

Tesis de Posgrado

Trypanosoma cruzi : Mecanismos reguladores de la metaciclogénesis

Wainszelbaum, Marisa

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:

Wainszelbaum, Marisa. (2002). Trypanosoma cruzi : Mecanismos reguladores de la metaciclogénesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3467_Wainszelbaum.pdf

Cita tipo Chicago:

Wainszelbaum, Marisa. "Trypanosoma cruzi : Mecanismos reguladores de la metaciclogénesis". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3467_Wainszelbaum.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

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

***Trypanosoma cruzi*: Mecanismos reguladores de la
metaciclogénesis**

Lic. Marisa Wainszelbaum

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

Directora: Dra. Elvira L. Durante de Isola
Director Asistente: Dr. Jorge Florin-Christensen

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología
Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires
2002

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Poly Isola por permitirme trabajar en su grupo y tener confianza en mi. Gracias Doc por su ayuda constante, en todos los aspectos de mi vida, no sólo la parte científica.

Al Dr. Jorge Florin-Christensen, por guiarme en el mundo de los lípidos y permitirme descubrir que son “muy interesantes”. Por tantas horas en el laboratorio o frente a la computadora: gracias!

A la Dra. González Cappa por aceptarme en el Área de Parasitología del Departamento, y estar siempre disponible para escucharme y aconsejarme.

A Estela por enseñarme todo sobre el *Trypanosoma cruzi* y el trabajo en el laboratorio en general, y porque sin su organización y dedicación, nada hubiera sido posible.

A Silvi, mi compañera en la facu, en el laboratorio, y amiga en la vida. Por su ayuda en mis comienzos y por “bajarme” a la realidad con sus consejos centrados y ubicados. Por tantas charlas mientras trabajábamos, que realmente se extrañan mucho.

A Laura, mi compañerita de estos últimos años. Gracias Lau, por tu ayuda constante y porque es un placer trabajar con tanta alegría y buena onda.

A Lien, por tantos años compartiendo el trabajo y por estar siempre disponible para organizar salidas, asados o “happy hours”.

A las más chiquitas y nuevitas del grupo, Meche y Guada, por la colaboración en los momentos críticos y por haber traído “nuevos aires” al laboratorio.

A Damián y a Luis, ya que sin su asistencia, gran parte de los experimentos desarrollados en esta Tesis no hubieran sido posibles.

A mis compañeros del piso 13: Fernanda, M. Elisa, Susana, Gerardo, Cata, Vale, Lubiana, Marikena, Gloria, Anette.

Quiero agradecer especialmente a Gloria y Susana por la colaboración en los ensayos de medición de trans-sialidasa, y al Dr. J.J.B. Cannata por los ensayos de localización subcelular.

A la Dra. Mónica Florin-Christensen, por enseñarme en mis comienzos la metodología de trabajo con los lípidos y por tantas “conversaciones” por mail.

Al Dr. Malchiodi por su ayuda en las cromatografías y su apoyo técnico en general.

Al Dr. Isola por malcriarnos con tantos alfajores y chocolates y por tener siempre un ratito para preguntarme por mis cosas.

A Alejandro Barbieri, por su ayuda a la distancia.

A Gaby y Fer, mis amigas las “diseñadoras” por la ayuda en el diseño de los posters y especialmente el de esta Tesis.

Y finalmente pero principalmente, a mis padres y a mi “hermanito” por acompañarme y apoyarme en todas las etapas de mi vida, pero muy especialmente con mi “ansiedad” de estos últimos días. Los quiero mucho!!!

A mi abuelo Vinke, que me regaló la historia de su vida y a quien me hubiera gustado regalarle esta parte de la mía.

Solo se crece llegando al final de algo y empezando otra cosa...

John Irving

En el intestino de su vector, insecto hematófago, *Trypanosoma cruzi*, se encuentra expuesto a una gran variedad de compuestos. Algunos de éstos inducen la diferenciación del parásito hacia su estadio de tripomastigote metacíclico, que es la forma infectante. Este proceso implica la activación de vías específicas de señalización. En esta Tesis investigamos la generación de moléculas liposolubles con actividad metaciclogénica y su mecanismo de acción. Demostramos que los ácidos grasos libres, juegan un rol importante en la metaciclogénesis, el que puede explicarse por la activación de la proteína kinasa C (PKC). La generación de estos ácidos grasos libres tiene lugar por efecto de fosfolipasas exógenas (del intestino del vector) y endógenas (del tripanosoma) actuando en forma concurrente. Estas fosfolipasas han sido aisladas y caracterizadas. Los ácidos grasos libres estimulan la generación de diacilglicerol, contribuyendo a explicar su efecto activador sobre la PKC. A este efecto, se suma la aparición de aumentos de calcio citoplásmico, por exposición a extractos intestinales, que ha sido demostrada anteriormente, con lo que se generan simultáneamente los dos segundos mensajeros (iones calcio y diacilglicerol), requeridos para la activación de la PKC.

Estudios previos indicaron que la digestión de la hemoglobina genera péptidos metaciclogénicos que actúan a través de la proteína kinasa A (PKA) del parásito. Existen en consecuencia mecanismos redundantes, mediados por la PKC y la PKA, que aseguran la diferenciación celular en *Trypanosoma cruzi*. En ambos casos, péptidos de la hemoglobina y ácidos grasos libres, son productos de la digestión de la sangre. Un posible significado biológico de estas observaciones es que dichos productos desempeñen un rol coordinador entre la fisiología alimentaria del insecto y la aparición de las formas infectantes del parásito.

Inside the intestinal medium of its blood sucking vector, *Trypanosoma cruzi* is exposed to large variety of compounds. Some of these induce the differentiation of the parasite to its infective metacyclic trypomastigote stage. This process implies the activation of specific signaling pathways. In this Thesis we investigate the generation of lipid soluble molecules with metacyclogenetic activity and their mechanism of action. We show that free fatty acids play a key role in this process which can be explained through the activation of protein kinase C (PKC). The generation of those free fatty acids takes place through exogenous (intestinal) and endogenous (trypanosomal) phospholipases which act concurrently. These phospholipases have been characterized in this work. The free fatty acids stimulate the formation of diacylglycerol thus, accounting for the PKC-activating effects. Cytoplasmic calcium peaks have been demonstrated to take place upon stimulation with the intestinal extracts. Therefore, both second messengers, diacylglycerol and calcium; appear simultaneously as required for PKC activation.

Previous work has shown that peptides derived from the digestion of hemoglobin, have metacyclogenetic activity through the activation of protein kinase A (PKA) in the parasite. Thus, there are redundant mechanisms, involving PKC and PKA that ensure cell differentiation in *Trypanosoma cruzi*. In both cases, hemoglobin peptides and free fatty acids, the regulatory compounds, are blood digestion products. A possible biological meaning of these observations is that such products serve a coordinated role between the feeding physiology of the insect and the appearance of the infective forms of the parasite.

Trabajos realizados durante el período de Tesis

Lysosomal phospholipase A₁ in *Trypanosoma cruzi*: an enzyme with a possible role in the pathogenesis of Chagas's disease. **Wainszelbaum, M.J.**, Isola, E.L.D., Wilkowsky, S.E., Cannata, J.J.B., Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M. Biochemical Journal 355(3):765-770. 2001

Free fatty acids induce metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. **Wainszelbaum, M.J.**, Belaunzarán M.L., Lammel, E.M., Florin-Christensen, M., Florin-Christensen, J., Isola, E.L.D. Remitido para su publicación. 2002

A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes. Florin-Christensen J., Suarez C.E., Florin-Christensen M., **Wainszelbaum M.J.**, Brown W.C., McElwain T.F., Palmer G.H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98(14):7736-41. 2001

Trypanosoma cruzi: participation of intracellular Ca²⁺ during metacyclic trypomastigote-macrophage interaction. Wilkowsky, S.E., **Wainszelbaum, M.J.**, Isola, E.L.D. Biochemical and Biophysical Research Communications 222: 386-389. 1996

INDICE

Abreviaturas

INTRODUCCIÓN

1. Reseña histórica	1
2. Distribución geográfica	1
3. Vías de transmisión	2
4. Enfermedad de Chagas	2
4.1 Etapa aguda	3
4.2 Etapa indeterminada	4
4.3 Etapa crónica	4
5. El parásito	6
5.1 Clasificación taxonómica	6
5.2 Estructura	6
5.3 Estadíos evolutivos	8
6. El insecto vector	10
6.1 Clasificación taxonómica	10
6.2 Generalidades	11
6.3. Características morfológicas	12
6.4 Ciclos de transmisión	14
6.5 Ciclo de vida del parásito	15
6.6 Interacción parásito-vector	16
7. Modelos de metaciclogénesis	17
8. Proliferación y diferenciación en Tripanosomátidos	19

9. Mecanismos de transducción de señales en células eucariotas	19
9.1 La proteína kinasa C (PKC)	20
9.2 El diacilglicerol	23
9.3 El inositol trifosfato y el ión calcio	23
9.4 Las proteínas CaM kinasas	25
9.5 El AMPc y la proteína kinasa A	26
9.6 Los ácidos grasos libres	28
9.7 Los lisofosfolípidos	29
10. Fosfolípidos y fosfolipasas: generalidades	30
10.1 Fosfolipasas A ₁	31
10.2 Fosfolipasas A ₂	32
10.3 Fosfolipasas C	33
10.4 Fosfolipasas D	34
11. Las fosfolipasas y transducción de señales	34
11.1 Fosfolipasas A	34
11.2 Fosfolipasas C	35
11.3 Fosfolipasas D	36
11.4 Fosfolipasas que hidrolizan fosfatidilcolina	37
12. Biosíntesis de diacilglicerol y fosfolípidos	38
12.1 Síntesis de diacilglicerol	39
12.2 Síntesis de fosfolípidos	39

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales	41
2. Parásitos	42
2.1 Epimastigotes	42

2.2	Tripomastigotes metacíclicos	42
2.2.1	Obtención por cultivo axénico	42
2.2.2	Purificación de tripomastigotes metacíclicos	43
2.2.3	Preparación de extracto de intestino posterior de <i>Triatoma infestans</i> (Ei)	44
2.2.4	Evaluación de la actividad biológica de diversos compuestos	44
2.3	Tripomastigotes y amastigotes obtenidos en cultivo celular	45
2.3.1	Células Vero	46
2.4	Obtención de homogenato total de parásitos	46
3.	Extracción y análisis de lípidos	46
3.1	Extracción de lípidos	46
3.2	Cuantificación de lípidos totales del <i>Ei</i>	47
3.3	Cuantificación de ácidos grasos libres (AGL)	48
3.4	Identificación por cromatografía gaseosa de los AGL	48
4.	Relación entre PKC y metaciclogénesis	49
4.1	Diferenciación en parásitos tratados con activadores de la PKC	49
4.2	Efecto de inhibidores de la PKC sobre la diferenciación	49
4.3	Efecto de la regulación negativa (" <i>down-regulation</i> ") de la PKC sobre la diferenciación	50
4.4	Comparación de perfiles de fosforilación de proteínas producidas por <i>Ei</i> , AGL y agonistas de la PKC	50
4.4.1	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	51
4.4.2	Tinción de proteínas con Coomassie Blue	52
4.4.3	Tinción de proteínas con plata	52
4.4.4	Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	53
5.	Incorporación y destino metabólico de los AGL en epimastigotes	54

6. Relación entre metaciclologénesis e inducción de síntesis de lípidos en epimastigotes	55
6.1 inducción de la síntesis de fosfolípidos con factores metaciclologénicos	55
6.2 Inducción de la síntesis de lípidos neutros con <i>Ei</i>	55
6.3 Inducción de la síntesis de lípidos neutros y polares con diferentes concentraciones de ácido oleico	56
7. Degradación de fosfatidilcolina en cultivos de epimastigotes	56
8. Fuentes endógenas de ácidos grasos libres: fosfolipasas en <i>Trypanosoma cruzi</i>	57
8.1 Determinación en epimastigotes	57
8.2 Determinación en tripomastigotes y amastigotes	58
9. Determinación de la actividad de la fosfolipasa A ₁ en <i>T. cruzi</i>	58
9.1 Diseño y optimización del protocolo experimental	58
9.2 Determinación de la actividad fosfolipasa A ₁ sobre fosfatidiletanolamina	60
10. Purificación de la fosfolipasa A ₁ de epimastigotes	60
10.1 Diseño y optimización del protocolo	60
10.2 Purificación de la enzima	61
10.2.1 Preparación de la muestra	61
10.2.2 Cromatografía en DEAE-celulosa	61
10.2.3 Cromatografía en Concanavalina A-Shepharosa	61
10.2.4 Cromatografía en Carboxi-Metil-Sepharosa	62
10.2.5 Análisis electroforético	62
11. Caracterización de la fosfolipasa A ₁ de epimastigotes	62
11.1 Determinación del pH óptimo	62
11.2 Acción de iones sobre la actividad enzimática	63

11.3 Acción de detergentes sobre la actividad enzimática	63
12. Localización subcelular de la fosfolipasa A ₁ de epimastigotes	63
12.1 Tratamiento con digitonina	63
12.2 Sedimentación diferencial	64
12.3 Determinación de la actividad de enzimas marcadoras	65
12.3.1 Actividad de la enzima cruzipaína	65
12.3.2 Actividad de la enzima α -manosidasa	65
12.3.3 Actividad de la enzima citrato sintasa	66
12.3.4 Actividad de la enzima hexokinasa	66
12.3.5 Actividad de la enzima málica	66
12.3.6 Actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxikinasa	67
13. Actividad de la fosfolipasa A en los distintos estadios de <i>Trypanosoma cruzi</i>	67
14. Fuentes exógenas de ácidos grasos: fosfolipasas presentes en el intestino del insecto vector	68
14.1 En el extracto del intestino posterior del <i>Triatoma infestans</i>	68
14.2 En el contenido intestinal de <i>Triatoma infestans</i>	69
15. Digestión de proteínas en gel	69
16. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	70
17. Determinación de proteínas	70
18. Análisis estadístico	70

RESULTADOS

1. Multiplicidad de señales metaciclogénicas

en extractos de intestino de triatomíneos	71
2. Evaluación de la actividad biológica de los lípidos presentes en el extracto de intestino posterior de <i>Triatoma infestans</i>	71
2.1. Concentración de lípidos totales en el <i>Ei</i>	71
2.2. Evaluación biológica de los lípidos totales del <i>Ei</i>	72
3. Análisis de los lípidos presentes en la sangre de gallina y en el <i>Ei</i>	73
3.1. Análisis por cromatografía	73
3.2. Densitometría y cuantificación de los lípidos hallados en la sangre de gallina y en el <i>Ei</i>	75
4. Ácidos grasos libres del <i>Ei</i> y su participación en el proceso de metaciclologénesis	77
4.1. Análisis de la relevancia de los ácidos grasos del <i>Ei</i> en el proceso de metaciclologénesis	77
4.2. Identificación por cromatografía gaseosa de los ácidos grasos libres presentes en el <i>Ei</i>	78
4.3. Actividad biológica de los diferentes ácidos grasos identificados en el <i>Ei</i>	79
5. Relación entre PKC y metaciclologénesis	80
5.1. Diferenciación en parásitos tratados con activadores de la PKC	81
5.2. Efecto de inhibidores de la PKC sobre la diferenciación	82
5.3. Efecto de la regulación negativa (" <i>down-regulation</i> ") de la PKC sobre la diferenciación	84
5.4. Comparación de perfiles de fosforilación de proteínas producidas por <i>Ei</i> , AGL y agonistas de la PKC	86
6. Incorporación y destino metabólico de los ácidos grasos	

en los epimastigotes	87
6.1 Incorporación de ácido oleico y ácido esteárico	87
6.2 Incorporación de ácido palmítico	90
7. Relación entre metaciclologénesis e inducción de síntesis de lípidos en epimastigotes	91
7.1 Inducción de la síntesis de fosfolípidos con factores metaciclologénicos	91
7.2 Inducción de la síntesis de lípidos neutros con <i>Ei</i>	92
7.3 Inducción de la síntesis de lípidos neutros y polares con diferentes concentraciones de ácido oleico	93
8. Incorporación y degradación de fosfatidilcolina en cultivos de epimastigotes	95
9. Estudio de la generación de ácidos grasos libres durante procesos autolíticos	98
10. Determinación de actividad fosfolipasa A en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	100
10.1 Variación de la hidrólisis enzimática de la fosfatidilcolina en función del pH	101
10.2 Variación de la hidrólisis enzimática en función de la concentración de sustrato	102
10.3 Variación de la hidrólisis enzimática en función de los tiempos de incubación	103
10.4 Variación de la hidrólisis enzimática en función de la concentración de proteína presente en epimastigotes	104
10.5 Ensayos de la actividad fosfolipasa con otros sustratos	105
11. Purificación de la fosfolipasa A ₁ de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	106

12. Caracterización de la fosfolipasa A ₁ de epimastigotes	110
12. 1 Determinación del pH óptimo de la fosfolipasa A ₁	110
12.2 Acción de los iones sobre la actividad enzimática	111
12.3 Acción de detergentes sobre la actividad enzimática	111
13. Localización subcelular de la fosfolipasa A ₁ de epimastigotes	112
14. Actividad fosfolipasa A ₁ en los diferentes estadios del parásito	114
15. Generación exógena de ácidos grasos: estudio de fosfolipasas del intestino del vector	117
15.1 En el extracto del intestino posterior del <i>Triatoma infestans</i> (Ei)	117
15.2 En el contenido intestinal de <i>Triatoma infestans</i>	117
DISCUSIÓN	
1. Los ácidos grasos libres presentes en extractos de intestino de <i>Triatoma infestans</i> son metaciclogénicos	119
2. La PKC juega un rol crítico en la metaciclogénesis	122
3. Los ácidos grasos libres estimulan la formación de diacilglicerol y activan la biosíntesis de fosfatidilcolina	127
4. La generación de ácidos grasos libres metaciclogénicos tiene lugar por mecanismos endógenos y exógenos	129
4.1 Mecanismos endógenos de generación de AGL	129
4.2 Mecanismos exógenos de generación de AGL	136
CONCLUSIONES	138
BIBLIOGRAFÍA	143

ADN: ácido desoxiribonucleico

Ae: actividad específica

AGL: ácidos grasos libres

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ATP: adenosina trifosfato

ATPasa: adenosina trifosfatasa

Bisindolilmaleimida: 2-[1-(3-Dimetilaminopropil)-1H-indol-3-il]-3-(1H-indol-3-il)-maleimida

BSA: seroalbúmina bovina

Ca²⁺: ión calcio

cm: centímetros

Con A: concanavalina A

DG: diacilglicerol

Dibutiril-AMPc: N, 2-O-Dibutiriladenosina 3':5'- monofosfato cíclico

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxiribonucleico

EDTA: ácido etiléndiaminotetraacético

EGTA: ácido etilénglicoltetraacético

Ei: extracto de intestino posterior de *Triatoma infestans*

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

GTP: guanosina trifosfato

h: horas

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

HA 1004: N-(2-guanidioetil)-5-isoquinolinesulfonamida

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

hs: horas

IC₅₀: concentración que inhibe el 50 %

IP₃: inositol trifosfato

kDa: kilodalton

k-ADN: ADN del kinetoplástido

K_i: constante de inhibición
LPA: ácido lisofosfatídico
LPC: lisofosfatidilcolina
LPE: lisofosfatidiletanolamina
M: molar
MeOH: metanol
mg: miligramo
Mg²⁺: ión magnesio
min: minutos
ml: mililitro
mm: milímetros
mM: milimolar
MOPS: buffer morfolinopropanosulfonato
NF-κB: factor nuclear-κB
ng: nanogramo
nm: nanometro
nM: nanomolar
OAG: 1-oleoil 2-acetil-*sn* glicerol
PA: ácido fosfatídico
PBS: solución buffer fosfato
PC: fosfatidilcolina
PE: fosfatidiletanolamina
PI: fosfatidilinositol
PIP: fosfatidil inositol fosfato
PIP₂: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PKA: proteína kinasa A
PKC: proteína kinasa C
PLA₁: fosfolipasa A₁
PLA₂: fosfolipasa A₂
PLC: fosfolipasa C
PLD: fosfolipasa D

PM: peso molecular

PMA: forbol 12-miristato 13-acetato

PMSF: fenilmetilsulfoniiflururo

POPOP: 1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil)benzene

PPO: 2,5-difeniloxazole

PSA: persulfato de amonio

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

seg: segundos

SFB: suero fetal bovino

TEMED: N,N,N',N',- tetrametiletilendiamina

TFA: trifluoro acético

TG: triacilglicerol

TLCK: tosyl-L-lisina chlorometilcetona

Tris: 2-amino-2-hidroximetil-1-3propanodiol

V: voltios

v: volumen

µg: microgramo

µl: microlitro

µm: micrometro

µM: micromolar

°C: grados centígrados

Introducción

ENFERMEDAD DE CHAGAS Y *TRYPANOSOMA CRUZI*

1. RESEÑA HISTÓRICA

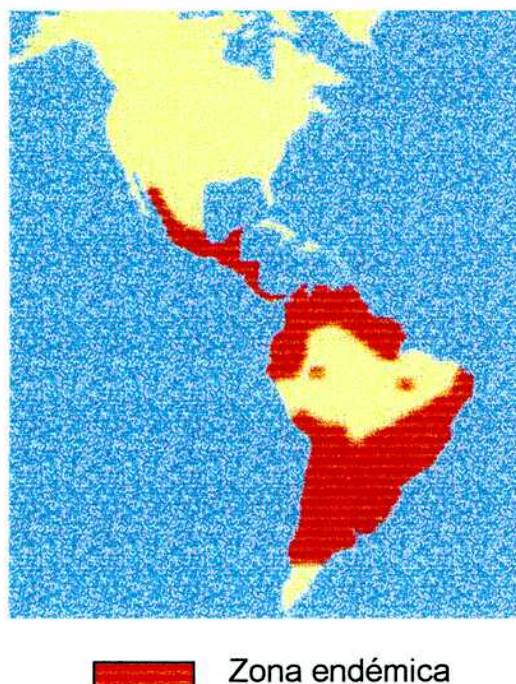
Trypanosoma cruzi, el agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, es un protozoo flagelado, digenético, es decir con dos hospedadores distintos, uno de ellos insecto hematófago triatomíneo, y otro, un mamífero que puede ser de especies diversas, incluyendo marsupiales. El ciclo de vida comprende distintos estadios que presentan profundas diferencias morfológicas y fisiológicas [1].

El parásito fue descubierto por Carlos Chagas en Minas Gerais, Brasil, en 1909. Lo denominó así en homenaje a su maestro Oswaldo Cruz. Chagas encontró el parásito por primera vez, en las heces de un insecto hematófago, *Pastronylus megistus*, y lo relacionó con una enfermedad que padecían los pobladores de la zona [2].

2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La distribución geográfica del parásito es coincidente con la del insecto vector y se asocia a factores socioeconómicos deficientes que favorecen la instalación del insecto en la vivienda humana y/o en el peridomicilio. Se han encontrado triatomíneos infectados desde el paralelo 40° de latitud Norte en USA hasta el paralelo 45° de latitud Sur, en Argentina y Chile [3] (**Figura 1**). En Argentina, la zona endémica comprende desde el límite norte con Bolivia, Paraguay y Brasil, hasta el norte de la provincia de Chubut, pero se han comunicado casos en humanos aún en Tierra del Fuego [4].

Figura 1: Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas



3. VÍAS DE TRANSMISIÓN

Trypanosoma cruzi puede ingresar al organismo por diferentes mecanismos: por transmisión vectorial, transfusional, transplacentaria, trasplante de órganos y menos frecuentemente accidentes de laboratorio. Sin lugar a dudas, la más importante numéricamente es la vectorial, representando más del 80 % de la transmisión en humanos, mientras que un 15 % corresponde a la transfusional [5].

4. ENFERMEDAD DE CHAGAS

La Enfermedad de Chagas se limita al continente americano y está ampliamente distribuida en América Latina. La Organización Mundial de la Salud ha estimado que 90 millones de personas viven en áreas endémicas y

están expuestas al riesgo de contraer la infección; de esa cantidad 16 a 18 millones ya están infectadas [6].

Los cambios anatomopatológicos que se producen durante la historia natural de la enfermedad de Chagas son bastante conocidos gracias a los intensos estudios y numerosas publicaciones realizadas hasta la fecha. La interacción del parásito con su hospedador humano, es una relación dinámica resultado de múltiples factores ligados al *Trypanosoma cruzi* (cepa, virulencia, cantidad de inóculo) y al hombre (edad, sexo, estados inmunológico y nutricional). Genéricamente se distinguen tres etapas en la enfermedad: aguda, indeterminada y crónica.

4.1 Etapa aguda

La enfermedad aguda puede presentarse en forma aparente o inaparente. La primera se produce con mayor frecuencia en niños pequeños, y la segunda puede desarrollarse en todas las edades y generalmente se presenta como un cuadro febril pasajero e inespecífico [7].

La infección reciente no suele ser evidente debido a que los signos y síntomas son tan leves que no se relacionan con la infección por *T. cruzi*. Reportes de la Organización Mundial de la Salud señalan que esta etapa es diagnosticada sólo entre el 1-2 % de los pacientes [6]. En los pocos casos en que aparecen síntomas y se reconoce la infección, el punto de entrada del parásito muestra un "chagoma" primario que se suele acompañar de tumefacción de ganglios linfáticos satélites. Estos signos pueden ser seguidos de fiebre y hepatoesplenomegalia. Anemia, trombocitopenia, leucocitosis con predominio de linfocitos y función renal alterada son alguna de las anomalías más frecuentes determinadas en el laboratorio. Se han reportado casos de niños pequeños con síntomas de miocarditis o meningoencefalitis aguda, sin embargo, la mortalidad suele ser baja, excepto en los casos con afección cardíaca o de sistema nervioso central [7].

Durante esta etapa los tripomastigotes se encuentran en sangre periférica y también en fluido cerebroespinal, donde el parásito se replica mayormente en las células del sistema reticuloendotelial mediante ciclos asincrónicos [8]. Esta característica de parasitemia elevada tiene como consecuencia la posibilidad de realizar diagnósticos directos, detectando la presencia del parásito o de sus antígenos.

Esta es la única fase de la infección en la que hasta el momento se ha conseguido lograr la cura parasitológica, mediante la administración de fármacos tales como Nifurtimox y Benznidazol.

4.2 Etapa indeterminada

La mayoría de los pacientes chagásicos agudos no tratados evolucionan a la llamada forma indeterminada pasados los 2 o 3 meses.

Esta fase consiste en la presencia de infección, revelada por serología, asociada a la ausencia de síntomas, con exámenes clínicos, electrocardiográficos y radiológicos (de corazón, esófago y colon) normales [6]. Ésta es la forma más frecuente encontrada en la población infectada y no se han reportado casos mortales, debido a la falta de alteraciones clínicas y anatomopatológicas. Sólo entre un 10-20 % de los pacientes en etapa indeterminada evolucionará a la etapa crónica [2,6].

4.3 Etapa crónica

Después de un período asintomático latente que puede durar 10 años o más, un porcentaje variable de personas (10-20 %), dependiendo de la zona geográfica, la cepa de parásito y de características intrínsecas al hospedador, presentará las manifestaciones cardíacas o digestivas que caracterizan a la fase crónica de la enfermedad. En Argentina, la forma de presentación más frecuente es la cardiomiopatía crónica [7,9].

Se ha determinado que si bien no tiene relación con el sexo o la raza, la incidencia es máxima entre la segunda y cuarta década de la vida. Los

síntomas más habituales son disnea y palpitaciones. Sin embargo, alteraciones electrocardiográficas como bloqueo de rama derecha o hemibloqueo anterior izquierdo o ambos; extrasístoles ventriculares unifocales y cambios primarios de la onda T, se consideran compatibles con cardiopatía chagásica leve. En los casos graves, la cardiomegalia se acompaña de bloqueo auriculoventricular, extrasístoles frecuentes y multifocales y fibrilación auricular [2,10,11]. Una de las lesiones cardíacas típicas descriptas es el aneurisma de la punta [2].

El pronóstico de pacientes con manifestaciones cardíacas evidentes o intensas es malo. Habitualmente no sobreviven más de cinco años. Algunos pacientes sufren una muerte súbita por taquicardia paroxística y fibrilación ventricular y, más del 50 % presentan insuficiencia cardíaca [6,10].

Las manifestaciones digestivas de la enfermedad de Chagas, como el megacolon y megaesófago, se han encontrado principalmente en pacientes de la zona central de Brasil, donde esta manifestación parece ser más frecuente [12]. Más de dos terceras partes de los casos de megaesófago aparecen en personas de 20 a 60 años de edad, de las que el 66 % son hombres. Los síntomas más frecuentes son disfagia y odinofagia, con los consiguientes signos de malnutrición [7,12].

En esta etapa se utiliza tratamiento farmacológico de los síntomas arrítmicos y, si bien los métodos terapéuticos habituales no son totalmente efectivos en la etapa crónica, se ha demostrado que un control de la parasitemia en las tres fases de la infección mejora la prognosis de la enfermedad [13].

Cabe destacar que como hasta el momento no existe un tratamiento totalmente efectivo contra todos los períodos de la enfermedad ni tampoco una vacuna, el control del vector y el mejoramiento de la vivienda son aún los métodos más seguros para prevenir la enfermedad de Chagas en área endémica. Por ejemplo, en nuestro país los métodos de fumigación de viviendas han producido un descenso muy importante del número de infectados por transmisión vectorial [3,6].

5. EL PARÁSITO

5.1 Clasificación taxonómica

Los tripanosomas de los mamíferos han sido divididos en dos Secciones: Salivaria y Estercoraria [14]. *Trypanosoma cruzi* pertenece a la segunda y es el único parásito patógeno dentro de dicha sección. La característica principal de los representantes de Estercoraria es que son transmitidos por un insecto vector que elimina las formas infectantes del parásito mediante sus deyecciones.

La identificación de *Trypanosoma cruzi* y su clasificación taxonómica derivan de estudios morfológicos, biológicos, bioquímicos y genéticos.

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

5.2 Estructura

Una de las características más interesantes del *Trypanosoma cruzi*, es la existencia de una única mitocondria, que se extiende por toda la célula. Como en todas las células eucariotas, la mitocondria de los tripanosomas posee ADN. Sin embargo, además de un ADN que se asemeja al hallado en otras mitocondrias, se encontró una gran cantidad de ADN que se organiza en forma de minicírculos y se concentra en una región de la mitocondria, localizada debajo del corpúsculo basal, dando origen a una estructura

intramitocondrial llamada kinetoplasto. Esta estructura es distintiva del Orden **Kinetoplástida**. Este ADN presente en el kinetoplasto o k-ADN, representa el 20 % del total de ADN del parásito [15].

Se han determinado variaciones significativas de las mitocondrias durante el ciclo de vida del parásito. Investigaciones realizadas en *T. brucei* señalan que si bien las formas multiplicativas encontradas en el insecto tienen mitocondrias funcionales, en los estadíos presentes en el hospedador mamífero, las mitocondrias son prácticamente inexistentes. Estas variaciones indican la capacidad de estos protozoarios de alternar entre un metabolismo más oxidativo, con intensa participación mitocondrial, y un metabolismo fermentativo, donde participan enzimas halladas en otra organela particular: el glicosoma.

Desde los primeros estudios sobre la ultraestructura de los tripanosomatídeos se observó la presencia de una organela envuelta por una membrana y que poseía una matriz relativamente densa. Esta estructura denominada glicosoma, fue aislada y caracterizada por primera vez por Oppenheimer y col, mostrando que prácticamente todas las enzimas de la vía glicolítica del protozoario estaban localizadas allí [16].

En varias oportunidades han sido descritas en el parásito, así como también en otros tripanosomas, estructuras citoplasmáticas delimitadas por unidades de membrana que contienen en su interior un material electrodenso. Estas estructuras han sido denominadas gránulos de volutina, cuerpos densos, etc. La utilización de la microscopía electrónica ha permitido detectar la presencia de calcio y fósforo en algunas de estas organelas [17]. Estudios bioquímicos realizados en *T. cruzi* y *T. brucei* señalaron la existencia de una organela citoplasmática que tiene un pH ácido, siendo acidificado por acción de una protón ATPasa vacuolar y que también posee una Ca^{2+} ATPasa. Esta estructura descrita por Docampo y col fue llamada acidocalcisoma [18,19].

El parásito se moviliza mediante un único flagelo que nace del cuerpo basal o kinetosoma, situado cerca de la envoltura mitocondrial del kinetoplasto, surgiendo por el bolsillo flagelar, rasgo característico de la Familia *Trypanosomatidae*. Este kinetosoma es una estructura cilíndrica constituida por 9 tripletes de microtúbulos. El flagelo, en cambio, presenta 9 pares de microtúbulos periféricos longitudinales y un par central que desaparece en su porción distal, además de una vaina que lo envuelve y que es una extensión de la membrana celular. El órgano de locomoción del parásito está constituido, entonces, por el flagelo más el kinetosoma [15].

5.3 Estadíos evolutivos

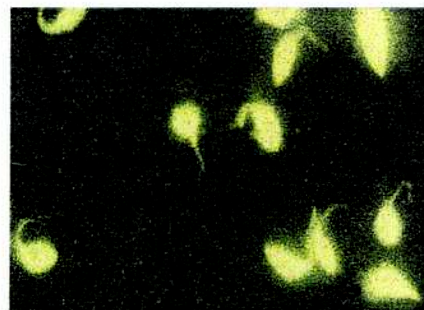
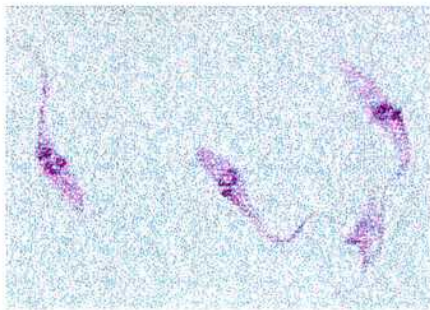
La morfología celular, la motilidad, la posición relativa entre el núcleo y el kinetoplasto (anterior, lateral o posterior) y la forma de salida del flagelo del bolsillo flagelar (central o lateral) definen las diferentes formas evolutivas para los tripanosomas: esferomastigote, epimastigote, tripomastigote y amastigote (**Figura 2**) si bien existen una serie de formas intermediarias [20].

- **Esferomastigote:** estadio replicativo y no infectivo que se halla tanto en el sistema digestivo del insecto vector como en determinadas situaciones experimentales *in vitro*. Tiene forma esférica, 2-4 μm , con el flagelo extracelular pequeño, bordeando el cuerpo del parásito.
- **Epimastigote:** estadio replicativo y no infectivo que se encuentra en el intestino del vector y en cultivo axénico. Posee forma elongada, 20-40 x 2 μm , con un flagelo que se origina en el kinetoplasto, por delante del núcleo. Dicho flagelo emerge por el costado del cuerpo celular y se libera por el extremo anterior, arrastrando la membrana citoplasmática en un trayecto breve, originando una imagen de membrana ondulante corta.

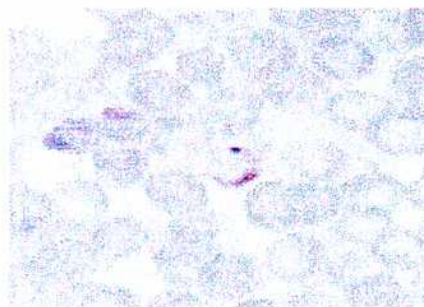
- **Tripomastigote:** forma no replicativa pero infectiva, presente en la ampolla rectal del insecto vector, en cultivo en medio axénico (tripomastigote metacíclico), en cultivos celulares y en la sangre del hospedador mamífero (tripomastigote sanguíneo o circulante). Tiene una forma elongada, 20-32 x 2 μm , con el kinetoplasto ubicado detrás del núcleo. El flagelo emerge a partir del kinetoplasto y se libera por el extremo anterior, dando entonces una imagen de membrana ondulante extensa.
- **Amastigote:** estadio replicativo que se halla en el citoplasma de las células del hospedador mamífero o en cultivo celular. Su forma es característicamente esférica u ovalada, 2-4 μm , y carece de flagelo libre.

