de arginina

Para determinar si existe una relación entre la incorporación de arginina y la replicación celular, se empleó un agente anti-mitótico, la hidroxí urea, que actúa como un inhibidor de la ribonucleótido reductasa y en consecuencia inhibe la replicación del ADN, con la consiguiente detención de la proliferación celular. Además, el efecto de esta droga se puede revertir por remoción y lavado de las

células, seguido de un pasaje a medio de cultivo fresco. La hidroxí urea fue usada con este fin en una gran variedad de eucariotas inferiores del orden Kinetoplastida, incluso en *Trypanosoma cruzi* (Galanti N, 1994; Santori I, 2002). A epimastigotes del día 3 se los trató adicionando al medio de cultivo (LIT) con hidroxí urea a una concentración final de 20 mM. Transcurridas 24 horas de tratamiento, se determinó una disminución en la tasa de replicación desde 1.02 duplicaciones celulares por día en el grupo control a 0.11 duplicaciones diarias en los parásitos tratados con hidroxí urea. Al estudiar la incorporación de arginina se observó una disminución del 40 % en aquellos parásitos en los que se les impidió la división celular, respecto a los controles. Cuando las células fueron lavadas y pasadas a un medio de cultivo condicionado de parásitos del día 4, la incorporación de arginina retomó los valores correspondientes a ese día, en tanto que la tasa de replicación medida fue de 0.8 duplicaciones celulares por día (tabla 3.1). No se detectaron efectos tóxicos como resultado del tratamiento con hidroxí urea, durante el período de tiempo en el que se utilizó en este ensayo.

Condición	Vmax. (pmol.min ⁻¹ .10 ⁷ células)	SD (±)
Incorporación de arginina en función de los días.		
Día 3 (d3)	30.85	0.62
Día 6 (d6)	16.20	0.24
Día 9 (d9)	5.23	0.11
Día 12 (d12)	2.13	0.16
Día 14 (d14)	1.47	0.13
Tratamientos con medios condicionados (MC) y efecto de la densidad celular		
d3 + MCd14	5.32	0.14
d14 + MF	14.26	0.22
d3 + MCd14 (↑δ)	20.98	0.31
d14 + MF (↓δ)	2.79	0.09
Efecto del ayuno		
d3 sin ayuno	9.07	0.21
d14 sin ayuno	0.86	0.06
Tratamiento con hidroxí urea (HU)		
D3 + HU	18.50	0.17
D4	29.35	0.42
D4 + HU lavado	29.85	0.53

Tabla 3.1. Incorporación de arginina por epimastigotes de *T. cruzi*, en diferentes condiciones de cultivo.

Capítulo 4

Estudio de la arginina quinasa y el transporte de arginina en *Trypanosoma brucei*.

El *Trypanosoma brucei*, es un parásito protozoario flagelado, responsable de dos enfermedades endémicas en determinadas regiones de África: la “enfermedad del sueño” en humanos y el “Nagana” en el ganado. El *Trypanosoma brucei brucei*, es un parásito de los animales silvestres y domésticos que no es infeccioso para los seres humanos. En contraste *Trypanosoma brucei rhodesiense* y *Trypanosoma brucei gambiense* si lo son (Mandell, 1991).

Los miembros del complejo *T. brucei* son transmitidos por varias especies de moscas tsetse pertenecientes al género *Glossina*. Estos insectos hematófagos se hallan solamente en África. El *Trypanosoma brucei* posee un ciclo de vida complejo que comienza cuando la mosca tsetse de ambos sexos se infectan con tripanosomas cuando ingieren sangre de huéspedes mamíferos infectados que contienen tripomastigotes, la forma del parásito que circula en el torrente sanguíneo. Existen dos formas de tripomastigotes circulantes: microorganismos, largos y delgados, con capacidad de división y formas cortas y redondas que se cree que son parásitos que no se dividen, infecciosas para los insectos. Una vez en el intestino medio de la mosca, los tripomastigotes cortos del torrente sanguíneo se transforman en tripomastigotes procíclicos delgados y relativamente largos. Luego de muchos ciclos de multiplicación, las formas procíclicas migran hasta las glándulas salivales, donde se diferencian en epimastigotes y siguen multiplicándose. Ocurre una transformación final cuando los epimastigotes se convierten en tripomastigotes metacíclicos que no se dividen. La transmisión tienen lugar, cuando estas formas infectivas son inoculadas durante una ingestión posterior. El ciclo se completa cuando las formas metacíclicas inyectadas se convierten en tripomastigotes del torrente sanguíneo y comienzan a multiplicarse en la sangre y otros espacios extracelulares (Mandell, 1991). Casi toda la transmisión de tripanosomátidos africanos a los animales silvestres y domésticos, así como a los humanos, tienen lugar en la forma cíclica que se acaba de describir. La figura 4.1 resume el ciclo de vida descrito y lo compara con el de tripanosomátidos americanos.

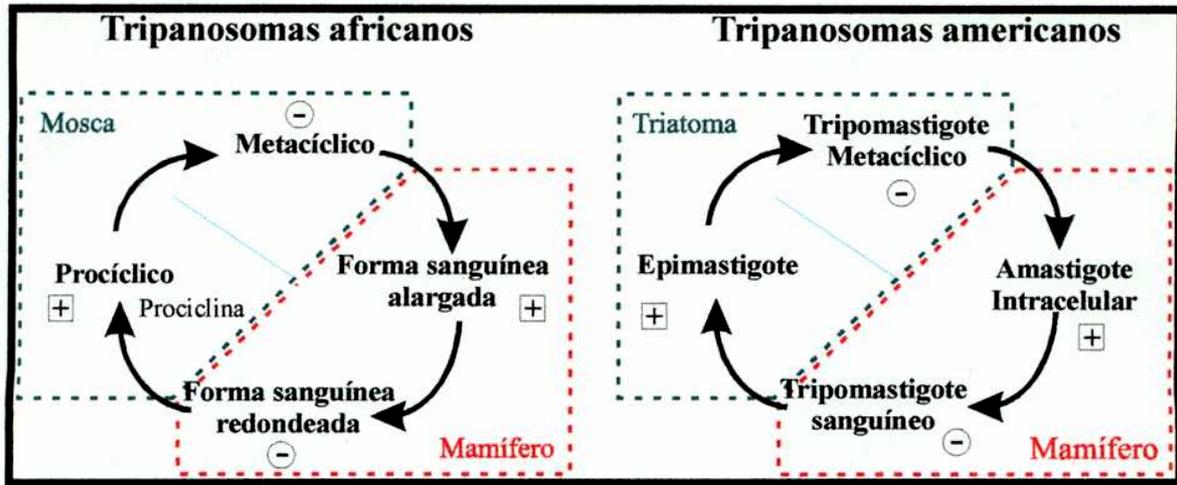


Figura 4.1. Esquemas comparativos de los ciclos de vida de tripanosomátidos africanos y tripanosomátidos americanos. (-), forma infectiva no replicativa; (+), forma replicativa no infectiva.

Desde un punto de vista evolutivo, la arginina quinasa pertenece a una familia de proteínas muy conservadas y ampliamente distribuida ya que se encuentra en: Annelida, Coelenterata, Platyhelminthes, Nemertea, Mollusca, Phoronida, Arthropoda, Echinodermata, Hemichordata, y Chordata, donde actúa manteniendo los niveles intracelulares de ATP durante períodos de alta demanda energética (Morrison, 1973; Walliman, 1992). Además, la arginina quinasa es considerada el miembro mas cercano a las guanidino quinazas ancestrales (Suzuki, 1997).

Debido a la importancia del hallazgo de la arginina quinasa en tripanosomátidos americanos por su relación con la administración de fuentes de energía y por ser considerada un posible blanco terapéutico para el desarrollo de drogas contra el Mal de Chagas, se decidió extender el estudio de esta ruta metabólica hacia los tripanosomátidos africanos.

Los estudios llevados a cabo en este capítulo fueron realizados con *Trypanosoma brucei brucei*.

4.1. La arginina quinasa de *Trypanosoma brucei*.

4.1.i. Caracterización bioquímica de la arginina quinasa de *Trypanosoma brucei*.

Se estudió la actividad arginina quinasa en extractos solubles de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei brucei*. La actividad específica obtenida fue de $288.6 \pm 12.5 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Este valor es similar al que se obtiene con epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* de la cepa CL Brener ($253.9 \pm 12.2 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$).

Mediante ensayos de "Western Blot" utilizando un anti-suero realizado contra la arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi*, se determinó la presencia de un polipéptido de 40 kDa en extractos provenientes de la forma procíclica de *T. brucei*. Además, otro polipéptido de 45 kDa también fue reconocido por el anticuerpo sugiriendo la presencia de más de una enzima en los extractos de *T. brucei*, o una posible modificación post-traducciona capaz de modificar la movilidad electroforética (figura 4.2).

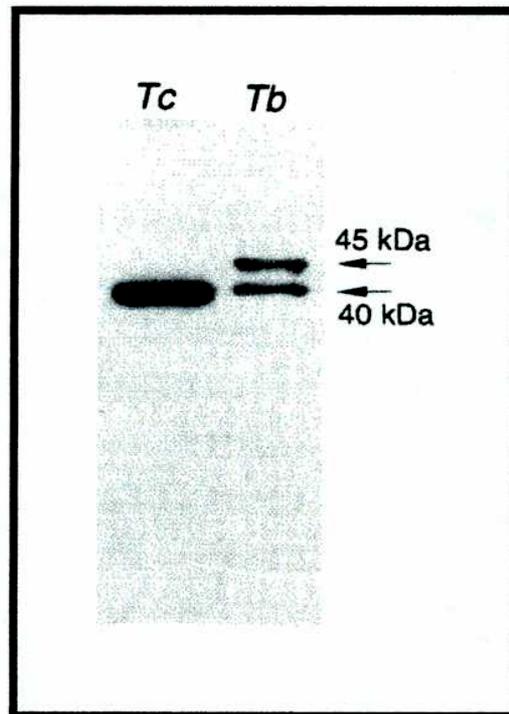


Figura 4.2. Análisis por "Western Blot" de fracciones solubles (30 μg) de *T. cruzi* (Tc) y *T. brucei* (Tb). Los pesos moleculares de las bandas obtenidas se señalan mediante flechas.

4.1.ii. Clonado de la arginina quinasa de *Trypanosoma brucei*.

Utilizando la información disponible en los estudios de secuencias genómicas (GSSs, por sus siglas en inglés) correspondientes a los números de acceso: AQ654847, AQ642971, AQ658136, AQ656418, AQ654848, AQ655010 y las etiquetas de secuencias expresadas (ESTs, por sus siglas en inglés) numero W00186, W15092, W00192, AA003463, principalmente obtenidos del proyecto genoma de *Trypanosoma brucei*, fueron utilizadas como una valiosa fuente de información para la amplificación y el ensamblado de una secuencia postulada como el gen completo de la arginina quinasa de este parásito. Los oligonucleótidos iniciadores utilizados en la reacción de PCR se detallan a continuación:

- AKTb5' : 5'ATGGCTACCCGCGACGTTGCTG3'
- AKTb3' : 5'CTACTTCGACTTCTCCAGTTTG3'

El único producto resultante de la amplificación presento un tamaño de 1071 pb. La secuenciación de este fragmento presento un 76 % de identidad en nucleótidos con la secuencia del gen completo de la arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi* (Figura 4.3). Al analizar los marcos de lectura abiertos (ORFs, por sus siglas en Inglés) se determino uno capaz de codificar para un polipéptido de 356 aminoácidos con un peso molecular teórico de 40.1 kDa y un punto isoeléctrico de 5.82, el cuál resulto ser aproximadamente una unidad de pH menor al calculado para la arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi*.

Además, la secuencia de aminoácidos deducida del ORF de *T. brucei*, presenta un 91 % de homología y un 82 % de identidad con la arginina quinasa de *T. cruzi*.

La proteína codificada por la secuencia obtenida de *T. brucei*, presento la secuencia consenso de las guanidino quinazinas: C-P-(S/T)-N-(I/L)-G-T entre las posiciones 271-277 (figura 4.3, resaltado en amarillo) y un posible sitio de unión a actina: NDKTFLVWNE entre las posiciones 214-224 (figura 4.3, resaltado en verde).

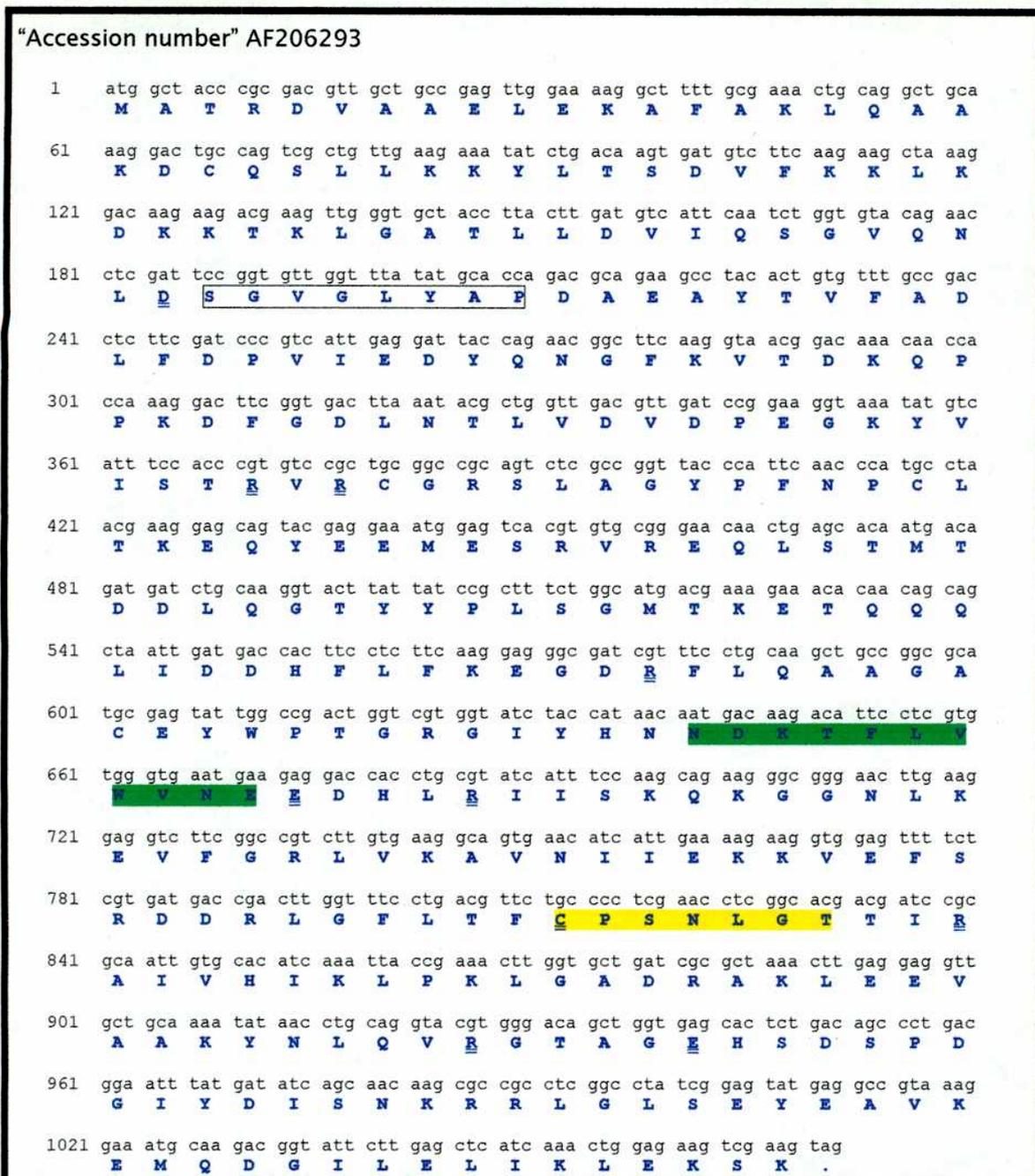


Figura 4.3. Marco abierto de lectura correspondiente al gen de la arginina quinasa de *Trypanosoma brucei*. En amarillo se resalta la secuencia consenso de las guanidino quinazinas y en verde se destaca el posible sitio de unión a actina.

Al estudiar en la secuencia obtenida de *T. brucei*, la posición de algunos aminoácidos críticos para la actividad arginina quinasa (Zhou, 1998), se hallaron cinco argininas (Arg¹²⁴, Arg¹²⁶, Arg²²⁹, Arg²⁸⁰, y Arg³⁰⁹) involucradas en la unión del ATP y dos aminoácidos ácidos (Glu²²⁵ y Glu³¹⁴) y una cisteína C²⁷¹, que interactúan con el grupo guanidino aceptor de la arginina y que forman el "sitio GS" (estas posiciones están indicadas en la figura 4.3, mediante dobles subrayado). Además, la región de especificidad para el grupo guanidino representada por los residuos ubicados entre las posiciones 56 a 70 (recuadro en la figura 4.3) fue ligeramente a la presentada en la arginina quinasa de *T. cruzi* (3 posiciones diferentes en un total de 15). Pero los residuos críticos S⁶³, G⁶⁴, V⁶⁵ y Y⁶⁸ estuvieron presentes en ambas secuencias. Al menos, el residuo R¹⁹³ y D⁶², los cuales están involucrados en la estabilización del sitio activo, estuvieron también conservados. Para obtener una visualización gráfica, todas las posiciones indicadas se destacan en el modelo presentado en la figura 4.4.

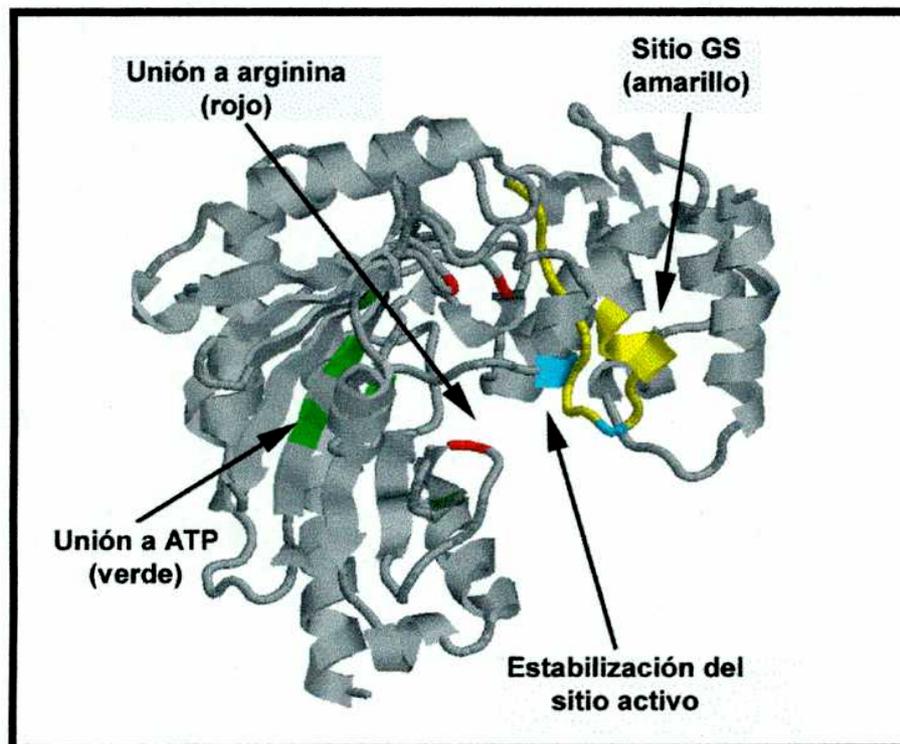


Figura 4.4. Modelado de la arginina quinasa de *T. brucei* basado en los datos disponibles de la estructura de la arginina quinasa del cangrejo herradura (pdb 1BGO). Se encuentran señalados los sitios de unión al sustrato (ATP: Verde, arginina: rojo). En amarillo se señala la región de reconocimiento del grupo guanidino (región GS) y la región de estabilización del sitio activo se señala en

celeste. El modelado de la proteína se realizó utilizando los programas Swiss-Model (Guex, 1999) y RasMol.

4.1.iii. Comparación de aminoácidos de la arginina quinasa de *Trypanosoma brucei* contra otros taxones.

La mayor identidad en aminoácidos fue obtenida con la arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi* mostrando una cercanía entre estos dos grupos. En la figura 4.5, se representa mediante un árbol filogenético, la relación de distancias con respecto a un secuencia consenso de la arginina quinasa deducida a partir de una variedad de *phyla* incluyendo: Nematoda, Mollusca, Arthropoda, Sarcomastigophora, Echinodermata, y Cnidaria. En esta figura se puede ver claramente la similitud de secuencias existente entre la arginina quinasa del *phyla* Sarcomastigophora (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*) y Arthropoda.

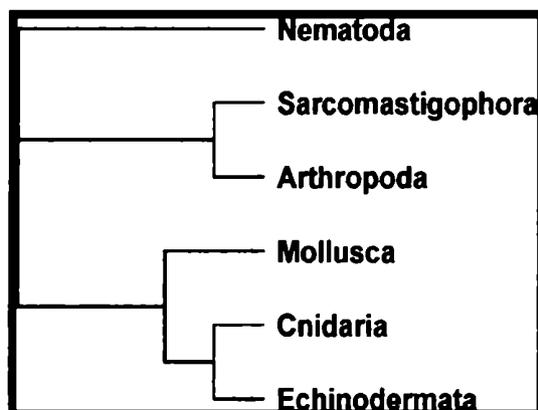


Figura 4.5. Árbol filogenético de secuencias pertenecientes a argininas quinasa de organismos de diferentes taxones. Nematoda: *Caenorhabditis elegans* (gb Q10454 y Q27535); Sarcomastigophora: *Trypanosoma brucei* (gb AF206293) y *Trypanosoma cruzi* (gb AF070451); Arthropoda: *Callinectes sapidus* (gb AF233355), *Carcinus maenas* (gb AF167313), *Chasmagnathus granulata* (gb AF233357), *Eriocheir sinensis* (gb AF233356), *Pachygrapsus marmoratus* (gb AF288785), *Procambarus clarkii* (prf 20204535A), *Homarus gammarus* (sp P14208), *Penaeus japonicus* (sp P51545), *Limulus polyphemus* (sp P51451); Mollusca: *Octopus vulgaris* (gb BAA95609), *Turbo cornutus* (gb BAA22870) *Liolophura japónica* (gb BAA22871) *Sepioteuthis lessoniana* (gb BAA95610), *Nautilus pompilius* (gb BAA95594); Cnidaria: *Anthopleura japonicus* (gb BAA22888); Echinodermata: *Stichopus japonicus* (gb BAA76385). El análisis de secuencias se realizó con el programa TreeView.

Por último, la figura 4.6, muestra una comparación detallada de la secuencia de aminoácidos de la arginina quinasa de *Trypanosoma brucei* con la correspondiente al *phylum* más relacionado: Arthropoda (Identidad entre 71-76 %).

Parte de los resultados mostrados en esta sección fueron publicados:

Pereira, CA, Alonso, GD, Torres, HN and Flawiá, MM. (2002) Arginine kinase a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated Trypanosomatids. J. Eukariot. Microbiol. 49(1):83-86.