Figura 2: Estadios de *Trypanosoma cruzi*

epimastigotes



tripomastigotes



“Nido” de amastigotes



6. EL INSECTO VECTOR

El primer registro de triatomíneos en América data del año 1590, cuando Lizarraga los describió en su viaje a la Argentina, específicamente en la provincia de Tucumán. También Carlos Darwin se refirió a ellos en su viaje por América del Sur.

6.1 Clasificación Taxonómica

Reino: ***Animalia***
Phylum: ***Artropoda***
Clase: ***Insecta***
Orden: ***Hemíptera***
Familia: ***Reduviidae***
Subfamilia: ***Triatominae***
Géneros: ***Pastrongylus, Triatoma, Rhodnius*, etc.**

6.2 Generalidades

Más de 110 especies de insectos de la familia **Reduviidae** y subfamilia **Triatominae** actúan como vectores de la Enfermedad de Chagas. Las distintas especies y subespecies que conforman esta subfamilia han sido identificadas taxonómicamente por las características morfológicas de sus adultos.

Clásicamente *Trypanosoma cruzi* es transmitido en América Latina por estos insectos hematófagos, que frecuentemente colonizan viviendas pobres, emergiendo durante la noche de entre las grietas de las paredes y techos para alimentarse sobre los habitantes dormidos y animales domésticos [1]. Ejemplos de esos insectos son *Pastrongylus megistus*, *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, siendo en nuestro país *Triatoma infestans* ("vinchuca") el responsable más frecuente de la transmisión domiciliaria (**Figura 3**).

Los triatomíneos han sido primitivamente insectos selváticos, en focos naturales directamente en relación con sus fuentes alimenticias, siendo la posibilidad de acceso a dicha fuente de alimento la que condiciona el tipo de hábitat en el cual se establecen.

Figura 3: Vectores de la Enfermedad de Chagas

T. infestans



R. prolixus



P. megistus



6.3. Características morfológicas

Estos insectos son alados o ápteros, dependiendo del estadio, son aplanados dorsoventralmente y poseen un aparato bucal succionador. Son ovíparos y su metamorfosis es incompleta o hemimetábola.

Su cabeza es pequeña con ojos compuestos y ocelos. Posee también una trompa y antenas. Estas antenas se ubican por delante de los ojos y su modalidad de implantación es la que permite la caracterización de los diferentes géneros de triatomíneos.

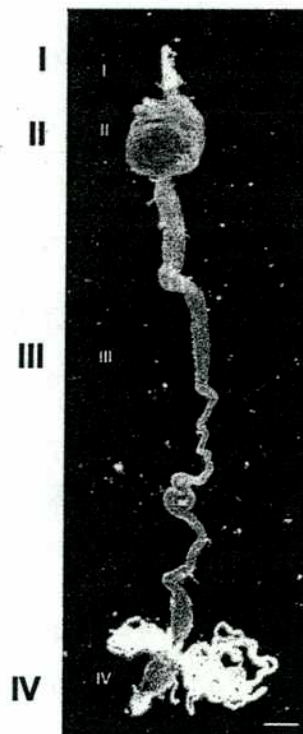
Dorsalmente, presentan un tórax trapezoidal, conocido como pronoto, que también se utiliza para su ubicación sistemática (**Figura 3**).

El estadio adulto se caracteriza por poseer un par de alas anteriores diferenciadas en una parte basal oscura (corio) y otra distal (membrana) que se pliegan sobre el abdomen. Dicho abdomen está constituido por segmentos que presentan un borde saliente que se denomina conexivo; en el conexivo las diferentes especies presentan manchas de color, que son de valor taxonómico [21].

La mayoría de los hemípteros son fitófagos, sin embargo, la familia **Reduviidae** agrupa dos tipos de insectos, uno predador que se alimenta de otros insectos y un segundo estrictamente hematófago. Las características de la trompa permiten distinguir las especies hematófagas de las predadoras y de las fitófagas. La primera está constituida por 3 segmentos rectos, mientras que la segunda presenta también 3 segmentos pero cada uno de ellos es ligeramente curvo. La última o fitófaga, presenta una trompa larga con 4 segmentos [21]. Los insectos hematófagos, en el momento de alimentarse, excretan saliva lubricante y con efecto anestésico. Esta es vertida en la piel y tejido subcutáneo del hospedador por el canal salival, ubicado en la trompa por debajo del canal alimenticio (por donde pasa la sangre). Ambos canales se encuentran ubicados dentro de un tubo articulado constituyendo la pieza bucal.

El aparato digestivo de este insecto, lugar donde *T.cruzi* cumple parte de su ciclo evolutivo, está constituido por 3 secciones: intestino anterior, medio y posterior. El primero comprende a su vez el aparato bucal y el esófago, que desemboca en el proventrículo, primera porción del intestino medio. Continúa luego el estómago o promecenterón, que se dilata y ocupa gran parte de la cavidad general del triatomíneo cuando éste se alimenta. La tercera sección corresponde al intestino posterior, que en su porción terminal presenta la ampolla rectal, lugar donde desembocan los túbulos de Malpighi cuya función es absorber diversas sustancias y eliminar metabolitos [7] (Figura 4).

Figura 4: Sistema digestivo de los Triatomíneos



I: aparato bucal y esófago, II: estómago o promecenterón, III: intestino posterior, IV: ampolla rectal. Extraído de Kollien, A.H., Schaub, G.A. (2000) *The development of Trypanosoma cruzi in Triatominae. Parasitol. Today* 16(9):381-387.

En el ciclo de vida del triatomíneo, se reconocen cinco estadíos ninfales con un imago adulto reproductivo, estando las mudas relacionadas con la temperatura. Todos estos estadíos son hematófagos, y sólo con fuentes sanguíneas de alimentación se cumplen los pasos de su metamorfosis, entonces son capaces de transmitir al *Trypanosoma cruzi* durante todo su ciclo de vida [7,22]. El insecto depende de la ingesta de hemoglobina tanto para pasar de un estadío ninfal al siguiente, como, en el caso de la hembra, para la maduración ovárica y oviposición.

Los vectores pueden alimentarse en diferentes hospedadores y si bien es común la alimentación mixta, pueden tener hospedadores preferenciales. Algunas especies de insectos subsisten a través de alimentaciones abundantes y pueden permanecer por largos períodos de ayuno sin sufrir daños funcionales, mientras que otras requieren de ciclos periódicos de alimentación.

6.4 Ciclos de transmisión

Existen tres tipos de ciclos de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en los que interviene el vector. El ciclo doméstico, que perpetúa la infección en seres humanos y animales domésticos, funciona principalmente en viviendas rurales o de las zonas periurbanas con paredes de adobe y techos de paja. Los principales reservorios del parásito son los seres humanos, perros, gatos y, en algunos países, los cobayos. El vector vive y se multiplica en grietas de las paredes, agujeros del techo, debajo y detrás de los muebles y de los cuadros. En el ciclo selvático intervienen triatomas selváticos que se infectan y a su vez infectan a roedores, marsupiales y otros animales salvajes. El tercer ciclo es el peridoméstico, en el que intervienen mamíferos (roedores domésticos, marsupiales, gatos, perros, cabras) que entran y salen libremente de las viviendas, o viven cerca de ellas, y triatomas selváticos atraídos a las casas por la luz y el alimento. Este ciclo peridoméstico sirve de nexo entre los ciclos doméstico y selvático [3,22].

6.5 Ciclo de vida del parásito

El *Triatoma*, vector hematófago, ingiere tripomastigotes circulantes mientras se alimenta sobre la sangre de un hospedador infectado. En el sistema digestivo del insecto, los tripomastigotes ingeridos inicialmente se diferencian a esferomastigotes y luego a epimastigotes. En una segunda etapa, los epimastigotes que son proliferativos pero no infectivos se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. Dicho proceso es conocido como metaciclogénesis. La transformación de los epimastigotes a las formas de tripomastigotes metacíclicos ocurre naturalmente en el tracto digestivo del insecto vector, como un paso esencial en la perpetuación del parásito en la naturaleza, a partir de su estadio infectivo en el mamífero [23]. Estos tripomastigotes metacíclicos son estadios infectivos que se eliminan con las heces del vector durante un nuevo episodio alimentario y son capaces de penetrar por una herida o a través de una mucosa a los tejidos del hospedador [7,23]. Luego del pasaje por la sangre del hospedador, el parásito infecta diferentes tipos de células nucleadas. Dentro de las células los tripomastigotes se diferencian a amastigotes que se dividen activamente, transformándose en tripomastigotes circulantes nuevamente, los que son liberados para infectar nuevas células o son ingeridos por un nuevo vector [1,7,22].

Luego de la penetración del tripomastigote a las células, el parásito puede ser encontrado en una vacuola llamada parasitófora. De inmediato, inicia un proceso de transformación a la forma de amastigote conjuntamente con la destrucción de la membrana de dicha organela. Posteriormente, el amastigote escapa de la vacuola y se encuentra libre en el citoplasma. Cerca de 35 hs después, comienza un proceso de división celular binaria que prosigue por varios días, dependiendo de las características de la cepa de *T. cruzi* y de la célula hospedadora. Luego de aproximadamente 5 días, se observan en la célula hasta 500 amastigotes y se inicia un proceso cuasi-sincrónico de transformación de las formas amastigotes en tripomastigotes. Al adquirir mediante la diferenciación, un flagelo más largo, los parásitos

producen un movimiento intenso que, aparentemente es el responsable de la ruptura de la célula hospedadora y la liberación de los tripomastigotes al espacio intercelular primero, y luego al torrente sanguíneo [7].

6.6 Interacción parásito-vector

Como se ha mencionado anteriormente, *Trypanosoma cruzi* se desarrolla a través de un complejo ciclo de vida el cual transcurre en diferentes ecosistemas: el intestino del insecto vector y el mamífero. Esta variación de medios se correlaciona funcionalmente con las diferenciaciones cíclicas del parásito en sus diversos estadios, respondiendo a las características particulares de cada uno de esos ecosistemas.

Existen importantes limitaciones en cuanto al conocimiento conceniente a las interacciones entre el Triatoma y el parásito. Esta relación puede aparentemente ser modulada por diferentes parámetros relativos a ambos, parásito y vector [1,22]. Respecto a la influencia de éste último, se han descrito varios factores que interfieren con el desarrollo del parásito. Muchos de ellos están relacionados con las especies de Triatomas involucradas e incluyen características genéticas y estadios evolutivos, mientras que otros involucran a las moléculas presentes en el sistema digestivo del insecto [1,22]. Considerando que los parásitos ingresan conjuntamente con el alimento ingerido, diversos factores presentes en la sangre deben ser requeridos para su desarrollo y diferenciación, así como también otros componentes secretados en el intestino del vector. Pereira y col han determinado la presencia de receptores de lectinas en los epimastigotes pero no en los tripomastigotes [24]. La presencia de actividades de lectinas en el intestino de *R. prolixus* y su reacción selectiva con *T. cruzi* pueden entonces, representar un rol regulatorio en la interacción entre el parásito y el vector durante el ciclo de vida.

Por otro lado, se ha observado que los tripanosomas se unen a la superficie del epitelio intestinal a través del flagelo, expandiendo su membrana para

aumentar el área de contacto con la célula-sustrato. Esta unión, que se produce tanto en epimastigotes como en tripomastigotes, es mediante uniones conocidas como hemidesmosomas [25].

Es ampliamente aceptado que la diferenciación del parásito en el insecto vector prepara al mismo para su sobrevivencia al ingresar en el hospedador mamífero, en el que se encontrará con un medio hostil, proporcionado por el complemento presente en el suero. Mientras que los epimastigotes son lisados por los componentes del complemento, los tripomastigotes son capaces de resistir su acción. Además, los epimastigotes presentan numerosos receptores para complemento mientras que en los tripomastigotes éstos son escasos. Esta resistencia, presentada tanto por las formas tripomastigotes metacíclicas como por las circulantes, es un proceso que se conoce con el nombre de "preadaptación". Al respecto, se ha clonado a partir de tripomastigotes, el dominio funcional del factor T-DAF (Trypomastigote Decay-Accelerating Factor), que es una glicoproteína de 87-93 kDa, con capacidad de inhibir la C3-convertasa del suero, y de impedir que se complete la cascada del complemento con su efecto lítico [26].

7. MODELOS DE METACICLOGÉNESIS

Entre los mecanismos que han sido propuestos para explicar la diferenciación de epimastigote a tripomastigote metacíclico, proceso conocido como metaciclogénesis, dos de ellos son los más aceptados. Uno involucra a factores biológicamente activos y el otro está relacionado con la falta de nutrientes esenciales o la acumulación de determinados metabolitos [27,28]. En el último caso, la morfogénesis tendría lugar hacia el final de la fase estacionaria concomitantemente con el arresto de la multiplicación.

Diversos autores han determinado que la metaciclogénesis, puede ser inducida *in vitro* a partir de diferentes metodologías. Entre ellas se destacan los cultivos líquidos que imitan la orina del insecto [29], los que inducen stress metabólico [27] o los que poseen segundos mensajeros tales como el AMPc [30].

En nuestro laboratorio, se ha desarrollado un modelo de diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos en medio axénico. Este proceso es desencadenado por estimulación de los epimastigotes con extracto de intestino posterior de *Triatoma infestans* (Ei), disuelto en el medio de cultivo Grace, de células de insecto. La exposición de los parásitos al Ei se lleva a cabo por 15 min a 28°C, retirándose luego el estímulo. La incubación se continúa luego por un lapso de 8 a 10 días, al cabo del cual se observan los tripomastigotes metacíclicos [31,32].

Según nuestra hipótesis, la interacción de moléculas presentes en el Ei con receptores de la membrana parasitaria induciría en el citoplasma, la síntesis y liberación de compuestos específicos o segundos mensajeros, capaces de controlar los procesos intracelulares que culminarían con la metaciclogénesis.

En ese sentido, se aisló de los extractos intestinales, una fracción inductora de la metaciclogénesis, constituida por varias proteínas de bajo peso molecular (17 a 75 kDa) [33]. Investigaciones posteriores identificaron diversos péptidos, presentes en el intestino del vector, que producen activación de la enzima adenilato ciclasa del parásito y estimulan parcialmente la metaciclogénesis [34]. Los estudios de homología determinaron que dichos péptidos se originan a partir de la digestión del alimento del vector (sangre de gallina, en nuestro laboratorio), ya que poseen una secuencia idéntica al extremo N-terminal de la globina de gallina, así como también extensa homología con las globinas humana y de ratón [34].

8. PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN EN TRIPANIOSOMÁTIDOS

Durante el ciclo de vida de los tripanosomátidos existe una alternancia entre las formas replicativas y no replicativas. En estas últimas debe existir un mecanismo que bloquea el ciclo celular. Para estudiar los mecanismos que median la división celular y la diferenciación es necesario identificar las moléculas específicas involucradas en los mecanismos de señalización intracelular. Dichas moléculas disparan procesos en respuesta a los cambios en el medio que rodea al parásito en sus diferentes hospedadores. Estos parásitos han desarrollado estrategias para coordinar las complejidades de sus ciclos de vida, como se evidencia por la presencia de genes que codifican proteínas-señales similares a las involucradas en los ciclos celulares de las levaduras y los humanos. Así por ejemplo, están presentes proteínas que coordinan la mitosis, incluyendo las que tienen homología con las ciclinas, las kinasas dependientes de ciclinas y otras proteínas regulatorias [35,36]. Esto sugiere que la diferenciación y proliferación de los kinetoplastidos pueden ser controladas por mecanismos de transducción que se asemejan a los que existen en las células de mamíferos. El conocimiento de esos mecanismos podría permitir diseñar nuevas drogas capaces de interferir con la capacidad de los Tripanosomas de adaptarse y sobrevivir en su hospedador vertebrado [37].

9. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN CÉLULAS EUCARIOTAS

Las respuestas a cambios en el medio que rodea a las células están mediadas por vías de señalización que coordinan procesos que resultan en la funcionalidad, el crecimiento y el desarrollo de las mismas. Generalmente, en eucariotas esta coordinación se realiza por circuitos regulatorios que involucran proteínas kinasas, fosfatasa, proteínas G y moléculas de diversa

naturaleza, segundos mensajeros, que participan en diferentes vías de señalización. Sin lugar a dudas la efectividad y regulación en esos procesos son cruciales para la vida normal de las células. Estas señales están integradas para producir una respuesta fisiológica que incluye cambios en el citoesqueleto, modificaciones en la transcripción de genes o la secreción de determinadas sustancias. Varias moléculas han sido descritas como segundos mensajeros en una amplia variedad de células. Los más conocidos son el AMP_C, GMP_C, diacilglicerol (DG), inositol trifosfato (IP₃), ácidos grasos libres, lisofosfolípidos y Ca²⁺ [38].

Los mecanismos de transducción de señales desde el medio externo hacia el interior, son de especial interés en protozoarios digeneicos como *Trypanosoma cruzi*. Este parásito, en el invertebrado hematófago y en el mamífero se encuentra expuesto a diversos medios en los que, la interacción de moléculas circundantes con receptores de la membrana parasitaria pueden inducir la generación de señales de segundos mensajeros que participan en el control de diferentes procesos celulares tales como multiplicación y diferenciación. Un aspecto que permanece parcialmente resuelto es el que está relacionado con las vías de señalización involucradas en la metaciclogénesis, proceso que se desencadena evidentemente por señales de moléculas presentes en el intestino del insecto vector. En esta Tesis intentamos dilucidar los mecanismos a través de los cuales determinadas moléculas participan en la metaciclogénesis, proceso que conlleva una detención en el ciclo celular.

9.1 La proteína kinasa C

La proteína kinasa C (PKC), enzima que cataliza la fosforilación de proteínas en residuos serina y treonina, es el nombre colectivo de una familia de proteína kinasas con múltiples isoformas que poseen características enzimológicas individuales y exhiben patrones de expresión distintivos en

diferentes tipos celulares. Cada una de ellas tiene funciones diversas en el procesamiento y modulación de una variedad de respuestas fisiológicas y patológicas a señales externas [39].

Cuando la PKC fue descubierta en 1977, por el grupo de Nishizuka, no se le adjudicó inicialmente un rol en la transducción de señales [40]. Más adelante se determinó que la enzima era activada por Ca^{2+} y era dependiente de fosfolípidos [41] y se la ligó firmemente a la transducción de señales.

Se ha establecido que, cuando un ligando se une a ciertos receptores en la superficie celular, se degradan fosfolípidos de la membrana generando diacilglicerol, que actúa como segundo mensajero, aumentando la afinidad del calcio y de los fosfolípidos por la PKC y activándola [42,43]. La PKC entonces fosforilaría una amplia variedad de proteínas celulares. Otros hallazgos del mismo grupo, revelaron que la enzima esta constituida por dos dominios funcionalmente diferentes. Uno regulatorio e hidrofóbico, que puede unirse a membrana, y que interactúa con el calcio, la fosfatidilserina y el diacilglicerol y el otro hidrofílico, que posee el centro activo catalítico, con uniones al ATP y a las proteínas sustrato [44,45].

Existen varias isoformas en la familia de la PKC con diferente respuesta a combinaciones de lípidos, incluyendo fosfolípidos, diacilglicerol, ácidos grasos libres, lisofosfatidilcolina y probablemente muchos otros metabolitos en las membranas. Por ello, los patrones de activación de esas isoformas pueden variar en duración y localización intracelular [46]. Hasta el momento han sido identificadas una gran variedad de las mismas en distintos tejidos que pueden ser divididas en tres grupos. El primer grupo, PKCc, está compuesto por las cuatro isoformas convencionales (α , β I, β II y γ); que se activan en presencia de Ca^{2+} y son reguladas por diacilglicerol y fosfolípidos. Las kinasas nuevas, pertenecientes al segundo grupo, PKCn, (δ , ϵ , η y θ) son independientes de Ca^{2+} y son reguladas por diacilglicerol y fosfolípidos. Y finalmente el tercer grupo, PKCa, está formado por dos PKC atípicas (λ y

ζ) que también son independientes de Ca^{2+} y no requieren diacilglicerol, aunque los fosfolípidos regulan su actividad [46,47]. Esta heterogeneidad en la familia de la PKC, sugiere que las diversas isoformas deben tener roles fisiológicos específicos, correlacionándose los niveles de expresión diferencial de cada una con el crecimiento celular [48] y/o la diferenciación [49].

Entre las diversas acciones de esta enzima, se ha descrito que puede inducir la fosforilación de ciertos factores de transcripción que activarían o inhibirían la síntesis de determinados ARNm. Un ejemplo típico lo constituye la fosforilación de una proteína que unida al factor de transcripción NF-κB en el citoplasma contribuye a mantenerlo en esta localización. La fosforilación causa la disociación de este complejo y la liberación del NF-κB, permitiendo su migración al núcleo induciendo la transcripción de un grupo de genes [50]. Se ha postulado también que una isoforma de PKC ($\text{PKC}\alpha$), fosforilaría y activaría a la proto-oncoproteína Raf 1, iniciando la vía de señales de la cascada de kinasas activadas por mitógenos (MAPK). Otros blancos de la PKC han sido descritos incluyendo miogenina, laminina B y P-glicoproteínas [38].

En epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* la PKC ha sido descrita y caracterizada por Gómez y col. [51,52]. Esta enzima se encuentra tanto en forma soluble como asociada a membrana y requiere Ca^{2+} y fosfatidilserina para ser estimulada por DG o forbol miristato acetato (PMA). Por otro lado, se ha encontrado una enzima tipo PKC en *Trypanosoma brucei* [53], y se detectaron en el mismo parásito, seis kinasas de proteínas que presentaban durante el desarrollo de su ciclo distintos niveles de activación, sugiriendo que estas kinasas podrían jugar un papel alternante en la proliferación y diferenciación [54,55].

9.2 El diacilglicerol y su análogo estructural el forboi miristato acetato

En cuanto al DG, su función principal es, como se discutió anteriormente activar a la PKC. En ausencia de estimulación la enzima está presente soluble en el citosol catalíticamente inactiva. Un aumento en el Ca^{2+} citoplasmático induce una traslocación de esta enzima a membranas y otras estructuras intracelulares, en las que fosforila a sus sustratos [39,46,56]. Así, la activación depende de ambos Ca^{2+} y DG.

Los promotores de tumores son compuestos no-carcinógenos por ellos mismos, pero que pueden inducir tumores en animales previamente tratados con una dosis subóptima de ciertos compuestos carcinógenos [57]. La mayoría de los trabajos experimentales con promotores de tumores han sido realizados con forbol ésteres, especialmente con 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato, TPA, también conocido como forbol miristato acetato, PMA. Este compuesto deriva de las semillas de la planta *Croton tiglium*. El PMA y otros forbol ésteres han mostrado generar efectos pleiotrópicos que incluyen: estimulación de la síntesis de macromoléculas, fosforilación de histonas, proliferación celular, diferenciación celular, síntesis de fosfolípidos, modulación del metabolismo de las poliaminas y de los nucleótidos cíclicos [56-60]. Análisis de cinética enzimática indican que el PMA, que es un análogo estructural del diacilglicerol, es capaz de sustituir a éste lípido, imitando su acción: aumentando la afinidad de la PKC por sus activadores: Ca^{2+} y fosfolípidos [56,58,61,62]. Los trabajos de Gómez y col. han descripto la acción de este forbol éster en *Trypanosoma cruzi* y han corroborado su capacidad de activar a la PKC del parásito [51,52].

9.3 El inositol trifosfato y el ión calcio

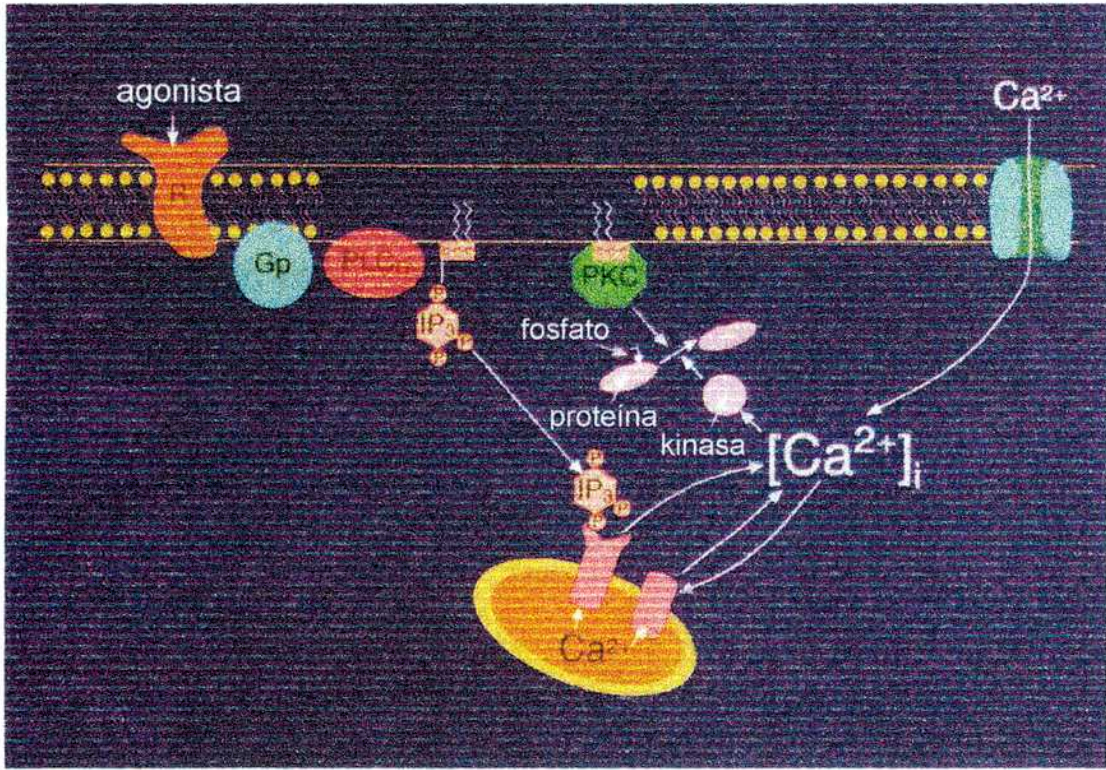
Con respecto a otro segundo mensajero bien conocido, el IP_3 , se sabe que en células eucariotas se genera por la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2), por la acción de fosfolipasas C (PLC). La hidrólisis de PIP_2 produce dos importantes moléculas: DG, el cual, permanece adosado a la cara interna de la membrana, y el IP_3 que es soluble en medio acuoso y por

lo tanto se libera al citosol. Una vez formado, el IP₃ difunde hasta la superficie del retículo endoplásmico donde se une a un receptor específico que es un canal de Ca²⁺ compuesto por cuatro subunidades idénticas cada una con un sitio de unión para el IP₃. Induce entonces, la apertura de ese canal y permite a los iones Ca²⁺ acceder al citoplasma [50]. Estos incrementos en los niveles de Ca²⁺ citosólico juegan un rol crucial en la transducción de señales, disparando variadas respuestas celulares [63-67]. Además de la liberación de Ca²⁺ al citoplasma a partir de reservorios intracelulares, se han descrito señales que involucran la el ingreso del ión desde el medio extracelular. En la mayoría de los casos, la liberación intracelular y la activación de la entrada de Ca²⁺ a través de la membrana plasmática, son procesos coordinados [68].

Numerosos estudios han demostrado que los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* poseen un camino de señalización funcional a través de inositol fosfatos y DG, el cual es activado por Ca²⁺ [69,70]. Dicho ión, también ha sido involucrado en varios eventos importantes del ciclo parasitario como por ejemplo la invasión celular [71-72]. Particularmente, en nuestro laboratorio hemos determinado una relación entre el aumento de calcio intracelular ([Ca²⁺]_i) y el éxito en la invasión del parásito a la célula-hospedadora [73]. En otros trabajos también hemos demostrado que durante la interacción entre los epimastigotes y el extracto de intestino de *Triatoma infestans* se produce un aumento transiente de [Ca²⁺]_i de aproximadamente 5 veces con respecto al valor basal [74]. Este aumento del [Ca²⁺]_i en el parásito es uno de los requerimientos para la metaciclogénesis, aunque otros factores presentes en el extracto intestinal serían además necesarios para desencadenar este proceso.

En otros parásitos protozoarios como *Trypanosoma brucei*, *Entamoeba histolytica* y *Ichthyophthirius* (Ciliophora) *theronts*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum*, también se ha relacionado el aumento de calcio por movilización de reservorios intracelulares con la infectividad y/o citotoxicidad [75-79].

Figura 5: activación de PKC



Modificado de Docampo, R., Moreno, S.N.J. (1996). *Parasitology Today*, 12(2):61-65.

9.4 Las proteínas CaM kinasas

Como se comentó anteriormente, los aumentos en las concentraciones del calcio citosólico median respuestas de transducción de señales transmembrana. Sin embargo, varios de los efectos del calcio intracelular son modulados por un aceptor: la proteína citosólica calmodulina (CaM). Los complejos Ca^{2+} /CaM activan proteínas-quinasas y otras enzimas que juegan un rol importante en la transducción de señales en células eucariotas. Entre estas enzimas están la proteína quinasa tipo II, dependiente de Ca^{2+} /CaM (CaM KII) [80] y la AMPc fosfodiesterasa que degrada el AMPc, degradando a este segundo mensajero [50]. Por otra parte, las CaM kinasas también han

sido detectadas dentro de las vías de señalización de varios eucariotas inferiores, como *Saccharomyces cerevisiae* [81,82] y *Aspergillus nidulans* [83], así como en *Trypanosoma brucei* [84-85]. Más aún, se ha purificado y caracterizado una CaM kinasa en el *Trypanosoma cruzi* [86,87], así como otras tres enzimas claves reguladas por complejos $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$: una fosfodiesterasa dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ [85], una ATPasa activada por CaM ($\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$) [88] y una proteína kinasa dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ particular [89]. Es interesante destacar que en nuestro laboratorio se ha determinado que el tratamiento de los epimastigotes con las fenotiazinas: calmidazolium, trifluoperazina y clorpromazina, compuestos que se unen e inactivan a la calmodulina, inhiben la diferenciación del epimastigote al tripomastigote metacíclico [74].

9.5 El AMPc y la proteína kinasa A

En distintos tipos celulares, la activación de la adenilato ciclasa genera aumentos de AMPc intracelular. Ésta es una enzima unida a membrana, que posee dos dominios catalíticos en la cara citoplasmática. Un modelo clásico de activación es la unión de determinados ligandos a receptores de la superficie celular, que se halla vinculada a una proteína trimérica estimuladora del tipo Gs. Los diversos efectos del AMPc están mediados a través de la acción de proteínas kinasas dependientes de AMPc, colectivamente denominadas proteín-kinasas A (PKA), que fosforilan grupos de proteínas específicas en diferentes tipos celulares. En ausencia de AMPc, la PKA se encuentra en su forma tetramérica inactiva, mientras que por la unión de este mensajero, la enzima se disocia, liberando dos subunidades monoméricas que son catalíticamente activas y que fosforilan diferentes sustratos [50]. Estas subunidades no sólo actúan a nivel de citoplasma, sino que también entran en el núcleo, donde fosforilan sustratos nucleares como el factor transcripcional CREB. Este factor se une a determinadas secuencias de ADN conocidas como secuencias CRE (elemento de respuesta a cAMP), entonces la fosforilación de CREB es necesaria para la

transcripción de ciertos genes que contienen promotores regulados por CREB [90].

En eucariotas inferiores, el AMPc es un segundo mensajero importante para el control de la división celular y la diferenciación. Esto se ha demostrado en varios organismos [91,92], incluyendo a *Trypanosoma lewisi* [93], *Trypanosoma brucei* [94] y *Leishmania* sp. [95].

Por otra parte, en *Trypanosoma cruzi*, se han caracterizado actividades enzimáticas que dependen de AMPc en el estadio de epimastigotes y se encontró que esa actividad reside en un único tipo de proteína con propiedades diferentes a las reportadas anteriormente en eucariotas inferiores y superiores [37,96]. Rangel-Aldao y col. exploraron el posible rol del AMPc en la diferenciación del parásito y observaron que los tripomastigotes (estadio no replicativo) tienen niveles de AMPc 4 veces mayores que los epimastigotes [30]. Esto sugiere un rol para este segundo mensajero en los mecanismos intracelulares de señales que inducen la diferenciación. Esto coincide con trabajos previos que postulaban que el AMPc sería un regulador negativo de la división celular de tripanosomátidos [93,94].

Estudios realizados en colaboración con nuestro laboratorio, muestran la presencia, en extractos de intestino de *Triatoma infestans*, de péptidos, derivados de la degradación de la hemoglobina. Estos péptidos son activadores de la adenilato ciclasa, enzima generadora de AMPc, del *T. cruzi* y estimuladores de la metaciclogénesis [34]. El modelo propone que los péptidos luego de unirse a un receptor específico presente en la membrana del epimastigote, inducirían la activación de la adenilato ciclasa. Una proteína Gs estaría involucrada en las vías de transducción de señales responsables del aumento intracelular de los niveles de AMPc. Esto conduciría a la activación de PKA, que podría determinar la fosforilación de proteínas blanco específicas, involucradas en la diferenciación del epimastigote al estadio de tripomastigote metacíclico.

9.6 Los ácidos grasos libres

Los ácidos grasos insaturados han mostrado efectuar varias acciones biológicas, como la modulación de los canales de iones, la fusión de membranas y la activación de proteínas kinasas, entre otras [46]. Así, Murakami y col. han señalado que los ácidos grasos *cis*-insaturados, como el oleico y el araquidónico, pueden estimular la actividad de la PKC en presencia o ausencia de Ca^{2+} y fosfolípidos [97,98]. Sin embargo, investigaciones posteriores demostraron que la capacidad de activar a la PKC no era exclusiva de los ácidos grasos *cis*-insaturados, sino que los ácidos grasos *trans*-insaturados de cadenas de 16 y 18 carbonos activaban a la enzima de una manera comparable a sus estereoisómeros *cis* [99]. Estos hallazgos son importantes porque sugieren la existencia de otros mecanismos de activación para la PKC, mediados por la liberación de ácidos grasos a partir de fosfolipasas A.

Uno de los ácidos grasos más estudiados es el ácido araquidónico, precursor de prostaglandinas, que puede ser generado a partir de la hidrólisis de fosfoinosítidos, a través de dos reacciones consecutivas, catalizadas por la fosfolipasa C y la diacilglicerol lipasa [100]. Sin embargo, en la mayoría de los tipos celulares, el ácido araquidónico y otros ácidos grasos son también liberados por la degradación de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina por fosfolipasas A. Se ha postulado que la activación de fosfolipasas A_2 podría aumentar la concentración de ácidos grasos en localizaciones específicas en la membrana [101]. Más aún, se ha encontrado que la liberación de menos del 1 % de los ácidos grasos de la membrana celular por tratamiento con fosfolipasas A_2 , resulta en una marcada estimulación de una actividad $(\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+})\text{ATPasa}$ en eritrocitos humanos [102], sugiriendo que pequeñas cantidades de ácidos grasos constituyen una señal capaz de modular actividades enzimáticas.

9.7 Los lisofosfolípidos

La degradación de fosfolípidos por parte de fosfolipasas A, genera no sólo ácidos grasos libres sino también lisofosfolípidos. Investigaciones de Oishi y col. han demostrado que la lisofosfatidilcolina estimula específicamente a la PKC en forma sinérgica con el diacilglicerol y en forma aditiva con el ácido oleico [103]. Estos descubrimientos sugieren que la lisofosfatidilcolina derivada de la hidrólisis de fosfatidilcolina, por acción de fosfolipasas A₂, puede jugar un rol en la transducción de señales, por regulación de la PKC, interactuando con los otros dos activadores de la enzima: el diacilglicerol y los ácidos grasos libres.

Resumiendo, la integración de los mecanismo de acción de las distintas moléculas hasta aquí mencionadas se produciría cuando un ligando se une a su receptor en la superficie celular. A partir de ello, tres eventos interrelacionados ocurren: (a) se libera Ca²⁺ de los reservorios intracelulares, (b) aumenta la permeabilidad de Ca²⁺ en la membrana plasmática, y (c) aumenta el contenido en diacilglicerol. Los dos primeros, conducen a un aumento intracelular de Ca²⁺. Ese aumento de calcio es detectado por proteínas como la calmodulina, y como consecuencia un número de proteínas, entre ellas proteínas kinasas, y procesos dependientes de calcio se activan, produciendo una respuesta celular inicial. Por otro lado, el incremento en los niveles de Ca²⁺ y en los contenidos de diacilglicerol conducen a la activación de proteínas kinasas C. Esta enzima cataliza la fosforilación de una variedad de proteínas diferentes que serían responsables del mantenimiento a largo plazo de las respuestas celulares [39,46,50,56]. Además, se acumulan evidencias según las cuales, la lisofosfatidilcolina y los ácidos grasos libres, productos de la hidrólisis de fosfolípidos por la fosfolipasas A han mostrado un efecto positivo en la activación de la PKC inducida por DG [38,97-99,103]. En consecuencia, la PKC estaría ubicada en un punto estratégico en el que se entrecruzarían.

varias vías de señalización, que involucrarían al Ca^{2+} , diferentes lípidos, así como también nucleótidos cíclicos y factores promotores de tumores.

10. FOSFOLÍPIDOS Y FOSFOLIPASAS: GENERALIDADES

Los fosfolípidos son los componentes principales de las membranas biológicas. Dentro de ellos, los más abundantes en las células animales son la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina, que contienen como cabezas polares etanolamina y colina respectivamente. Otros fosfolípidos importantes son la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol [104]. Generalmente la posición *sn*-1 se halla esterificada por ácidos grasos saturados, tales como el palmítico y el esteárico y, la posición *sn*-2 ácidos por grasos insaturados como el oleico, linoleico o araquidónico [50].

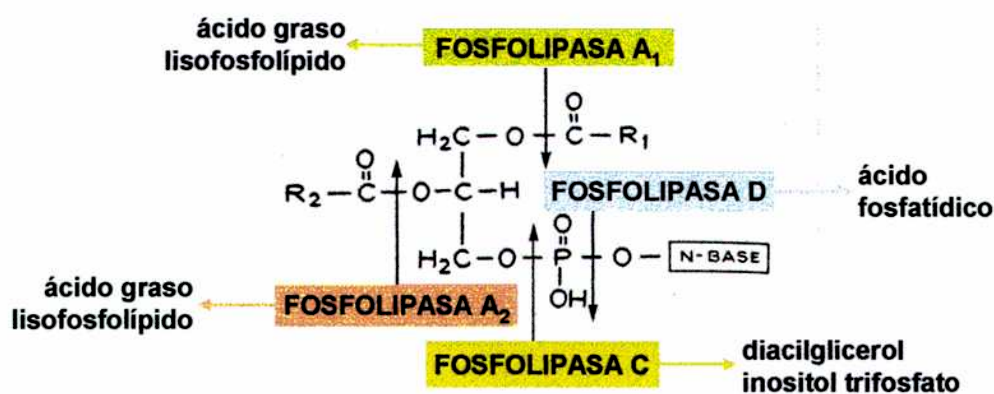
Las enzimas que hidrolizan fosfolípidos, es decir, las fosfolipasas han sido muy útiles para la determinación de la estructura de dichos lípidos (**Figura 6**). Mientras que la fosfolipasa A_1 (PLA_1) ataca la unión acil ester en la posición *sn*-1 del fosfolípido, la fosfolipasa A_2 (PLA_2) cataliza la hidrólisis de la unión acil ester en la posición *sn*-2. Estas enzimas, generan ácidos grasos libres y lisofosfolípidos. Estos últimos son intermediarios en el metabolismo de los fosfolípidos, pero sólo aparecen en células y en tejidos en cantidades muy pequeñas. En concentraciones elevadas son tóxicos y dañinos para las membranas, actuando como verdaderos compuestos líticos, característica que dio origen a su nombre. Otros tipos de fosfolipasas son las C y la D. La fosfolipasa C (PLC) hidroliza la unión fosfodiéster liberando diacilglicerol más una base fosforilada y la fosfolipasa D (PLD) libera la base de la cabeza polar, formando ácido fosfatídico [104].

En general, las fosfolipasas tienen especificidad por la posición más que por un ácido graso particular o un grupo polar, sin embargo marcadas

preferencias por determinadas cabezas polares han sido reportadas [105-107]. Particularmente, las fosfolipasas que atacan fosfolípidos zwitteriónicos son generalmente distintas de las que hidrolizan fosfoinosítidos.

Se han descrito enzimas que hidrolizan los grupos acilos remanentes de los lisofosfolípidos, catalizando el mismo tipo de reacción que las PLA₁ y la PLA₂. Esas enzimas son designadas en la literatura como lisofosfolipasas.

Figura 6: Sitios de actividad hidrolítica de las fosfolipasas



10.1 Fosfolipasas A₁

La distribución y propiedades de estas enzimas han sido estudiadas desde hace muchos años, especialmente en ciertas bacterias como *Escherichia coli* y en células de mamíferos. La PLA₁ encontrada en bacterias se localizó asociada a membranas y se la denominó inicialmente "fosfolipasa A resistente a detergentes", porque no era inhibida por estos compuestos sino que por el contrario parecían estabilizarla [108]. Se describió que la enzima no requería Ca²⁺ y que tenía un pH óptimo neutro. Fue purificada también de otras fuentes como *Bacillus megaterium* y *Mycobacterium phlei*. En células de mamífero fue hallada por primera vez en lisosomas por Mellors y col en 1967 [109], en cerebro bovino por Pete y col [110] y años más tarde

Hostetler y col aislaron cinco isoformas ácidas de la PLA₁ asociadas a lisosomas de ratas [111]. Este mismo grupo purificó también una PLA₁ en lisosomas de riñón de rata, que fue descrita como una glicoproteína, con pH óptimo ácido [112]. Si bien las diferentes enzimas encontradas varían en peso molecular, punto isoelectrico y contenido de carbohidratos, todas han mostrado ser independientes de cationes bivalentes, actuar sobre una gran variedad de fosfolípidos [111] y ser estabilizadas por la adición de detergentes [108].

Fosfolipasas que hidrolizan la posición *sn*-1 también han sido descritas en diferentes eucariotas protozoarios. En *Tetrahymena thermophila* se halló una enzima con pH óptimo ácido, que era secretada al medio [113,114]. En un estudio comparativo de cuatro especies de tripanosomas africanos, la PLA₁ fue la mayor actividad fosfolipasa hallada y, dentro de ellas la enzima de *Trypanosoma brucei brucei* reveló poseer una de las actividades más elevadas reportadas para organismos eucariotas y procariotas [115,116]. En *Trypanosoma cruzi*, por otra parte, estudios recientes de Bertello y col. determinaron una actividad PLA₁ que actúa sobre fosfatidilinositol e inositol fosfoceramida, asociada a membrana [117].

10.2 Fosfolipasas A₂

La PLA₂ fue la primera enzima fosfolipasa reconocida a partir de la observación de que el jugo pancreático de mamíferos o el veneno de cobra podían hidrolizar fosfatidilcolina [118]. A partir de ese descubrimiento fue subsecuentemente hallada en una gran variedad de venenos de serpientes y glándulas exócrinas de mamíferos, donde posee un rol digestivo. Si bien las PLA₂ encontradas inicialmente tenían actividades dependientes de Ca²⁺, se han descrito en los últimos años varios grupos de enzimas con distintas propiedades respecto a las descritas originalmente [119,120].

Las PLA₂ se clasifican según sus características estructurales dentro de cuatro clases, que, a su vez pueden estar formadas por varios grupos de enzimas relacionadas [119,120]. Mientras que las sPLA₂ requieren Ca²⁺ y se

secretan, las cPLA₂ son citoplasmáticas y también requieren Ca²⁺, las iPLA₂ son intracelulares pero son independientes del ión y finalmente las PAF-AH o PAF-PLA₂ son acetil hidrolasas del factor activador de plaquetas (PAF) y tienen especificidad por ácidos grasos de cadena corta.

Entre las fosfolipasas que atacan PI, halladas en protozoarios, Bertello y col hallaron evidencias de una actividad PLA₂ en *Trypanosoma cruzi*, que era recuperada en la fracción de membrana y que hidroliza fosfatidilinositol e inositol fosfoceramida [117].

10.3 Fosfolipasas C

La PLC fue purificada por primera vez a partir del medio de cultivo de diferentes tipos de bacterias, así como también en células de mamífero [121-123]. Estas fosfolipasas actúan sobre varios sustratos siendo los más importantes fosfatidilinositol y fosfatidilcolina, aunque se han encontrado efectos de PLC sobre esfingomielina [124,125]. Dentro de este grupo de enzimas también existen numerosas isoformas que difieren en su estructura y cinética, así como también en su ubicación y regulación [120].

Recientemente, se han identificado dos actividades de PLC que clivan PI (PI-PLC) en *Trypanosoma cruzi*: una que libera ceramida a partir de inositol fosfoceramidas y otra que libera alquil-acilglicerol, alquil-glicerol o diacilglicerol a partir de fosfatidilinositol. Se postula que estas enzimas podrían tener acción en los eventos de remodelación involucrados en la maduración del ancla de glicofosfatidilinositol, tan característica en este parásito [117]. Posteriormente Furuya y col. clonaron y secuenciaron el gen que codifica para la PLC específica de PI del mismo parásito [126]. Estos autores observaron que la enzima es muy similar a la descrita en mamíferos, levaduras y plantas en términos de identidad de secuencia y de conservación de dominios. Por otro lado, también determinaron que el gen se expresa en niveles muy elevados en los epimastigotes y amastigotes, y que su expresión es inducida durante la diferenciación de los tripomastigotes al estadio de amastigote.

10.4 Fosfolipasas D

Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en células de mamífero, plantas, hongos y bacterias [127]. En los mamíferos su principal sustrato es fosfatidilcolina, mientras que en otros sistemas es capaz de hidrolizar otros fosfolípidos. Se han encontrado también en este caso, varias isoformas de PLD, todas con cuatro regiones altamente conservadas, presentes también en algunas enzimas de plantas, levaduras y bacterias.

11. LAS FOSFOLIPASAS Y SU ROL EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

La estimulación de receptores en la superficie celular inicia una cascada de degradación de varios lípidos constituyentes de la membrana. Muchos de esos metabolitos pueden potencialmente actuar como segundos mensajeros al ser generados a partir de la activación de enzimas fosfolipasas [38,46,120].

11.1 Fosfolipasas A

Como se mencionó previamente, los efectos de diferentes fosfolipasas A parecen mediar la generación de diversos segundos mensajeros tales como los ácidos grasos y los lisofosfolípidos [101,102]. En células animales, se han descrito un gran número de PLA₂ que exhiben roles diferentes, en la transducción de señales, en la generación de diferentes factores, en la remodelación de la membrana y en el metabolismo de lípidos en general [119]. Entre ellas, la PLA₂ citosólica es responsable de la liberación de ácido araquidónico de la fosfatidilcolina, evento que conduce a la generación de diversos mensajeros lipídicos eicosanoides [128]. Los eicosanoides participan en variados procesos biológicos, tales como la contracción de músculo liso, la agregación de plaquetas y la respuesta inflamatoria. Se ha

determinado que cuando la fosfatidilcolina es hidrolizada por una PLA, la lisofosfatidilcolina generada actúa como precursora del factor activador de plaquetas (PAF) [129].

Matsuda y col describieron una actividad fosfolipasa A₁/A₂, que hidroliza el grupo acilo de ambas posiciones *sn*-1 y *sn*-2 de fosfatidiletanolamina, en células HL-60 y observaron un aumento en dicha actividad durante la diferenciación a granulocitos [130].

Los trabajos de Eintracht y col [131], han estudiado algunos aspectos de la regulación del proceso de entrada de Ca²⁺ a través de la membrana plasmática en tripanosomatídeos, proponiendo que la PLA₂ juega un rol pivotal en el control de la entrada de Ca²⁺ desde el exterior, en las formas sanguíneas de *T. brucei*. Más aún, trabajos recientes de Catisti y col [132] proponen que los ácidos araquidónico, linolénico y linoleico, generados por acción de PLA₂ pueden inducir la entrada de Ca²⁺ en los parásitos procíclicos de *T. brucei*, los promastigotes de *L. donovani* y los amastigotes de *T. cruzi*. Así como también, la liberación de ese ión a partir de los acidocalcisomas presentes en las formas procíclicas de *T. brucei*.

11.2 Fosfolipasas C

Como se discutió anteriormente, la importancia de estas fosfolipasas en la transducción de señales, radica en la posibilidad de hidrolizar fosfoinosítidos de membrana generando IP₃ y DG, que son capaces de liberar calcio de reservorios intracelulares y de activar a la PKC, respectivamente (sección § 9.1, 9.2 y 9.3). Al ser estimulados los receptores en la superficie celular, el DG es inmediatamente producido por la degradación de fosfoinosítoles, como resultado de la activación de PLC. Los niveles de DG, sin embargo, sufren posteriormente un nuevo incremento lento que persiste por minutos y ocasionalmente por horas, manteniendo la señal por más tiempo. Diversos investigadores consideran que esta nueva onda de DG resulta de la hidrólisis de fosfatidilcolina, ya que el DG producido por la hidrólisis de fosfatidilinositol es rápidamente convertido a ácido fosfatídico, por acción de

una DG-kinasa. Por el contrario, el DG producido por fosfatidilcolina, es un sustrato pobre para las DG-kinasas y entonces, es degradado más lentamente por DG-lipasas [46].

Se han descrito 3 isoformas de la PI-PLC: β , γ , δ [133]. La activación se produce vía proteínas G heterotriméricas, para las dos primeras isoformas, mientras que la PLC δ se une a receptores de kinasas de tirosina y es activada por fosforilación.

Se ha comentado previamente la existencia y funcionalidad de la vía de señalización del inositolfosfato y el diacilglicerol en los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* [69,70]. La formación de IP_3 y diacilglicerol se observó que era estimulada por Ca^{2+} , sugiriendo la presencia de una fosfolipasa activa sobre PI [69]. Se han hallado también diferentes inositoles fosfato en amastigotes [134] y tripomastigotes [135].

11.3 Fosfolipasas D

Se ha descrito que esta enzima hidroliza principalmente fosfatidilcolina, generando ácido fosfatídico y colina en respuesta a varios estímulos extracelulares [136]. El ácido fosfatídico ha sido implicado como un segundo mensajero importante en la regulación de proteínas kinasas, proteínas activadas por GTP, proteínas kinasas de fosfoinositoles, adenilato ciclasa y otras moléculas de señalización [38]. Si bien se ha sugerido que dicho ácido actuaría como activador directo de la PKC [137], los efectos directos del mismo, no se han podido establecer y numerosos investigadores suponen que podría mediar la generación de otros segundos mensajeros como el DG y el ácido lisofosfatídico [46]. Por otra parte, se ha relacionado también a esta fosfolipasa con el tráfico a través de la membrana y el transporte vesicular [138].

11.4 Fosfolipasas que hidrolizan fosfatidilcolina

En los últimos años, las enzimas que degradan fosfatidilcolina (PC) han demostrado jugar roles importantes en los procesos de señalización de células eucariotas. Particularmente PLD en combinación con la fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP) son importantes en la generación de señales de diacilglicerol para la activación de las vías en las que participan proteínas kinasas C [139]. PLA₂ que actúan sobre PC también han sido implicadas en la activación de estas kinasas [119,140], en adición a su bien establecido rol en la liberación de ácido araquidónico, un paso regulatorio en la formación de eicosanoides [120].

Estudios de esta última década sugieren que las enzimas que atacan posiciones *sn*-1 en fosfolípidos pueden tener también roles en señalización [46,141]. Mientras que la vía de señalización del fosfatidilinositol (PI) ha sido demostrada en *T. cruzi* [117,69,70], las enzimas que degradan PC no han sido examinadas en este parásito.

La actividad de fosfolipasas que hidrolizan PC ha sido objeto de estudio en Tripanosomátidos africanos [115,116,142]. En cuatro especies diferentes, la actividad PLA₁ independiente de Ca²⁺ fue la mayor actividad detectada. Los niveles de PLA₁ varían ampliamente, con una actividad muy alta en las especies patogénicas como *T. brucei* y una actividad relativamente baja en las especies no patogénicas de *T. lewisi*. La actividad PLA₁ en *T. brucei* también fue investigada por Oppendoes y van de Roy [116]. Estos autores también encontraron altos niveles en las formas sanguíneas pero no en las formas procíclicas inmaduras, sugiriendo un rol fisiológico importante para la enzima. Este aspecto fue analizado por Bowes y col [143]: la PLA₁ de *T. brucei* parecía no poseer una actividad lisofosfolipasa [144] pero participaba en la incorporación de ácidos grasos y cabezas polares para la síntesis de fosfolípidos celulares. En un estudio reciente, se demostró que la incubación de *T. brucei* vivos con 1-palmitoil-2[¹⁴C] araquidonoil-PC libera ácido araquidónico, sugiriendo que una PLA₂ también estaría involucrada en este proceso. Se demostró que el ácido araquidónico, así como también otros

ácidos grasos insaturados, eran capaces de aumentar el influjo de calcio en esas células [131]. Entonces, la deacilación de fosfolípidos parece ser un evento de señalización en *T. brucei*.

12. BIOSÍNTESIS DE DIACILGLICEROL Y FOSFOLÍPIDOS

12.1 Síntesis de diacilglicerol

El diacilglicerol es un intermediario directo en la generación del triacilglicerol (TG), y de los fosfolípidos zwitteriónicos. El TG es un lípido de almacenamiento, que es activamente sintetizado en células hepáticas y adiposas de animales vertebrados, así como también en células de plantas superiores [104]. Como se observa en la **Figura 7**, diversas reacciones son requeridas para la formación de diacilglicerol y triacilglicerol. La primera etapa consiste en dos acilaciones sucesivas de los hidroxilos libres del *sn*-glicerol-3-fosfato por dos moléculas acil-CoA, para formar primeramente ácido lisofosfatídico (LPA) y después ácido fosfatídico (PA). Estas reacciones están catalizadas por la enzima *glicerol-fosfato-acil-transferasa* y tienen efecto preferentemente con acil-CoA de ácidos saturados y no saturados de 16 a 18 átomos de carbono. Existe también una ruta alternativa de formación de PA que involucra la acilación de la dihidroxiacetona-fosfato. Estos ácidos fosfatídicos se encuentran en las células sólo en cantidades mínimas pero constituyen intermediarios importantes en la biosíntesis de lípidos neutros y fosfolípidos.

En la ruta que conduce hacia el triacilglicerol, el PA experimenta su hidrólisis por acción de la *fosfatasa de ácido fosfatídico* (PAP) formando diacilglicerol (DG), enzima que es activada por ácidos grasos libres [145-149]. El DG reacciona después con una tercera molécula de acil-CoA para generar un triacilglicerol, catalizada por la *diacilglicerol-acil-transferasa*. En la mucosa intestinal de los animales superiores, que sintetiza activamente TG durante la absorción de los ácidos grasos del intestino, entra en juego otro tipo de

reacción de acilación: los monoacilgliceroles (MG) pueden ser directamente acilados por la *monoacilglicerol-acil-transferasa*, y entonces el PA no es intermediario. Por otro lado, la reacción inversa, generadora de PA a partir de DG, es catalizada por la enzima *diacilglicerol-kinasa* (DG-K).

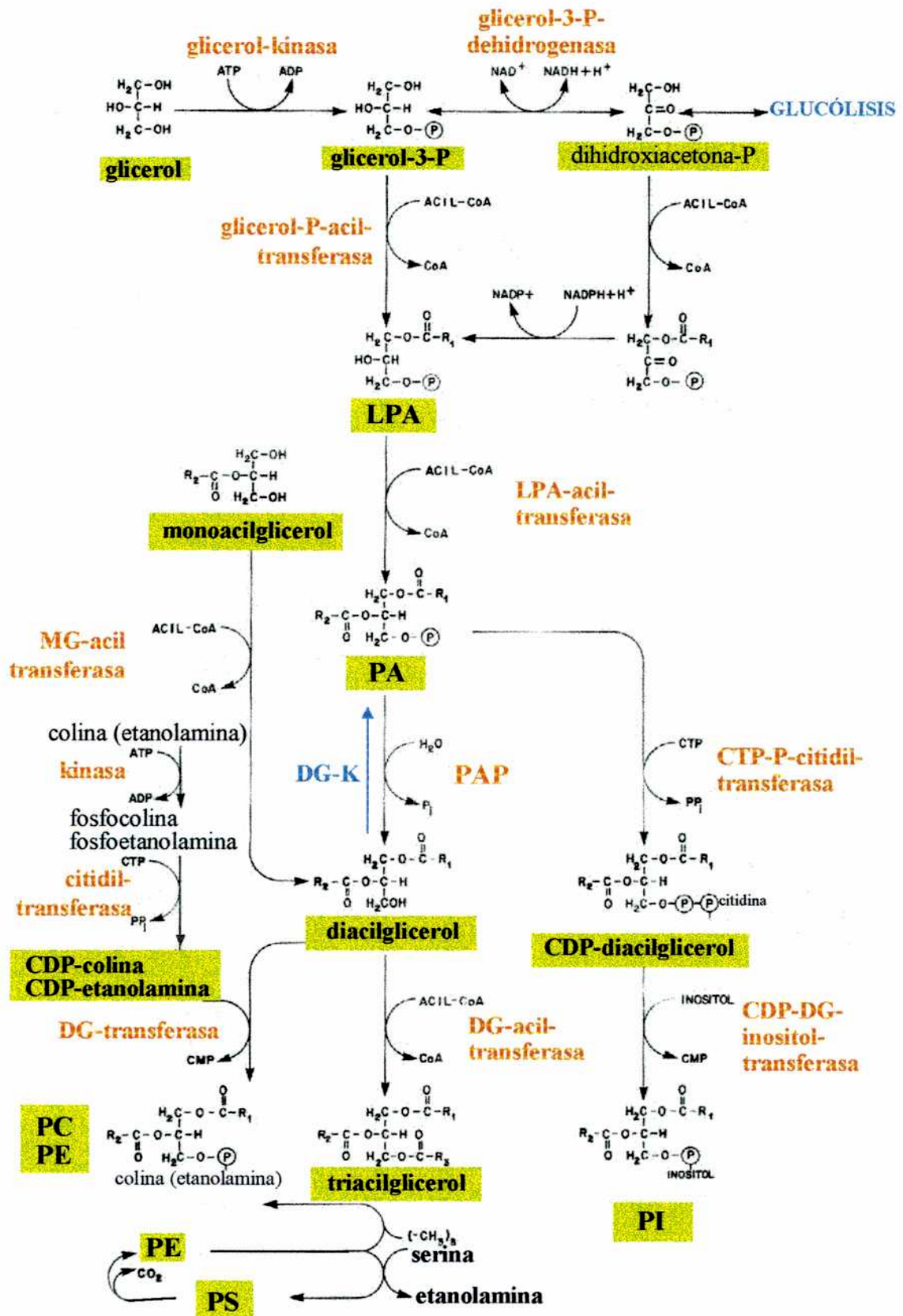
12.2 Síntesis de fosfolípidos

Los principales fosfolípidos que sirven como componentes de las membranas y de las lipoproteínas de transporte se forman a partir del PA por dos rutas diferentes, a partir de PA, como el fosfatidilinositol (PI) o a partir de DG como la fosfatidilcolina (PC) o la fosfatidiletanolamina (PE).

Como se observa en la **Figura 7**, para la síntesis del PI, la citidina trifosfato (CTP) reacciona con el PA para formar citidina-difosfato-diacilglicerol (CDP-diacilglicerol), a través de la acción de la *CTP-fosfatidato-citidil-transferasa*. Finalmente, este compuesto reacciona con el inositol, catalizado por la *CDP-diacilglicerol-inositol-transferasa*, generando PI.

En la biosíntesis de PC y PE, la colina o la etanolamina, deben ser primero transformadas en "colinas activas" o "etanolaminas activas" respectivamente. Este proceso requiere dos etapas, involucrando, primero una reacción con una enzima *kinasa* que transfiere fosfato desde el ATP, para formar el monofosfato correspondiente: fosfocolina o fosfoetanolamina. Segundo, una nueva reacción catalizada por la *fosfocolina-citidil-transferasa* o *fosfoetanolamina-citidil-transferasa*, que requiere CTP, para crear la citidina difosfocolina (CDP-colina) o citidina difosfoetanolamina, (CDP-etanolamina) respectivamente. En esta forma, la colina o etanolamina reaccionan con el DG, tal que la base fosforilada es transferida al DG, por la *fosfocolina-diacilglicerol-transferasa* o *fosfoetanolamina-diacilglicerol-transferasa*, para formar la PC o la PE. Por otra parte, la fosfatidilserina (PS) es formada por PE directamente por la reacción con la serina.

Figura 7: Biosíntesis de diacilglicerol y fosfolípidos



Materiales y Métodos

1. MATERIALES

Los medios de Grace, el medio 199, el medio MEM, el medio RPMI 1640, Hepes, suero fetal bovino, Bisindolilmaleimida, HA1004 y H7 fueron adquiridos en Gibco BRL (Rockville, MD, USA). Fosfatidilcolina de soja, grado II-S, PMSF, leupeptina, aprotinina, benzamidina, inhibidor de tripsina, TLCK, Dibutiril-AMPc, acrilamida, TEMED, PSA, SDS, Azul de Bromofenol, Tris, glicina, β -mercaptoetanol, Coomasie Brilliant Blue R-250, p-nitrofenil- α -manopiranosido, p-nitrofenol, Tritón X-100, digitonina, placas de autorradiografía Kodak X O-AR, Concanavalina A-Sepharosa 4B, PMA, OAG, ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido linolénico, albúmina bovina (fracción V), standards de lípidos, EGTA, EDTA, sialil-lactosa, QAE-Sephadex A-25, ditiotretol, iodoacetamida, acetonitrilo, revelador y fijador para autorradiografías y DMSO se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Las placas de Sílica Gel 60, para cromatografía en capa delgada y los solventes (grado analítico) se compraron a Merck (Darmstadt, Alemania). CM-Sepharosa, [^{14}C] acetato de sodio, [$1\text{-}^{14}\text{C}$] oleato, [^{14}C] palmitato, [^{14}C] estearato, [^{32}P] ortofosfato de sodio, 1-palmitoil-2-[$1\text{-}^{14}\text{C}$] oleoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-[$1\text{-}^{14}\text{C}$] linoleoil L-3-fosfatidiletanolamina, se obtuvieron de Amersham-Pharmacia (Arlington Heights, IL, USA). El kit de tinción con plata para proteínas, fue adquirido de Bio-Rad (Hercules, CA, USA) y la DEAE-celulosa (DE-52) a Whatman Chemical Separation (Clifton, NJ, USA). El péptido derivado de la globina que corresponde a los residuos 30-49 (TRMFTTYPQTKTYFPHFDL) fue sintetizado por el Dr. Robert Mecham en Washington University, St. Louis, MO, USA.

2. PARÁSITOS

2.1 Epimastigotes

Se utilizaron epimastigotes de la cepa letal RA [31], que fue aislada de un paciente en la etapa aguda de la Enfermedad de Chagas. Los parásitos fueron mantenidos por pasajes semanales en cultivo axénico en medio bifásico [32] y cuantificados por microscopía óptica en cámara de Neubauer.

2.2 Tripomastigotes metacíclicos

2.2.1 Obtención por cultivo axénico

Se empleó el método desarrollado en este laboratorio por Isola y col [32]. Brevemente, epimastigotes obtenidos de medio bifásico ($5 \times 10^6/\text{ml}$) y cosechados a las 48 hs (fase exponencial) por centrifugación a 1.000 xg por 15 min, se lavan con PBS con el agregado de 1 % BSA. Luego de los lavados los parásitos se estimulan durante 15 min., a 28°C, con extracto de intestino posterior del insecto vector (*Ei*) disuelto en medio de Grace [31,150]. Transcurrido dicho lapso, el estímulo se retira por centrifugación y los parásitos se transfieren a medio de Grace modificado [151]. La modificación del medio de Grace consiste en la adición de 7 % SFB, 1 % BSA y 10 % ultrafiltrado de huevo. Este último componente es una solución constituida por una parte de huevo de gallina y dos partes de 0.9 % NaCl que son incubados con agitación durante toda la noche a 4°C y pasados a través de una membrana de ultrafiltración de 10 kDa.

La observación microscópica de los cultivos se realiza cada 48 h, obteniéndose entre los 8-10 días posteriores a la estimulación, un 60-70 % de tripomastigotes metacíclicos. La evaluación de la metaciclogénesis se determina por dos técnicas diferentes:

(a) Microscopía: Observando la motilidad, la forma y la posición relativa del núcleo y del kinetoplasto. El porcentaje de metacíclicos se establece en preparaciones húmedas y en preparaciones fijadas y teñidas con Giemsa.

(b) Determinación de actividad de la enzima tran-sialidasa: La trans-sialidasa es una enzima sólo presente en Tripanosomátidos, que transfiere ácido siálico entre macromoléculas. Esta enzima se expresa en la superficie del tripomastigote, que la libera al medio, no así el epimastigote.

La actividad enzimática se mide, en sobrenadantes de los cultivos parasitarios, en diferentes momentos del ensayo de diferenciación.

Se utiliza sialil-lactosa como dador de ácido siálico y [^{14}C]-Lactosa (Amersham, Amersham, UK) como aceptor. Luego de una hora de incubación la reacción se detiene con agua destilada y se agrega una suspensión densa de QAE-Sephadex A-25. Luego de 3 lavados de las partículas, se eluyen las moléculas unidas con ClNa 0.5 M y la actividad se determina en contador de centelleo líquido [152]. *Estas determinaciones se realizaron con la colaboración con el grupo de la Dra. M. Susana Leguizamón, Fac. Medicina. Universidad de Buenos Aires.*

2.2.2 Purificación de Tripomastigotes metacíclicos

La suspensión de parásitos, mezcla de epimastigotes (40-30 %) y tripomastigotes metacíclicos (60-70 %), obtenida entre los días 8 y 10, se centrifuga a 1.000 xg. Al pellet resultante se le agrega 1 ml de suero humano fresco normal, que se incuba 1h a 37°C produciendo la lisis de los epimastigotes sensibles a la acción del complemento, sin afectar a los tripomastigotes [153]. Los metacíclicos obtenidos por centrifugación se cuentan en cámara de Neubauer y se resuspenden en el medio apropiado para su posterior utilización. Para los ensayos de determinación de fosfolipasas se utiliza PBS con el agregado de 1% BSA, mientras que para infectar células de mamífero se resuspenden los parásitos en medio 199 o

medio mínimo esencial (MEM) con el agregado de 10 % SFB, 20 mM buffer Hepes, 200 U/ml Penicilina y 100 µg/ml Estreptomicina.

2.2.3 Preparación de extracto de intestino posterior de *Triatoma infestans* (Ei)

Se prepara siguiendo el protocolo ya descrito por Isola y col. [32], a partir de triatomas de estadio adulto, alimentados 48 hs antes. Se remueven y maceran los intestinos posteriores del insecto vector en medio Grace o en solución de buffer fosfato (PBS), según su utilización posterior (2.0-3.0 intestinos/ml). Luego de centrifugar por 30 min, a 12.000 xg y esterilizar por membranas de 0.2 µm de poro, se mide la concentración de proteína en los homogenatos obtenidos por el método de Lowry y col. [154]. Para los ensayos de diferenciación, la concentración se ajusta a 2 mg/ml en medio Grace. Los homogenatos se mantienen a -70°C hasta ser utilizados.

Solución buffer fosfato (PBS), pH 7.4

CINa	10 g
KCl	0.25 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1.88 g
Volumen final:	1000 ml

2.2.4 Evaluación de la actividad biológica de diversos compuestos

Se evaluó también la capacidad de inducir metaciclogénesis (actividad biológica) repitiendo el protocolo de la sección § 2.2.1, reemplazando el extracto de intestino (Ei) por diferentes estímulos:

- sangre de gallina hemolisada, proteína: 2 mg/ml
- 1-oleoil 2-acetil-sn glicerol, OAG, 10 µg/ml

- forbol 12-miristato 13-acetato, PMA, 20 ng/ml (32 nM)
- lípidos del extracto de intestino (FL), 300 µg/ml
- ácidos grasos presentes en el *Ei*, 300 µM

El diacilglicerol, el forbol éster, los lípidos del extracto de intestino y los ácidos grasos fueron obtenidos a partir de una solución madre en DMSO. En todos los caso, la metaciclogénesis se evalúa como ha sido descripta anteriormente (sección § 2.2.1).

2.3 Tripomastigotes y amastigotes obtenidos en cultivo celular

Se obtuvieron tripomastigotes y amastigotes siguiendo el método de Docampo y col [135]. Suspensiones de células Vero cultivadas en medio 199 + 10 % SFB a 37° C y 5 % CO₂ se exponen a radiación Gama (2000 rads) en una bomba de Cesio 125. Este procedimiento resulta en la detención del crecimiento celular, permitiendo la obtención de cultivos sincrónicos de tripomastigotes y amastigotes con un mayor rendimiento. Luego de la irradiación, y cuantificación de las células Vero viables utilizando Trypan blue, se siembran en botellas de 75 cm² en una concentración de 6-8x10⁶ células/botella. Una vez adheridas a la botella, se las incuba con los tripomastigotes (10 parásitos/célula), provenientes de ratón, de cultivo o metacíclicos, por 24 hs, a 37° C y 5 % CO₂. Luego de dicho período las células se lavan con PBS, para retirar los parásitos no incorporados y se les adiciona medio fresco. (Los parásitos provenientes de ratón son mantenidos por pasajes semanales por inoculación de 2 x 10⁵ tripomastigotes por vía intraperitoneal). Los tripomastigotes se cosechan del sobrenadante del cultivo celular 5 días después, por centrifugación a 12.000 xg, 30 min, a temperatura ambiente, obteniéndose de 1-2 x 10⁸ tripomastigotes por botella. Se repone el medio y se continúa la incubación de los cultivos por 48-72 hs para permitir la liberación de los amastigotes (3-5 x 10⁸/botella).

2.3.1 Células Vero

Con la finalidad de obtener tripomastigotes y amastigotes periódicamente se estableció una línea celular (células Vero) derivada de células de riñón de mono verde africano obtenida por gentileza del Dr. Campos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Las células se cultivaron por pasajes semanales en medio 199 con el agregado de 5% SFB para su mantenimiento, o 10% SFB para su crecimiento, a una temperatura de 37°C en 5 % de CO₂

2.4 Obtención de homogenato total de parásitos

Previa cuantificación en cámara de Neubauer los diferentes estadíos parasitarios a utilizar se lavan dos veces en PBS y se resuspenden en 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, en presencia de los siguientes inhibidores de proteasas: 0.5 mM TLCK, 0.01 % leupeptina; 2 mM PMSF; 25 U/ml aprotinina; 1 mM benzamidina; 0.2 mg/ml inhibidor de tripsina de soja. Se homogeneizan mediante tres ciclos de congelamiento, en nitrógeno líquido, y descongelamiento a 37°C y las suspensiones se conservan a -70°C hasta su utilización posterior. En los casos indicados luego de la ruptura por congelamiento-descongelamiento se sonicó la suspensión parasitaria utilizando un Sonifier Cell Disruptor, Model W185 (tres tratamientos de 30 seg, cada uno a 45 W)

3. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE LÍPIDOS

3.1 Extracción de lípidos

Se extraen los lípidos en las diferentes muestras a analizar según la técnica de Bligh & Dyer [155]: a cada 0.8 ml de la muestra acuosa se le agregan 3 ml de reactivo de Bligh & Dyer (cloroformo:metanol, 1:2) y se agita. Luego se

adicionan 1 ml de cloroformo y 1 ml de agua y se repite la agitación. Con este procedimiento se obtiene una fase superior y otra inferior que contiene los lípidos. Una vez particionadas las fases se separa la fase inferior, se evapora bajo N_2 el solvente, y se agregan 50 μ l de cloroformo para resuspender los lípidos, que se siembran luego en placas de Sílica Gel 60. La separación se realiza por cromatografía en capa delgada usando dos sistemas con desarrollo secuencial. Primero, cloroformo/ metanol/ agua (65:35:2,5, v/v), hasta la mitad de la placa para separar los lípidos polares, y después hexano/ dietileter/ ácido acético (70:30:1, v/v), hasta el final de la placa, para separar los lípidos neutros en la porción superior [156,157]. Lípidos auténticos obtenidos de fuentes comerciales, se cromatografían en paralelo y se exponen a vapor de I_2 para su visualización y posterior identificación de los lípidos de la muestra.