Trypanosoma brucei	MATRDVAEELEKAFKLAQAKDCQSLKKYLTSDVFKKLKDKKTKLGATLLDVIQSGVQNLDSGVGLYAPDA	72
Trypanosoma cruzi	MASAEVSKLEAAFAKLNASDCHSLKKYLTKEVFDQLKQKTKMGATLMDVIQSGVENLDSGIGVYAPDA	72
Callinectes sapidus	MADAATIAKLEEGFKLEAATDCKSLKKYLTKEVFDQLKDKKTKSLGATLLDVIQSGVENLDSGVGVYAPDA	72
Carcinus maenas	MADAATITKLEEGFKLEAATDCKSLKKYLTKEVFDQLKAKKTKSLGATLLDVIQSGVENLDSGVGVYAPDA	72
Chasmagnathus granulata	MADAATIAKLEEGFKLEAATDCKSLKKYLTKEVFDQLKAKKTKSLGATLLDVIQSGVENLDSGVGVYAPDA	72
Eriocheir sinensis	MADAATIAKLEEGFKLEAATDCKSLKKYLTKEVFDQLKAKKTKSLGATLLDVIQSGVENLDSGVGVYAPDA	72
Pachygrapsus marmoratus	MADAATISKLEEGFKLQGGATDCKSLKKYLTKEVFDQLKAKKTKSLGATLLDVIQSGVENLDSGVGVYAPDA	72
Procambarus clarkii	MADAATIAKLEEGFKLEAATDCKSLKKYLSKSFDSLAKKTKSLGATLLDVIQSGVENLDSGVGIYAPDA	72
Homarus gammarus	MADAATIAKLEEGFKLEAATDCKSLKKYLSKSFDSLAKKTKSLGATLLDVIQSGVENLDSGVGIYAPDA	72
Penaeus japonicus	MVDAAVLEKIQAGFKLEAATDCKSLKKYLSKSFIDKLGQKTKSLGATLLDVIQSGVENLDSGVGIYAPDA	72
Limulus polyphemus	MVDQATLDKLEAGFKLQEAASDCKSLKKHLTKDFVDSIKNKTGMGATLLDVIQSGVENLDSGVGIYAPDA	72
Trypanosoma brucei	EAYTVFADLFDPEVIEDYQNGFKVTDKQPPKDFGDLNLTLDVDPGKYVISTRVRCGRSLAGYFPNPLCKEQ	144
Trypanosoma cruzi	ESYTLFAALFDPEIIEYHKGFKPSDKQPPKDFGDLNLTLDVDPDKKYVISTRVRCGRSLAGYFPNPLCKEQ	144
Callinectes sapidus	EAYTLFAPLFDPEIIEYHKGFKQTDKHPNKDFGDNQFVNVDPDGKQVISTRVRCGRSMEGYFPNPLCTEAQ	144
Carcinus maenas	EAYTLFAPLFDPEIIEYHKGFKQTDKHPNKDFGDNQFVNVDPDGKQVISTRVRCGRSMEGYFPNPLCTEAQ	144
Chasmagnathus granulata	EAYTLFAPLFDPEIIEYHKGFKQTDKHPNKDFGDNQFVNVDPDGKQVISTRVRCGRSMEGYFPNPLCTEAQ	144
Eriocheir sinensis	EAYTLFAPLFDPEIIEYHKGFKQTDKHPNKDFGDNQFVNVDPDGKQVISTRVRCGRSMEGYFPNPLCTEAQ	144
Pachygrapsus marmoratus	EAYTLFAPLFDPEIIEYHKGFKQTDKHPNKDFGDNQFVNVDPDGKQVISTRVRCGRSMEGYFPNPLCTEAQ	144
Procambarus clarkii	EAYSFLAPLFDPEIIEYHKGFKQTDKHPNKDFGDNQFVNVDPDGKQVISTRVRCGRSMEGYFPNPLCTEAQ	144
Homarus gammarus	EAYSFLAPLFDPEIIEYHKGFKQTDKHPNKDFGDNQFVNVDPDGKQVISTRVRCGRSMEGYFPNPLCTEAQ	144
Penaeus japonicus	EAYTLFAPLFDPEIIEYHKGFKQTDKHPNKDFGDNQFVNVDPDGQYVISTRVRCGRSMEGYFPNPLCTEAQ	144
Limulus polyphemus	ESYRTFGLFDPEIIEYHKGFKLTDKHPKKEWGDINTLVDLDPGGQFIISTRVRCGRSLQGYFPNPLCTEAQ	144
Trypanosoma brucei	YEEMSRVREQLSTMTDDLQGTYYPLSGMTKETQQQLIDDHFLFKEGDRFLQAAGACEYWPTRGRIYHNDK	216
Trypanosoma cruzi	YEEMSRVKGQLESMSGELRGKYYPLTGMTKETQQLIDDHFLFKEGDRFLQAAGACEYWPTRGRIYHNDK	216
Callinectes sapidus	YKEMESKVSSTLSNLEGEKGTYPFLTGMTKEVQKLIIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDK	216
Carcinus maenas	YKEMESKVSSTLSNLEGEKGTYPFLTGMTKEVQKLIIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDK	216
Chasmagnathus granulata	YKEMESKVSSTLSNLEGEKGTYPFLTGMTKEVQKLIIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDK	216
Eriocheir sinensis	YKEMESKVSSTLSNLEGEKGTYPFLTGMTKEVQKLIIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDK	216
Pachygrapsus marmoratus	YKEMEAKVFSSTLSLEGEKGSFYPLTGMKDVQKLIIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDK	216
Procambarus clarkii	YKEMEAKVFSSTLSLEGEKGSFYPLTGMKDVQKLIIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDK	216
Homarus gammarus	YKEMEAKVFSSTLSLEGEKGSFYPLTGMKDVQKLIIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDK	216
Penaeus japonicus	YKEMQKVSSTLSLEGEKGTYPFLTGMKDVQKLIIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDK	216
Limulus polyphemus	YKEMEAKVFSSTLSMEDELKGTYPFLTGMKDVQKLIIDDHFLFKEGDRFLQANACRYWPTGRGIYHNDK	216
Trypanosoma brucei	TFLVWVNEEDHLRIISMQGGDLGQVYRRLVSAVNEIEKRVPFSSHDRGLGFLTFPCPTNLGTTVRASVHIKLP	288
Trypanosoma cruzi	TFLVWVNEEDHLRIISMQGGDLGQVYRRLVSAVNEIEKRVPFSSHDRGLGFLTFPCPTNLGTTVRASVHIKLP	288
Callinectes sapidus	TFLVWCNEEDHLRIISMQGGDLGQVYRRLVSAVNEIEKRVPFSSHDRGLGFLTFPCPTNLGTTVRASVHIKLP	288
Carcinus maenas	TFLVWCNEEDHLRIISMQGGDLGQVYRRLVSAVNEIEKRVPFSSHDRGLGFLTFPCPTNLGTTVRASVHIKLP	288
Chasmagnathus granulata	TFLVWCNEEDHLRIISMQGGDLGQVYRRLVSAVNEIEKRVPFSSHDRGLGFLTFPCPTNLGTTVRASVHIKLP	288
Eriocheir sinensis	TFLVWCNEEDHLRIISMQGGDLGQVYRRLVSAVNEIEKRVPFSSHDRGLGFLTFPCPTNLGTTVRASVHIKLP	288
Pachygrapsus marmoratus	TFLVWCNEEDHLRIISMQGGDLGQVYRRLVSAVNEIEKRVPFSSHDRGLGFLTFPCPTNLGTTVRASVHIKLP	288
Procambarus clarkii	TFLVWCNEEDHLRIISMQGGDLGQVYRRLVSAVNEIEKRVPFSSHDRGLGFLTFPCPTNLGTTVRASVHIKLP	288
Homarus gammarus	TFLVWCNEEDHLRIISMQGGDLGQVYRRLVSAVNEIEKRVPFSSHDRGLGFLTFPCPTNLGTTVRASVHIKLP	288
Penaeus japonicus	TFLVWVNEEDHLRIISMQGGDLGQVYRRLVSAVNEIEKRVPFSSHDRGLGFLTFPCPTNLGTTVRASVHIKLP	288
Limulus polyphemus	TFLVWVNEEDHLRIISMQGGDLKTVYKRLVAVDNIESKLPFSSHDRGLGFLTFPCPTNLGTTVRASVHIKLP	288
Trypanosoma brucei	KLADRAKLEEVAAYKYLQVRGTAGEHSDSPDGIYDISNKRRLGLSEYEAVKEMQDGIILELIKLEKSK-	356
Trypanosoma cruzi	KLADRAKLEEVAAYKYLQVRGTAGEHSDSPDGIYDISNKRRLGLSEYEAVKEMQDGIILELIKLEKSK-	357
Callinectes sapidus	KLAANREKLEEVAGKYSLQVRGTAGEHTEAEGGVYDISNKRRLGLTEYQAVKEMQDGIILELIKLEKEMQ	357
Carcinus maenas	KLAANREKLEEVAGKYSLQVRGTAGEHTEAEGGVYDISNKRRLGLTEYQAVKEMQDGIILELIKLEKEMQ	357
Chasmagnathus granulata	KLAANREKLEEVAGKYSLQVRGTAGEHTEAEGGVYDISNKRRLGLTEYQAVKEMQDGIILELIKLEKEMQ	357
Eriocheir sinensis	KLAANREKLEEVAGKYSLQVRGTAGEHTEAEGGVYDISNKRRLGLTEYQAVKEMQDGIILELIKLEKEMQ	357
Pachygrapsus marmoratus	KLAANREKLEEVAGKYSLQVRGTAGEHTEAEGGVYDISNKRRLGLTEYQAVKEMQDGIILELIKLEKEMQ	357
Procambarus clarkii	KLAANREKLEEVAGKYSLQVRGTAGEHTEAEGGVYDISNKRRLGLTEYQAVKEMQDGIILELIKLEKEMQ	357
Homarus gammarus	KLAANREKLEEVAGKYSLQVRGTAGEHTEAEGGVYDISNKRRLGLTEYQAVKEMQDGIILELIKLEKEMQ	356
Penaeus japonicus	KLAANREKLEEVAGKYSLQVRGTAGEHTEAEGGVYDISNKRRLGLTEYQAVKEMQDGIILELIKLEKEMQ	356
Limulus polyphemus	KLAANREKLEEVAGKYSLQVRGTAGEHTEAEGGVYDISNKRRLGLTEYQAVKEMQDGIILELIKLEKEMQ	357

Figura 4.6. Alineación de la secuencia de aminoácidos de las arginina quinasa de *Trypanosoma brucei* (gb AF206293) y *Trypanosoma cruzi* (gb AF07451) con las

secuencias correspondientes a distintos miembros del phylum Arthropoda: *Callinectes sapidus* (gb AF233355), *Carcinus maenas* (gb AF167313), *Chasmagnathus granulata* (gb AF233357), *Eriocheir sinensis* (gb AF233356), *Pachygrapsus marmoratus* (gb AF288785), *Procambarus clarkii* (prf 20204535A), *Homarus gammarus* (sp P14208), *Penaeus japonicus* (sp P51545), *Limulus polyphemus* (sp P51451) El sombreado indica residuos idénticos. Para la alineación se utilizó el programa Clustal W 1.81.

4.2. Posible transportador de aminoácidos catiónicos de *Trypanosoma brucei*.

En el clonado de transportadores de aminoácidos, al igual que como ocurre con otras proteínas de membrana, es sumamente dificultoso. Tanto es así, que el primer gen de un transportador de aminoácidos en células de mamíferos fue clonado recién en el año 1991 y pertenecía a la familia CAT. Pero con la llegada de las primeras secuencias y la gran conservación de la relación estructura-función, se lograron grandes avances.

4.2.i. Clonado del hipotético gen de un transportador de aminoácidos de *Trypanosoma brucei*.

En el caso del transportador de arginina de *Trypanosoma brucei*, se comenzó una búsqueda en distintas bases de datos, que contienen secuencias de proyectos genoma de parásitos, como por ejemplo la del Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/>). Utilizando como objeto de búsqueda, una secuencia de *Dictyostelium discoideum* similar a un transportador de alta afinidad para aminoácidos catiónicos (gb AF015566), se detectó una secuencia con gran similitud presente en el cromosoma VI de *Trypanosoma brucei* (EMBL: AC007863).

Al buscar en el cromosoma VI de *Trypanosoma brucei* distintos marcos abiertos de lectura, se encontró uno que codifica para un polipéptido de 539 aminoácidos, que al ser estudiado, presentó una alta identidad con otros transportadores de aminoácidos (figura 4.7).

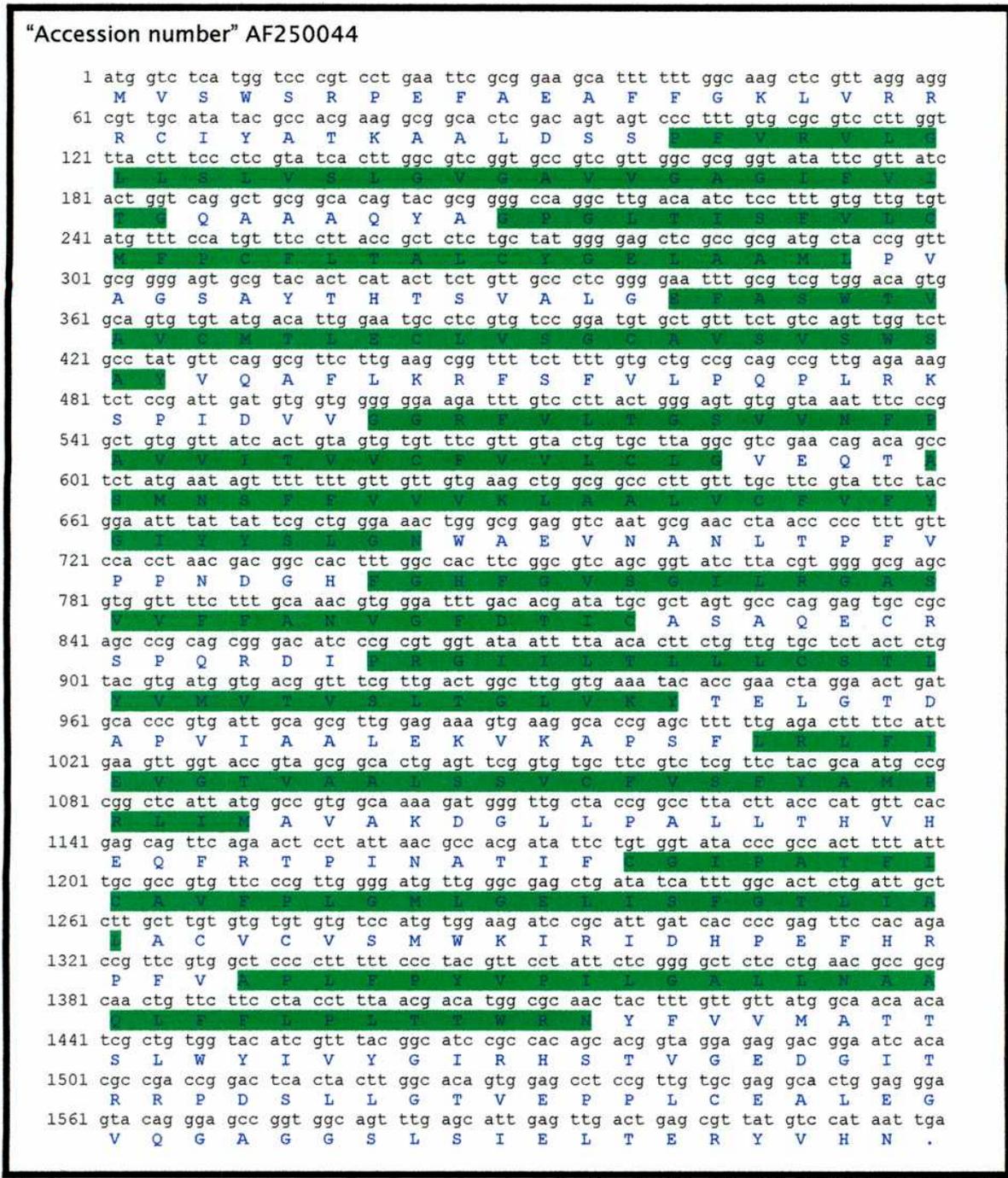


Figura 4.7. Marco abierto de lectura correspondiente al hipotético gen de un transportador de aminoácidos de *Trypanosoma brucei*. Resaltados en verde se destacan los posibles segmentos transmembrana (ver mas adelante).