En los casos indicados las placas se someten al procedimiento de "charring" o carbonización. Para ello, se rocían las muestras con una solución de 10 % $CuSO_4$ y 8 % H_3PO_4 y luego se incuban a 150° C por 15 min. [158]. Las placas resultantes son procesadas en un scanner Umax, Astra 610S y analizadas por densitometría con el programa SigmaGel (Gel Analysis Software, SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Cada calle se analiza por triplicado y se determina el porcentaje de cada lípido presente en la muestra.

3.2 Cuantificación de lípidos totales del *Ei*

Los solventes orgánicos de la fase inferior obtenida durante el procedimiento de Bligh & Dyer [155] fueron evaporados en su totalidad con N_2 gaseoso y se valoró la cantidad de lípidos totales por pesada.

3.3 Cuantificación de ácidos grasos libres

Con el objetivo de cuantificar los ácidos grasos libres (AGL) presentes en la sangre de gallina, en el extracto de intestino de *Triatoma infestans* (Ei) y en el contenido intestinal de dicho insecto vector, se extrajeron los lípidos de cada una de las muestras según la técnica de Bligh & Dyer [155]. Las fases inferiores, conteniendo los lípidos se separaron por cromatografía en capa delgada y se corrieron en paralelo diferentes cantidades de ácido oleico comercial. Las placas se revelaron por la técnica de "charring" [158], y se analizaron por densitometría. Las diferentes cantidades de ácido oleico sembradas se utilizaron para construir una curva de lecturas densitométricas en función de distintas masas sembradas, que permitió cuantificar aproximadamente los AGL totales presentes en cada muestra.

3.4 Identificación por cromatografía gaseosa de los ácidos grasos libres

Con la finalidad de determinar la identidad de los AGL presentes en el Ei, se purifican previamente de ese extracto por cromatografía en capa delgada. La porción de la placa correspondiente a los AGL se recorta y se eluye por inmersión en un vial con 2 ml de metanol, durante 5 min con agitación. Luego de retirar la placa del vial, se adicionan 100 µl de ácido sulfúrico concentrado, se agita y se incuba 2 hs a 64°C en oscuridad, bajo N₂. Transcurrido ese lapso se agregan 2 ml de agua y 2 ml de hexano y se recoge la fase superior. La operación se repite 2 veces sumando las diferentes fases superiores. El solvente se evapora bajo corriente de N₂ y se resuspenden los ácidos grasos metilados por este procedimiento (AGLME), en 100 µl de hexano, conservándose bajo nitrógeno a -20°C, en oscuridad hasta su análisis.

La identificación y cuantificación de cada AGLME se determina por Cromatografía Gaseosa en un equipo Hewlett Packard 5840 A, usando una columna (1.80 m x 2 mm), cuya fase fija consiste en 10 % SP-2330 sobre

Chromosorb W-AW-DMCS (100-200 mesh). El programa incluye un aumento de la temperatura de 140 a 220°C, con una rampa de calentamiento 3°C/min. La detección de los AGLME se realiza con un detector de ionización en llama. La identidad de cada pico se efectúa por comparación con el tiempo de retención de standards auténticos de los distintos AGLME y se confirma por Espectrometría de Masa. *Estas determinaciones fueron realizadas en el Laboratorio del Dr. Gros, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.*

4. RELACIÓN ENTRE PROTEÍNA KINASA C Y METACICLOGÉNESIS

4.1 Diferenciación en parásitos tratados con activadores de la PKC

Para determinar si los activadores conocidos de la PKC [46,51,52,56,58,61] inducen metaciclogénesis, los epimastigotes se incubaron con 10 µg/ml OAG o con 20 ng/ml PMA en medio Grace, por 3 hs, a 28°C. Luego de retirar el estímulo por centrifugación los parásitos se transfieren a medio Grace modificado. La observación microscópica de los cultivos se realizó cada 48 h y se evalúa la metaciclogénesis como se indica en el ensayo de morfogénesis original (sección § 2.2.1).

4.2 Efecto de inhibidores de la PKC sobre la diferenciación

En otro conjunto de experimentos, los epimastigotes fueron tratados con los diferentes inhibidores conocidos de la PKC [159-165] durante 30 min, a 28°C. Transcurrido dicho lapso se retira el inhibidor por centrifugación y se efectúa la estimulación de la metaciclogénesis mediante la metodología habitual. Los compuestos ensayados fueron: 15 nM Bisindolilmaleimida, 2.7

nM Staurosporina, 10 μ M HA1004 y 6 μ M H7. Luego de retirar el estímulo por centrifugación, los parásitos son transferidos a medio Grace modificado y la metaciclogénesis se evalúa como fue descripta en el sección § 2.2.1.

4.3 Efecto de la regulación negativa (“*down-regulation*”) de la PKC, por exposición prolongada a forbol ésteres, sobre la diferenciación

La regulación negativa de la enzima se realizó por exposición prolongada a altas concentraciones de PMA [166,167]. Con esa finalidad, los epimastigotes se incuban durante 24 hs con 100 nM de PMA a 28°C. Luego de dicho período se retira el compuesto y se efectúa el ensayo de estimulación con el *Ei* o con 300 μ M ácido oleico tal como se describe anteriormente (sección § 2.2.1).

4.4 Comparación de perfiles de fosforilación de proteínas producidas por *Ei*, AGL y agonistas de la PKC

La activación de proteínas kinasas *in vivo* se determinó según la técnica descripta por Brattsand y col. [168]. Para ello, los epimastigotes (10^7 células/ml, 41 μ g proteína) se incuban con [32 P] ortofosfato de sodio 100 μ Ci/ml (Ae: 900-1100 μ Ci/ μ mol) durante 15 hs en un medio RPMI 1640 libre de fosfato con 0.2 % de BSA. Luego de dicho período los parásitos se lavan 3 veces, se resuspenden en el mismo volumen de medio Grace y 500 μ l de los parásitos marcados se incuban durante 15-30 minutos a 28°C con los diferentes agentes: a. sin estímulo, b. 10 μ g/ml diacilglicerol, c. *Ei* (2 mg/ml de proteína), d. 300 μ M ácido oleico, e. 1 mM Dibutiril-AMPc.

La reacción se detiene rápidamente sumergiendo las muestras en un baño de hielo y centrifugándolas. Los pellets se resuspenden en 100 μ l del buffer muestra para realizar una electroforesis en geles de poliacrilamida, y se separan las proteínas [169,170]. Los perfiles proteicos resultantes se transfirieren a membranas de nitrocelulosa y se exponen durante 24 hs a

placas de autorradiografía.

4.4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las electroforesis para separación de proteínas se realizaron según el método de Laemmli y col. [169] modificado posteriormente por Studier y col. [170], en geles de 10 % poliacrilamida, en condiciones desnaturizantes.

	Gel separador (10 ml)	Gel concentrador (5 ml)
Acrilamida 30:1	3.3 ml	0.83 ml
Tris HCl 1.5 M, pH 8.8	2.5 ml	—
Tris HCl 1 M, pH 6.8	—	0.63 ml
SDS 10 %	0.1 ml	0.05 ml
PSA 10 %	0.1 ml	0.05 ml
TEMED	4 μ l	5 μ l
H₂O	4 ml	3.4 ml

Todas las muestras fueron tratadas previo a ser sembradas en el gel con buffer muestra (2x) y posterior incubación a 100°C por 3 min.

Buffer muestra (1X) *

Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	50 mM
SDS	2 % p/v
Glicerol	10 % v/v
Azul de Bromofenol	0.1 % p/v

Buffer de corrida (1X)

Tris	25 mM
SDS	0.1 %
Glicina	250 mM

* Se agregan 50 μ l de β -mercaptoetanol a 950 μ l de **buffer muestra** antes de ser utilizado.

La electroforesis se realiza a 120 V para el gel concentrador y 200 V para el gel separador, hasta que el colorante, marcador de frente de corrida, sale del gel. Se utilizó en todas las corridas electroforéticas el kit de marcadores de peso molecular de amplio rango (203 - 72 kDa), preteñidos, de BioRad:

Peso Molecular (Da)

Miosina	203.000
β -galactosidasa	123.000
Seroalbúmina bovina	83.000
Ovoalbúmina	50.700
Anhidrasa carbónica	35.700
Inhibidor de tripsina	29.600
Lisozima	21.900
Aprotinina	7.200

4.4.2 Tinción de proteínas con Coomassie Blue

Los geles se tiñen durante 1 h con una solución de:

Metanol	50 % v/v
Ácido acético	10 % v/v
Coomassie Brilliant Blue R-250	0.2 % p/v

Posteriormente se los decolora con una mezcla de metanol/ ácido acético/ agua (10:7:83), durante el tiempo necesario para lograr un buen contraste.

4.4.3 Tinción de proteínas con plata

Se utilizó el kit Bio-Rad Silver Stain, que es altamente sensible para la

detección de proteínas y ácidos nucleicos y que deriva del método de Merrill y col [171]. Este protocolo de tinción es de 10-50 veces más sensible que el que utiliza Coomassie Brilliant Blue R-250, detectando aproximadamente 0.1 ng/mm² de proteína.

Una vez terminada la electroforesis se incuba el gel durante 30 min en la solución fijadora (40 % metanol, 10 % ácido acético, v/v). Luego de dicho período se sumerge completamente el gel en la solución oxidante (10 ml de la solución concentrada en 90 ml de agua), que contiene dicromato de potasio, por 5 min. Con posterioridad se lava entre 6 y 7 veces con abundante cantidad de agua durante 15 min y se incuba el gel con el reactivo de plata durante 20 min (10 ml de reactivo concentrado en 90 ml de agua). Se detiene la incubación lavando rápidamente con agua. Se sumerge luego el gel en la solución reveladora (32 g de revelador por litro de agua), que contiene carbonato de sodio y paraformaldehído, por aproximadamente 30 min, hasta la aparición de un precipitado marrón. Se reemplaza rápidamente la solución reveladora por solución reveladora fresca y se repite hasta obtener la intensidad deseada. La reacción se detiene con 5 % (v/v) ácido acético.

4.4.4 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas separadas mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Sigma, tamaño de poro: 0.2 µm). Para ello, se coloca la membrana en contacto con el gel y se los sumerge en buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20 %, pH 8.3), durante 1-1.30 hs a 100 V, a 4°C, en celdas para transferencia (Bio-Rad). Para aumentar la eficiencia de la transferencia, sobre todo de las proteínas de alto peso molecular, se puede transferir a 30 V toda la noche, también a 4°C. La comprobación de la eficiencia de transferencia se efectúa incubando por 5 min la membrana de nitrocelulosa

con 5 % (p/v) de Rojo Poinceau en metanol y se lava el exceso con PBS o agua.

5. INCORPORACION Y DESTINO METABÓLICO DE LOS ACIDOS GRASOS EN LOS EPIMASTIGOTES

Para evaluar la incorporación y el destino de los ácidos grasos libres en los epimastigotes, se incubaba una suspensión de epimastigotes en medio Grace (10^7 /ml) con ácido graso radiactivo ($5 \mu\text{Ci /ml}$), durante 15 y 30 min a 28°C . Se complementa la concentración de ácido graso con el agregado de ácido graso frío hasta $300 \mu\text{M}$. Luego de dicho período, los parásitos se centrifugan y lavan 3 veces, para retirar el ácido graso no incorporado. Los lípidos se extraen por el método de Bligh & Dyer [155], se someten a cromatografía en capa delgada y los lípidos radiactivos se visualizan por exposición al procesador Storm® Gel and Blot Imaging System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ USA). La identificación de cada lípido se realiza por comparación lípidos auténticos obtenidos de fuentes comerciales. La intensidad presente en cada porción se cuantificó por densitometría, utilizando el programa SigmaGel (Gel Analysis Software, SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Los ácidos grasos ensayados fueron [^{14}C] ácido oleico (Ae: $51 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), [^{14}C] ácido esteárico (Ae: $54 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) y [^{14}C] ácido palmítico (Ae: $57 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$).

6. RELACIÓN ENTRE METACICLOGÉNESIS E INDUCCIÓN DE SÍNTESIS DE LÍPIDOS EN EPIMASTIGOTES

6.1 inducción de la síntesis de fosfolípidos con factores metaciclogénicos

Con el objetivo de determinar la influencia de los factores metaciclogénicos (OAG, *Ei* y ácido oleico) en la síntesis de fosfolípidos, se realizó una modificación de la técnica descrita por Brattsand y col. [168], que se describió anteriormente para los ensayos de fosforilación de proteínas. Brevemente, los epimastigotes (10^7 células/ml) se incuban [^{32}P] ortofosfato de sodio, 100 $\mu\text{Ci/ml}$ (Ae: 900-1100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) durante 15 h. Alícuotas 5×10^6 parásitos/ensayo se lavan y resuspenden en medio Grace durante 30 min con el agregado de los siguientes estímulos: a. vehículo, b. 10 $\mu\text{g/ml}$ diacilglicerol, c. *Ei* (2 mg/ml de proteína), d. 300 μM ácido oleico. Las incubaciones se detienen por extracción de lípidos [155], y los mismos se siembran en placas de cromatografía en capa delgada con solventes adecuados para separar lípidos polares. Los distintos perfiles lipídicos se visualizaron por exposición al procesador Storm® Gel and Blot Imaging System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ USA). La intensidad presente en cada porción se cuantificó por densitometría, utilizando el programa SigmaGel (Gel Analysis Software, SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

6.2 Inducción de la síntesis de lípidos neutros con *Ei*

Para analizar los efectos de la metaciclogénesis sobre la generación de lípidos neutros se incubaron epimastigotes ($10^7/\text{ml}$) en medio Grace con 2 mg/ml *Ei*, durante 15-30 min, a 28°C. A fin de visualizar el destino de los ácidos grasos que posee ese extracto intestinal, se adicionó al ensayo 1 μCi de [^{14}C] ácido oleico (Ae: 51 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). Se extraen los lípidos por la metodología de Bligh & Dyer [155], se separan por cromatografía en capa delgada con solventes para separar lípidos neutros y, se visualizan y

cuantifican por densitometría luego de la exposición al procesador Storm® Gel and Blot Imaging System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ USA).

6.3 Inducción de la síntesis de lípidos neutros y polares con diferentes concentraciones de ácido oleico

Epimastigotes de 48 hs en medio bifásico (10^7 parásitos/ensayo) se incubaron con diferentes concentraciones: 0, 10, 30, 100 y 300 μM de ácido oleico resuspendidas en medio Grace (1 ml, volumen final) durante 30 min a 28°C . Luego de dicho lapso, a cada muestra se le adicionó 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^{14}C] ácido oleico (Ae: 51 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) y la incubación se continuó durante una hora más. Posteriormente los lípidos fueron extraídos por el procedimiento de Bligh & Dyer [155], separados por cromatografía en capa delgada con solventes para separar lípidos neutros y polares. La cuantificación lipídica se realizó por densitometría luego de la exposición al procesador Storm® Gel and Blot Imaging System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ USA).

7. DEGRADACIÓN DE FOSFATIDILCOLINA EN CULTIVOS DE EPIMASTIGOTES INTACTOS

Con el objetivo de estudiar la incorporación y metabolización de los fosfolípidos presentes en el *Ei*, se incubó una suspensión de epimastigotes (9×10^8) con 1 μCi 1-palmitoil-2-[1- ^{14}C] oleoil fosfatidilcolina (Ae: 58 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) en 1 ml de medio Grace modificado, a 28°C . Alícuotas correspondientes a 1.8×10^8 parásitos se retiran a diferentes tiempos. Los parásitos son lavados 3 veces con PBS para eliminar el radiactivo no incorporado y se extraen los lípidos por el método de Bligh & Dyer [155]. Los lípidos polares y neutros se analizan por cromatografía en capa delgada y se

visualizan por exposición al procesador Storm® Gel and Blot Imaging System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ USA).

8. FUENTES ENDÓGENAS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES: FOSFOLIPASAS EN EL *Trypanosoma cruzi*

Se desarrollaron dos técnicas diferentes que fueron ensayadas en los estadios epimastigotes y en los tripomastigotes y amastigotes:

8.1 Determinación en epimastigotes

Para estudiar la hidrólisis de fosfolípidos endógenos, 10 μCi de [^{14}C] acetato de sodio (Ae: 56 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), resuspendidos en 10 μl de etanol, se agregan a un cultivo de 3.6×10^9 epimastigotes en medio LIT. Luego de 48 h a 28°C, los parásitos se cosechan, lavan y resuspenden en 2 ml de 25 mM succinato de sodio, pH 6, con el agregado de inhibidores de proteasas (0.5 mM TLCK, 0.01 % leupeptina; 2 mM PMSF; 25 U/ml aprotinina; 1 mM benzamidina; 0.2 mg/ml inhibidor de tripsina de soja). Las células se lisan mediante tres ciclos de congelamiento-descongelamiento y posterior sonicación (tres tratamientos de 30 seg. cada uno a 45 W en un Sonifier Cell Disruptor, Model W185).

Diferentes alícuotas conteniendo 2×10^8 parásitos se incuban a 28°C en presencia o ausencia de 1 mM CaCl_2 o 1 mM Na_2EDTA con el agregado de 0.1 % azida sódica. A diferentes tiempos, los lípidos se extraen según la técnica de Bligh y Dyer [155], se separan por cromatografía en capa delgada y se analizan los distintos perfiles obtenidos. La radiactividad se detecta por exposición a placas de autorradiografía y se cuantifica mediante un contador de centelleo líquido (Rackbeta, Liquid Scintillation Counter, Amersham-Pharmacia).

Líquido de centelleo

PPO	2,5 g
POPOP	0.05 g
Tolueno	hasta volumen final: 1000 ml.

Medio LIT: (1 litro): 5 g infusión de hígado, 5 g triptosa, 68 ml NaCl 1 M, 5.3 ml NaK 1 M, 22 ml HPO₄Na₂. Luego de autoclavar se agregan 10 ml de 20 % glucosa, 1 ml hemina (1 g en 50 ml de 0.2 M NaOH), 100 ml SFB (10 % final), 100 µg/ml estreptomicina, 100 U/ml penicilina.

8.2 Determinación en tripomastigotes y amastigotes

Para estudiar la degradación de lípidos endógenos, se utilizó [1-¹⁴C] ácido oleico (Ae: 51 µCi/µmol) como precursor radiactivo, adicionado al cultivo celular (10 µCi/botella). Los parásitos metabólicamente marcados se resuspenden en PBS conteniendo los inhibidores de proteasas citados en la sección anterior. Luego de lisarlos completamente con congelamiento-descongelamiento y sonicación, alícuotas correspondientes a 1.2×10^7 tripomastigotes y 7×10^6 amastigotes se incuban durante 12 h a 37°C en presencia de 0.1 % de azida sódica. Las incubaciones se detienen por extracción de lípidos, los cuales se separan por cromatografía en capa delgada y cuantifican con el mismo procedimiento que el utilizado en los epimastigotes.

9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA A₁ EN *Trypanosoma cruzi*

9.1 Diseño y optimización del protocolo experimental

Para establecer las condiciones que permitieran medir las actividades fosfolipasas presentes en el parásito, se ensayaron en el estadio

epimastigote las siguientes variables: concentración de sustrato, pH óptimo, cantidades de proteína, tiempos de incubación y grado de hidrólisis dentro de los que se mantienen las condiciones de linealidad respecto de proteína y tiempo. **Se halló que, por debajo de 15 % de degradación de sustrato, rigen dichas linealidades en las condiciones utilizadas.**

Epimastigotes de cultivo bifásico se lavan con PBS y se resuspenden en 2 ml de Tris/HCl 20 mM, pH 7 con el agregado de inhibidores de proteasas. Se lisan los parásitos con 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento y sonicación tal como se describe en la sección § 2.4. Se incuban (salvo en los casos indicados) 140 μ l de homogenato de parásitos con 40 μ l de una mezcla de sustrato y 20 μ l de buffer acetato de sodio 1 M, pH 4.7. Los experimentos se realizan en presencia de 200 μ l de dietileter saturado en agua para inhibir la actividad lisofosfolipasa y permitir la acumulación de LPC.

Mezcla de sustrato: 0.01 μ Ci/ensayo de 1-palmitoil-2-[1- 14 C] oleoil fosfatidilcolina (Ae: 58 μ Ci/ μ mol) con 0.6 mg/ensayo de fosfatidilcolina de soja. La formación de suspensiones homogéneas de los lípidos previa al agregado de la muestra de enzima se efectúa mediante agitación con la adición de perlas de vidrio seguido por sonicación.

Las incubaciones se realizan por 60 min., a 28°C, los lípidos se extraen luego según el método de Bligh & Dyer [155] y se separan por cromatografía en capa delgada usando el sistema doble de solventes descripto anteriormente [156,157]. La radiactividad se detecta por autorradiografía y las diferentes manchas se identifican por comparación con lípidos comerciales que se corren en paralelo. Las porciones de las placas conteniendo los diferentes lípidos radiactivos se cortan, se sumergen en viales y se cuantifica la radiactividad por centelleo líquido.

Teniendo en cuenta que el sustrato utilizado estaba marcado en la posición *sn*-2, la aparición de lisofosfatidilcolina radiactiva indica actividad de fosfolipasa tipo A_1 , mientras que la aparición de ácido graso marcado sugiere la actividad fosfolipasa A_2 . La cantidad de LPC radiactiva presente, junto con la actividad específica de la PC usada en el ensayo permite calcular los nmoles de LPC producidos, lo cual es una medida directa de la actividad fosfolipasa A_1 . Con los resultados experimentales se construyeron curvas que grafican la cinética de la reacción. Todos los experimentos subsiguientes de actividad fosfolipasa se realizaron según las condiciones óptimas.

9.2 Determinación de la actividad fosfolipasa A_1 sobre fosfatidiletanolamina

Se procede con la misma metodología que en la sección anterior, utilizando 0.01 μCi /ensayo de 1-palmitoil-2-[1- ^{14}C] linoleoil L-3-fosfatidiletanolamina (Ae: 54.6 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$).

10. PURIFICACIÓN DE LA FOSFOLIPASA A_1 DE EPIMASTIGOTES.

10.1 Diseño y optimización del protocolo

Se ensayan diferentes columnas de intercambio iónico (catiónico y aniónico), y de afinidad, el pH óptimo de la enzima para unirse a cada resina y la fuerza iónica necesaria para eliminarla de cada resina.

10.2 Purificación de la enzima

10.2.1 Preparación de la muestra

Se resuspenden 6 g (peso húmedo) de epimastigotes en 20 ml de 10 mM buffer Tris-HCl, pH 7.8, con el agregado de inhibidores de proteasas: 0.5 mM TLCK, 0.01 % leupeptina; 2 mM PMSF; 25 U/ml aprotinina; 1 mM benzamidina; 0.2 mg/ml inhibidor de tripsina de soja. Los parásitos se lisan por congelamiento-descongelamiento y sonicación, y se centrifugan durante 30 min., a 105.000 xg a 4°C. Se separa el pellet del sobrenadante y se utiliza este último como material para la purificación de la enzima, como se describe a continuación.

10.2.2 Cromatografía en DEAE-celulosa

Una alícuota del sobrenadante se siembra en una columna DEAE-celulosa (6 x 2.4 cm), equilibrada con el mismo buffer. Después de lavar la columna con 5 volúmenes del buffer se efectúa la elución con un gradiente lineal de NaCl, obtenido por la mezcla de 150 ml de 300 mM NaCl/10 mM Tris-HCl, pH 7.8 y 150 ml de 10 mM Tris-HCl, pH 7.8; con un flujo de 50 ml/h. Se recolectan fracciones de 4 ml y la actividad fosfolipasa A₁ se ensaya en cada una de ellas, según el protocolo descrito anteriormente. Aquellas fracciones que contienen el pico de actividad se suman y dializan contra 50 volúmenes de 1 mM CaCl₂/1 mM MnCl₂/0.5 M NaCl/20 mM Tris-HCl, pH 7.4 (buffer CMNT).

10.2.3 Cromatografía en Concanavalina A-Shepharosa

La muestra resultante del procedimiento anterior, se siembra en una columna de ConA -Sepharosa 4B (volumen de lecho: 3.5 ml), equilibrada con buffer CMNT. La elución se lleva a cabo con 50 ml de 10 mM α -metil manopiranosido en el mismo buffer, con un flujo de 2 ml/min, recolectando fracciones de 2 ml. La actividad fosfolipasa A₁ se ensaya en todas las

fracciones y las que presentan el pico de actividad se mezclan y dializan contra buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4.

10.2.4 Cromatografía en Carboxi-Metil-Sepharosa

Luego de la diálisis la muestra se siembra en una columna de CM-Sepharosa (40 ml), equilibrada con buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4. Una vez lavada la columna, la elución de la enzima se realiza con un gradiente lineal de NaCl (0-300 mM), en el mismo buffer, recolectándose fracciones de 2 ml. Las fracciones con actividad se concentran, dializan y liofilizan.

10.2.5 Análisis electroforético

Alícuotas obtenidas en cada uno de los diferentes pasos de la purificación se liofilizaron y disolvieron en buffer de muestra para su sembrado en geles de poliacrilamida. Las proteínas se visualizan por tinción con Coomassie Blue o por tinción con Plata.

11. CARACTERIZACIÓN DE LA FOSFOLIPASA A₁ DE EPIMASTIGOTES

11.1 Determinación del pH óptimo

Con esta finalidad, se incuban alícuotas de la enzima purificada (1 µg de proteína por ensayo) con sustrato radiactivo, pero en este caso se utiliza un buffer universal (pKa: 3.1, 4.8, 6.4, 8.1) compuesto por 0.1 M Tris-HCl / 0.1 M citrato de sodio. El buffer se ajusta a diferentes valores de pH (3 a 8).

11.2 Acción de iones sobre la actividad enzimática

Diversos investigadores han reportado que las fosfolipasas A_1 halladas en células de mamíferos, no requieren iones metálicos divalentes y no son inhibidas por cationes mono o divalentes [109,111,172,173]. Para investigar el efecto de los iones en la enzima del parásito se ensayan los diferentes niveles de actividad fosfolipasa con la adición de 2 mM de Na_2EDTA o $CaCl_2$ o $MgCl_2$.

11.3 Acción de detergentes sobre la actividad enzimática

En otros sistemas biológicos, la fosfolipasa A_1 es conocida por su resistencia a los detergentes, que no la inhiben sino que parecen estabilizarla [108]. Para estudiar el efecto de los detergentes sobre la fosfolipasa del *Trypanosoma cruzi*, diferentes cantidades de Tritón X-100 son agregadas a la enzima purificada y la actividad se determina en todas las muestras. Las concentraciones finales de detergente estudiadas fueron: 0; 0.1; 0.3; 1 y 10 %.

12. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA FOSFOLIPASA A_1 DE EPIMASTIGOTES

La localización subcelular se examinó en el estadio de epimastigote por dos metodologías diferentes:

12.1 Tratamiento con digitonina

Se utiliza la técnica descripta por Cazzulo y col. [174]. Brevemente, los epimastigotes se cosechan por centrifugación (4000 xg, 10 min.), se lavan tres veces en 20 mM de buffer morfolinopropanosulfonato (MOPS), pH 7 con el agregado de una solución de 0.25 M sacarosa/3mM EDTA (MSE) y se

resuspenden en buffer MSE. Se toman alícuotas correspondientes a 150 mg de parásitos (peso húmedo) y se agregan a una solución de MSE conteniendo diferentes concentraciones (0.1-2 mg/ml) de digitonina (40 mg/ml en dimetilformamida), volumen final 1 ml. Luego de incubar durante 5 min., a 25°C la suspensión se centrifuga a 15.000 xg durante 2 min a 4°C.

En alícuotas de los sobrenadantes obtenidos con cada concentración de digitonina se determinan las actividades de enzimas marcadoras de las diferentes localizaciones subcelulares. Mitocondria: citrato sintasa, glicosoma: hexokinasa y fosfoenolpiruvato carboxikinasa, citosol: enzima málica activada por L-aspartato, lisosoma: cruzipaina y α -manosidasa. En cada alícuota se determina también la actividad de fosfolipasa A₁.

Como se ha establecido en experimentos previos (sección § 11.3) que los detergentes estimulan la actividad fosfolipasa A₁ de *Trypanosoma cruzi*, los resultados de las mediciones de la enzima se corrigieron para compensar dicho efecto en cada concentración de digitonina.

12.2 Sedimentación diferencial

Se resuspenden epimastigotes (1 g peso húmedo) en 3 volúmenes de 20 mM PBS, pH 7.4, conteniendo 1 mM 2-mercaptoetanol y 0.1 mM EDTA y se someten a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento. Luego, se centrifugan a 27.000 xg por 30 min, a 4°C y se separa el sobrenadante. El pellet se lava con el mismo buffer y se centrifuga nuevamente. Este último sobrenadante se incorpora al sobrenadante anterior (**Sobrenadante A**).

El pellet resultante se resuspende en 3 volúmenes del mismo buffer y se sonica en un Sonifier Cell Disruptor, Model W185 con tres tratamientos (30 seg. cada uno) a 45 W. El homogenato resultante se centrifuga como se indica más arriba. El sobrenadante se separa y el pellet se lava con 2 volúmenes de buffer y se centrifuga nuevamente. Ambos sobrenadantes se mezclan conjuntamente para formar el **Sobrenadante B**.

Se ensaya la actividad fosfolipasa A₁ en ambos sobrenadantes A y B así como también las actividades de enzimas marcadoras lisosomales: cruzipaina, α -manosidasa y glicosomales: hexokinasa y fosfoenolpiruvato carboxikinasa.

12.3 Determinación de la actividad de enzimas marcadoras

Todas las determinaciones enzimáticas se realizaron a partir de los diferentes sobrenadantes obtenidos en los experimentos de localización subcelular (sección § 12.1 y 12.2). *Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. J.J.B. Cannata. Centro de Investigaciones Bioenergéticas, CIBIERG, CONICET-UBA.*

12.3.1 Actividad de la enzima cruzipaina

El ensayo enzimático se realizó utilizando el sustrato sintético cromogénico Bz-Pro-Phe-Arg-pNA, a pH 8 [175]. Se incuban 350 μ l de la fuente de enzima con 650 μ l de la mezcla de reacción y se mide la absorbancia a 410 nm luego de 30 min de incubación. La mezcla de reacción contiene 500 μ l buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.6, 100 μ l β -mercaptoetanol 0.1 M y 50 μ l sustrato 3 mM.

12.3.2 Actividad de la enzima α -manosidasa

Se utiliza p-nitrofenil- α -D-manopiranosido como sustrato cromogénico a pH 4.5 y en una concentración de 12.5 mM [176]. La mezcla de reacción se compone de 100 μ l de la muestra y 100 μ l del sustrato (25 mM) resuspendido en buffer Acetato de Sodio 0.5 M, pH 4.5. La incubación se efectúa durante 15 min., a 37°C, se detiene con NaOH 1 N o glicina 1 M, pH 10 y se lee la absorbancia a 410 nm.

12.3.3 Actividad de la enzima citrato sintasa

La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente a 30°C como se describió anteriormente [177], siguiendo el incremento en la densidad óptica a 412 nm, debido a la reacción de la coenzima A liberada con el reactivo de tioles DTNB. La mezcla de incubación contiene 50 μ moles buffer Tris-HCl, pH 7.6; 1 μ mol EDTA, 0.1 μ mol AcetilCoA, 0.25 μ moles oxaloacetato, 0.1 μ mol DTNB (volumen final 1 ml). Finalmente se adiciona la preparación enzimática con la que se inicia la reacción.

12.3.4 Actividad de la enzima hexokinasa

La actividad se determinó espectrofotométricamente acoplándole el sistema de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, siguiendo la reducción del NADP⁺ a 340 nm y a 30°C [178]. La mezcla de reacción contiene 50 μ moles buffer Tris-HCl, pH 8; 0.3 μ moles NADP⁺, 5 μ moles MgCl₂, 7 μ moles ATP, 50 μ moles glucosa, 2.5 miliunidades de glucosa -6-fosfato deshidrogenasa (volumen final 1 ml). La preparación enzimática se adiciona para iniciar la reacción.

12.3.5 Actividad de la enzima málica

La actividad fue medida espectrofotométricamente a 30°C en la dirección de la decarboxilación del L-malato, siguiendo la reducción del NADP⁺ a 340 nm, de acuerdo a lo descrito por Cannata y col [179]. La mezcla de reacción contiene 50 μ moles buffer Tris-HCl, pH 7.6, 10 μ moles L-malato, 0.15 μ moles NADP⁺ y 2 μ moles MnCl₂ (volumen final 1 ml). La reacción se inicia con el agregado de la preparación enzimática.

12.3.6 Actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxikinasa

La actividad fue medida radioquímicamente mediante la reacción de intercambio $^{14}\text{CO}_2$ -oxaloacetato. La mezcla de reacción contiene, 25 μmoles buffer Tris-Acetato, pH 5.4; 1 μmol MnCl_2 , 1 μmol ATP, 12 μmoles oxaloacetato, 0.96 μmoles (1.2 μCi) $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (volumen final de 0.5 ml). La preparación enzimática se agrega al final para iniciar la reacción. Luego de incubar durante 10 min a 30°C se detiene por adición de 50 μl HClO_4 2 M y se cuantifica la radiactividad presente [180].

13. ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA A EN LOS DISTINTOS ESTADÍOS DEL *Trypanosoma cruzi*

Se realiza un ensayo comparativo de la actividad fosfolipasa en epimastigotes, tripomastigotes metacíclicos, tripomastigotes de cultivo celular y amastigotes de cultivo celular, analizando los productos de la hidrólisis de fosfatidilcolina radiactiva. Brevemente, la mezcla de incubación consiste en 140 μl de los distintos homogenatos de parásitos (6.12×10^7 epimastigotes y amastigotes y 1.82×10^7 tripomastigotes metacíclicos y de cultivo celular), 40 μl de una mezcla de sustrato y 20 μl de buffer acetato de sodio, 1 M, pH 4.7.

Mezcla de sustrato: 0.01 μCi /ensayo de 1-palmitoil-2-[1- ^{14}C] oleoil fosfatidilcolina (Ae: 58 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) con 0.6 mg/ensayo de fosfatidilcolina de soja. La formación de suspensiones homogéneas de los lípidos previa al agregado de la muestra de enzima se realiza mediante agitación con la adición de perlas de vidrio seguido por sonicación. Se agregan 200 μl de dietileter saturado en agua para inhibir la actividad lisofosfolipasa.

Las incubaciones se realizan por 60 min., a 37°C, los lípidos se extraen luego según el método de Bligh & Dyer [155] y se separan por cromatografía en capa delgada usando el sistema doble de solventes descrito anteriormente [156,157]. La radiactividad se detecta por autorradiografía y las diferentes manchas se identifican por comparación con lípidos comerciales que se corren en paralelo. Las porciones de las placas conteniendo los diferentes lípidos se cortan, se sumergen en viales y se cuantifica la radiactividad por centelleo líquido.

La cantidad de radiactividad presente en la porción correspondiente a la lisofosfatidilcolina, junto con la actividad específica de la fosfatidilcolina utilizada, permite calcular los μ moles de lisofosfatidilcolina producida, lo cual es una medida directa de la actividad fosfolipasa A₁.

14 FUENTES EXÓGENAS DE ÁCIDOS GRASOS: FOSFOLIPASAS PRESENTES EN EL INTESTINO DEL INSECTO VECTOR

14.1 En el extracto del intestino posterior del *Triatoma infestans*

Las actividades fosfolipasas se ensayan en el extracto de intestino del vector (sección § 2.2.3) analizando los productos de la hidrólisis de fosfatidilcolina utilizando los métodos anteriormente descriptos.

Las mezclas de incubación consisten en 140 μ l de extracto de intestino (2 mg/ml de proteína) y 60 μ l de sustrato resuspendido en 0.1 M de Tris-HCl, pH 7.2.

Sustrato: 0.01 μ Ci/ensayo de 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C]oleoilfosfatidilcolina, (Ae: 58 μ Ci/ μ mol) y 0.6 mg/ensayo de fosfatidilcolina de soja

Luego de 1 o 2 horas de incubación a 30°C, los lípidos se extraen por el procedimiento de Bligh & Dyer [155] y se separan por cromatografía

delgada. La radiactividad se detecta por autorradiografía siguiendo la metodología ya descripta.

14.2 En el contenido intestinal de *Triatoma infestans*

El contenido intestinal de grupos de 15 insectos alimentados 5 o 48 hs antes, se obtiene presionando cada insecto con un par de pinzas y disolviendo el material obtenido en 1 ml de PBS.

La actividad fosfolipasa se ensaya a pH 7.2, tal como se describe anteriormente, usando como fuente de enzima el contenido intestinal. Se utilizaron 12 µg de proteína por ensayo y se promediaron los resultados obtenidos a partir de 4 grupos.

15. DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS EN GEL

Una vez realizada la electroforesis en geles de poliacrilamida de la proteína purificada, se tiñe el gel con 0.1 % Coomassie R250 / 20 % MeOH / 0.5 % AcOH y se destiñe con 30% MeOH. Se recorta el trozo de gel que contiene la banda de interés y se realiza una reducción y alquilación de la proteína previa a la digestión que consiste en la incubación con NH_4HCO_3 100 mM y 10 µl de Ditiotretitol 45 mM a 60° C, 30 min. Luego de ese tiempo se agregan 10 µl de iodoacetamida 100 mM y se vuelve a incubar 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Se descarta el solvente y se lava el gel en 500 µl de acetonitrilo 50 % / NH_4HCO_3 100 mM en agitación durante 1 h. Se descarta el solvente, se agregan 50 µl de acetonitrilo y después de 10-15 min se remueve el solvente y se seca el gel en un rotavapor. Se reconstituye el trozo de gel con 10 µl NH_4HCO_3 25 mM conteniendo tripsina modificada Promega (0.1-0.2 µg de tripsina por cada 10 µl de NH_4HCO_3 25 mM). Se deja de 10-15 min y se agregan 10-20 µl de buffer adicional para cubrir el gel (los trozos de gel deben estar húmedos durante la digestión). La incubación

se lleva a cabo durante 15 horas a 37° C. La extracción se realiza lavando 3 veces con 50 µl Acetonitrilo 60 % / 0.1 % TFA por 20 min y centrifugando. La muestra obtenida se centrifuga con vacío hasta que quedan 10-20 µl y se envía a analizar.

16. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE PVDF

Se realizó la transferencia de la fosfolipasa A₁ purificada a membranas de PVDF para intentar su secuenciación. Previamente se activa una hoja de PVDF (Problott de Applied Biosystems) por inmersión en metanol por 10 seg y luego se la enjuaga por inmersión en agua milipore. Se deja transferir a 100 V durante 90 min, se lava y tiñe con 0.1 % de Coomassie blue en metanol 50 %/ácido acético 1 % durante 1 min. Luego se decolora con metanol 50 %, se lava con agua milipore, se seca y se envía para su secuenciación.

17. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Las cantidades de proteínas se determinaron por el método de Lowry y col. [154] o mediante el método de Bradford [181].

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

18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron comparaciones de medias muestrales utilizando tests *t* de Student unilaterales.

Resultados

1. MULTIPLICIDAD DE SEÑALES METACICLOGÉNICAS EN EXTRACTOS DE INTESTINO DE TRIATOMÍNEOS

En nuestro laboratorio se estableció que extractos intestinales de los Triatomíneos poseen actividad metaciclogénica [32]. Estudios posteriores demostraron que la digestión de la hemoglobina en el intestino de estos insectos resulta en la aparición de péptidos con actividad metaciclogénica variable [34]. Sin embargo esos péptidos no inducen los porcentajes de metaciclogénesis obtenidos con el extracto de intestino posterior de *Triatoma infestans* (Ei) completo (**Figura 1**), sugiriendo la presencia de otros factores metaciclogénicos. En este trabajo se investigó la aparición de moléculas liposolubles con actividad metaciclogénica, durante la digestión de la sangre en el intestino del insecto vector.

2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS LÍPIDOS PRESENTES EN EL EXTRACTO DE INTESTINO POSTERIOR DE *Triatoma infestans* (Ei).

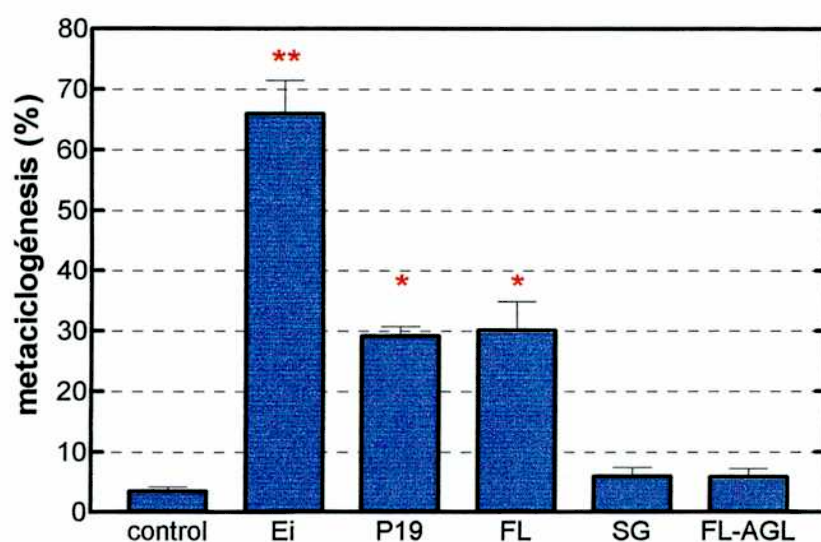
2.1. CONCENTRACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES EN EL Ei

Al realizar la extracción de los lípidos [155] de extractos de intestino posterior de *Triatoma infestans*, cuya concentración de proteínas había sido ajustada a 2 mg/ml (cantidad utilizada para los ensayos de metaciclogénesis), se determinó que la concentración lipídica en dichos extractos oscilaba entre 250 a 350 µg/ml, dependiendo del lote de insectos analizado.

2.2. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS LÍPIDOS TOTALES DEL *Ei*

Los lípidos obtenidos en la sección anterior (§ 2.1), fueron utilizados para evaluar su capacidad de inducir metacicloogénesis. Como se observa en la **Figura 1**, los lípidos del *Ei* son capaces de promover una morfogénesis significativa con respecto a los valores obtenidos con parásitos no estimulados (control).

Figura 1: Los lípidos del *Ei* inducen metacicloogénesis



Los asteriscos señalan los componentes que inducen aumentos significativos en la metacicloogénesis con respecto al control (parásitos no estimulados). ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$. **Ei**: extracto de intestino posterior de *T. infestans* (proteína: 2 mg/ml), **P19**: péptido derivado de la globina que corresponde a los residuos 30-49 (100 μ M). **FL**: fracción lipídica del *Ei* (300 μ g/ml), **SG**: sangre de gallina hemolisada (proteína: 2 mg/ml), **FL-AGL**: fracción lipídica del *Ei* sin los ácidos grasos libres.

Pudimos observar también que mientras que la fracción lipídica del *Ei* induce la diferenciación del estadio de epimastigote a tripomastigote metacíclico, el

hemolisado de sangre de gallina, alimento del vector en nuestro laboratorio, en cantidad equivalente, no es capaz por sí mismo de estimular dicha metaciclologénesis (**Figura 1**).

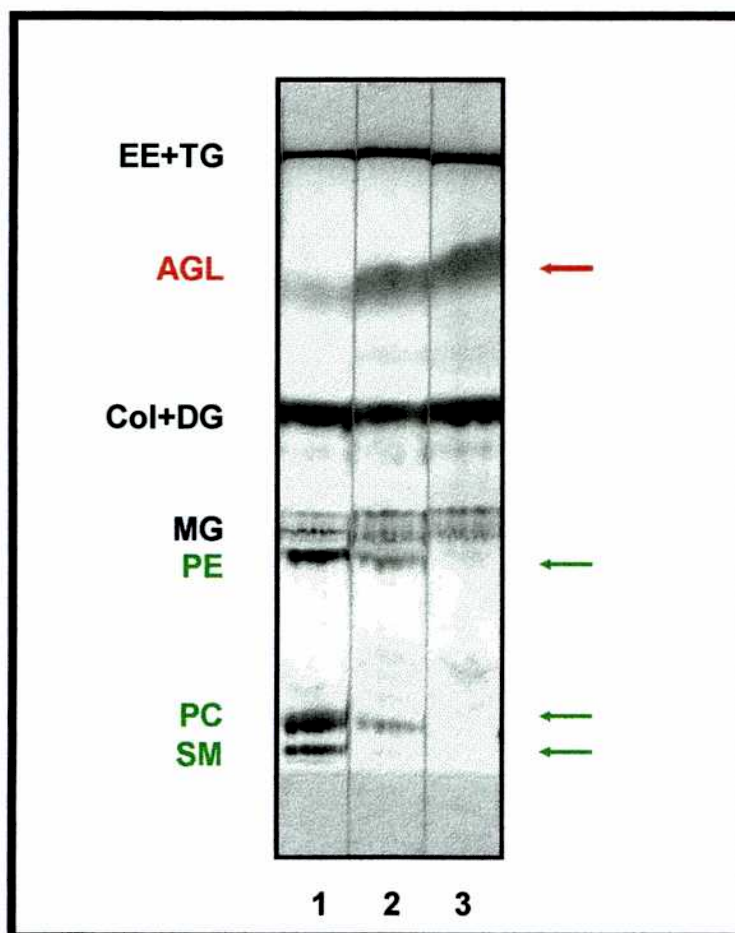
Estos hallazgos determinaron la necesidad de analizar los lípidos presentes en el *Ei* para identificar el componente activo. Este componente debería presentarse en diferente concentración o estar ausente en la sangre de gallina sin digerir, pues esta última es inactiva.

3. ANALISIS DE LOS LÍPIDOS PRESENTES EN LA SANGRE DE GALLINA Y EN EL *Ei*

3.1. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA

Con el objetivo de comparar la composición lipídica de la sangre de gallina sin digerir y el *Ei*, se analizaron dichas muestras por cromatografía en capa delgada (**Figura 2**). Los solventes utilizados permitieron la separación de los lípidos polares y neutros de cada preparación. La carbonización de los lípidos mediante la técnica de "charring" [158] permitió la visualización y posterior cuantificación densitométrica de cada lípido presente.

Figura 2: Análisis de los lípidos presentes en la sangre de gallina sin digerir, en el *Ei* y en el contenido intestinal



1: sangre de gallina sin digerir, **2:** *Ei*: extracto de intestino posterior de *T. infestans*, **3:** contenido intestinal de *T. Infestans*. En todos los casos la cantidad de lípidos sembrada fue de 1 mg. **SM:** esfingomielina, **PC:** fosfatidilcolina, **PE:** fosfatidiletanolamina, **MG:** monoacilglicerol, **Col+DG:** colesterol + diacilglicerol, **AGL:** ácidos grasos libres, **EE+TG:** ésteres de esteroides + triacilglicerol.

En la **Figura 2** se observa, en la calle 1, sangre de gallina sin digerir, una gran cantidad de fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), y de lípidos neutros: triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol, ésteres de esteroides y colesterol así como pequeñas

cantidades de ácidos grasos libres (AGL). En la calle 2, que corresponde al *Ei*, se muestra una marcada disminución en la cantidad de fosfolípidos y un aumento importante en la cantidad de AGL.

Por último, considerando que el *Ei* está formado por el tejido intestinal y su contenido, se decidió analizar también el perfil lipídico del contenido intestinal aislado presionando ligeramente los insectos (calle 3). Esa calle refleja nuevamente el aumento de AGL observado en el *Ei* y una desaparición total de los fosfolípidos, indicando que las escasas cantidades de PC y PE halladas en el *Ei* pueden explicarse como restos de las membranas celulares del intestino del insecto.

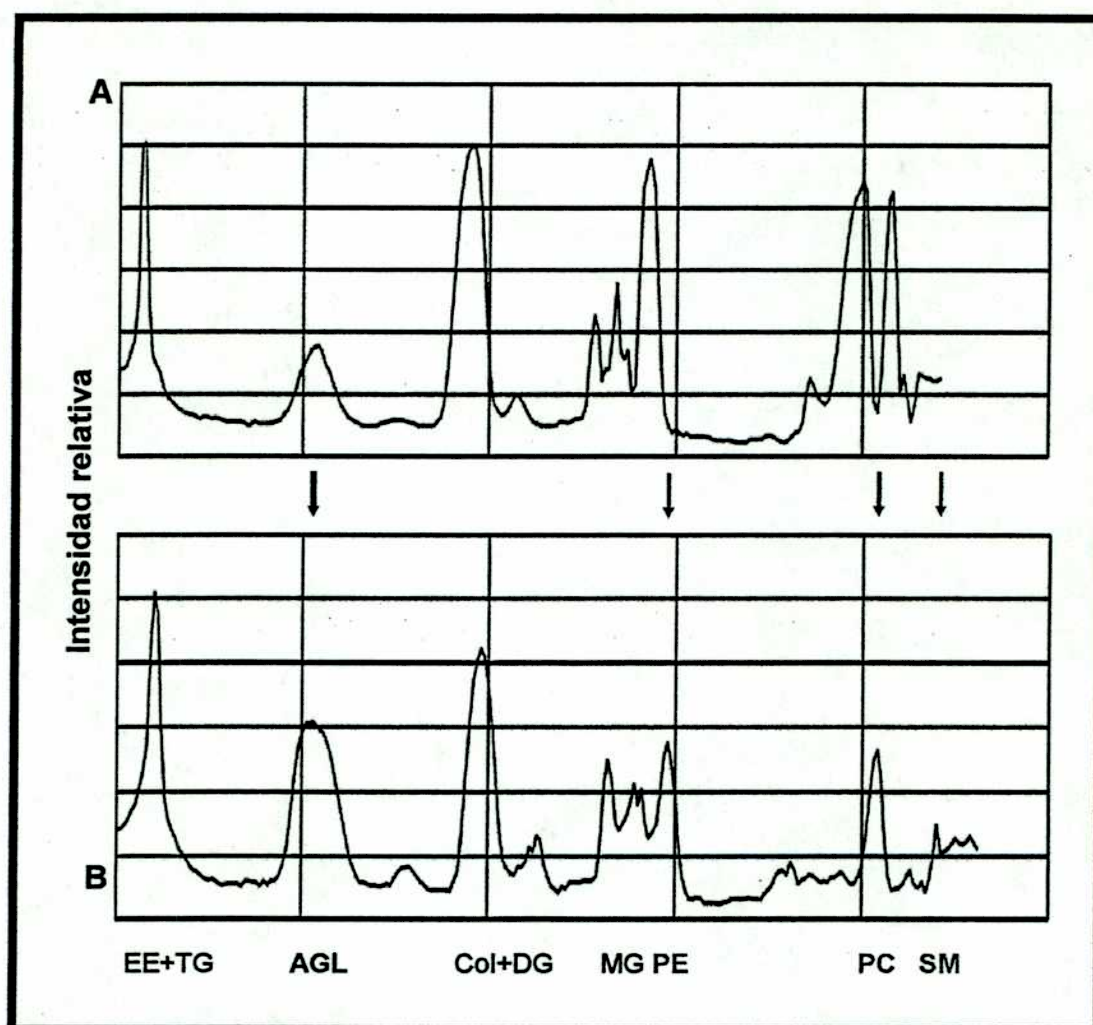
Por otro lado, los aumentos en los AGL y las disminuciones de los fosfolípidos en la sangre digerida (*Ei*) indican la activa presencia de fosfolipasas en el contenido intestinal.

3.2. DENSITOMETRÍA Y CUANTIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS HALLADOS EN LA SANGRE DE GALLINA Y EN EL *Ei*.

Los perfiles lipídicos, mostrados en la Figura 1, fueron analizados utilizando un scanner Umax, Astra 610S (Figura 3) y mediante el programa SigmaGel se determinó por densitometría el porcentaje relativo de cada lípido presente, que se observa en la Tabla 1.

Los resultados muestran un aumento de AGL de 4 veces en el *Ei* con respecto a la sangre de gallina sin digerir. Dado que la cantidad de lípidos totales presentes en el *Ei* se determinó en aproximadamente 300 µg/ml y que los AGL representan el 30.4 % de la totalidad de los lípidos, dicha cantidad corresponde aproximadamente a 91 µg/ml. Por otra parte, las disminuciones de los lípidos polares en el *Ei* respecto de la sangre de gallina, resultaron de aproximadamente 40 y 75 % para PE y PC, respectivamente.

Figura 3: Densitometría de los lípidos hallados en la sangre de gallina no digerida (A) y en el extracto de intestino de *Triatoma infestans* (B).



SM: esfingomielina, **PC:** fosfatidilcolina, **PE:** fosfatidiletanolamina, **MG:** monoacilglicerol, **Col+DG:** colesterol + diacilglicerol, **AGL:** ácidos grasos libres, **EE+TG:** ésteres de esteroides + triacilglicerol.

Tabla 1: Aumento de los ácidos grasos libres en el *Ei*

LÍPIDO	SG (%)	<i>Ei</i> (%)
EE+TG	9.5	13.5
AGL	7.6	30.4
Col+DG	31.8	30.2
MG	8.3	11.6
PE	14.3	8.6
PC	19.7	5.1
SM	8.8	0.6

SG: sangre de gallina sin digerir, ***Ei*:** extracto de intestino posterior de *T. infestans*. **EE +TG:** ésteres de esteroides + triacilglicerol, **AGL:** ácidos grasos libres, **Col+DG:** colesterol + diacilglicerol, **MG:** monoacilglicerol, **PE:** fosfatidiletanolamina, **PC:** fosfatidilcolina, **SM:** esfingomielina.

4. ÁCIDOS GRASOS LIBRES DEL *Ei* Y SU PARTICIPACIÓN EN EL PROCESO DE METACICLOGÉNESIS

4.1. ANÁLISIS DE LA RELEVANCIA DE LOS ÁCIDOS GRASOS DEL *Ei* EN EL PROCESO DE METACICLOGÉNESIS

Por cromatografía en capa delgada se determinó la aparición de importantes cantidades de AGL en el *Ei*, notoriamente superiores a las halladas en la sangre de gallina. La capacidad de los AGL de atravesar membranas biológicas y sus efectos sobre el metabolismo lipídico, activando enzimas

tales como la fosfatasa de ácido fosfatídico [145-149], sugirieron un posible rol de estos lípidos en la metaciclologénesis.

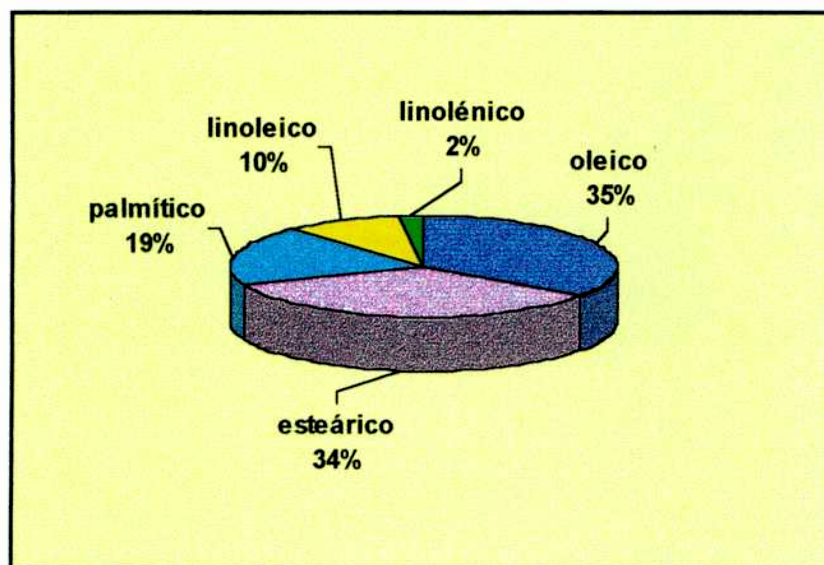
Experimentos preliminares en los cuales se investigó la posible actividad metaciclologénica de los distintos lípidos separados por cromatografía en capa delgada, indicaron que sólo los AGL manifestaban dicha actividad (resultados no mostrados). Para confirmar este hallazgo, se realizó nuevamente separación cromatográfica de la fracción lipídica del *Ei*, removiéndose en esta oportunidad, la porción correspondiente a los AGL. Los lípidos restantes se eluyeron conjuntamente y se ensayó la actividad biológica tal como se describe en Materiales y Métodos (sección § 2.2.1).

Los resultados que se observan en la **Figura 1** determinaron que al ser eliminados los AGL de la fracción lipídica, la estimulación de la metaciclologénesis resulta suprimida, mientras que su restitución a los cultivos da lugar al recuperación completa de los porcentajes de diferenciación previamente observados ($30.5 \pm 3.6 \%$).

4.2. IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA DE LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES PRESENTES EN EL *Ei*.

Se realizaron estudios por cromatografía gaseosa de la fracción de AGL, como se detalla en Materiales y Métodos, que demostraron la existencia de oleato, estearato, palmitato, linoleato y linolenato. La identidad de cada uno de ellos fue confirmada por espectrometría de masa. Los porcentajes de cada ácido graso se grafican en la **Figura 4** que muestra que los ácidos oleico y esteárico son significativamente mayoritarios con respecto al resto de los AGL.

Figura 4: Los ácidos oleico y esteárico son los ácidos grasos mayoritarios del *Ei*

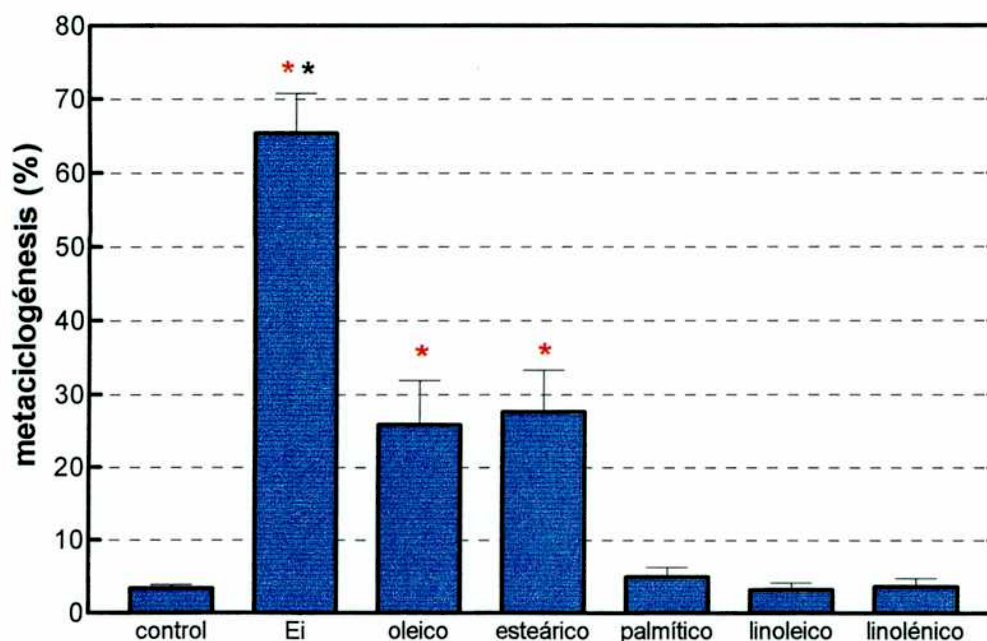


4.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS DIFERENTES ÁCIDOS GRASOS IDENTIFICADOS EN EL *Ei*

Con la finalidad de estudiar si los ácidos grasos hallados en el *Ei* eran capaces de inducir metaciclogénesis, cada AGL fue agregado en forma aislada a los cultivos de epimastigotes en el ensayo de diferenciación. La concentración de cada AGL utilizada en estos experimentos fue equivalente a la hallada en el *Ei*: 91 $\mu\text{g/ml}$, que corresponde aproximadamente a 300 μM para los ácidos grasos mayoritarios, oleico y esteárico. Sin embargo, cabe destacar que la concentración de los ácidos palmítico, linoleico y linolénico en el *Ei*, es mucho menor (**Figura 4**).

La **Figura 5** muestra los porcentajes de metaciclogénesis alcanzados con cada uno de los AGL y en ella se observa que sólo el ácido esteárico y el ácido oleico, fueron capaces de promover la diferenciación.

Figura 5: El ácido oleico y el ácido esteárico inducen metaciclologénesis.



Los asteriscos señalan los componentes que inducen aumentos significativos en la metaciclologénesis con respecto al control (parásitos no estimulados). ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$. La concentración de AGL utilizada fue de $300 \mu\text{M}$. *Ei*: extracto de intestino de *T. infestans*.

5. RELACIÓN ENTRE PROTEÍNA KINASA C Y METACICLOGÉNESIS

Está ampliamente aceptado que diversas proteínas kinasas participan en la regulación de la diferenciación celular [39,46,56,167]. Observaciones que se describen en detalle más adelante en esta Tesis, mostraron que los AGL inducen la síntesis de diacilglicerol, lípido activador de la proteína kinasa C (PKC). Por este motivo se investigó si dicha kinasa se halla involucrada en la diferenciación del *Trypanosoma cruzi*. Para alcanzar este objetivo se usaron 4 estrategias experimentales diferentes:

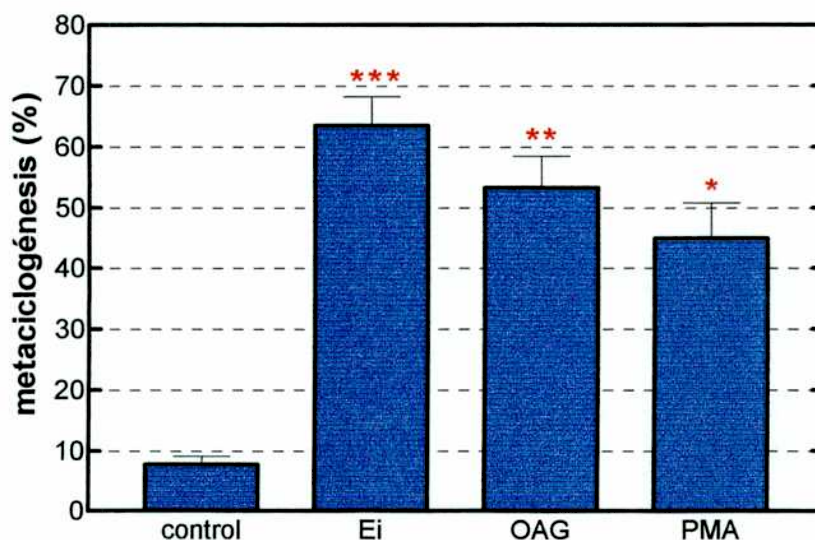
- (i) Diferenciación en parásitos tratados con activadores de la PKC.
- (ii) Efecto de inhibidores de la PKC sobre la diferenciación.
- (iii) Efecto de la regulación negativa ("*down-regulation*") de la PKC, por exposición prolongada a forbol ésteres, sobre la diferenciación.
- (iv) Comparación de perfiles de fosforilación de proteínas producidas por *Ei*, AGL y agonistas de la PKC.

5.1. DIFERENCIACIÓN EN PARÁSITOS TRATADOS CON ACTIVADORES DE LA PKC

Para evaluar los efectos de los agonistas de la PKC sobre la morfogénesis de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, se utilizaron compuestos cuya concentración óptima y activación de la enzima había sido demostrada anteriormente en el parásito y en otros sistemas [46,51,52,56,58,61]. Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 6. Se observa que cuando los parásitos son estimulados durante 30 min con forbol miristato acetato (PMA) o con oleoil acetil glicerol (OAG), se logra en ambos casos una inducción significativa de la morfogénesis con relación a los controles no estimulados.

En todos los experimentos se realizaron controles utilizando la misma concentración del vehículo empleado para disolver los compuestos (dimetilsulfóxido o etanol) sin que ninguno de ellos mostrara algún efecto tóxico sobre las células.

Figura 6: Los activadores de la PKC inducen metaciclologénesis.



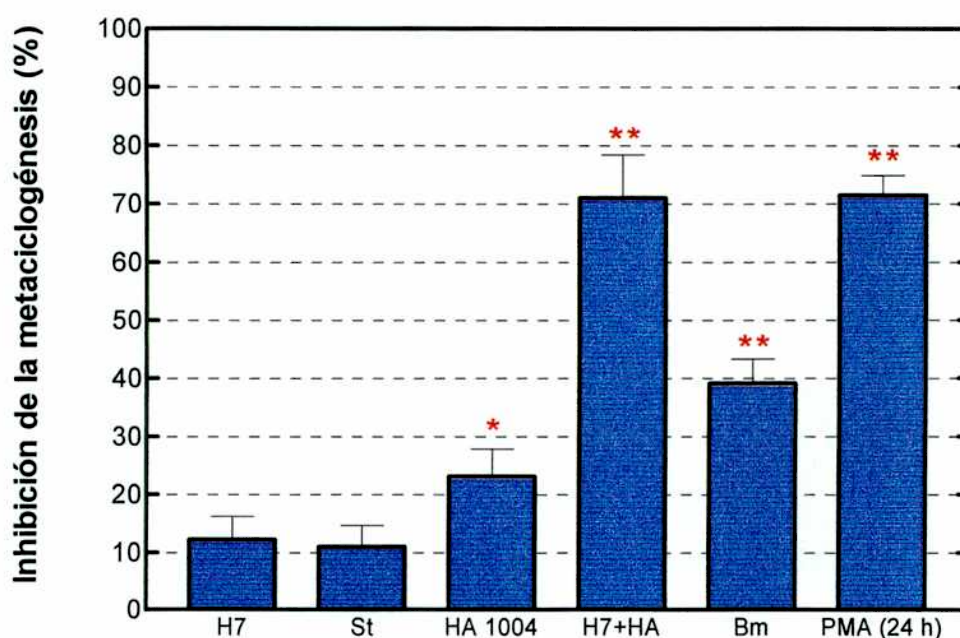
Los asteriscos señalan los componentes que inducen aumentos significativos en la metaciclologénesis con respecto al control (parásitos no estimulados). *** $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. **Ei**: extracto de intestino posterior de *T. infestans*, **OAG**: 1-oleoil 2-acetil-*sn* glicerol (10 $\mu\text{g/ml}$), **PMA**: forbol 12-miristato 13-acetato (20 ng/ml).

5.2. EFECTO DE INHIBIDORES DE LA PKC SOBRE LA DIFERENCIACIÓN.

Los epimastigotes fueron incubados con diferentes inhibidores conocidos de la PKC [159-165] previo a la estimulación con el *Ei*. Los compuestos utilizados fueron: H7 ($K_i = 6 \mu\text{M}$), HA 1004 ($K_i = 40 \mu\text{M}$), Staurosporina ($\text{IC}_{50} = 2.7 \text{ nM}$) y Bisindolilmaleimida ($K_i = 10 \text{ nM}$). Como se muestra en la **Figura 7**, HA1004 (10 μM) y Bisindolilmaleimida (15 nM) inhiben significativamente la metaciclologénesis en concentraciones que no poseen efectos tóxicos. El H7 (6 μM) por sí mismo carece de acción inhibitoria sobre la diferenciación. Sin embargo, cuando el H7 y el HA1004 fueron añadidos conjuntamente, se observó una inhibición significativamente mayor de la

metacicloogénesis. Ninguna de las concentraciones de los compuestos anteriores, utilizadas mostró ser tóxicas, ya que no se vio afectada la movilidad ni la morfología de los parásitos. Sin embargo, cuando el alcaloide microbiano Staurosporina (IC_{50} 2.7 nM), fue ensayado en concentraciones de 2.7 nM, no se detectó una supresión significativa de la metacicloogénesis (**Figura 7**). Concentraciones mayores de este inhibidor resultaron en una importante toxicidad celular.

Figura 7: Efecto de inhibidores de la PKC sobre la metacicloogénesis.



Los asteriscos señalan los componentes que inducen aumentos significativos en la metacicloogénesis con respecto al control (parásitos no estimulados). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. La inhibición de la metacicloogénesis fue evaluada con respecto a epimastigotes estimulados con *Ei* y sin inhibidores. **St**: Staurosporina, **Bm**: Bisindolilmaleimida, **PMA**: forbol-12-miristato-13-acetato (24h)

5.3. EFECTO DE LA REGULACIÓN NEGATIVA (“*down-regulation*”) DE LA PKC, POR EXPOSICIÓN PROLONGADA A FORBOL ÉSTERES, SOBRE LA DIFERENCIACIÓN.

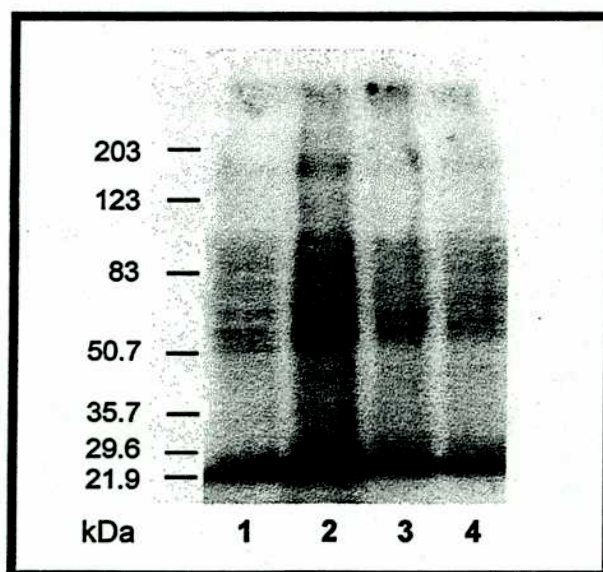
Numerosos investigadores han descrito en células eucariotas, que mientras que la incubación con cantidades bajas de PMA, administradas en pulsos de corta duración, estimulan a la PKC, altas concentraciones de dicho compuesto, por tiempos prolongados, regulan negativamente a la enzima [166,167,182]. Con el objetivo de comprobar si en el *Trypanosoma cruzi* el forbol éster actúa de la misma manera y tiene efecto sobre la metaciclogénesis, se expuso a los parásitos a altas concentraciones de PMA 100 nM (61.7 ng/ml), por 24 hs. Transcurrido dicho período, se realizó el ensayo de diferenciación, comprobándose que en los epimastigotes este tratamiento producía una regulación negativa de la PKC, que bloqueaba significativamente la metaciclogénesis inducida por el *Ei* (Figura 7). Resultados similares se obtuvieron cuando los parásitos fueron incubados con ácido oleico, reemplazando al *Ei* completo (dato no mostrado).

Para comprobar que la PKC estuviera en efecto regulada negativamente por la incubación con altas concentraciones de PMA, durante tiempos prolongados, se realizaron ensayos de fosforilación de proteínas. Se utilizaron epimastigotes (10^7 células/ml, 41 μ g proteína) tratados con 100 nM PMA durante 24 hs a 28°C y, como control, alícuotas de los mismos cultivos tratados con el correspondiente vehículo, DMSO. Al cabo de dicho período se elimina por lavado el compuesto y se añade [32 P] ortofosfato de sodio 100 μ Ci/ml (Ae: 900-1100 μ Ci/ μ mol) disuelto en medio RPMI 1640 libre de fosfato con 0.2 % de BSA, prolongándose la incubación por 12 horas adicionales. Luego de ese lapso, los parásitos se lavan 3 veces, se resuspenden en el mismo volumen de medio Grace y 500 μ l de los parásitos marcados se exponen durante 30 min a: DMSO (control) o a PMA (20

ng/ml). Las proteínas fosforiladas se analizan por electroforesis en geles de SDS poliacrilamida y se visualizan por autorradiografía.

La **Figura 8** ilustra la disminución de la actividad enzimática por efecto de la exposición prologada a PMA. Este resultado verifica que el fenómeno de la regulación negativa también ocurre en *Trypanosoma cruzi*. En la calle 2 (parásitos estimulados con un pulso de PMA, 30 min, control positivo) se observan bandas intensas de fosforilación. Los niveles de fosforilación de proteínas para los parásitos que fueron incubados 24 hs con PMA (calle 3) resultaron semejantes al control (parásitos no estimulados, calle 1). La supresión de la fosforilación tuvo lugar también en parásitos estimulados con Ei en lugar de PMA (calle 4). Estos experimentos confirman funcionalmente que en estas condiciones, la enzima está bloqueada, sugiriendo una relación entre la actividad de la PKC y la metacicloogénesis.