4.2.ii. Estudios de hidropatia del hipotético transportador de aminoácidos de *Trypanosoma brucei*.

Para realizar los estudios de hidropatia y predecir los posibles segmentos transmembrana se utilizaron distintos algoritmos. El primero de ellos fue el algoritmo de Kyte y Doolittle, el cual postula como segmentos transmembrana a aquellos de aproximadamente 19 residuos de longitud con una hidrofobicidad promedio mayor a 1.6 (Kyte, J. & Doolittle, R.F, 1982). La figura 4.8 muestra el perfil obtenido al aplicar este algoritmo al hipotético transportador de arginina de *Trypanosoma brucei*.

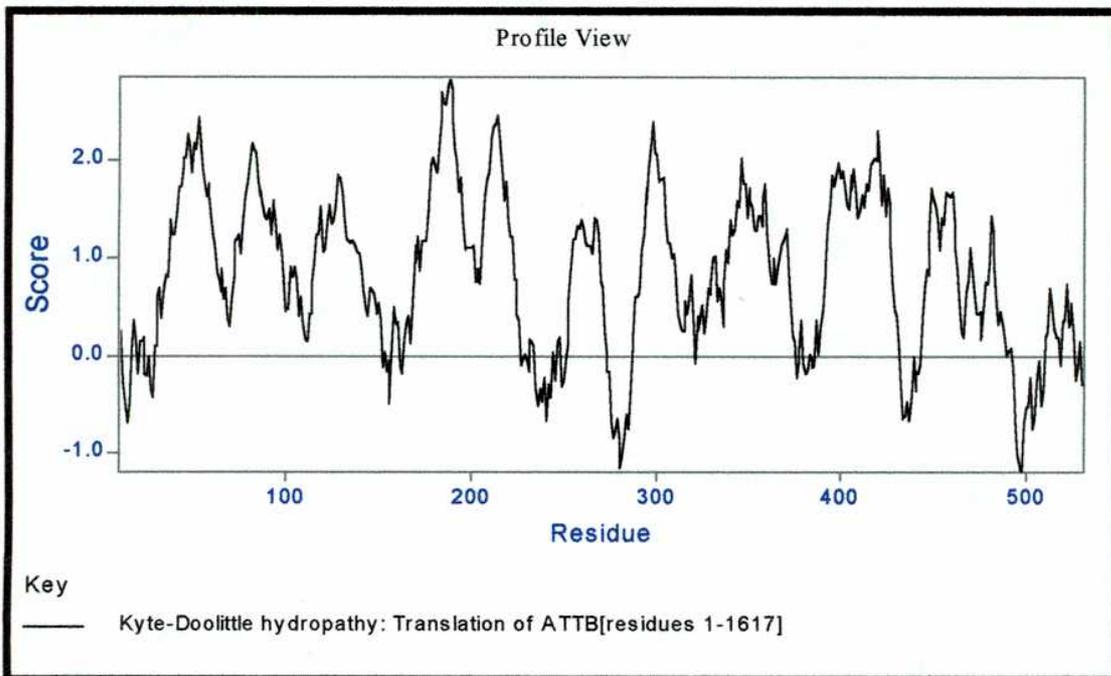


Figura 4.8. Estudio de hidropatia realizado utilizando el algoritmo de Kyte y Doolittle. Los valores por encima de 0, corresponden a regiones hidrofóbicas. Se puede observar en la figura las características claramente no polares de esta proteína.

El segundo algoritmo utilizado fue el de Argos, que predice regiones helicoidales de proteínas, las cuales se reconocen que interactúan con la membrana (Argos, 1982). La figura 4.9, muestra el perfil obtenido.

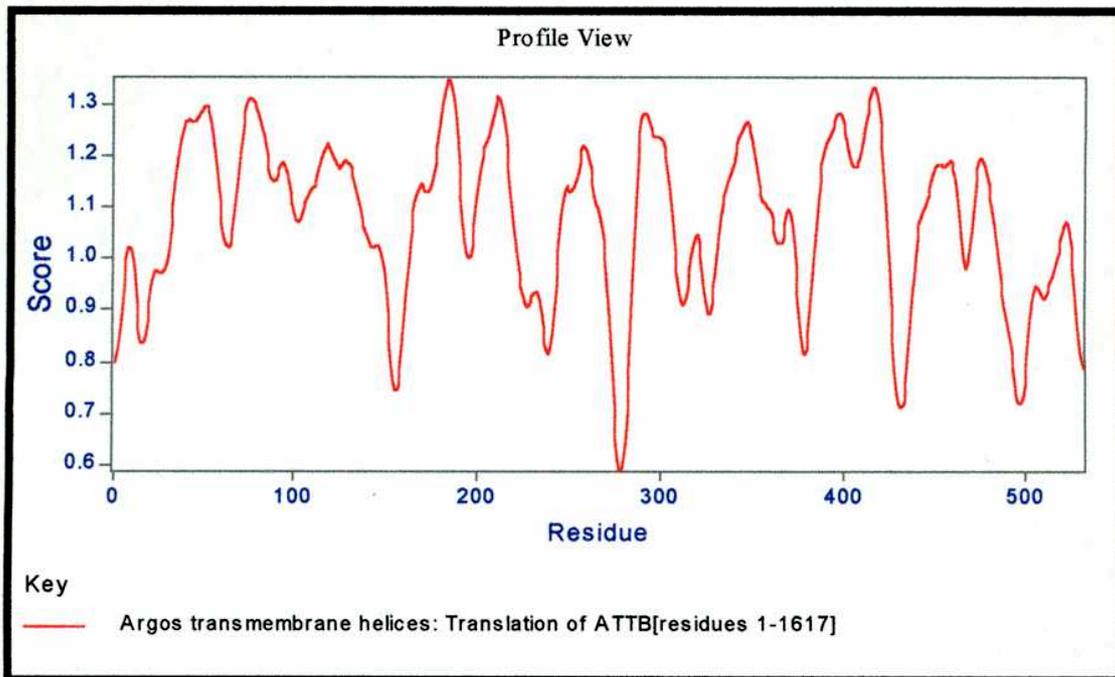


Figura 4.9. Estudio de posibles pasos transmembrana utilizando el algoritmo de Argos.

Por último se utilizó el programa TMAP disponible en la red brindado por el Instituto Karolinska (<http://www.mbb.ki.se/tmap/index.html>). Este programa se basa en correcciones realizadas sobre otros métodos ya existentes de modo de hacer mas fiables sus resultados (Persson B, Argos P., 1994; Persson B, Argos P., 1996). En este caso se detectaron 10 supuestos segmentos transmembrana que se marcaron en la figura 4.7, y se resumen en la tabla 4.1.

Segmento	Residuo de inicio	Residuo de finalización	Longitud del segmento
TM 1:	34	62	(29)
TM 2:	70	98	(29)
TM 3:	114	142	(29)
TM 4:	167	195	(29)
TM 5:	200	228	(29)
TM 6:	247	273	(27)
TM 7:	287	314	(28)
TM 8:	336	364	(29)
TM 9:	393	421	(29)
TM 10:	444	472	(29)

Tabla 4.1. Posición de los supuestos segmentos transmembrana utilizando el programa TMAP.

4.2.iii. Demostración de la función del hipotético transportador de aminoácidos de *Trypanosoma brucei*.

El gen completo correspondiente al hipotético transportador ya fue amplificado utilizando ADN genómico de *Trypanosoma brucei*. Actualmente se está trabajando para expresarlo en sistemas heterólogos (levaduras y bacterias) para así determinar si realmente es funcional y de serlo comenzar con su caracterización. Es importante destacar que este transportador podría ser utilizado en conjunto con la arginina quinasa para el desarrollo de drogas que permitan combatir tanto la tripanosomiasis americana como así también la africana.

Con este capítulo se logró el objetivo propuesto al comienzo, o sea extender el estudio del metabolismo de la arginina desde los tripanosomátidos americanos a los africanos, abriendo de esta manera una gran variedad de estudios comparativos.

DISCUSSION

En el capítulo 1, se buscó generar poblaciones de epimastigotes transfectadas establemente que sobre-expresen o que tengan suprimida funcionalmente la arginina quinasa. De esta manera se quiso obtener una mayor información a cerca de la función que desempeña esta enzima en el metabolismo del *Trypanosoma cruzi*. Además, desde que fue caracterizada bioquímica y molecularmente por nuestro laboratorio (Pereira, 2000), esta enzima, se consideró como un posible blanco terapéutico ya que participa en el metabolismo energético del *T. cruzi* y esta ausente en el hospedador humano. Para sustentar la hipótesis de la relevancia de la arginina quinasa en la supervivencia del parásito, la manera mas directa es eliminar la actividad enzimática en estudio mediante técnicas de knock-out clásicas o bien trabajando con un ARN anti-sentido, como se opto en este trabajo.

Mas allá de los resultados, los trabajos realizados con parásitos modificados genéticamente, representan un importante aporte al empleo de técnicas de transfección estable en tripanosomátidos, ya que no se dispone de mucha bibliografía al respecto.

Los resultados que se desprenden de estos estudios pueden ser extensamente discutidos debido a lo poco fisiológico que resulta modificar (en el caso de la sobre-expresión, exaltando decena a cientos de veces la producción de una enzima) los niveles intracelulares de una enzima, que en el caso particular de la arginina quinasa, utiliza ATP como uno de sus sustratos. Es de esperar que la sobre-expresión por si misma sea una situación de estrés y hay que ser sumamente cuidadoso para no confundir los resultados y atribuir un fenotipo erróneo. Por este motivo en los controles que implicaran actividades biológicas siempre se comparó con la población de parásitos que sobre-expresaban la proteína verde fluorescente (GFP), que se encuentra en una situación fisiológica similar.

Durante el primer evento de transfección que en este trabajo se describe como "etapa 1", se logra seleccionar exitosamente poblaciones de parásitos que sobre-expresan aproximadamente 2.5 veces la arginina quinasa, y poblaciones que tienen una débil disminución de los niveles intracelulares de esta enzima. Estas poblaciones al ser caracterizadas no mostraron diferencias con los controles. Pero cabe destacar que en este mismo trabajo se describe que por una regulación endógena la arginina quinasa aumenta aproximadamente 7 veces durante la curva de crecimiento, por lo que una variación de 2.5 veces estaría dentro de un rango de variaciones a las que el parásito esta adaptado. De hecho las variaciones observadas desde el día 3 al día 6 son de 3 veces.

Esta hipótesis sobre la falta de efecto de la sobre-expresión, debido a los bajos niveles logrados, queda mas clara al ver los resultados obtenidos durante la etapa 2.

La población que se obtuvo al transfectar con el vector que poseía el gen de la arginina quinasa clonado en orientación sentido (el mismo vector utilizado en la etapa 1), en este caso mostró hasta 60 veces de sobre-expresión. Esta diferencia entre dos eventos independientes nos lleva a una discusión acerca del mecanismo por el cual el vector se integra. La región correspondiente al promotor ribosomal que se halla presente en el vector de expresión pTREX-A, además de su función promotora tienen la responsabilidad de la integración en el locus ribosomal, en el cual los genes para proteínas ribosomales se encuentran organizados en tandem. Esto tiene dos efectos independientes, el primero es que al haber varias copias de estos genes la presión de selección, baja y hay una mayor libertad para mantener mutaciones que posiblemente bajen la eficiencia de la expresión, el segundo efecto, es la inserción del vector en el evento de transfección. Como se describió en resultados, la eficiencia de la transfección es baja por lo que la mayoría de los parásitos no incorporan plásmido y los que lo hacen, a lo sumo logran integrar una copia. En estudios hechos al respecto, se ha observado que es muy baja la frecuencia de inserción de mas de una copia de plásmido por parásito (Hernán Lorenzi, comunicación personal). Esto nos lleva a que podría haber varios sitios de inserción posibles con distintas eficiencias de expresión y en eventos de transfección independientes se incorpora en una u otra posición.