Figura 8: Regulación negativa de la PKC de *Trypanosoma cruzi*

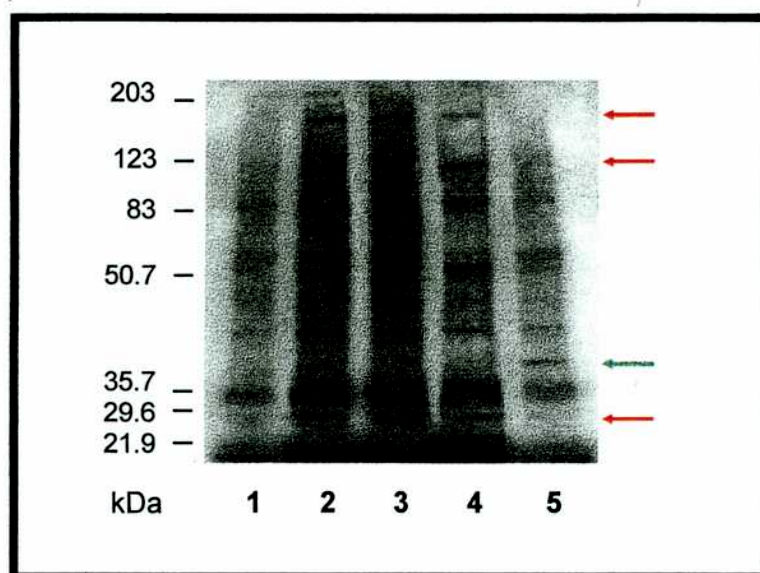


1: control sin estimulación, 2: estimulación con 32 nM (20 ng/ml) PMA, 30 min, 3: regulación negativa de la PKC con 100 nM (61.7 ng/ml) PMA por 24 hs, 4: regulación negativa de la PKC y posterior estimulación con el Ei. Se sembró material correspondiente a 4 µg proteína (10^6 parásitos) en cada calle.

5.4. COMPARACIÓN DE PERFILES DE FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS PRODUCIDAS POR *Ei*, AGL Y AGONISTAS DE LA PKC.

Finalmente, en un cuarto enfoque se investigó la activación *in vivo* de la PKC, analizando la fosforilación de proteínas luego de la estimulación de la metaciclologénesis. Para ello se utilizaron como inductores de la diferenciación *Ei* y PMA y se compararon los perfiles de fosforilación de proteínas en parásitos previamente marcados con [32 P] fosfato de sodio.

Figura 9: Fosforilación de proteínas en epimastigotes tratados con estimuladores de la metaciclologénesis.



1: control, 2: OAG 10 μ g/ml, 3: *Ei* 2 mg/ml, 4: ácido oleico 300 μ M, 5: Dibutiril-AMPc 1 mM. En cada calle se sembró material correspondiente a 4 μ g proteína (10^6 parásitos). Las flechas rojas señalan las proteínas fosforiladas por la PKC, mientras que la flecha verde indica un banda fosforilada por la PKA.

La **Figura 9** muestra los distintos perfiles de fosforilación obtenidos con cada estímulo. Se observa un aumento en la fosforilación de las bandas de

aproximadamente 180, 120 y 26 kDa en las calles correspondientes a OAG (calle 2), *Ei* (calle 3) y ácido oleico (calle 4), con relación al control sin estimular (calle 1). Es decir, los perfiles de fosforilación correspondientes al *Ei* y al ácido oleico son semejantes al del OAG, activador de la PKC. Ello sugiere fuertemente que tanto el *Ei* como el ácido oleico, que son estimuladores de la metaciclologénesis, activan la PKC en células de *T. cruzi*.

Se incorporó también en esta investigación la estimulación con 1 mM Dibutiril-AMPc (calle 5), un análogo permeante del AMPc que activa selectivamente a la proteína kinasa A (PKA) [183,184]. Este análisis mostró un perfil de fosforilación netamente distinto de los observados al utilizar el *Ei*, OAG o ácido oleico. En particular el Dibutiril-AMPc induce una fosforilación marcada en una banda de peso molecular aproximado de 38 kDa.

6. INCORPORACIÓN Y DESTINO METABÓLICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN LOS EPIMASTIGOTES

Para determinar si los ácidos grasos, presentes en el *Ei* son incorporados por los epimastigotes y cuál es su destino final en el metabolismo del parásito, se realizaron estudios de marcación radioisotópica, con los AGL mayoritarios del *Ei*: [^{14}C] ácido oleico, [^{14}C] ácido esteárico y [^{14}C] ácido palmítico.

6.1 INCORPORACIÓN DE ÁCIDO OLEICO Y ÁCIDO ESTEÁRICO

En las Figuras 10 A y B, se observa ya en tiempos tempranos (15 min) una incorporación importante de los ácidos grasos oleico y esteárico, siendo mucho mayor la correspondiente al ácido oleico. En la Figura 10A se

sembró en cada calle el total de lípidos extraídos a partir de los parásitos utilizados (10^8 células por ensayo) y en la **Figura 10B** se sembraron alícuotas conteniendo la misma cantidad de radiactividad, aproximadamente $0.2 \mu\text{Ci}$. Ambas figuras reflejan que la incorporación de estos AGL ocurre tanto hacia la síntesis de lípidos polares como de lípidos neutros.

Figura 10: Incorporación de ácidos oleico y esteárico en epimastigotes.

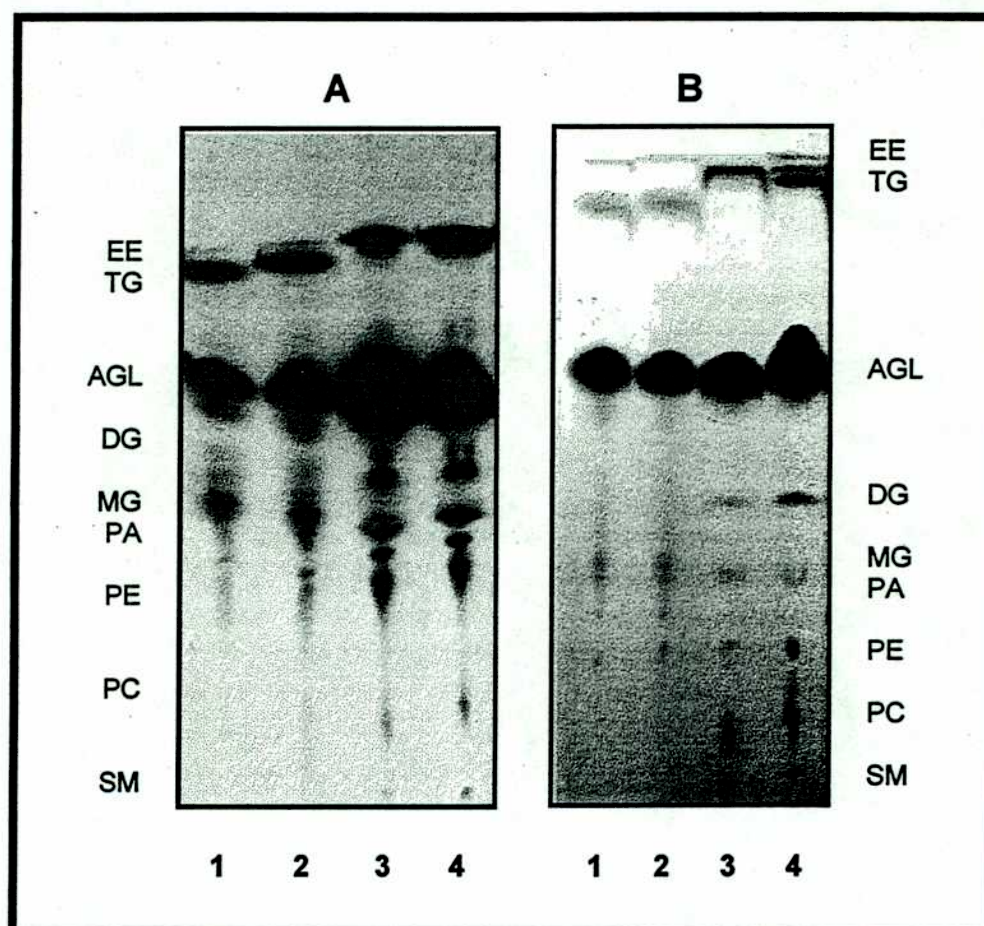


Figura A: 10^8 parásitos por calle, **Figura B:** $0.2 \mu\text{Ci}$ por calle. 1: ácido esteárico 15 min, 2: ácido esteárico 30 min, 3: ácido oleico 15 min, 4: ácido oleico 30 min. **SM:** esfingomielina, **PC:** fosfatidilcolina, **PA:** ácido fosfatídico, **PE:** fosfatidiletanolamina, **MG:** monoacilglicerol, **DG:** diacilglicerol, **AGL:** ácidos grasos libres, **TG:** triacilglicerol, **EE:** ésteres de esteroles.

Tabla 2: Incorporación y destino metabólico de los ácidos esteárico y oleico en epimastigotes

Incorporación de radiactividad (%)				
Lípido	Ácido esteárico (15 min)	Ácido esteárico (30 min)	Ácido oleico (15 min)	Ácido oleico (30 min)
EE+TG	5	6.6	17.4	21.8
AGL	82.3	67.9	63.3	55
DG	1.7	1.4	3.4	6.9
MG	4.2	9.7	---	---
PA	2.8	8.3	4.5	3.3
PE	3	5.2	0.7	3.6
PC	1	0.9	8.7	8.3
SM	---	---	2	1.1

Las determinaciones de los porcentajes de cada lípido son los correspondientes al análisis de la **Figura 10 B**. **SM**: esfingomielina, **PC**: fosfatidilcolina, **PA**: ácido fosfatídico, **PE**: fosfatidiletanolamina, **MG**: monoacilglicerol, **DG**: diacilglicerol, **AGL**: ácidos grasos libres, **EE+TG**: ésteres de esteroides + triacilglicerol.

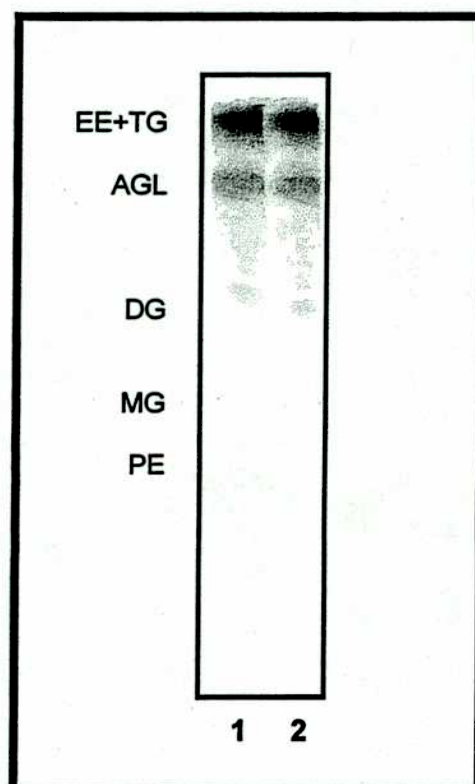
La **Figura 10** pone en evidencia la capacidad de los AGL de incorporarse rápidamente al parásito, generando diversos lípidos. Dentro de ellos, destacan en el caso del ácido esteárico: ésteres de esteroides, monoacilglicerol, fosfatidiletanolamina y ácido fosfatídico. Mientras que con respecto al ácido oleico, se sintetizan mayoritariamente: ésteres de

esteroles, diacilglicerol, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina y esfingomielina.

6.2 INCORPORACIÓN DE ÁCIDO PALMÍTICO

A diferencia de lo observado con los ácidos oleico y esteárico (**Figura 10**) los ensayos con ácido palmítico mostraron que si bien se incorpora al parásito, no lo hace hacia los diferentes fosfolípidos del parásito. La **Figura 11** refleja que en los tiempos ensayados (15 y 30 min) dicho ácido graso sólo es utilizado para la síntesis de lípidos neutros, mayoritariamente ésteres de esteroides y triacilglicerol, con muy baja incorporación hacia diacilglicerol.

Figura 11: Incorporación de ácido palmítico en epimastigotes.



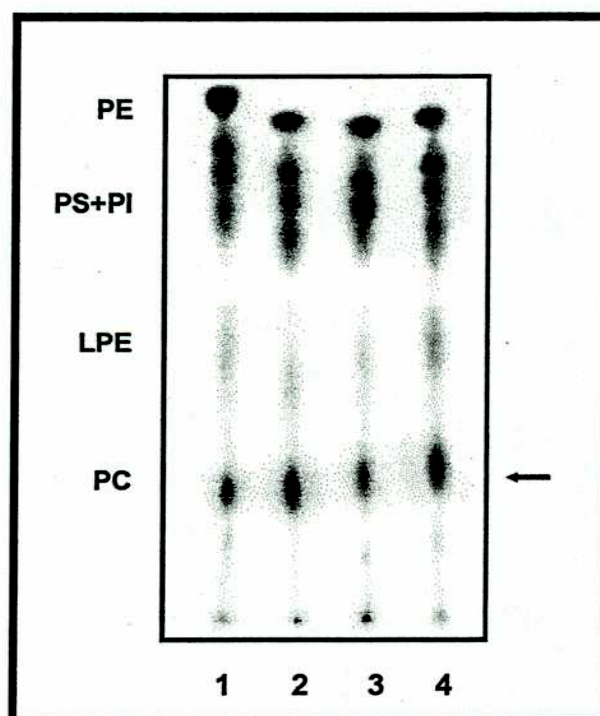
1: 15 min, 2: 30 min. Se utilizaron 10^8 parásitos por calle. MG: monoacilglicerol, DG: diacilglicerol, AGL: ácidos grasos libres, EE+TG: ésteres de esteroides + triacilglicerol, PE: fosfatidiletanolamina, PC: fosfatidilcolina.

7. RELACIÓN ENTRE METACICLOGÉNESIS E INDUCCIÓN DE SÍNTESIS DE LÍPIDOS EN EPIMASTIGOTES

7.1 INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE FOSFOLÍPIDOS CON FACTORES METACICLOGÉNICOS

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en los experimentos de incorporación de AGL marcados con ^{14}C , se empleó una metodología similar a la utilizada en los ensayos de fosforilación de proteínas (sección § 5.4). Se investigó si los diferentes factores metaciclogénicos estimulaban la síntesis de fosfolípidos en parásitos marcados previamente con $[^{32}\text{P}]$ fosfato de sodio.

Figura 12: Síntesis de fosfatidilcolina en epimastigotes estimulados con OAG, ácido oleico y *Ei*



1: control (sin estímulo), 2: ácido oleico 300 μM , 3: OAG 10 $\mu\text{g/ml}$, 4: *Ei* 2 mg/ml .
 PC: fosfatidilcolina, LPE: lisofosfatidiletanolamina, PS+PI: fosfatidilserina+
 fosfatidilinositol, PE: fosfatidiletanolamina

Tabla 3: Aumento de la síntesis de fosfatidilcolina en epimastigotes estimulados con ácido oleico, OAG y *Ei*

Lípido	CONTROL (%)	OLEICO (%)	OAG (%)	<i>Ei</i> (%)
PE	28.3	20.4	23.7	20.3
PS+PI	63.1	57.5	64.3	59
LPE	2.5	2.6	2.8	2.7
PC	6.1	19.5	9.2	18

PC: fosfatidilcolina, LPE: lisofosfatidiletanolamina, PS+PI: fosfatidilserina + fosfatidilinositol, PE: fosfatidiletanolamina

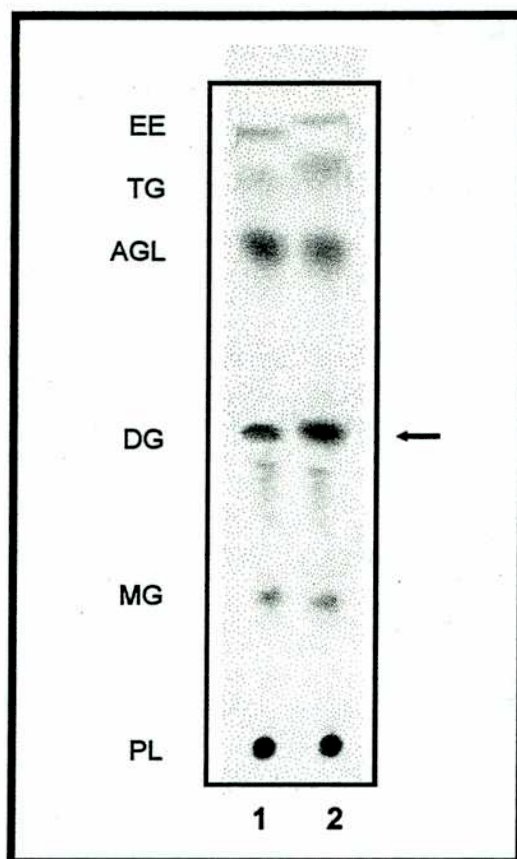
La **Figura 12** y la **Tabla 3**, muestran un marcado aumento de PC (aproximadamente 300 %) en los parásitos estimulados con ácido oleico y *Ei*, y de 50% en el caso de los estimulados con OAG, sugiriendo que el extracto de intestino del insecto vector mediante los AGL que posee activan la biosíntesis de PC. Ello confirma que estos estímulos activan la síntesis de DG intermediario directo para la formación de PC.

7.2 INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS NEUTROS CON *Ei*

Para investigar y visualizar los efectos que los AGL del extracto de intestino poseen sobre la biosíntesis de los lípidos neutros en el parásito, se utilizaron las condiciones que inducen metaciclogénesis en presencia de 1 μ Ci/ml de [14 C] ácido oleico. La **Figura 13** revela una mayor incorporación de los ácidos grasos radiactivos y un aumento de 3 veces en la marcación de

diacilglicerol en los parásitos estimulados con *Ei*, con respecto de los parásitos controles, en los que sólo se añadió vehículo.

Figura 13: Aumento de la generación de diacilglicerol en parásitos estimulados con *Ei*



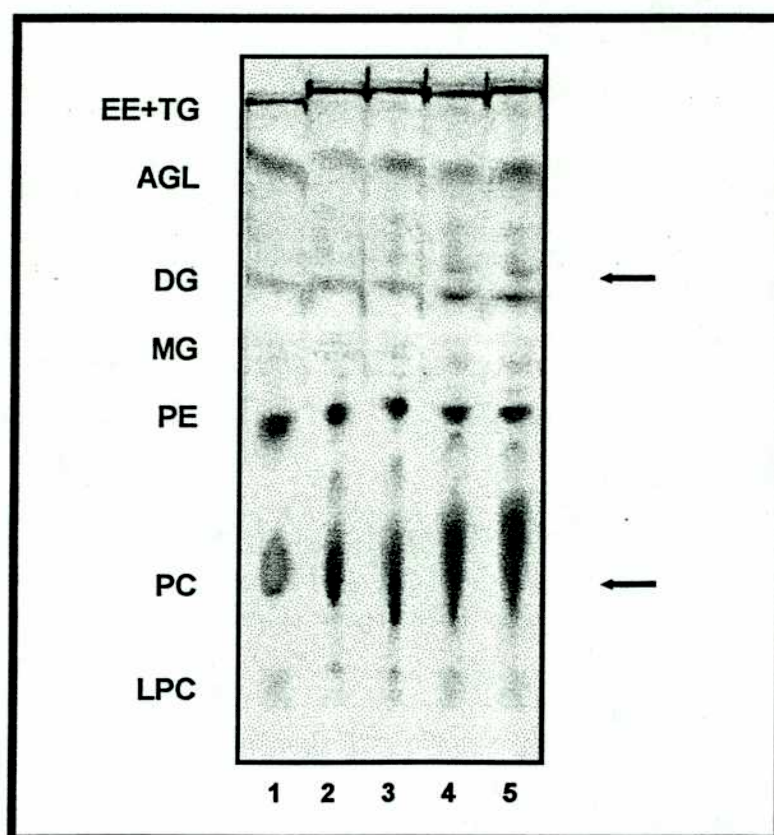
1: control (sin estímulo), 2: estimulación con *Ei*. PL: fosfolípidos, MG: monoacilglicerol, DG: diacilglicerol, AGL: ácidos grasos libres, TG: triacilglicerol, EE: ésteres de esteroides

7.3 INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS NEUTROS Y POLARES CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO OLEICO

Los ensayos anteriores (sección § 7.1) habían sugerido la activación de diferentes vías de síntesis de fosfolípidos durante la estimulación de la

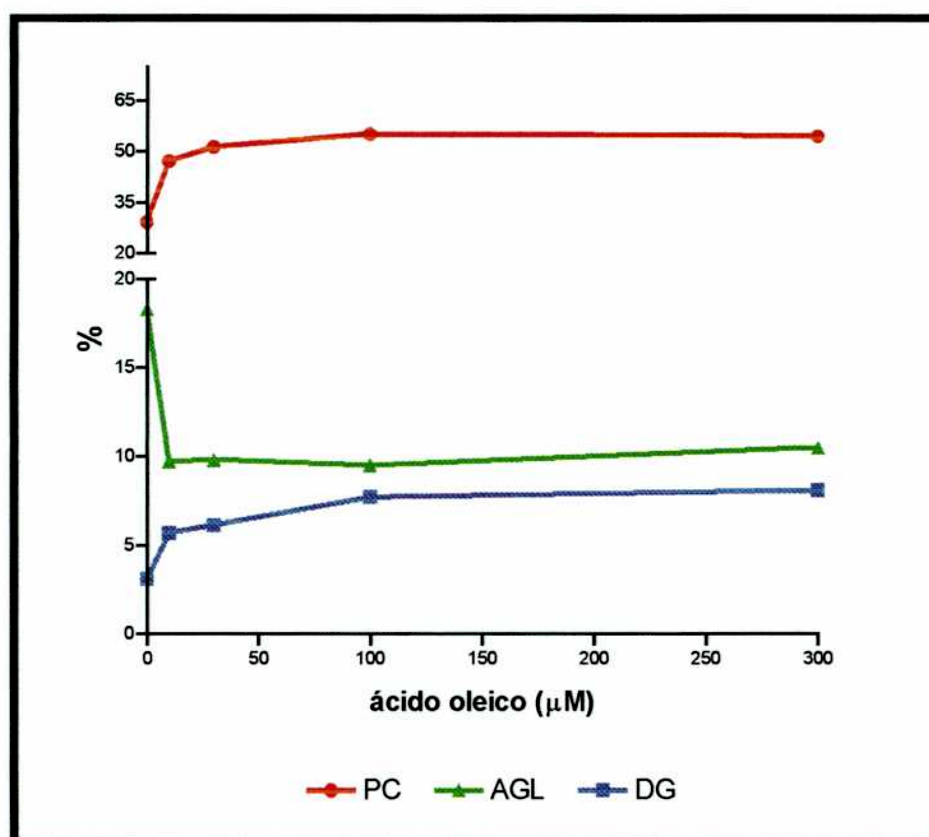
metaciclologénesis con *Ei* y ácido oleico. Con el objetivo de establecer qué caminos metabólicos se activan y cuáles son los intermediarios polares y neutros que se generan concomitantemente con la diferenciación inducida por ácido oleico, se estimularon epimastigotes con diferentes concentraciones de este ácido, durante 30 min, a los que posteriormente se les adicionó 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^{14}C]oleato. Los resultados que se muestran en las Figuras 14 y 15, reflejan un incremento de hasta 2.5 veces en las cantidades de DG y de 2 veces en la de PC.

Figura 14: Síntesis de lípidos en epimastigotes estimulados con diferentes concentraciones de ácido oleico.



1: control (sin ácido oleico), 2: ácido oleico 10 μM , 3: ácido oleico 30 μM , 4: ácido oleico 100 μM , 5: ácido oleico 300 μM . LPC: lisofosfatidilcolina, PC: fosfatidilcolina, PE: fosfatidiletanolamina, MG: monoacilglicerol, DG: diacilglicerol, AGL: ácidos grasos libres, EE+TG: ésteres de esteroides + triacilglicerol.

Figura 15: Aumento de DG y PC en parásitos estimulados con oleato

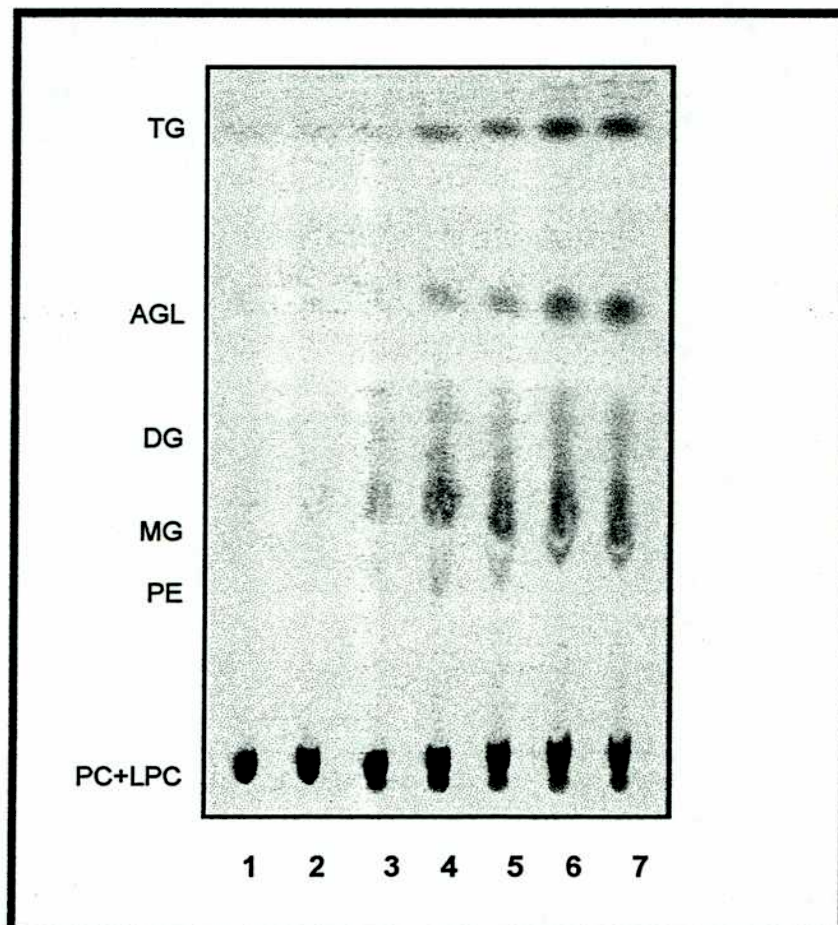


8. INCORPORACION Y DEGRADACIÓN DE FOSFATIDILCOLINA EN CULTIVOS DE EPIMASTIGOTES

En el intestino del insecto vector, los epimastigotes se encuentran inmersos en un medio inicialmente provisto de grandes cantidades de fosfolípidos. Estos fosfolípidos pueden ser captados por los parásitos y actuar como sustratos para fosfolipasas endógenas generando así AGL. Más aún, por razones desconocidas hasta el presente, el ultrafiltrado de huevo es un agregado esencial para la diferenciación *in vitro* [1]. Este componente posee importantes cantidades de fosfolípidos que también podrían jugar el rol como fuentes de AGL. Por estas razones resultó importante investigar la

degradación de fosfolípidos por epimastigotes de *T. cruzi*. Para ello, utilizamos 1 μ Ci 1-palmitoil-2-[1- 14 C] oleoil fosfatidilcolina, adicionada al cultivo de epimastigotes y examinamos la generación de diferentes lípidos en el interior de los parásitos, a diferentes tiempos. En la **Figura 16** se muestran los resultados del análisis de los lípidos, reflejando principalmente la producción de lípidos neutros: triacilglicerol, AGL, diacilglicerol, monoacilglicerol y entre los lípidos polares fosfatidiletanolamina.

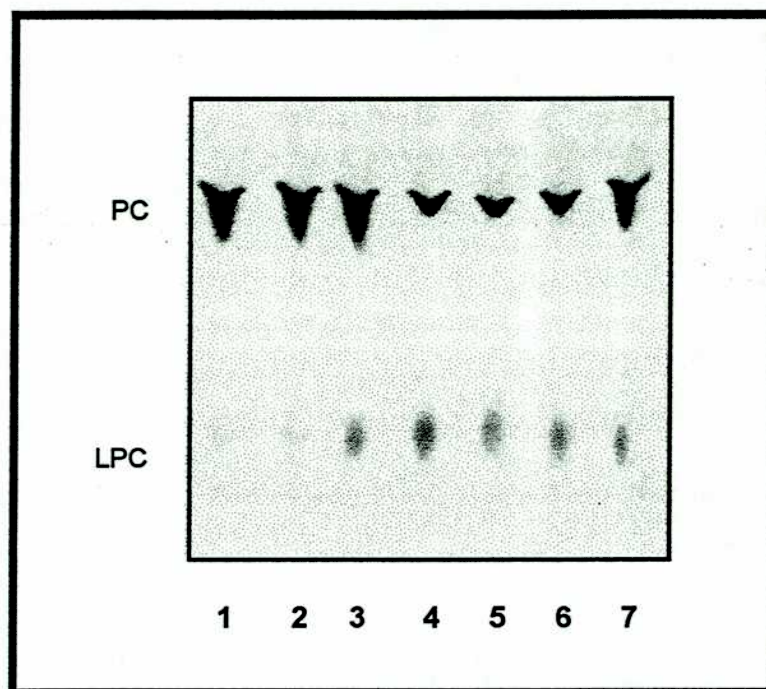
Figura 16: Digestión de fosfatidilcolina e incorporación de sus AGL a lípidos endógenos de epimastigotes



1: control 0 hs, 2: control 65 hs, 3: parásitos 1 h, 4: 15 hs, 5: 24 hs, 6: 48 hs, 7: 65 hs. LPC+PC: lisofosfatidilcolina + fosfatidilcolina, PE: fosfatidiletanolamina, MG: monoacilglicerol, DG: diacilglicerol, AGL: ácidos grasos libres, TG: triacilglicerol.

En la **Figura 16** se observa que la mezcla de solventes utilizada para analizar los lípidos polares, no resultó eficiente para separar la fosfatidilcolina de la lisofosfatidilcolina. Debido a ello, se desarrolló nuevamente la cromatografía en placa con una mezcla de solventes de mayor polaridad (cloroformo/metanol/agua, 65:35:5, v/v). Este procedimiento adicional permitió visualizar la generación de lisofosfatidilcolina, que no se había observado anteriormente (**Figura 17**).

Figura 17: Digestión de fosfatidilcolina y generación endógena de lípidos en epimastigotes



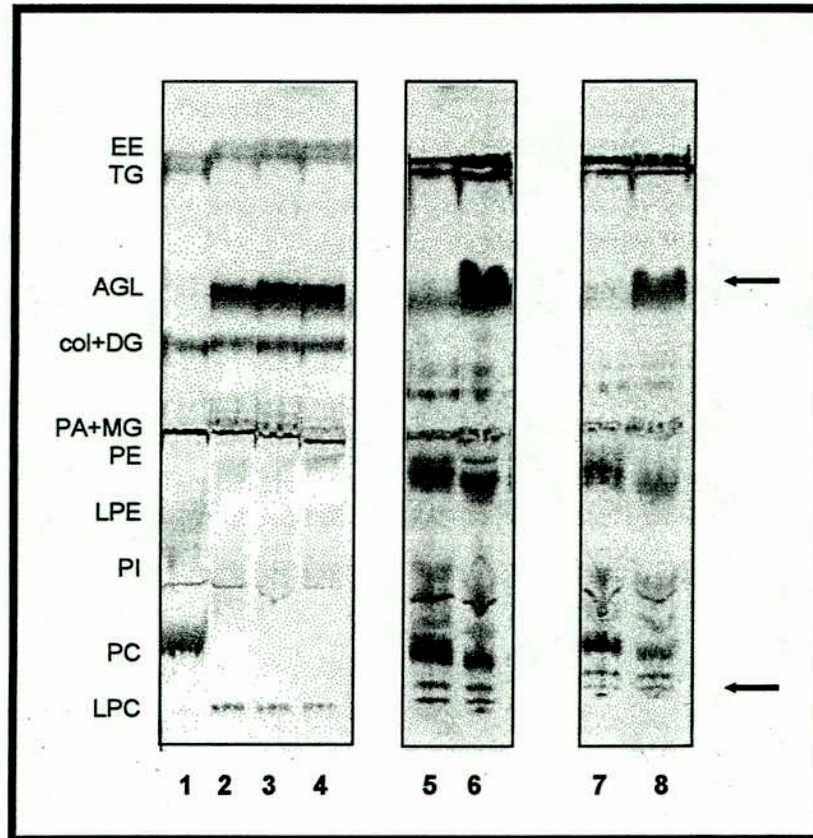
1: control 0 hs, **2:** control 65 hs, **3:** parásitos 1 h, **4:** 15 hs, **5:** 24 hs, **6:** 48 hs, **7:** 65 hs. **LPC:** lisofosfatidilcolina, **PC:** fosfatidilcolina.

9. ESTUDIO DE LA GENERACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES DURANTE PROCESOS AUTOLÍTICOS

Con el objetivo de investigar si las fosfolipasas propias del parásito pueden dar lugar a una importante degradación de fosfolípidos endógenos en los distintos estadios del *Trypanosoma cruzi*, epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes se marcaron metabólicamente con precursores lipídicos, [^{14}C]acetato de sodio para los epimastigotes y [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oleato para los tripomastigotes y amastigotes. Los parásitos luego se lisaron y se incubaron en diversas condiciones. En el caso de los epimastigotes, las incubaciones se extendieron hasta 24 hs, a 28° C, mientras que para los tripomastigotes y los amastigotes las incubaciones se realizaron durante 12 hs, a 37°C. Luego de esos períodos una rápida e importante degradación de los fosfolípidos endógenos fue encontrada en todos los estadios parasitarios. El análisis de los lípidos radiactivos resultantes mostró una importante reducción de la PC y una acumulación de AGL (**Figura 18**), ambos indicadores de la presencia de fosfolipasa tipo A. Asimismo se observó que la producción de AGL y lisofosfatidilcolina en los epimastigotes lisados no fue alterada por el agregado de CaCl_2 o EDTA (calles 3 y 4).

En la suspensión de epimastigotes también se observó acumulación de lisofosfatidilcolina (LPC). La acumulación de AGL fue marcadamente mayor que el aumento de LPC, indicando una actividad lisofosfolipasa A. Es importante destacar que, en un intento por imitar las condiciones naturales, en estos experimentos no se utilizó dietileter (inhibidor de la actividad lisofosfolipasa).

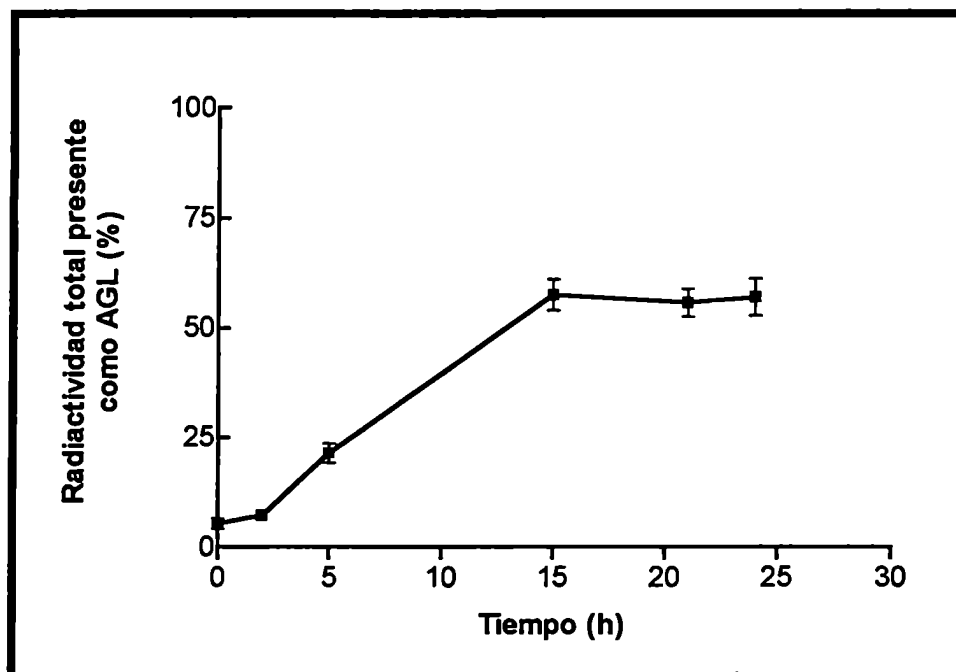
Figura 18: Aumento de ácidos grasos libres en epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes lisados.



1: Epimastigotes, tiempo 0, 2: 24 hs de incubación, 3: 24 hs incubación con 1 mM CaCl_2 , 4: 24 hs de incubación con 1 mM EDTA. 5: Tripomastigotes, tiempo 0, 6: 12 hs de incubación. 7: Amastigotes, tiempo 0, 8: 12 hs de incubación. LPC: lisofosfatidilcolina, PC: fosfatidilcolina, PI: fosfatidilinositol, LPE: lisofosfatidiletanolamina, PE: fosfatidiletanolamina, PA+MG: ácido fosfatídico + monoacilglicerol, col+DG: colesterol + diacilglicerol, AGL: ácidos grasos libres, EE: ésteres de esteroides, TG: triacilglicerol.

Como se observa en la **Figura 19**, el máximo de acumulación de AGL en epimastigotes se alcanzó luego de 15 hs de incubación, mostrando una actividad que no decae en el tiempo estudiado.

Figura 19: Acumulación de ácidos grasos en epimastigotes lisados a diferentes tiempos.



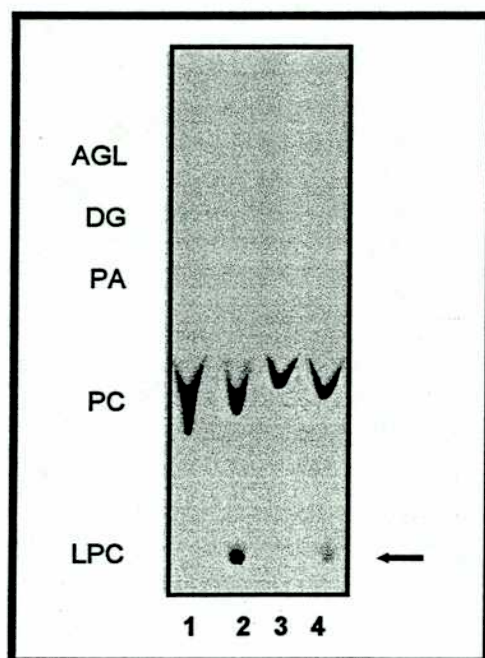
10. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD FOSFOLIPASA A EN EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi*

Se realizaron diversos estudios se realizaron utilizando epimastigotes con el objetivo de establecer las condiciones óptimas que permitieran medir las actividades fosfolipasas presentes en el parásito. Para ello, se analizaron las variaciones de la hidrólisis de fosfolípidos en función de: pH, concentración de sustrato, concentración de proteína y tiempos de incubación.

10.1 VARIACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA FOSFATIDILCOLINA EN FUNCIÓN DEL pH

Se examinaron las enzimas que hidrolizan PC en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, a pH neutro y ácido, utilizando un sustrato radiactivo marcado en la posición *sn*-2. Como se muestra en la **Figura 20**, el único producto radiactivo obtenido en ambos pH ensayados fue LPC. No se observó ningún aumento en AGL, diacilglicerol o ácido fosfatídico radiactivos. A pH ácido la hidrólisis resultó marcadamente mayor que a pH neutro. Resultados similares se obtuvieron cuando se agregó 2 mM de CaCl_2 o 2 mM de EDTA a las mezclas de incubación (datos no mostrados). Estos hallazgos indican la presencia en epimastigotes de una fosfolipasa tipo A_1 (PLA_1). En estas condiciones experimentales no se detectaron actividades de fosfolipasas tipo A_2 , C o D que degraden PC.

Figura 20: Actividad fosfolipasa A_1 en epimastigotes a pH 4.7 y pH 7.4

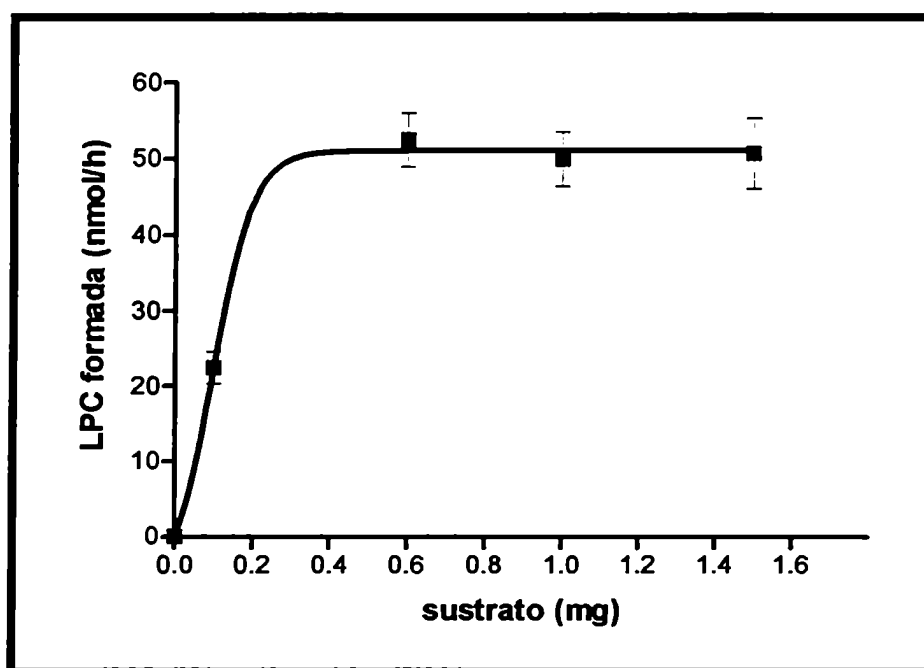


1: control (buffer) pH 4.7, 2: homogenato de epimastigotes pH 4.7, 3: control (buffer) pH 7.4, 4: homogenato de epimastigotes pH 7.4. LPC: lisofosfatidilcolina, PC: fosfatidilcolina, DG: diacilglicerol, AGL: ácidos grasos libres.

10.2 VARIACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO

La **Figura 21** muestra que a partir de 0.4 mg de sustrato, la fosfolipasa A₁ se encuentra en condiciones de saturación, siendo la actividad enzimática, entonces, independiente de la concentración de sustrato. Los resultados que se observan en dicha figura se realizaron a pH ácido, utilizando 275 µg proteína y con 0.01 µCi de 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C] oleoil fosfatidilcolina por ensayo.

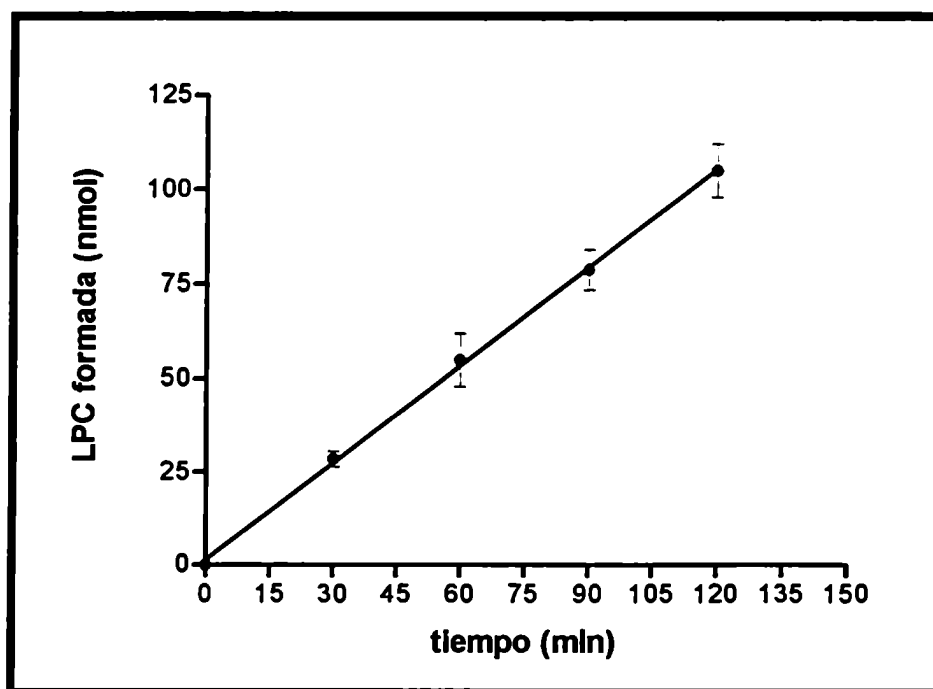
Figura 21: Variación de actividad fosfolipasa en función de la concentración de sustrato



10.3 VARIACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN FUNCIÓN DE LOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN

En la **Figura 22** se muestra la cantidad de producto liberado (LPC) en función del tiempo de reacción. Para estos ensayos, que se efectuaron a pH ácido, se emplearon 275 μg proteína, 0.01 μCi de 1-palmitoil-2-[1- ^{14}C] oleoil fosfatidilcolina y 0.6 mg de fosfatidilcolina por ensayo. En estas condiciones se verificó que entre 0 y 2 hs la aparición de producto es lineal respecto del tiempo.

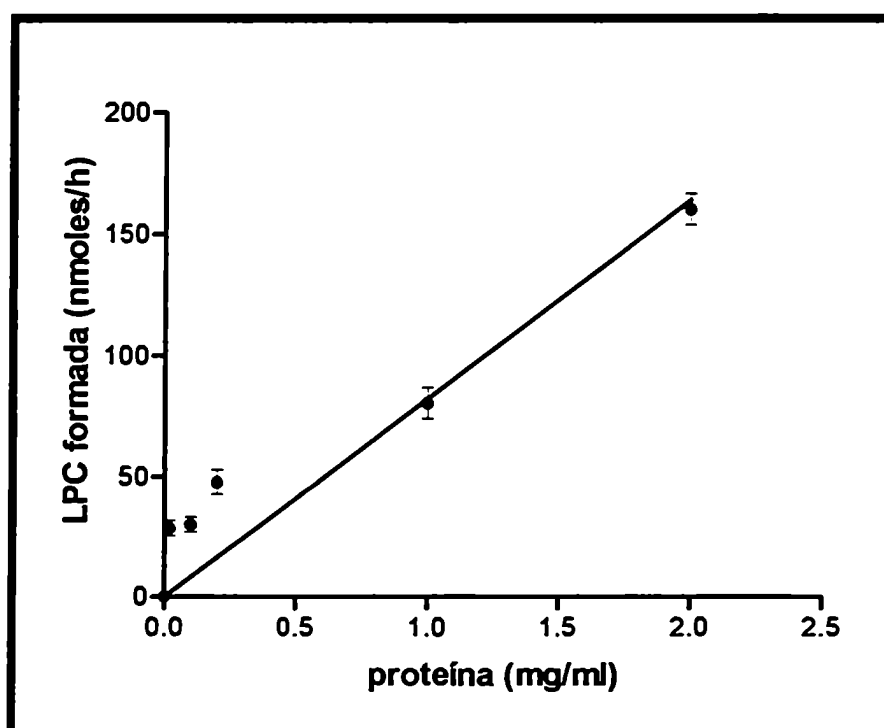
Figura 22: Hidrólisis de PC en función del tiempo de incubación.



10.4 VARIACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA PRESENTE EN EPIMASTIGOTES

La **Figura 23** muestra que a pH ácido, utilizando hasta 2.5 mg/ml de proteína, con 0.01 μCi de 1-palmitoil-2-[1- ^{14}C] oleoil fosfatidilcolina y 0.6 mg de fosfatidilcolina por ensayo, durante 60 min, la hidrólisis enzimática presenta una variación lineal.

Figura 23: Variación de la cantidad de LPC formada por hora en función de la concentración de proteína parasitaria

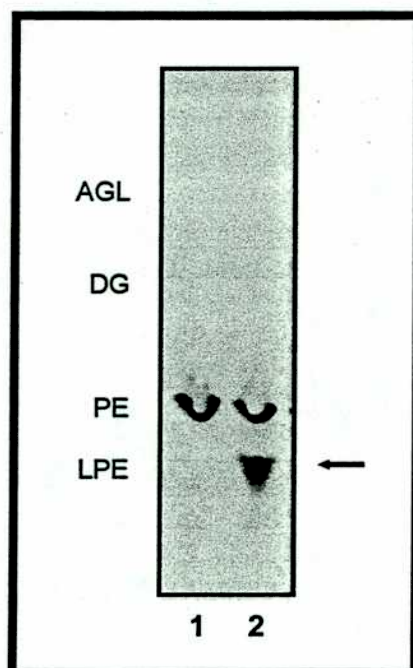


A partir de los resultados obtenidos en esta sección, todos los experimentos subsiguientes de actividad fosfolipasa A_1 se realizaron en condiciones de linealidad respecto de tiempo y concentración de enzima.

10.5 ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASA CON OTROS SUSTRATOS

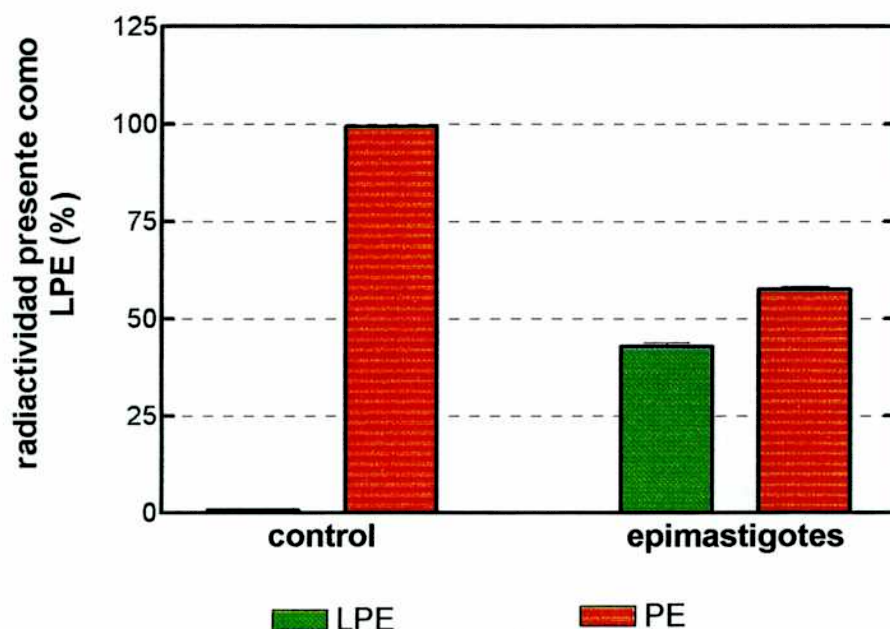
Los experimentos se realizaron con la metodología ya descrita, incubando el homogenato de parásitos (3.5×10^8) con $0.01 \mu\text{Ci}$ de 1-palmitoil-2-[1- ^{14}C] linoleoil L-3-fosfatidiletanolamina y 0.6 mg fosfatidiletanolamina por ensayo, a pH ácido durante 1 h . Las Figuras 24 y 25 muestran una actividad fosfolipasa A_1 presente en los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* capaz de hidrolizar también fosfatidiletanolamina. No se pudieron detectar actividades de otros tipos de fosfolipasas bajo estas condiciones experimentales.

Figura 24: Actividad fosfolipasa A_1 sobre fosfatidiletanolamina



1: control (buffer), 2: homogenato de epimastigotes. LPE: lisofosfatidiletanolamina, PE: fosfatidiletanolamina, DG: diacilglicerol, AGL: ácidos grasos libres.

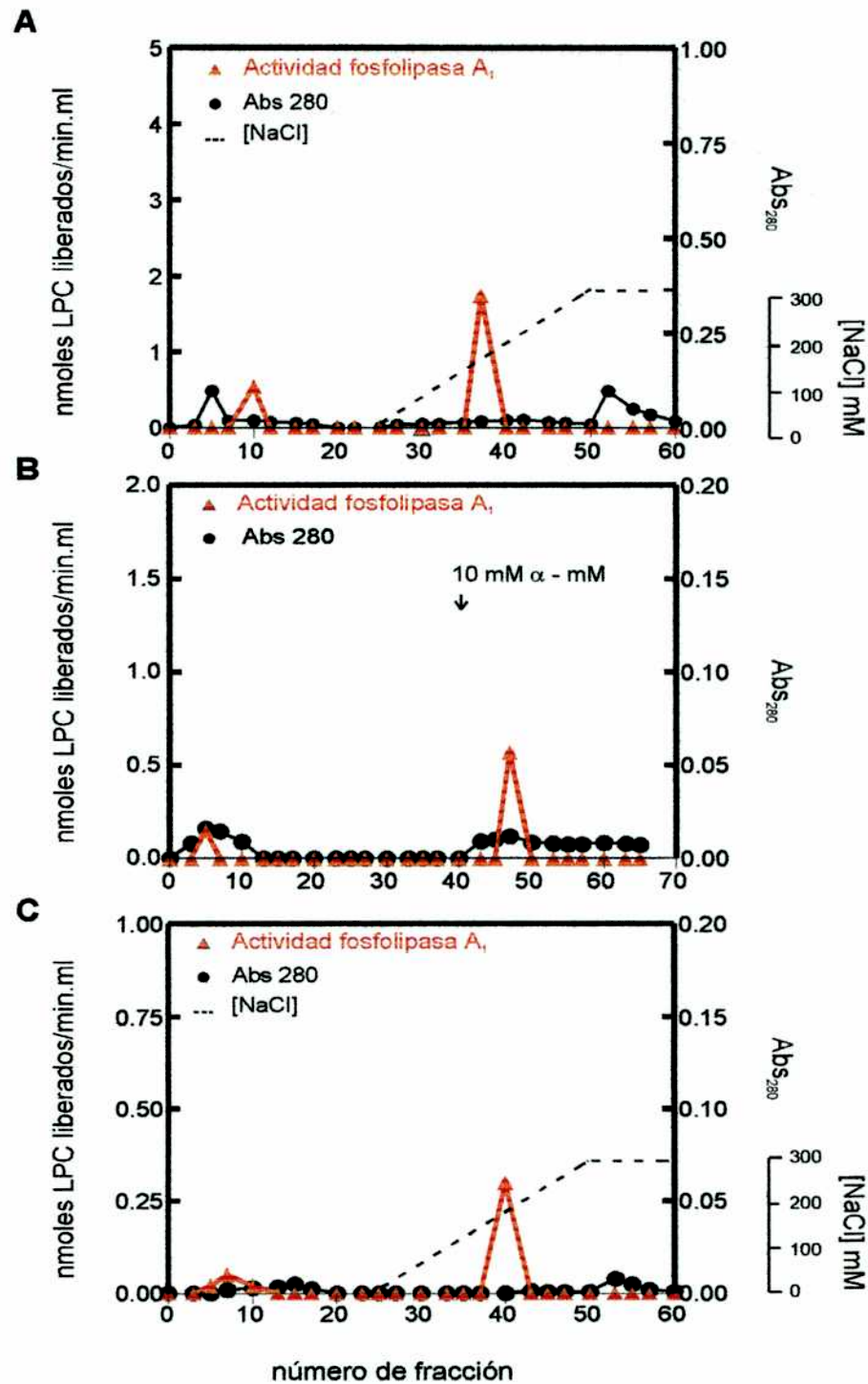
Figura 25: Actividad fosfolipasa A₁ sobre fosfatidiletanolamina (PE)



11. PURIFICACIÓN DE LA FOSFOLIPASA A₁ DE EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi*

La fosfolipasa A₁ se purificó, según se detalla en Materiales y Métodos, a partir de un homogenato de epimastigotes, ya que se había determinado anteriormente que la mayor parte de la actividad se recuperaba en forma soluble en el citosol, en parásitos procesados por congelamiento-descongelamiento y posterior sonicación. Se utilizaron cromatografías de intercambio iónico, aniónicas y catiónicas, y de afinidad secuenciales: DEAE-celulosa, Concanavalina A-Sepharosa, CM-Sepharosa, cuyos perfiles de elución se observan en la **Figura 26**.

Figura 26: Purificación de la fosfolipasa A₁ de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*



A: DEAE-celulosa. **B:** ConA-Sepharosa. **C:** CM-Sepharosa. **a-mM:** α-metilmanopiranosido

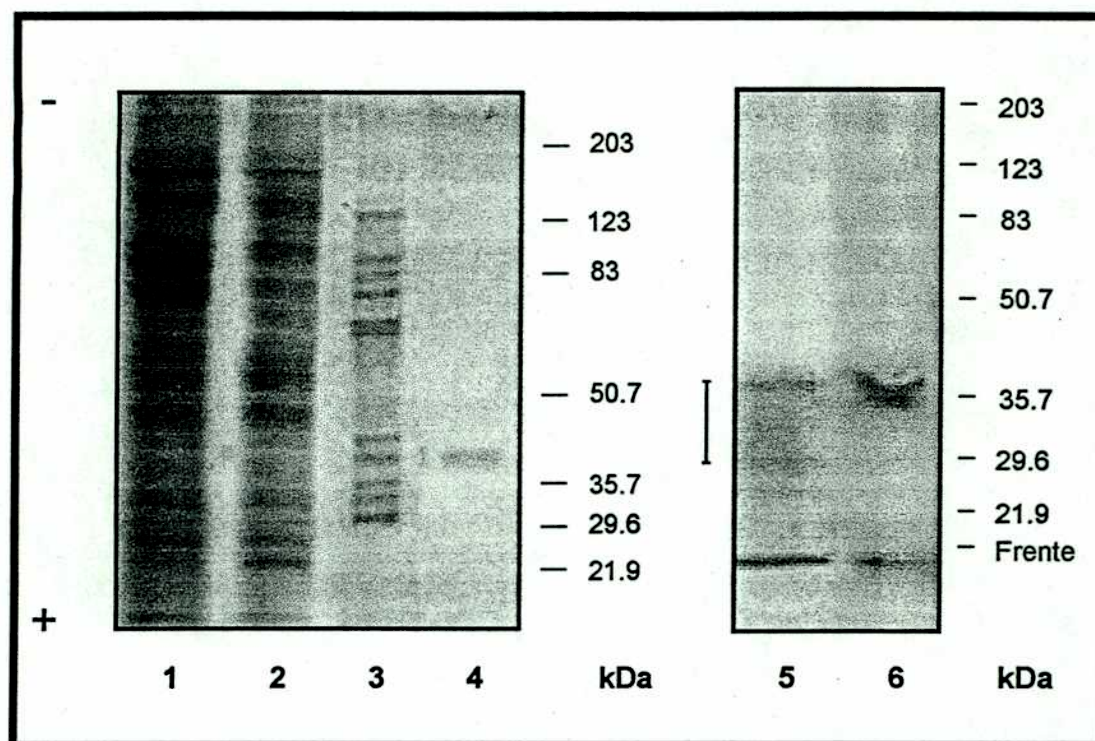
Los resultados de cada paso se resumen en la **Tabla 4** y finalmente muestran una fracción que contiene a la fosfolipasa A₁ con aproximadamente 1900 veces de aumento en la actividad específica y un rendimiento alcanzado de 7.8%.

Tabla 4: Purificación de la Fosfolipasa A₁ de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Act. total (nmol LPC/min)	Act. esp. (nmol LPC /min. mg)	Purific. (-veces)	Rendim. (%)
Homogenato	160	29.6	0.18	1	100
Sobrenad. (105.000 xg)	34	18.6	0.54	3	63
DEAE - celulosa	0.40	8.4	20.74	115	28
ConA - Sepharosa	1.6×10^{-2}	3.1	187.5	1042	10
CM-Sepharosa	6.5×10^{-3}	2.3	353.84	1966	8

Alícuotas de las diferentes preparaciones obtenidas durante la purificación se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (**Figura 27**). En la figura se observa que la preparación final posee una banda con un peso molecular de aproximadamente 38 kDa. La muestra obtenida a partir de la columna de Con A-Sepharosa al ser teñida con Coomassie Blue se presentaba como una banda única nítida, sin embargo, al ser evaluada la banda con tinción con plata, presentó un chorreado debajo de la banda principal. Dicho chorreado fue removido por medio de la cromatografía con CM-Sepharosa (calle 6).

Figura 27: Electroforesis en geles de poliacrilamida de los distintos pasos de purificación de la fosfolipasa A₁ de epimastigotes.



1: homogenato de epimastigotes, 2: sobrenadante del homogenato, 3: DEAE-celulosa, 4: Con A-Sepharosa, teñidos con Coomassie blue. 5: Con A-Sepharosa, 6: CM-Sepharosa, teñidos con plata

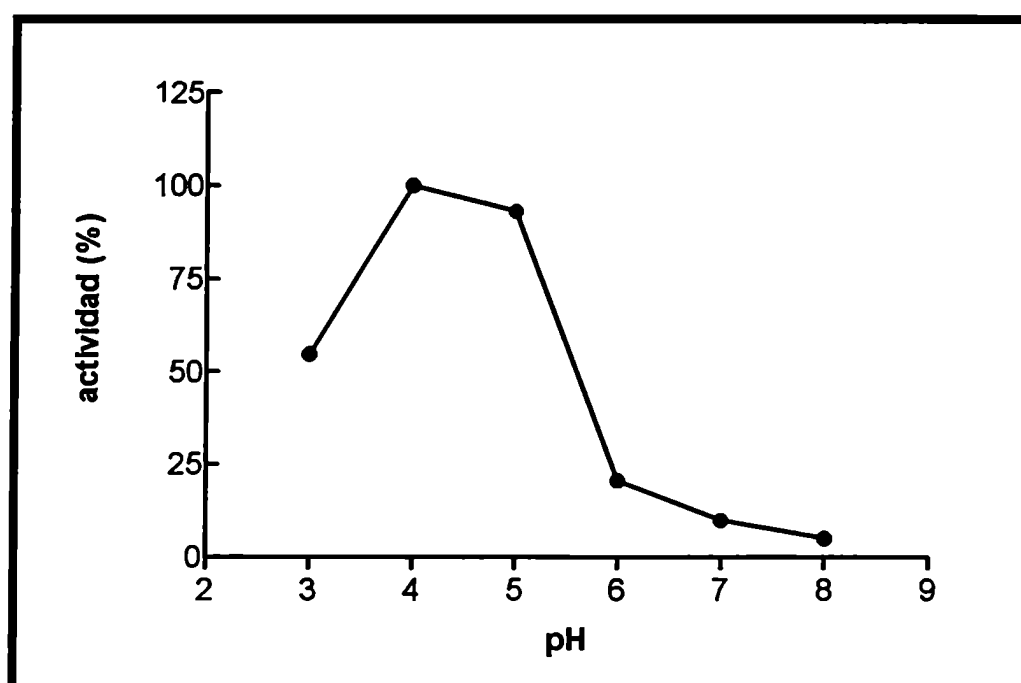
Se realizaron experimentos tendientes a lograr la secuenciación de la fosfolipasa A₁ de epimastigotes. Una vez purificada por la metodología antes descripta, la enzima fue transferida a membranas de PVDF para ser secuenciada. Sin embargo dicha secuenciación no pudo ser realizada porque la enzima, al igual que el 75 % de las proteínas de eucariotas resultó estar bloqueada en su extremo amino-terminal y esta modificación enzimática impide su secuenciación de la manera convencional. Por este motivo se realizaron técnicas de digestión enzimática "en gel" para luego analizar los péptidos resultantes mediante HPLC y elegir alguno de ellos para ser secuenciado. Estos estudios continúan en proceso.

12. CARACTERIZACIÓN DE LA FOSFOLIPASA A₁ DE EPIMASTIGOTES

12. 1 DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO DE LA FOSFOLIPASA A₁

Observaciones preliminares indicaban que la fosfolipasa A₁ de *Trypanosoma cruzi* tenía un pH óptimo ácido (**Figura 20**). Para analizar más profundamente las variaciones de la actividad en función del pH, se desarrolló el ensayo incubándose alícuotas de la enzima purificada por DEAE-celulosa y Con A-Sepharosa con fosfatidilcolina radiactiva, tal como se describe en Materiales y Métodos, con la particularidad de que en este caso se utilizó un buffer universal: 0.1 M Tris-HCl/ 0.1 M citrato de sodio (pKa: 3.1, 4.8, 6.4, 8.1) ajustado a diferentes valores de pH. Los resultados (**Figura 28**) mostraron que la fosfolipasa A₁ del parásito tiene un pH óptimo entre 4 y 5. La actividad fosfolipasa se expresó como el porcentaje de la máxima actividad que fue obtenida a pH 4 (0.16 nmoles LPC/mg . min).

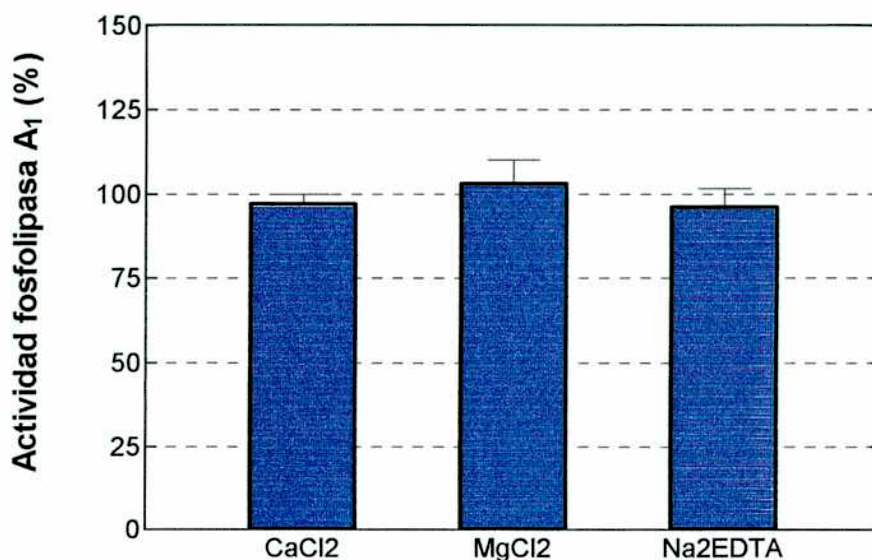
Figura 28: La fosfolipasa A₁ de *T. cruzi* tiene pH óptimo ácido



12.2 ACCIÓN DE LOS IONES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Estudios adicionales realizados utilizando buffer acetato, pH 4.7, mostraron que el agregado o no de 2 mM EDTA, 2 mM CaCl_2 o 2 mM MgCl_2 , no tenía ningún efecto sobre la actividad fosfolipasa A_1 en comparación con los controles que no habían recibido el agregado de esos compuestos (**Figura 29**). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos con los homogenatos totales (**Figura 16**), y muestran que la actividad fosfolipasa A_1 es independiente de cationes bivalentes.

Figura 29: La fosfolipasa A_1 de *Trypanosoma cruzi* es independiente de cationes bivalentes

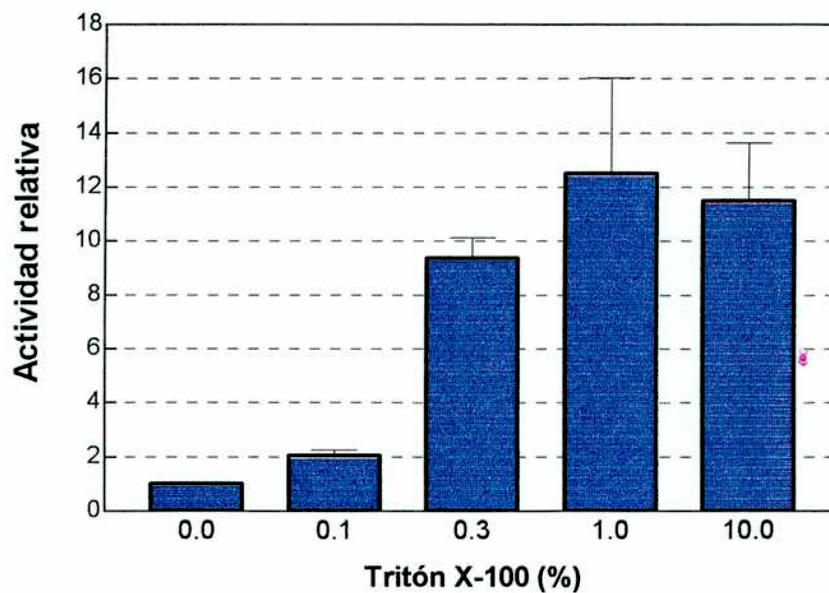


12.3 ACCIÓN DE DETERGENTES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Con el fin de determinar el efecto que tienen los detergentes sobre la actividad fosfolipasa, se agregaron diferentes cantidades de Tritón X-100 (0; 0.1; 0.3; 1 y 10 %, concentración final) a los ensayos. En la **Figura 30** se muestran los resultados que indican que este detergente tiene un efecto estimulante de la actividad enzimática, determinando una curva de

saturación con un máximo en la concentración de 1 %.

Figura 30: Efecto de diferentes concentraciones de Tritón X-100 sobre la actividad fosfolipasa A₁ de *T. cruzi*



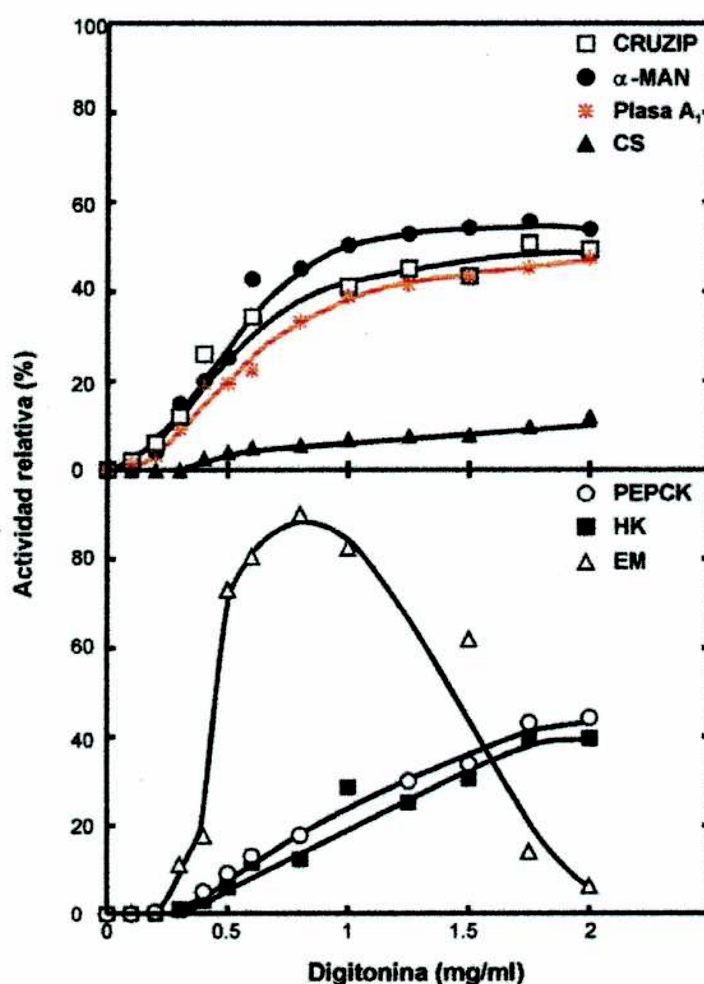
13. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA FOSFOLIPASA A₁ DE EPIMASTIGOTES

La ubicación subcelular de la enzima fue estudiada por dos metodologías diferentes:

- **Análisis de la liberación selectiva de ésta y de otras enzimas marcadoras de compartimentos subcelulares luego de la exposición a diferentes concentraciones de digitonina.**
- **Sedimentación diferencial de la fosfolipasa respecto de enzimas glicosomales y lisosomales marcadoras.**

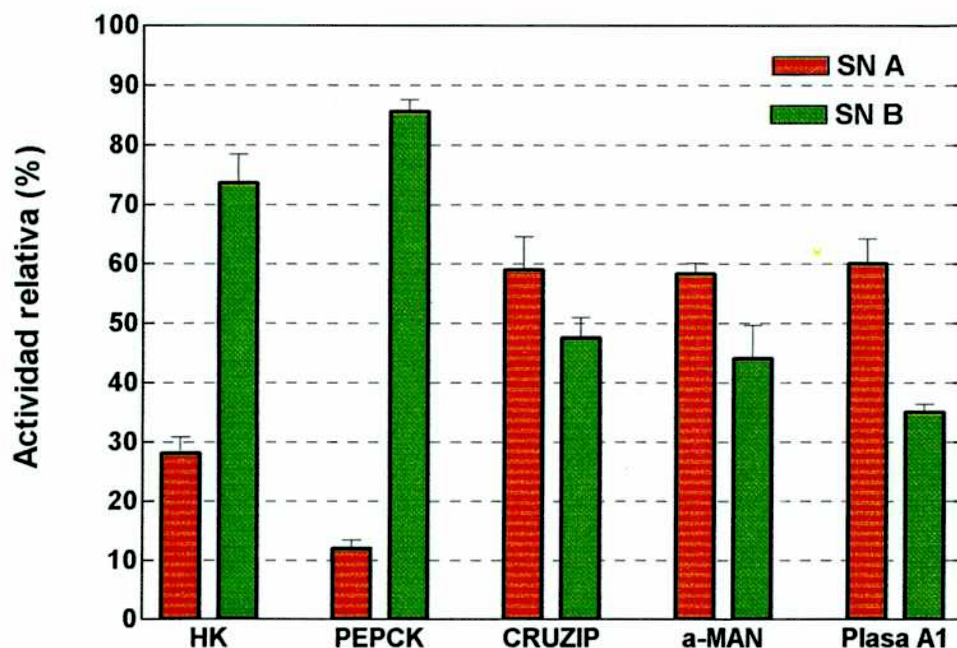
Como se muestra en las Figuras 31 y 32 ambas metodologías realizadas revelaron que el perfil de liberación de la fosfolipasa A₁ se asemeja al de las enzimas marcadoras lisosomales: cruzipaina y α -manosidasa y difiere completamente del de los marcadores citoplasmáticos (enzima málica), glicosomales (hexokinasa, fosfoenolpiruvato carboxikinasa) y mitocondriales (citrato sintasa). Estos resultados indican un origen lisosomal para la fosfolipasa A₁ de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 31: Localización subcelular por tratamiento con digitonina



Plasa A₁: fosfolipasa A₁, α -MAN: α -manosidasa, CRUZIP: cruzipaina, CS: citrato sintasa, PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxikinasa, HK: hexokinasa, EM: enzima málica.