Pese a que en este trabajo no se utilizaron clones, sino poblaciones, esta mostraron características esperables en un clon, como ser, en los estudios de "Chromosome Blot", se observa la integración en uno solo de los cromosomas, dependiendo de cada población, por ejemplo en la etapa 1 se ve que la construcción que llevaba la arginina quinasa en orientación sentido se inserto en un cromosoma y la construcción que lleva la arginina quinasa en orientación anti-sentido en el otro (Figura 1.10). Igualmente al realizar estudios por "Southern Blot", no fue notoria la heterogeneidad de la población. De todos modos ahora se están clonando las distintas poblaciones para confirmar los resultados aquí presentados.

Por observaciones realizadas durante las distintas transfecciones que realicé, da la sensación que durante el proceso de selección, no solo se enriquece en parásitos que posean la resistencia al antibiótico sino que también se va seleccionando por otras características que posiblemente le otorguen ventajas a un grupo de parásitos en particular.

Por ejemplo, como se ve en la figura 1.15, la cinética de crecimiento de los parásitos que sobre-expresan la arginina quinasa es superior al control. Estos parásitos, cuando estaban terminando el tiempo de selección, al medir la actividad arginina quinasa presentaban valores de aproximadamente 10 veces, luego empezaron a dar valores de 20 veces y así fueron aumentando hasta llegar a las 60 veces de sobre-expresión. Por lo tanto, en esta ocasión se puede ver notoriamente que una característica que no es la resistencia al antibiótico fue enriqueciendo en cada ciclo de duplicación en aquellos parásitos con altos niveles de sobre-expresión.

Ahora si de por si partimos de la base de una baja eficiencia de transfección, seguimos con lo casual de lograr la integración en una de las repeticiones que permita tan elevados valores de sobre-expresión, y por último, aquellos parásitos que sobre-expresan tanto se van enriqueciendo en cada ciclo, podríamos decir que la población que estamos teniendo posiblemente sea clonal aun sin haberlo planteado como un objetivo.

Hasta el momento el único efecto notado para la sobre-expresión fue una mayor cinética de crecimiento, pero una vez que se obtengan clones de estos parásitos se repetirán los experimentos de diferenciación e invasión de células susceptibles. Además, se esta repitiendo la transfección con la construcción que llevaba un inserto correspondiente a 52 nts de la región 5' no codificante del gen de la arginina quinasa, el sitio de inicio de la traducción e ingresa 110 nts en la región codificante que se denominó anti-sentido pequeño (ASp). En el caso de comparar los resultados obtenidos al intentar realizar la supresión de la expresión de un gen mediante la técnica de ARN anti-sentido, se obtuvo una mayor eficiencia al disminuir el tamaño del ARN que se unirá al ARN mensajero endógeno. Esto podría deberse a la formación de estructuras secundarias por parte del ARN mensajero sobre expresado y de esta manera disminuye su capacidad para generar híbridos.

Al obtener una construcción con alta eficiencia de supresión, se revirtió el fenotipo, posiblemente mediante rearrreglos de la copia en posición anti sentido. Este efecto ya fue descrito anteriormente al intentar suprimirse la tripanotion reductasa en *Trypanosoma cruzi*, en cuyo caso al realizarse los estudios de la zona de inserción se observó un rearrreglo por el cual la copia anti-sentido había sido ubicada a la posición sentido (Tovar J, 1996).

Posiblemente el fracaso en la obtención de una población que tenga completamente suprimida la arginina quinasa o que presente un muy bajo nivel de expresión, nos este indicando que esta enzima desempeña un importante papel en el metabolismo del parásito. Una estrategia posible seria realizar

distintas construcciones, a la búsqueda de una que disminuya los niveles endógenos de arginina quinasa hasta permitir ver un fenotipo, pero que no despierte la respuesta del parásito. Igualmente en este caso el fenómeno de selección por fenotipo descrito anteriormente, en el caso de la sobre-expresión nos estaría jugando en contra, ya que la población que tenga disminuida su actividad arginina quinasa se iría perdiendo en cada ciclo de duplicación. Posiblemente la mejor estrategia consista en comenzar un proceso de clonado desde el momento inmediato después de la transfección. También se están repitiendo las transfecciones para obtener nuevamente una población transfectada con el pT-ASp.

Además, se están poniendo a punto los ensayos de diferenciación para repetir los ensayos, con las poblaciones clonadas.

Como nuevas estrategias en este campo se está realizando la supresión del gen de la arginina quinasa mediante técnicas convencionales. Al día de hoy ya se halla anulado un alelo de este gen. Y como técnica innovadora, se está trabajando en la construcción de un vector que permita llevar a cabo la supresión de la arginina quinasa mediante la técnica de ARN de interferencia (ARNi). Consiste en un método simple y rápido para inhibir la función de genes específicos, que se basa en la degradación de ARN mensajero a través de la introducción dentro de la célula de ARN doble cadena. Se postula que la formación de ARN doble cadena resulta en una temprana degradación del ARN mensajero endógeno (Fire A., 1998), este método fue utilizado exitosamente en el nematode *Caenorhabditis elegans* (Fire A., 1998), en *Drosophila melanogaster* (Kennerdell R. y Carthew R., 1998 y Misquitta L. y Paterson B., 1999) y en *Trypanosoma brucei* (Huan Ngo, 1998).

En el *Trypanosoma cruzi*, la relación existente entre la actividad arginina quinasa (AK) y los requerimientos energéticos es un capítulo de importancia que aún esta sin resolver. Los procesos de mayor demanda energética en tripanosomátidos son la división celular, la motilidad, la diferenciación entre estadios y la invasión de las células huésped (Brener, 1973).

Como administra el parásito sus reservas energéticas es un punto de amplio interés para aumentar la comprensión de cómo en situaciones de estrés, con una baja disponibilidad de recursos en el medio, llevar a cabo procesos de alta demanda energética como la diferenciación entre estadios.

Estos parásitos soportan un amplio rango de condiciones ambientales durante su ciclo de vida complejo. Por ejemplo en el hospedador mamífero los estadios de tripomastigotes y amastigotes se encuentran en un ambiente constante, incluyendo un aporte permanente de glucosa y aminoácidos. Por el contrario en el insecto vector, los ciclos de alimentación determinan variaciones en la disponibilidad de nutrientes para el estadio de epimastigotes (Kollien, 2000).

Teniendo en cuenta estos hechos y la relevancia de los fosfágenos en las reacciones de transferencia de energía, en esta tesis se quisieron dar los primeros pasos en el estudio de la regulación de la arginina quinasa en relación a los cambios en la composición del medio extracelular durante las fases de crecimiento de un cultivo desarrollado *in vitro*. Para ello simplemente se dejo transcurrir el tiempo de cultivo en medio LIT, y se fueron retirando muestras, o se simularon determinadas condiciones intercambiando medios.

Como primer logro se detecto que los niveles de arginina quinasa no eran constante, sino que iban en aumento a medida que el cultivo va envejeciendo. Con respecto a esto es muy importante recordar que la arginina quinasa cataliza la transferencia reversible de un grupo fosfato entre la arginina y el ATP, o sea que dependiendo de las condiciones, puede llevar a cabo la reacción "directa" sintetizando fosfoarginina a partir de arginina y ATP, o puede estar llevando a cabo la reacción inversa, o sea la re-síntesis de ATP, a partir de fosfoarginina y ADP. La dirección en la cual la enzima esta trabajando en el interior de la célula, no se relaciona con el ensayo *in vitro*, ya que en este último, las condiciones favorecen la síntesis de fosfoarginina. Para ampliar la información de la dirección de trabajo de la enzima en las distintas etapas del ciclo de vida del parásito se están poniendo a punto técnicas que nos permitan cuantificar los niveles de arginina y fosfoarginina en las distintas etapas.

La hipótesis que se plantea en este trabajo es que durante la etapa temprana del cultivo, mientras hay una alta disponibilidad de recursos, la arginina quinasa se

encontraría llevando a cabo la reacción directa, aumentando las reservas de fosfoarginina.

Al ingresar a la etapa exponencial tardía y a la etapa de declinación del cultivo, donde los recursos comienzan a ser limitantes, la arginina quinasa canalizaría la reacción inversa brindando una doble ganancia, en primer lugar sintetizando ATP, el cual puede ser utilizado de inmediato y en segundo lugar, al liberar arginina, este aminoácido puede ser utilizado para ser oxidado, o sea, es utilizado como fuente de carbono para la obtención de energía.

El estudio de las variaciones en los niveles de la arginina quinasa no solo tiene valor para comprender, los mecanismos de regulación utilizados en su caso particular, sino que además, puede ser utilizado como un modelo que permita el estudio de la expresión de genes en tripanosomátidos. A esto se le suma los modelos generados por las transfecciones estables ya descritas.

El aumento en la actividad arginina quinasa en función del tiempo de cultivo, fue acompañado por un aumento en los niveles de proteína específica, detectado mediante estudios de "Western Blot". Sin embargo no se detectó una regulación de la actividad enzimática.

Al estudiar los niveles de ARN mensajero específicos para esta proteína se vio que no sufrían cambios mayores.

En base a estos resultados, solo se nota un claro correlato entre la tasa de crecimiento y la actividad arginina quinasa expresado por proteínas totales. Este aumento era devuelto a los valores de inicio con cada cambio de medio. Estos resultados nos llevaron a pensar que la alta densidad poblacional, algún factor derivado de la alta densidad celular (como el estrés energético), o un factor soluble secretado por los parásitos, podrían estar regulando los niveles de proteína arginina quinasa, posiblemente a través de su degradación en los primeros días del cultivo como se puede ver en el ensayo de "Western Blot" de la figura 2.7, en el que se nota la mayor cantidad de productos de degradación en los primeros días de cultivo. Este mecanismo de regulación parece poco conveniente desde el punto de vista energético, ya que mantener la síntesis de una proteína a niveles superiores a los que se necesita e ir regulando sus niveles mediante degradación. Peor para comprender esta estrategia se debe recordar que estamos en presencia de un parásito, que a lo largo de su ciclo de vida va pasando por condiciones sumamente dispares en cuanto a la disponibilidad de recursos y posiblemente se enfrente a situaciones en las cuales una rápida respuesta signifique el éxito o el fracaso en la carrera por la supervivencia, y como es de esperar, el mantener aunque mas no sea bajos niveles de distintas

proteínas, posibilita respuestas mas rápidas, que si se necesitara la síntesis de *ново*.

Durante un período poco superior a dos semanas, los epimastigotes creciendo en medio líquido, atravesaron por dos condiciones nutricionales distintas.

Durante la primera, la glucosa se produce el consumo de glucosa y el pH del medio de cultivo disminuye continuamente. La segunda etapa, comienza luego del sexto día de cultivo y se caracteriza por la excreción de amonio y el aumento progresivo del pH. Este fenómeno, se explica por el metabolismo oxidativo de los aminoácidos (Adroher, 1990), el cual va acompañado por un fuerte aumento en la actividad proteasa en la etapa tardía del la curva de crecimiento (Remedi, 1997).

En base a los resultados obtenidos al estudiar la regulación de la actividad arginina quinasa, y las evidencias presentes en otros sistemas como por ejemplo en el caso de la oxido nítrico sintaza (NOS) donde la disponibilidad de su sustrato, la arginina, consiste en uno de los puntos de regulación de su actividad (Stathopoulos, 2001; Mori, 2000), se decidió estudiar el transporte de arginina en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* durante las distintas fases de la curva de crecimiento.

Del estudio del transporte de arginina se desprendieron varias observaciones destacables.

En primer lugar se observo una relación inversa de la actividad del transportador si se la compara con la arginina quinasa. En tanto que la actividad de la enzima se va incrementando a medida que el cultivo va envejeciendo, la actividad del transporte de arginina, va disminuyendo continuamente. Esta observación estaría de acuerdo con el modelo planteado anteriormente, ya que en un cultivo joven, la arginina quinasa catalizando la reacción directa requiere de grandes cantidades de arginina para llevar a cabo la síntesis de las moléculas de fosfágenos, en tanto que en las etapas tardías del cultivo, al estar la enzima catalizando la reacción inversa, no solo prescindie de la arginina, sino que la libera.

Al estudiar en tripomastigotes, la presencia de arginina quinasa y el transporte de arginina, se obtuvieron resultados que lo asemejan a las condiciones metabólicas presentes en epimastigotes de un cultivo envejecido (en tripomastigotes se obtuvieron mas de dos veces de incorporación de arginina en relación a epimastigotes de día 7) (figura 3.4). Es importante destacar que es en este trabajo de tesis donde se aporta la primera evidencia de la presencia de la arginina quinasa en el estadio de tripomastigote.

Tanto el transporte de arginina como así también la actividad arginina quinasa podrían llegar a utilizarse como marcadores entre estadios, e incluso podrían

estar representando parte de los cambios metabólicos previos al cambio morfológico que ocurre durante la metaciclogénesis.

Como se dijo anteriormente la incorporación de arginina disminuye durante la curva de crecimiento, aproximadamente 21 veces y lo va haciendo de un modo similar a la tasa de replicación calculada como número de duplicaciones celulares por día. Además, en el medio condicionado de día 14, esta presente algún factor capaz de producir una disminución del transporte a parásitos del día 3, pero si a estos mismos parásitos se los expone al medio condicionado del día 14, en la densidad correspondiente a ese mismo día, llamativamente, la disminución en el transporte solo es de un 30 %. Esta observación posiblemente nos este indicando la existencia de una comunicación entre células.

Un efecto inverso se ve en parásitos del día 14 al ser tratados con medio fresco. Se observa la mayor respuesta al tratarlos con medio fresco a su densidad natural (Hasta casi 10 veces de aumento del transporte después de un tratamiento de toda la noche) y solo duplica el transporte al ser tratados toda la noche con medio fresco si se los somete a una densidad 10 veces menor a la normal.

Al estudiar la cinética del incremento en el transporte de arginina observado en parásitos del día 14 tratados con medio fresco durante 16 horas, se observó una clara respuesta que comenzó a notarse desde el primer punto estudiado (2 horas). Durante las primeras 8 horas es cuando se produce la mayor parte del incremento en la incorporación de arginina (aproximadamente el 83%), calculándose una tasa de aumento de $1.33 \text{ pmol/min} \cdot 10^7 \text{ células por hora}$. De aquí en adelante, el aumento en la incorporación de arginina se va dando mas lentamente, a razón de $0.27 \text{ pmol/min} \cdot 10^7 \text{ células por hora}$.

Al estudiar el aporte de los distintos componentes del medio de cultivo, se observó que aquellos que mas aportan al transporte son los que proveen alguna fuente de carbono: suero, glucosa, triptosa, extracto de hígado.

A su vez el "ayuno" de arginina, parecería ser mas efectivo al actuar sobre parásitos correspondientes a un cultivo joven. Esto nos podría estar indicando que en los tripomastigotes el transportador este menos activo o que existan menos moléculas de transportador posiblemente por algún mecanismo de degradación como el observado con la arginina quinasa.

Las evidencias obtenidas hasta el momento podrían estar indicando una relación entre el transporte de arginina, y la arginina quinasa. A su vez, ambas actividades están relacionadas con el estadio del parásito, ya sea durante el ciclo celular de los epimastigotes, como así también con los distintos estadios presentes en el *Trypanosoma cruzi*.

Para estudiar si existe alguna relación entre el metabolismo de arginina y la división celular se decidió utilizar agentes anti-mitóticos y medir el transporte de arginina en distintas condiciones.

Se utilizó hidroxí urea, que actúa como un inhibidor de la ribonucleótido reductasa y en consecuencia inhibe la replicación del ADN, con la consiguiente detención de la proliferación celular. Además, el efecto de esta droga se puede revertir por remoción y lavado de las células, seguido de un pasaje a medio de cultivo fresco. Además, existían reportes previos del uso de esta droga en una gran variedad de eucariotas inferiores del orden Kinetoplastida, incluso en *Trypanosoma cruzi* (Galanti N, 1994; Santori I, 2002).

Luego de 24 horas de tratamiento, se determinó una disminución en la tasa de replicación en los parásitos tratados con hidroxí urea, de aproximadamente 10 veces con respecto al control. Al estudiar la incorporación de arginina se observó una disminución del 40 % en aquellos parásitos en los que se les impidió la división celular, respecto a los controles. Luego de lavar las células y pasadas a un medio de cultivo condicionado de parásitos del día 4, la incorporación de arginina retomó los valores correspondientes a ese día, en tanto que la tasa de replicación medida fue de 0.8 duplicaciones celulares por día (tabla 3.1).

Este ensayo indica una relación importante entre la división celular y el transporte de arginina.

Tomando en cuenta estos datos, podemos postular, que en condiciones de estrés, la tasa de replicación celular disminuye y los parásitos utilizan sus reservas de fosfoarginina para la síntesis de ATP, y de esta manera se libera arginina, la que puede ser utilizada como una fuente de carbono.

La disminución en la incorporación de arginina mediada por el transporte asociada a la replicación, podría estar facilitando la reacción de la arginina quinasa que conduce a la síntesis de ATP.

Por último el estudio sobre como un determinado parásito incorpora y metaboliza componentes del medio que lo circunda, permite idear estrategias que conduzcan al desarrollo de nuevas drogas. En particular en el caso del transportador de arginina, este blanco se torna sumamente atractivo ya que se podría actuar a dos niveles, en un principio atacando al transportador y luego afectando a la actividad arginina quinasa, la cual es el principal blanco si se desea actuar sobre tripomastigotes.

Debido a la importancia del hallazgo de la arginina quinasa en tripanosomátidos americanos por su relación con la administración de fuentes de energía y por ser considerada un posible blanco terapéutico para el desarrollo de drogas contra el Mal de Chagas, se decidió extender el estudio de esta ruta metabólica hacia los tripanosomátidos africanos.

Desde un punto de vista evolutivo, la arginina quinasa pertenece a una familia de proteínas muy conservadas y ampliamente distribuida ya que se encuentra en: Annelida, Coelenterata, Platyhelminthes, Nemertea, Mollusca, Phoronida, Arthropoda, Echinodermata, Hemichordata, y Chordata. Además, la arginina quinasa es considerada el miembro mas cercano a las guanidino quinasa ancestrales (Suzuki, 1997).

Para llevar a cabo el estudio de la arginina quinasa en tripanosomátidos se trabajó con *Trypanosoma brucei brucei* el cual es un parásito de los animales silvestres y domésticos que no es infeccioso para los seres humanos.

Al estudiar la actividad arginina quinasa en extractos solubles de la forma procíclica de *Trypanosoma brucei brucei* la actividad específica obtenida fue similar a la que se obtiene con epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* de la cepa CL Brener. Pero a la vez esta actividad específica es al menos un orden de magnitud menor a la encontrada en insectos. Para evaluar posibles variaciones en las mediciones llevadas a cabo con distintas técnicas, se preparó y midió un extracto proveniente de músculo de pata de grillo. Los resultados obtenidos, confirmaron la observación de las diferencias en las actividades específicas.

Al realizar ensayos de "Western Blot" se determino la presencia de un polipéptido de 40 kDa en extractos provenientes de la forma procíclica de *T. brucei*. Además, otro polipéptido de 45 kDa también fue reconocido por el anticuerpo sugiriendo la presencia de mas de una enzima en los extractos de *T. brucei*, o una posible modificación post-traducciona capaz de modificar la movilidad electroforética.

Por el peso molecular (45 kDa) podría tratarse de una creatina quinasa o una glicociamina quinasa.

Como se explico en la introducción la arginina quinasa puede actuar como un "Buffer" espacial de ATP, para lo que hace falta la presencia de una enzima en un sitio que actué como fuente, y otra enzima en el sitio de destino. Cada una de estas enzimas estaría funcionando en una dirección distinta y de esa manera se logra transferir fosfatos de alta energía desde un punto con alta producción a otro punto donde existe un alto consumo.

Otra posibilidad seria la existencia de otra guanidino quinasa, presente en este parásito.

Para el clonado del gen de la arginina quinasa fue de gran utilidad las secuencias disponibles en las bases de datos de los proyectos genoma. Se utilizaron secuencias de “estudios de secuencias genómicas” (GSSs, por sus siglas en inglés) y “etiquetas de secuencias expresadas” (ESTs, por sus siglas en inglés). En base a la información brindada por estas secuencias se logró amplificar una secuencia correspondiente a una hipotética arginina quinasa. Dicha secuencia al ser estudiada en detalle, presentó una alta identidad de aminoácidos con su par presente en *Trypanosoma cruzi* y además presentó en su estructura primaria todas las regiones y aminoácidos importantes para la actividad catalítica.

Al realizar estudio filogenéticos se observó claramente la similitud de secuencias existente entre la arginina quinasa del *phyla* Sarcomastigophora (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*) y Arthropoda. Sugiriendo una posible transferencia horizontal de genes durante la evolución conjunta de parásito y vector.

Por último, es importante destacar que existen dos grupos distintos dentro del género tripanosoma que evolucionaron independientemente después de la separación de África y América. Por lo tanto el género *Trypanosoma* se divide en dos secciones: salivaria y estercolaria. En la primera están comprendidos Tripanosomas patógenos que se multiplican en el estadio tripomastigote en el mamífero, completan el desarrollo en la parte anterior del vector, y son transmitidos por inoculación, como por ejemplo el *Trypanosoma brucei*.

En la segunda se agrupan especies no patógenas (con la excepción de *T. Cruzi*). Se multiplican en el mamífero como amastigotes o como epimastigotes en el insecto, completando su desarrollo en la parte posterior del vector y son transmitidos por contaminación.

Por lo tanto la evidencia que aquí se presenta indica que la arginina quinasa, es común a estos dos grupos. Sin embargo como ya se expresó anteriormente la actividad específica encontrada en los tripanosomátidos resultó ser un orden de magnitud menor a la encontrada en artrópodos, por lo que posiblemente estos parásitos posean además otra fuente de reserva de energía.

Como se expresó en la introducción, el clonado de transportadores, al igual que como ocurre con otras proteínas de membrana, es sumamente dificultoso.

Pero actualmente se dispone de una serie de herramientas que permiten utilizar secuencias de transportadores ya clonado para realizar búsquedas en bases de datos. Además, la gran conservación de la relación estructura-función, permite

arribar con éxito al clonado de un transportador, al cual posiblemente aún no se lo ha caracterizado.

En el caso del clonado del hipotético gen de un transportador de aminoácidos de *Trypanosoma brucei* que se describe aquí, se comenzó una búsqueda en distintas bases de datos, que contienen secuencias de proyectos genoma de parásitos, como por ejemplo la del Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/>), utilizando como entrada para la búsqueda, una secuencia de *Dictyostelium discoideum* similar a un transportador de alta afinidad para aminoácidos cationicos (gb AF015566). Dentro de los resultados se detectó una secuencia con gran similitud presente en el cromosoma VI de *Trypanosoma brucei* (EMBL: AC007863). Al buscar en el cromosoma VI de *Trypanosoma brucei* distintos marcos abiertos de lectura, se encontró uno que codifica para un polipéptido de 539 aminoácidos, que al ser estudiado, presento una alta identidad con otros transportadores de aminoácidos (figura 4.7). Luego mediante estudios de hidropatia se determinó que presenta 10 hipotéticos pasos tranasmembrana. Actualmente se esta trabajando en la expresión de esta proteína en sistemas heterólogos para de esa manera demostrar su función.

Conclusiones

POBLACIONES DE PARASITOS TRANSFECTADOS ESTABLEMENTE

Se obtuvieron poblaciones de parásitos transfectados establemente que sobre-expresan la arginina quinasa hasta 60 veces por sobre el control realizado con parásitos transfectados con una construcción que sobre-expresa la proteína verde fluorescente (GFP).

Se obtuvo una población en la cual los niveles de arginina quinasa se lograron disminuir entre un 70–80 %, utilizando una secuencia de 162 pb capaz de aparearse con la región 5' no codificante del ARNm de la arginina quinasa y con los primer 110 nucleótidos de la región que sera traducida.

El caso de la supresión funcional, resulto ser una población inestable y al ir finalizando el proceso de selección se perdió el fenotipo supresor. Este efecto ya ha sido descrito en el pasado (Tovar, 1996).

Eventos independientes de transfección utilizando el vector de expresión específico de *T. cruzi*, pTREX-A brindaron distintos niveles de sobre-expresión.

La población de parásitos transfectados que sobre-expresa la arginina quinasa hasta tres veces no mostró diferencias en su cinética de crecimiento al se comparado con los controles transfectados con GFP.

La población de parásitos transfectados que sobre-expresa la arginina quinasa hasta tres veces no mostró diferencias en los ensayos de invasión a células susceptibles al se comparado con los controles transfectados con GFP.

La población con altos niveles de sobre-expresión (60 veces) presento una cinética de crecimiento superior a los controles de GFP. Esta cinética de crecimiento la logran mantener aun cuando el cultivo se encuentra en una alta densidad.

En ensayos de diferenciación celular, los parásitos que sobre-expresaron hasta tres veces la arginina quinasa no mostraron diferencias. Estos ensayos no se pueden considerar concluyentes ya que en todos los ensayos hechos fue elevada la mortalidad al poner los parásitos en el medio de diferenciación.

REGULACIÓN DE LA ARGININA QUINASA Y EL TRANSPORTE DE ARGININA DURANTE LA CURVA DE CRECIMIENTO

La actividad arginina quinasa aumenta aproximadamente 7 veces durante la curva de crecimiento.

El máximo nivel de aumento se observa en los primeros tres días del cultivo.

El aumento observado al envejecer el cultivo se puede obtener si a parásitos del día 3 se los trata con medio condicionado proveniente de parásitos del día 9.

Hay un alto grado de correlación entre el aumento en la actividad arginina quinasa y la proliferación celular. (recordar el efecto observado en los parásitos que sobre-expresan la arginina quinasa).

Al estudiar el nivel de regulación por el cual la actividad arginina quinasa va aumentando durante la curva de crecimiento, no se vio variaciones en el nivel del ARNm que codifica para esta enzima, en tanto que los niveles de proteína arginina quinasa aumentaron de manera comparable a la actividad.

Mediante la utilización del modelo con altos niveles de sobre-expresión se determinó la existencia de un importante nivel de degradación de la arginina quinasa en los primeros días del cultivo, por lo que la regulación de los niveles intracelulares de esta enzima parecerían estar regulados por estabilización proteica.

Al estudiar las variaciones del medio de cultivo durante las distintas fases de crecimiento, puede ver que aproximadamente en el día 6, cuando la glucosa comienza a ser escasa, se inicia la degradación de fuentes de carbono nitrogenadas y el pH del medio comienza a subir.

Los niveles de transporte de arginina disminuyen continuamente durante las distintas etapas de la curva de crecimiento de modo que acompaña la disminución en la tasa de replicación determinada como número de divisiones celulares por día.

Al igual que como se observo con la actividad arginina quinasa, el transporte de arginina también responde a los cambios de medio, por ejemplo al pasar

epimastigotes del día 14 a medio LIT fresco se ve una rápida recuperación de la actividad de transporte.

En tripomastigotes hay una alta actividad arginina quinasa y el transporte es casi nulo (30 veces menor que el observado en epimastigotes del día 7)

Los niveles de proteína arginina quinasa también son altos en tripomastigotes al ser evaluados en ensayos de "Western Blot".

Al impedir la replicación de los parásitos por tratamiento con un agente antimitótico el transporte de arginina disminuye. Luego de lavar se recuperan los valores normales de transporte.

ESTUDIO DEL METABOLISMO DE ARGININA EN TRIPANOSOMÁTIDOS AFRICANOS.

Se clonó la arginina quinasa de *Trypanosoma brucei*.

La actividad específica de la AK de *T. brucei* es comparada a la de su par presente en *T. cruzi*.

Por análisis de secuencias se halló una secuencia presente en el cromosoma VI de *T. brucei* que codifica para un supuesto transportador de aminoácidos.

REFERENCIAS

Adroher, F.J., Osuna, A. and Lupiáñez, J.A. (1990) Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. II. Hexokinase, phosphofructokinase and piruvate kinase. Mol. Cell. Biochem. 94:71–82.

Alexandre, S., Paindavoine, P., Tebabi, P., Pays, A., Halleux, S., Steitner, M. and Pays, E. (1990) Differential expression of a family of putative adenylate/guanylate cyclase genes in *T. brucei*. Mol. Biochem. Parasitol. 43:279–288.

Amado Neto, V. (1968) Transmissao por transfusao de sangue un Doenca de Chagas, Cancado, R, (Ed) Belo Horizonte, 130–142.

Andrade, Z. (1991) Pathogenesis of Chagas' disease. Res. Immunol. 142, 126.

Andrews N.W., Abrams C.K., Slatin S.L. & Griffiths G. (1990) A *Trypanosoma cruzi* secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. Cell 61, 1277.

Andrews, N.W. & Colli W. (1982) Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. J. Protozool. 29, 264.

Argos, P., Rao, J.K.N. & Hargrave, P.A., Eur. J. Biochem., 128, 565, 1982.

Avila H., & Avila A. (1981) *Trypanosoma cruzi*: allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas' disease. Exp. Parasitol. 51, 204.

Bairoch, A. (1991). PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. Nucleic Acid Res. 16: 2241–2245.

Bera, T. (1987). Mol. Biochem. Parasitol. 23:183–192.

Boothroyd J.C. (1990) "Molecular biology of trypanosomatids" en "Modern parasite biology – Cellular, immunological and molecular aspects". Editor: D.J.

Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248–254.

Brener Z. (1980) Immunity to *Trypanosoma cruzi*. Adv. Parasitol. 18, 247.

Brener, Z. & Krettli A. (1990) In Modern parasite biology. Cellular, immunological and molecular aspects. D.J. Wyle W.H. Freeman & Co. New York.

Brener, Z. (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Rev. Microbiol. 27, 347-382.

Brener, Z. (1977) Intraspecific variation of *Trypanosoma cruzi*. PAHO Sci. Publ. 347, 11.

Brener, Z. (1979) O parasito: relacoes hospedeiro-parasito en *Trypanosoma cruzi* e Doenca de Chagas. Brener Z, Andrade Z.(Eds) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp: 1-41.

Brener, Z. (1987). Laboratory-acquired Chagas disease: comment. Trans R Soc Trop Med Hyg 81: 527.

Buchel, D.E., Gronenborn, B., Muller-Hill, B. (1980) Sequence of the lactose permease gene. Nature 283(5747):541-5.

Burri, M., Schlimme, W., Betschart, B., Lindner, H., Kampfer, U., Schaller, J., Hecker, H. (1995) Partial amino acid sequence and functional aspects of histone H1 proteins in *Trypanosoma brucei brucei*. Biol. Cell 83(1):23-31.

Carlomagno, M., Cura, E., Pérez, A., Segura, E. (1989) Informe sobre Chagas. Ciencia Hoy, 1, 37.

Cassel, D., Shoubi, S., Glusman, G., Cukierman, E., Rotman, M. and Zilberstein, D. (1991) *Leishmania donovani*: characterization of a 38 kDa membrane protein that cross-reacts with the mammalian G protein transducin. Exp Parasitol 72:411-417.

Castro, C., Craig, S. P. & Castañeda, M. (1981) Genome organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 4, 273.

Cazzulo J.J. (1994) Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. J. Bioenerg. And Biomembranes, 26, 2, 157.

Cazzulo, J.J. (1992) Faseb J. 6:3153-3161.

Cerisola, J. (1977) Chemotherapy of Chagas' infection in man. PAHO Sc. Publications 347, 35.

Chagas C. (1909) Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1, 159.

Cohen, G.N., and J. Monod. (1957) Bacterial permeases. Bacteriol. Rev. 21:169-194.

Coso, O.A., Díaz-Añel, A., Martinetto, H., Muschetti, J.P., Kazanietz, M., Fraindenraich, D., Torres, H.N. and Flawiá, M.M. (1992) Characterization of a G_i-protein from *Trypanosoma cruzi* epimastigote membranes. Biochem. J. 287:443-446.

Coulter, L.J., and Hide, G. (1995) *Trypanosoma brucei*: characterization of a life cycle stage specific G-protein. Exp. Parasitol. 80:308-318.

De Moraes, C., Higuchi, M. & Lage, S. (1989) Chagas' heart disease and myocardial infarct. Incidence and report of four necropsy cases. Ann. Trop. Med. Parasitol. 83, 207.

De Souza, W. (1984) Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Int. Rev. of Cytology 86, 197.

De Souza, W. (1999) A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94, 17-36.

Dias J.C.P. (1993) Vigilancia epidemiológica contra *Triatoma infestans*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 26, 39-44.

Dias, J.C.P. & Schofield, C.J. (1999) The Evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 Years since Carlos Chagas Discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94, 103-121.

Docampo, R., and Pignataro, O. (1991) The inositol phosphate/diacylglycerol signaling pathway in *Trypanosoma cruzi*. Biochem. J. 275:407-411.

Doumen, C., Ellington, W.R. (1990) Mitochondrial arginine kinase from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. II. Catalytic properties and studies of potential coupling with oxidative phosphorylation. *J. Comp. Physiol. B* 160:458-68.

Dvorak, J. (1975) New *in vitro* approach to quantitation of *Trypanosoma cruzi* vertebrates cell interactions. *New Approaches Am. Trypanosom. Res. Sci. Pub.* 318, 109.

Eisenschlos, C., Paladini, A.A., Molina y Vedia, L., Torres, H.N. and Flawiá M.M. (1986) Evidence for the existence of an Ns-type regulatory protein in *Trypanosoma cruzi* membranes. *Biochem. J.* 237:913-917.

Ellington, W.R. (2001) Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annu. Rev. Physiol.* 63:289-325.

Fairlamb, A. & Le Quesne, S. (1997). *Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Biology and Control*. Hide G, Mottram J, Coombs G, Homes P (Eds.) pp 149-162. CAB International. Oxon, UK.

Fairlamb, A. (1990). *Biochem. Soc. Trans.* 18:717-720.

Ferreira, M.S., Nishioka, S.A., Rocha, A., Silva, A.M. (1997). Doença de Chagas e imunossupressão, p. 365-382. In JCP Dias & JR Coura (eds) *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Um Manual Prático para o Clínico Geral*, Fiocruz, Rio de Janeiro.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S. and Mello, C. (1998) *Nature* 391: 806-811.

Flawiá, M.M., Téllez Iñón, M.T. and Torres, H.N. (1997) Signal Transduction Mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. today* 13:30-33.

Fraidenraich, D., Peña, C., Isola, E.L., Lammel, E.M., Coso, O., Añel, A.D., Pongor, S., Baralle, F., Torres, H.N., Flawiá, M.M. 1993. Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an α D-globin fragment from *Triatoma hindgut*. Effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10140-10144.

Galanti, N., Dvorak, J., Grenet, J., McDaniel, J. (1994). Hydroxyurea induced synchrony of DNA replication in kinetoplastida. *Exp. Cell Res.* 214:225–230.

Gallerano, R., Marr, J. & Sosa, R. (1990) Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *Am. Trop. Med. Hyg.* 43, 159.

Gazzola, G.C., Franchi, R., Saibene, V., Ronchi, P. and Guidotti, G.G. (1972) *Biochem. Biophys Acta* 266:407–421.

Gazzola, R.F., Sala, R., Bussolati, O., Visigalli, R., Dall Asta, V., Ganapathy, V., Gazzola, G.C. (2001) The adaptative regulation of amino acid transport system A is associated to changes in ATA2 expression. *FEBS Letters* 490:11–14.

Gomez, M.L., Erijman, L., Arauzo, S., Torres, H.N., and Téllez-Iñón, M.T. (1989) Protein kinase C in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes forms: partial purification and characterization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36:101–108.

Gonzalez Cappa S.M., Kloetzel, J., Katzin, A.M. & Riberio dos Santos, R. (1980) *Trypanosoma cruzi*: activity of immune sera on surface antigens. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 22, 6, 275.

Gonzalez Cappa, S.M., & Isola E.L.D. (1994) "El parásito" en "Enfermedad de Chagas". Editores: Storino R. & Milei J. Doyma Argentina, Buenos Aires, p. 31.

Greig, S., Ashall, F. & Hudson, L. (1990) Use of total parasite DNA probes for the direct detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in domiciliary *Rhodnius prolixus*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 59.

Guex, N., Diemand, A., and Peitsch, M.C. (1999) Protein modeling for all. *Trends Biochem Sci.* 24:364–367.

Guhl, F., Hudson, L., Marinkelle, C., Jaramillo, C. & Bridge, D. (1987) Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. *Parasitology* 94, 475.

Haag, J., O'hUigin, C., Overath, P. (1998) The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91, 37–49.

Hediger, M.A. (1994) Structure, function and evolution of solute transporters in prokaryotes and eukaryotes. *J. Exp. Biol.* 196: 15–49.

Higgins, C.F. (1995) The ABC of channel regulation. *Cell* 82:693–696.

Hird, F. (1983) On the possible significance of the transamidation reaction in evolution. *Comp. Biochem. Physiol.* 76B(3):489–495.

Hird, F. (1986) The Importance of Arginine in Evolution. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B(2):285–288.

Hird, F., Davuluri, S. and McLean, R. (1982) Evolutionary relationships between arginine and creatine in muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 153:401–6.

Hird, F.J.R., McLean, R.M. (1983) Synthesis of phosphocreatine and phosphoarginine by mitochondria from various sources. *Comp. Biochem. Physiol.* 76B:41–46.

Hird, F.R.J., Robin, Y. (1985) Studies on phosphagen synthesis by mitochondrial preparations. *Comp. Biochem. Physiol.* 80B:517–20.

Hoare C. (1972). *The Trypanosomes of Mammals*, Blakwell Scientific Publications, USA.

Hoff, R., Teixeira, R., Carvalho, J. & Mott, K. (1978) *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during during the acute stage of Chagas' disease. *N. Engl. J. Med.* 298, 604.

Hyde, J. (1983) *Protocols in Molecular Parasitology*. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.

Isola E.L.D. & Gonzalez Cappa, S.M. (1994) "Vectores transmisores: triatominos "vinchucas." en "Enfermedad de Chagas." Editores: Storino R. & Milei J. Doyma Argentina, Buenos Aires.

Kaback, H.R. (1974) Transport studies in bacterial membrane vesicles. *Science* 186:882–892.

Kaback, H.R. (1997) A molecular mechanism for energy coupling in a membrane transport protein, the lactose permease of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:5539–5543.

Keith, K., Hide, G. and Tait, A. (1990) characterization of a protein kinase C like activities in *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol. 43:107–116.

Kennerdell, R. and Carthew, R. (1998) 95: 1017–1026.

Kollien, A.H. and Schaub, G.A. (2000) Parasitol. Today 16, 381–387.

Kyte, J. & Doolittle, R.F., J. Mol. Biol., 157, 105, 1982.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–5.

Le Quesne, S. & Fairlamb, A. (1996). Biochem. J. 316(2):481–486.

Lee, C.A., Saier, M.H. Jr. (1983) Mannitol-specific enzyme II of the bacterial phosphotransferase system. III. The nucleotide sequence of the permease gene. J. Biol. Chem. 258(17):10761–7.

Ley, V., Robbins, E.S., Nussenzweig, V. & Andrews, N.W. (1990) The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. J. Exp. Med. 171, 401–413.

Majumder, S., Wirth, J., Bitonti, A., McCann, P. & Kierszenbaum, F. (1992). J. Parasitol. 78:371–374.

Mandell, G.L., Douglas, R.G., Bennett, J.E. (1991) Enfermedades Infecciosas. Principio y practica. Panamericana (Ed.) 2213–2219pp. Buenos Aires, Argentina.

Marques Porto, R., Amino, R., Elias, M.C., Faria, M., Schenkman, S. (2002) Histone H1 is phosphorylated in non-replicating and infective forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol, 119(2):265–271.

Marsden, P.D. (1988). The Biology of parasitism (Englund P.T. and Sher A Eds) 9: 77–92. Alan R., Liss, New York.

Mazza, S., (1943). Prensa Médica Arg. 30: 1583:1595.

Meyer, R.A., Sweeney, H.L., Kushmerick, M.J. (1984) A simple analysis of the "phosphocreatine shuttle". Am. J. Physiol. Cell Physiol. 246:C365-C77.

Milei, J. (1994) "Patología" en "Enfermedad de Chagas" Editores: Storino R. & Milei J. Doyma Argentina, Buenos Aires, p. 141.

Misquita, L. and Paterson, B. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 1451-1456.

Moreno, S., Silva, J., Verseci, A. and Docampo, R. (1994) Cytosolic free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion J. Exp. Med. 180:1535:1540.

Mori, M., Gotoh, T. (2000) Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 275(3):715-9.

Morrison, J. (1973). The Enzymes, Vol VIIIA, Chap. 13, 457-486pp. Boyer P. (Ed.). Academic Press (Ed.). New York, USA.

Nathan, C. (1995) Cell 82:873-876.

Needham, D.M., Needham, J., Baldwin, E., Yudkin, Y. (1932) A comparative study of the phosphagens, with some remarks on the origin of the vertebrates. Nature 110:260-94.

Ngo Huan, Tschudi, C., Gull Keith and Ullu, Elisabetta (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 14687-14692.

Ochat, C., Ulloa, R., Torres, H.N. and Tellés-Iñón, M.T. (1993) Characterization of the catalytic subunit of *Trypanosoma cruzi* cyclic AMP-dependent protein kinase. Mol. Biochem. Parasitol. 57:73-81.

Oguetta, S., Solari, A., and Téllez-Iñón, M.T. (1994) *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms possess a Ca²⁺-calmodulin dependent protein kinase. FEBS Letters 337:293-297.

Okumara, M., Correa-Neto, A. & Silva, A. (1962) Contribução para o estudo da patogenia das lesões vasculares na doença de Chagas experimental em camundongos branco. Rev. Paul. Med. 61, 265.

Oliveira, J., Correa De Araujo, R., Navarro, M. & Mucillo, G. (1983) Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas heart disease. Am. J. Cardiol. 52, 147.

Ortega-Barria, E. & Pereira, M.E.A. (1991) A new *Trypanosoma cruzi* heparin-binding protein promoted fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomas into mammalian cells. Cell 67, 411.

Ouassiss, A., Cornette, J., Schonek, R., Plumas-Marty, B., Taibi, A., Lloyens, M. and Capron, A. (1992) Fibronectin cleavage fragments provides a growth factor-like activity for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes to amastigotes. Eur. J. Cell. Biol. 59:68-79.

Paindavoine, P., Rolin, S., Van Assel, S., Geuskens, M. Jauniaux, J., Dinsart, C., Huert, G., and Pays, E. (1992) A gene for the VSG expression site encodes one of several adenylate cyclases located on the flagellum of *Trypanosoma brucei*. Mol Cell Biol. 12:1218.

Pereira C., Alonso G., Paveto C., Flawiá M. and Torres H. (1999) L-Arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in *Trypanosoma cruzi*. J. Eukaryot. Microbiol., 46: 566-570.

Pereira, C.A., Alonso, G.D., Paveto, M.C., Iribarren, A, Cabanas, M.L., Torres, H.N. and Flawiá, M.M., (2000) *Trypanosoma cruzi* Arginine Kinase Characterization and Cloning: A NOVEL ENERGETIC PATHWAY IN PROTOZOAN PARASITES. J. Biol. Chem. 275: 1495-1501.

Persson, B., Argos, P. (1994) Prediction of transmembrane segments in proteins utilizing multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 237(2):182-92.

Persson, B., Argos, P. (1996) Topology prediction of membrane proteins. Protein Sci 1996 Feb;5(2):363-71.

Plessmann Camargo, E., Coelho, J., Moraes, G. & Figueiredo, E. (1978). *Trypanosoma spp.*, *Leishmania spp.* and *Leptomonas spp.*: Enzymes of ornithine-arginine metabolism. *Exp. Parasitol.* 46:141-144.

Racagni, G., Garcia de Lerma, M., Domenech, C., and Machado de Domenech, E. (1992) Phospholipids in *Trypanosoma cruzi*: phosphoinositide composition and turnover. *Lipids* 27:275-278.

Recinos, R.F., Kirchoff, L.V., Donelson, J.E. (2001) Cell cycle expression of histone genes in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113: 215-222.

Remedi, M.S., Scaraffia, P., Rodríguez, M., Bronia, D.H. and Gerez de Burgos, N.M. (1997) *Acta Physiol. Pharmacol. Therap. Latinoam.* 47:64-68.

Rezende, J. & Luquetti, A. (1994) Megaformaciones chagásicas. En *Enfermedad de Chagas*, Editores: Storino, R.; Milei, J., Ed. Doyma Argentina, Bs. As., Cap. 20 p. 160.

Robin, Y. (1964). Biological distribution of guanidines and phosphagens in marine annelida and related *phyla* with a note on pluriphosphagens. *Comp. Biochem. Physiol.* 12:347-67.

Romaña, C., (1963) *Enfermedad de Chagas*. López Libreros Ed., Buenos Aires.

Ross, D., Raibaud, A., Florent, I., Sather, S., Gross, M., Strom, D. and Eisen, H. (1991) The Trypanosome VSG expression site encodes adenylate cyclase and a leucine rich putative regulatory gene. *EMBO J.* 10:2047-2053.

Saier, M.H. Jr. (2000) A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(2):354-411.

Sanchez, M., Zeolli, D., Klamo, E., Kavanaugh, M., and Landfear, S. (1985) A family of putative receptor adenylate cyclases from *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 270:17551-17558.

Santori, M.I., Laria, S., Gomez, E.B., Espinosa, I., Galanti, N., Téllez-Iñón, M.T. (2002) Evidence for CRK3 participation in the cell division cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* (in Press).

Schmunis, G.A. (1991) *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and non-endemic countries. *Transfusion*. 31, 547-557.

Schmunis, G.A. Zicker, F., Moncayo, A. (1996) Interruption of Chagas disease transmission through vector elimination. *The lancet*. 348, 1171.

Schmuñiz, G.A. & Szarfman, A. (1977). *Medicina* 37: 47-53.

Schofield, C.J., Dias, J.C.P. (1999) The Southern Cone programme against Chagas disease. *Adv. Parasitol.*42, 1-25.

Scott, M. & Snary, D. (1982) American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Immunology of parasitic infections*. Blackwell Sc. Pub. 261.

Seebeck, T., Hemphill, A. & Lawson, D. (1990) The cytoskeleton of trypanosomes. *Parasitology Today* 6, 49.

Shikanai-Yasuda, M., Lopes, M., Tolezano, J., Umezawa, A., Amato Neto, V., Pereira Barreto, A., Higaki, Y., Moreira, A., Funayama, G., Barone, A., Duarte, A., Odone, V., Cerri, G., Sato, M., Possi, D. & Shiroma, M. (1990) Doença de Chagas aguda: *vias* de transmissão, aspectos clínicos e resposta à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 32, 16.

Sica, R. (1994) "Compromiso del sistema nervioso". En "Enfermedad de Chagas", Editores: Storino, R.; Milei, J., Ed. Doyma Argentina, Bs. As., Cap. 18: p. 303.

Simpson, L. & Show, J. (1989) RNA editing and the mitochondrial cryptogenes of kinetoplastid protozoa. *Cell* 57: 355.

Sommer, J.M. and Wang, C.C. (1994) Targeting proteins to the glycosome of African trypanosomes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:105-138.

Stathopoulos, P.B., Lu, X., Shen, J., Scott, J.A., Hammond, J.R., McCormack, D.G., Arnold, J.M., Feng, Q. (2001) Increased L-arginine uptake and inducible nitric oxide synthase activity in aortas of rats with heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280(2):859-867.

Storino, R. & Barragán, H. (1994) "Epidemiología." en "Enfermedad de Chagas." Editores: Storino R. & Milei J. Doyma Argentina, Buenos Aires.

Suzuki, T., Kawasaki, Y., Furukohri, T. & Ellington, R. (1997). Evolution of phosphagen kinase. VI. Isolation, characterization and cDNA-derived amino acid sequence of lombricine kinase from the earthworm *Eisenia foetida*, and identification of a possible candidate for the guanidine substrate recognition site. *Biochim. Biophys. Acta.* 1348:152-159.

Tanowitz, H., Kirchhoff, L., Simon, D., Morris, S., Weiss, L. & Wittner, M. (1992) Chagas' Disease. *Clinical Microb. Reviews* Oct., 400.

Teague, W. Jr. and Dobson, G. (1999) Thermodynamics of arginine kinase reaction. *J. Biol. Chem.* 274(32):22459-22463.

ter Kuile, B.H. (1997) Adaptation of metabolic Enzyme Activities of *Trypanosoma brucei* promastigotes to growth rate and carbon regimen. *J. Bacteriol.* 179:4699-4705.

Torres, H.N., Téllez-Iñón, M.T. and Flawiá, M.M. (1999) *Trypanosoma cruzi*: a model for studies of signal transduction pathways in lower eukaryotic organisms. *Research and Reviews in Parasitol.* 59(3-4):101-106.

Tovar, J. And Fairlamb, A. (1996) Extrachromosomal, homologous expression of trypanotione reductase and its complementary mRNA in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res.* 24:2942-2949.

Trischman, T. (1983) Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* 130, 1953.

Ulloa, R., Mesri, E., Esteva, M., Torres, H. and Telléz-Iñón, M.T. (1988) Cyclic AMP dependent protein kinase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 255:319-326.

Ulyses de Carvalho, T. M. y De Souza, W. (1989). *Cell Struct. Funct.* 14: 383:392.
Vazquez, M. and Levinm M. (1999) Functional analysis of the intergenic regions of TcP2 β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene* 239:217-225.

Vazquez, M.P. and Levin, M.J. (1999) Functional analysis of the intergenic regions of TcP2 β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene* 239(2):207–216.

Vickerman, K. 1976, "The diversity of kinetoplastid flagellates" en "Biology of the Kinetoplastida" Editores: W. H. R. Lumsden y D. H. Evans. Academic Press, New York Vol. 1, p. 1.

Walliman, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicoay, K. and Eppenberger, H.M. (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* 281:21–40.
Wang, Y., Esbensen, P. & Bentley, D. (1998). Arginine kinase expression and localization in growth cone migration. *J Neurosci.* 18(3):987–998.

Watts, D. (1973). *The Enzymes*, Vol VIII A, Chap. 12, 383–455pp. Boyer P. (Ed.). Academic Press (Ed.). New York, USA.

Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M.E., Rassi, A. (1992) Chagas Disease (American Tripanosomiasis): its impact on transfusión and clinical medicine, ISBT, Sao Paulo, 271 pp.

WHO (1987) Chagas' Disease. Tropical disease research: a global partnership (8th programme report). WHO, Geneva: 89.

WHO (World Health Organization). Health Organization). (1997) Tropical Disease Research. Thirteenth programme report. 112–123p.

WHO (World Health Organization). (1991) Report a WHO Expert Committee, Geneva . WHO Technical Report Series 811, 95 p.

WHO (World Health Organization). (1994) Tropical Disease Research. Twelfth programme report. 125–137p.

Wu, G. & Morris, S. (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 336:1–17.

Wylar. W.H. Freeman and Co., New York, p. 333.

Zhou, G., Somasundaram, T., Blanc, E., Parthasarathy, G., Ellington, R. & Chapman, M. (1998). Transition state structure of arginine kinase: implications for catalysis of bimolecular reactions. Proc. Natl. Acad. Sci, USA. 95:8449–8454.

Zingales, B. & Colli, W. (1985) "*Trypanosoma cruzi*: Interaction with Host Cells" en "The Biology of Trypanosomas". Current Topics in Microbiology and Immunology. Ed. Springer - Verlag Berlin, Heidelberg. Vol. 117 p. 128.



Dra. Mirtha M. Flawia
Profesor Titular
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
U.B.A.



Alonso, G.