Figura 32: Localización subcelular por sedimentación diferencial de la fosfolipasa A₁ (Plasa A₁).

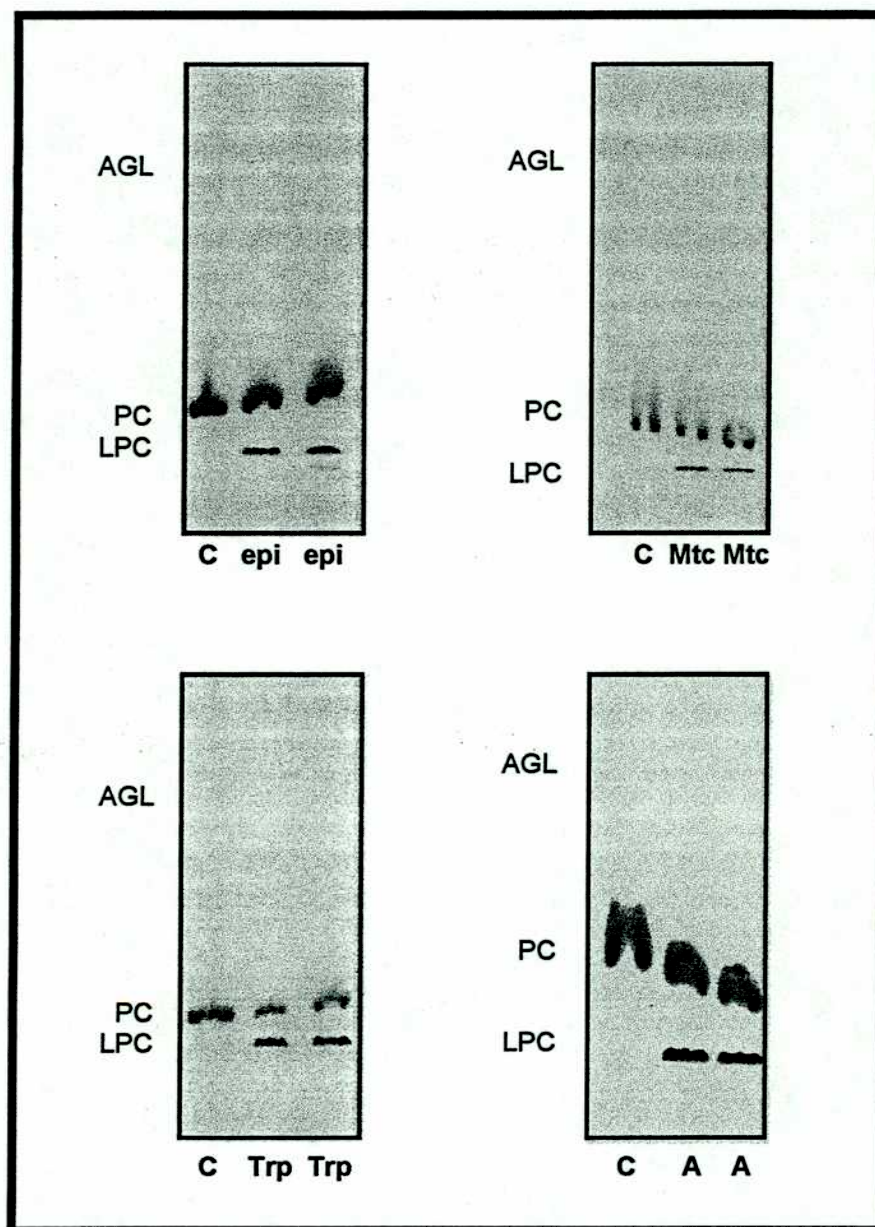


SN A: sobrenadante A, obtenido por centrifugación luego de congelamiento-descongelamiento. SN B: sobrenadante B, obtenido por centrifugación luego de sonicación. HK: hexokinasa (glicosoma), PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxikinasa (glicosoma), CRUZIP: cruzipaina (lisosoma), a-MAN: α -manosidasa (lisosoma)

14. ACTIVIDAD FOSFOLIPASA A₁ EN LOS DIFERENTES ESTADÍOS DEL PARÁSITO

Con una metodología similar a la descripta para epimastigotes se investigó la presencia de fosfolipasas en los otros estadíos del parásito: amastigotes, tripomastigotes metacíclicos y tripomastigotes de cultivo celular. En estos experimentos, que se llevaron a cabo en presencia de dietileter, la actividad fosfolipasa A₁ fue la única actividad enzimática detectada actuando sobre fosfatidilcolina (**Figura 33**).

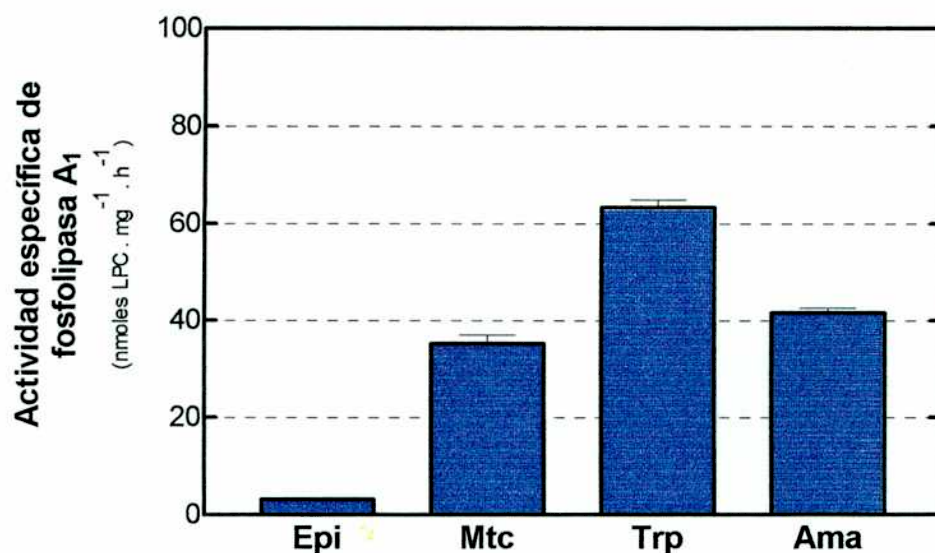
Figura 33: Actividad de fosfolipasas A₁ en los diferentes estadios del *Trypanosoma cruzi*.



Homogenatos de epimastigotes (**epi**), tripomastigotes metacíclicos (**Mtc**) y de cultivo (**Trp**) y amastigotes (**A**). Esos ensayos se realizaron por duplicado utilizando 6.12×10^7 parásitos para los epimastigotes y amastigotes, mientras que para los estadios de tripomastigotes metacíclicos y de cultivo se usaron 1.82×10^7 células. C: control (buffer), PC: fosfatidilcolina, LPC: lisofosfatidilcolina, AGL: ácidos grasos libres

Los valores de las actividades específicas (expresados en nmoles de LPC producida. $\text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) se resumen en la **Figura 34**.

Figura 34: Actividad específica de fosfolipasa A_1 en los distintos estadios del *Trypanosoma cruzi*.



Las actividades de los estadios infectivos tripomastigote y amastigote fueron significativamente más altas ($p < 0.001$) que la actividad medida para epimastigotes.

15. GENERACIÓN EXÓGENA DE ÁCIDOS GRASOS: ESTUDIO DE FOSFOLIPASAS DEL INTESTINO DEL VECTOR

15.1 EN EL EXTRACTO DEL INTESTINO POSTERIOR DEL *Triatoma infestans* (Ei)

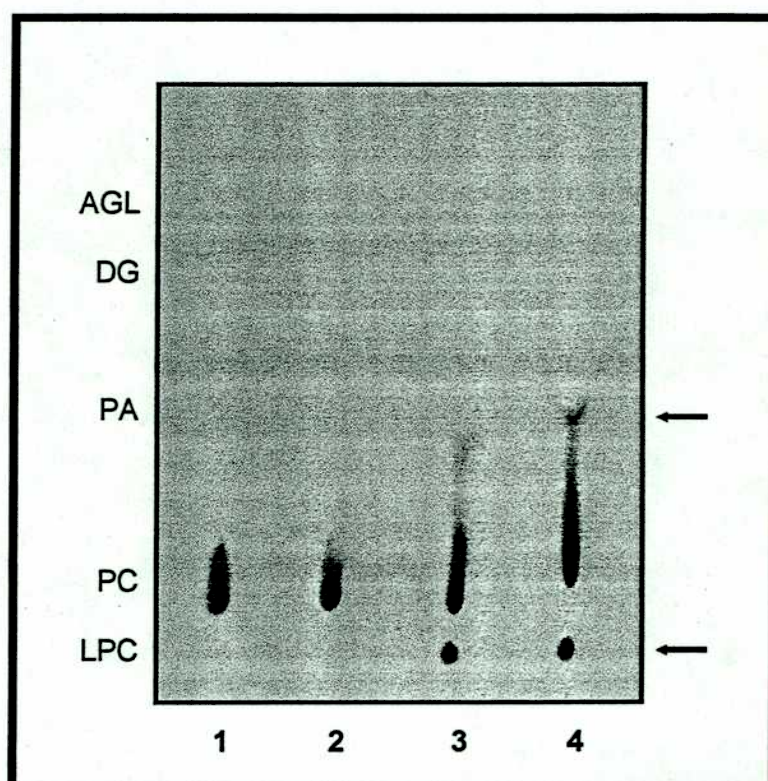
El análisis de los lípidos del *Ei* mostró la presencia de importantes cantidades de AGL y pequeñas cantidades de fosfolípidos. En la sangre de gallina sin digerir se detectaron, por el contrario, grandes cantidades de fosfolípidos y pequeñas cantidades de AGL (Figuras 2 y 3). Este hecho sugiere la presencia de fosfolipasas tipo A y/o D en el intestino del vector. Para investigar la actividad de dichas enzimas, se utilizó 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C]oleoilfosfatidilcolina, como sustrato radiactivo, incubado con el *Ei* a pH neutro (pH del contenido intestinal), durante 1 h y 2 hs. Como se muestra en la Figura 35 los únicos productos radiactivos detectados fueron lisofosfatidilcolina y ácido fosfatídico, indicando la presencia de fosfolipasas A₁ y D en el *Ei*, si bien la actividad fosfolipasa A₁ parecería ser mayor. No se detectaron aumentos de AGL o diacilglicerol en los ensayos realizados. Resultados similares se obtuvieron cuando 2 mM CaCl₂ o 2 mM EDTA fueron agregados a las mezclas de incubación.

15.2 EN EL CONTENIDO INTESTINAL DE *Triatoma infestans*

Con el objetivo de analizar el origen de la fosfolipasa A₁ detectada, se ensayó la actividad enzimática del contenido intestinal (libre de tejidos) de triatomas, que habían sido alimentados 5 o 48 hs antes. Los resultados revelaron un aumento de aproximadamente 3 veces en la cantidad de lisofosfatidilcolina liberada para los insectos alimentados 48 hs antes con respecto a los alimentados 5 hs antes (datos no mostrados), sugiriendo que la actividad enzimática aumenta con el transcurso de la digestión del

alimento en el intestino del vector.

Figura 35: Fosfolipasa A₁ presente en el extracto de intestino posterior de *Triatoma infestans*.



1: control (buffer), 1 h, 2: control (buffer) 2 hs, 3: *Ei*, 1 h, 4: *Ei* 2 hs. AGL: ácidos grasos libres, DG: diacilglicerol, PA: ácido fosfatídico, PC: fosfatidilcolina, LPC: lisofosfatidilcolina.

Discusión

1. LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES PRESENTES EN EXTRACTOS DE INTESTINO DE *Triatoma infestans* SON METACICLOGÉNICOS.

En nuestro laboratorio se ha establecido, que extractos intestinales de los triatomíneos (*Ei*) poseen actividad metaciclogénica [32]. Se ha determinado además, que entre los factores responsables de esta actividad, se halla una familia de péptidos derivados de la degradación de la hemoglobina presente en la sangre ingerida por el insecto vector. Estos péptidos actuarían a través de vías de señalización mediadas por AMPc [34]. Sin embargo, dichos péptidos, no alcanzan a inducir la actividad biológica encontrada en los extractos intestinales totales sugiriendo la presencia de otras moléculas que podrían ser inductoras de metaciclogénesis.

Además de las señales hidrofílicas, tales como los péptidos, diversos lípidos han sido estudiados en sistemas biológicos y se ha demostrado su rol en la transducción de señales, actuando como segundos mensajeros [38,46,97,98,103,167]. Gracias a la capacidad inherente de algunos lípidos de atravesar las membranas y conectar compartimentos que habitualmente se encuentran separados, podrían participar directamente en la activación de cascadas de proteínas kinasas localizadas en el interior de las células blanco [38].

Considerando la importancia potencial de dichos lípidos, en el presente trabajo demostramos la presencia y caracterizamos moléculas liposolubles con acción metaciclogénica en el extracto de intestino del vector.

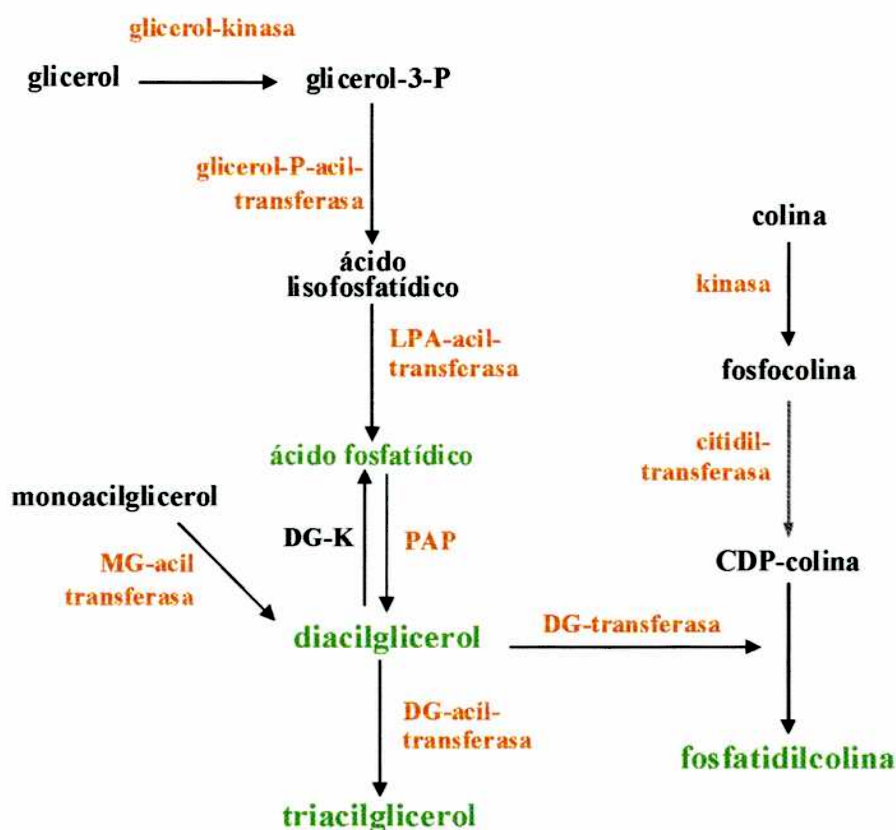
Durante las investigaciones realizadas, encontramos que los lípidos de la sangre de gallina sin digerir (alimento del insecto vector) no presentan actividad biológica, mientras que el extracto de intestino conteniendo la sangre digerida por el *Triatoma infestans*, sí la posee (Figura 1). Demostramos además que la actividad asociada a los lípidos del *Ei* es del mismo orden de magnitud que la hallada con los péptidos derivados de la hemoglobina.

¿Cuáles son los componentes lipídicos responsables de esta actividad? Para contestar este interrogante separamos los componentes de los extractos lipídicos crudos del *Ei*, utilizando métodos cromatográficos. Así se llegó a aislar el único principio activo subyacente, que resultó ser la fracción de ácidos grasos libres (AGL). Demostramos también que éstos se acumulan notoriamente durante el proceso de digestión de la sangre, en el intestino del vector (Figura 2). Concomitantemente con ese incremento de AGL se observó una marcada disminución en la fracción de fosfolípidos. Estos hallazgos indican que la acumulación de AGL se debe principalmente a la acción de fosfolipasas presentes en el contenido intestinal del vector (Figura 35). Estas enzimas tendrían por lo tanto una gran importancia en el ciclo parasitario, ya que contribuirían a la producción de AGL estimulantes de la diferenciación. Ninguno de los restantes componentes lipídicos del *Ei* mostró actividad metaciclogénica. El hecho destacable de que los hemolisados de sangre de gallina no posean acción metaciclogénica concuerda con la observación de que la misma posee relativamente poco AGL y abundantes fosfolípidos, mientras que el *Ei*, por el contrario, posee una concentración cuatro veces mayor de AGL. Estos resultados indican que la digestión sería generadora de señales inductoras de la metaciclogénesis, y que las enzimas presentes en el intestino del vector poseen por consiguiente, un rol como productoras de factores metaciclogénicos.

Los análisis por cromatografía gaseosa de la fracción de AGL de los extractos intestinales, demostraron que los componentes mayoritarios, son los ácidos esteárico (18:0), oleico (18:1) y palmítico (16:0) (Figura 4). De ellos, sólo los dos primeros poseen actividad metaciclogénica cuando se los agrega en estado puro a los epimastigotes (Figura 5). El 16:0, en cambio, no muestra prácticamente actividad biológica.

Estas observaciones están de acuerdo con las diferencias en los perfiles de incorporación y destino metabólico de los distintos AGL en epimastigotes. Esto en efecto, se comprobó cuando parásitos expuestos a diferentes AGL

radiactivos, mostraron que el 18:0 y el 18:1 dan lugar a una importante marcación de diacilglicerol (DG) y fosfolípidos (Figura 10 A y B, Tabla 2). Mientras que en el caso del 16:0, el DG se marca en un nivel notablemente menor y el ácido graso resulta incorporado exclusivamente a lípidos neutros, sin marcación detectable de fosfolípidos (Figura 11). En otras palabras, así como los distintos AGL del *Ei* mostraron variaciones en su actividad biológica, correspondientemente, se halló que sufren transformaciones metabólicas radicalmente distintas en el parásito. Esto puede explicarse por una actividad acil-transferasa selectiva que rápidamente eliminaría el DG conteniendo ácido palmítico, por conversión a triacilglicerol. Estos resultados son similares a hallazgos anteriores de Florin-Christensen y col., realizados en cuatro tipos de líneas celulares eucariotas diferentes, en los que los AGL saturados de cadena más corta tienden a acumularse preferentemente en lípidos neutros, mientras que los AGL de cadena más larga se acumulan tanto en lípidos neutros como fosfolípidos [156,157].



El diacilglicerol es un segundo mensajero que participa en la transducción de señales activando a la proteína kinasa C (PKC) [62]. En ausencia de estimulación, la PKC está presente soluble en el citosol y catalíticamente inactiva. Su activación por DG y Ca^{2+} va acompañada de una traslocación a membranas y a otras fracciones celulares sedimentables [46,56]. Los experimentos de incorporación de AGL aquí realizados, sugieren que el mecanismo de acción de dichos AGL es inducir la síntesis *de novo* de DG y así activar a la PKC durante el proceso de metaciclologénesis.

Por otra parte, la capacidad de los AGL de atravesar membranas biológicas y sus efectos sobre el metabolismo lipídico, en particular sobre la traslocación de la fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP), que es una fuente importante de DG, es bien conocida y ha sido señalada por diferentes autores [145-149]. Esta enzima, ha sido estudiada en diferentes sistemas biológicos y se ha determinado que es estimulada por Mg^{2+} y que se transloca del citosol a las membranas de la mitocondria o del retículo, al ser activada por ácidos grasos.

2. LA PROTEÍNA KINASA C JUEGA UN ROL CRÍTICO EN LA METACICLOGÉNESIS.

Diferentes clases de proteínas kinasas tienen un rol clave en la transducción de señales en células eucariotas, una de las proteín-kinasas reguladoras de la diferenciación celular es la PKC [46,56]. Debido a que esta enzima es activada por DG, y que dicho lípido se acumula por exposición al *Ei*, resultó importante investigar si en estas condiciones se produce activación de la PKC. Más aún, los AGL por sí mismos podrían actuar por estimulación directa de esta enzima [97,98,140,185]. Los estudios sobre el rol de la PKC en la metaciclologénesis se llevaron a cabo utilizando cuatro estrategias experimentales diferentes:

(a) En primer lugar se evaluó el efecto de activadores conocidos de la PKC sobre la metaciclologénesis. Se utilizaron PMA y OAG. El PMA es un potente promotor de tumores y se ha demostrado que activa a la PKC *in vivo* e *in vitro* [46-52]. Este compuesto es un análogo estructural del DG y al igual que éste aumenta la afinidad de la PKC por el Ca^{2+} , así como también por los fosfolípidos, activando a la enzima. Por otro lado, los diacilglicerolos sintéticos como el OAG han mostrado ser capaces de activar a la PKC en ensayos *in vivo* debido a su habilidad de atravesar membranas biológicas [186,187]. Los resultados de los experimentos desarrollados con estos dos activadores de la PKC mostraron que ambos producen estimulación significativa de la diferenciación del estadio de epimastigote al de tripomastigote metacíclico (Figura 6).

(b) En segundo lugar, se analizó el efecto sobre la metaciclologénesis, de varios inhibidores de la PKC, que poseen diferente grado de especificidad [159-165]. Mientras que H7 inhibe serin/treonin-quinasas como la PKC (K_i : 6 μM), la PKA (K_i : 3 μM) y la PKG (K_i : 5.8 μM), HA 1004 inhibe a la PKC (K_i : 40 μM), a la kinasa II dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (K_i : 13 μM), a la PKA (K_i : 2.3 μM) y a la PKG (K_i : 1.3 μM). Por otro lado la Bisindolilmaleimida sí es un inhibidor altamente selectivo de la PKC (K_i : 10 nM), que compite con el ATP por el sitio catalítico [161].

Los resultados con los parásitos mostraron que sólo la incubación conjunta de H7 (6 μM) + HA 1004 (10 μM) o la incubación con Bisindolilmaleimida (15 nM) poseen significativos efectos bloqueadores de la metaciclologénesis inducida por el *Ei* (Figura 7). Debe destacarse que el H7 y HA1004 aplicados separadamente, resultaron tóxicos en concentraciones más elevadas que las indicadas, por consiguiente no pueden utilizarse en este tipo de experimentos *in vivo* en los cuales la viabilidad celular es esencial. Por ello se recurrió a la combinación de ambos agentes teniendo en cuenta que

actúan sobre diferentes sitios de la PKC. Mientras que H7 afecta al dominio catalítico, compitiendo con el ATP por su sitio de unión [161], el HA1004 interfiere entre la interacción de los iones Ca^{2+} con el sitio regulador de la molécula de PKC [164]. Por ello, la aplicación simultánea de HA 1004 y H7 [165] podría dar lugar a una inhibición de ambos dominios, regulatorio y catalítico, obteniéndose una potente inhibición de la enzima.

(c) En un tercer abordaje, se analizó el rol de la PKC durante la metaciclologénesis, mediante la inducción de la regulación negativa de la enzima ("*down-regulation*") [166,167,182]. Se ha descrito que exposiciones prolongadas de la enzima al PMA, mantienen sostenidamente la asociación de la PKC con la membrana, y dan lugar a la degradación de esta enzima con una consiguiente disminución en el contenido de PKC en las células tratadas. Estudios de Nishizuka y col. mostraron que la calpaína I, que es activada por pequeños aumentos en los niveles de Ca^{2+} intracelular, cliva a la PKC en presencia de fosfatidilserina y DG o PMA, señalando que la forma activada de la PKC es un blanco de la acción de la calpaína [188].

Los experimentos realizados utilizando esa metodología mostraron que la regulación negativa ocurre también en *Trypanosoma cruzi* ya que la exposición de epimastigotes por 24 hs a PMA da lugar a una notable disminución de la PKC *in vivo*, demostrada funcionalmente. Para ello recurrimos a la marcación de parásitos con [^{32}P] ortofosfato de sodio y el análisis de la fosforilación de proteínas por SDS-PAGE (Figura 8). Estos estudios mostraron que en células expuestas por 24 hs a PMA, este compuesto deja de estimular la fosforilación de proteínas hallada en las células control estimuladas mediante pulsos de PMA, demostrándose funcionalmente que la actividad se halla prácticamente ausente.

Cuando los parásitos en los que la PKC está regulada negativamente, se estimularon con *Ei* o ácido oleico en condiciones que inducen la metacicloogénesis, encontramos que en ambos casos dicha diferenciación queda completamente bloqueada (Figura 7). Estos experimentos indican que la PKC está involucrada en el proceso de metacicloogénesis, y el hecho de que el ácido oleico no estimule la metacicloogénesis en parásitos regulados negativamente, refuerza la hipótesis de que dicho ácido graso actuaría a través de la estimulación de la PKC.

(d) Finalmente, para determinar si el extracto de intestino y los AGL activaban a la PKC *in vivo* se compararon los perfiles de fosforilación de proteínas inducidos por estos agentes con los que corresponden al diacilglicerol permeante OAG. La Figura 9 muestra que el patrón predominante inducido por el extracto intestinal y los AGL coincide con el generado por exposición al agente estimulante de la PKC. Particularmente, bandas de aproximadamente 180, 120 y 26 kDa presentan un aumento característico en el nivel de fosforilación en todos estos casos.

Se analizó también el perfil de fosforilación de proteínas luego de estimular los parásitos con Dibutiril-AMPc. Este compuesto es un análogo permeante del AMPc que activa proteínas quinasas dependientes de AMPc como la PKA [183,184]. En este caso, se observó la fosforilación de bandas de proteínas distintas a las halladas con OAG, el *Ei* y el ácido oleico, por lo que se concluye que tanto el *Ei* y los AGL que éste posee, actúan principalmente a través de la estimulación *in vivo* a la PKC.

En los eucariotas superiores, la regulación de los eventos de proliferación y diferenciación celular, está mediada en parte por cascadas de fosforilación de proteínas [48,49,189]. Numerosos investigadores han intentado establecer si las vías de fosforilación de proteínas también poseen un rol

importante en la diferenciación de parásitos protozoarios. De ser así, la actividad de muchas proteínas kinasas y fosfatasa debería estar regulada durante los ciclos de vida de dichos organismos.

Entre los estudios realizados en kinetoplástidos, se destacan los de Parsons y col en tripanosomas africanos. Estos autores han detectado en *Trypanosoma brucei*, que la actividad de seis proteínas kinasas, que fosforilan en residuos serina y treonina, varían durante el ciclo de vida, presentando distintos niveles de actividad [54]; así como también un número de enzimas tirosin-kinasas con una regulación estadio-dependiente [190]. Trabajos del mismo grupo mostraron que el *Trypanosoma congolense*, posee numerosas proteínas kinasas de serina y treonina, muchas de las cuales nuevamente tienen variaciones en los niveles de activación durante el desarrollo de su ciclo [191]. Por ejemplo, las formas procíclicas, que residen en el intestino del vector, y los epimastigotes, mostraron patrones de actividad kinasa muy similares. Sin embargo, los cambios más dramáticos en las funciones de las kinasas se observaron en las transiciones de las formas sanguíneas hacia las formas procíclicas y de los epimastigotes hacia los estadios metacíclicos [191]. Por otro lado, trabajos realizados en *Leishmania major* señalaron también cambios estadio-específicos en la fosforilación de proteínas durante el ciclo de vida de este parásito [192]. Todos estos datos combinados, apoyarían la hipótesis de que los cambios en las redes de fosforilación de proteínas podrían tener un rol importante en los procesos de proliferación y diferenciación en protozoarios.

Los estudios desarrollados en esta Tesis son los primeros en demostrar un rol biológico de la PKC en *Trypanosoma cruzi*, al relacionar su activación con el estímulo de la metaciclogénesis. Este proceso es especialmente interesante por dos motivos. Primero porque da lugar a la forma infectiva del parásito y segundo debido a que los tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos son característicamente no replicativos. Este hecho sugiere que en *Trypanosoma cruzi*, la PKC no sólo participaría en la regulación de la

morfogénesis sino que a través de este mecanismo existiría un control de la proliferación celular [36,189].

Hemos discutido previamente cuál es la fuente de DG que estimula a la PKC durante la diferenciación. Como indicamos, la exposición a AGL en condiciones metaciclogénicas induce la síntesis *de novo*, de diacilglicerol, explicándose así la estimulación de la PKC. Las fuentes de AGL y su mecanismo de acción son por ello de especial interés en este estudio.

3. LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES ESTIMULAN LA FORMACIÓN DE DIACILGLICEROL Y ACTIVAN LA BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILCOLINA.

Los experimentos anteriores demostraron que los lípidos de los extractos de intestino posterior de *Triatoma infestans*, constituyen una señal metaciclogénica y que ésta radica en los AGL. Considerando que el activador fisiológico de la PKC es el DG se estudió la relación entre la metaciclogénesis y la generación de ese lípido. Para ello se diseñó un ensayo que permitiera demostrar la formación de DG a partir de los AGL presentes en el *Ei*, adicionando 1 μ Ci de [14 C] ácido oleico a los epimastigotes estimulados con dicho extracto. Con esa metodología la masa de AGL era aportada por el propio *Ei*, y el radiactivo permitiría identificar los lípidos sintetizados a partir de dichos AGL. Los resultados de los experimentos mencionados revelaron un importante aumento en la generación de DG en parásitos estimulados para diferenciarse (Figura 13).

Más aún, ensayos de incorporación de ácido oleico marcado en células expuestas a diferentes concentraciones de ácido oleico frío, demostraron que a pesar de la disminución de la actividad específica del ácido oleico, al

aumentar la concentración de ácido oleico frío, se incrementa la marcación de DG (Figuras 14 y 15). Ese dato confirma un efecto estimulador de los AGL sobre la biosíntesis de DG. Este efecto puede ser mediado por la activación de la *fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP)*, enzima que, como ya se mencionó anteriormente, cataliza la producción de DG a partir de ácido fosfatídico y que es activada por AGL en células eucariotas [145-149]. Estos resultados sugieren que los AGL del *Ei* podrían promover la tranlocación y activación de la PAP, con la consiguiente síntesis de DG.

Por otra parte, se observó que el *Ei* y el ácido oleico, concomitantemente con la formación de DG, dan lugar a un notable aumento de la síntesis de fosfatidilcolina (PC) (Figura 12, Tabla 3). Este hallazgo sugiere que la biosíntesis de este fosfolípido es un mecanismo de terminación de señales de diacilglicerol en *Trypanosoma cruzi*. Ello implica la activación específica del camino metabólico que conduce a la transferencia del grupo polar fosfocolina al DG, y que involucra a la *fosfocolina citidil-transferasa* y la *fosfocolina diacilglicerol-transferasa*. De ambas enzimas, la primera, parece estar regulada tanto por la cantidad de sustrato: la citidina trifosfato (CTP) y la fosfocolina, como por su translocación entre el citosol, donde se encuentra inactiva, y el retículo endoplasmático, donde es activada por fosfolípidos [193].

Como se puede observar en la Figura 12, la estimulación de parásitos con el diacilglicerol permeante OAG, a diferencia de la producida por *Ei* y ácido oleico, no se refleja en aumentos importantes de PC. Estudios previos de Florin-Christensen y col. han demostrado que este lípido es metabolizado principalmente por hidrólisis y no por conversión a PC u otros fosfolípidos [156,157]. Los presentes hallazgos coinciden con esta alternativa. Es decir, los distintos diacilgliceroles tienen un diferente destino de acuerdo a su composición de AGL. Particularmente el OAG no muestra un comportamiento semejante al de los diacilgliceroles de cadena larga ya que

no da lugar a la formación de la correspondiente PC. Resultados similares fueron descritos por Kaibuchi y col que hallaron que el OAG no parece interactuar con el factor activador de plaquetas sino que se metaboliza rápidamente, *in situ* a su ácido fosfatídico correspondiente, presumiblemente por la acción de enzimas como la diacilglicerol kinasa [187].

4. LA GENERACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES METACICLOGÉNICOS TIENE LUGAR POR MECANISMOS ENDÓGENOS Y EXÓGENOS.

Habiéndose establecido la importancia de los AGL en la metaciclogénesis, estudiamos las actividades enzimáticas que están involucradas en la producción de los AGL. El análisis determinó que los mismos se producen principalmente a partir de la hidrólisis de fosfolípidos por acción de enzimas propias de *T. cruzi* (endógenas) y de otras presentes en el medio intestinal del insecto vector (exógenas):

4.1 MECANISMOS ENDÓGENOS DE GENERACIÓN DE AGL

Los epimastigotes en el intestino del insecto se encuentran inmersos en un medio con grandes cantidades de fosfolípidos, fundamentalmente provenientes de las lipoproteínas séricas y membranas eritrocitarias de la sangre ingerida. En vista de la relevancia de los AGL, esos fosfolípidos pueden ser contemplados como fuente de los mismos a través de la acción de fosfolipasas. En ese sentido, la presencia de fosfolípidos es también un requisito imprescindible, aportado por el suero fetal bovino [194] y especialmente por el ultrafiltrado de huevo, en el sistema de diferenciación utilizado en nuestro laboratorio, y por ello resultaba importante determinar cuáles eran los mecanismos que explicarían ese peculiar requerimiento.

El estudio de la digestión de PC exógena por parte de los epimastigotes (Figuras 16 y 17) que reveló que aún a tiempos muy tempranos (1 h) se generan lípidos neutros, entre los que se destacan el DG, triacilglicerol, monoacilglicerol y una importante cantidad de AGL. Se observó también, una rápida conversión hacia fosfatidiletanolamina. La aparición de notables cantidades de lisofosfatidilcolina, concomitantemente con el aumento de AGL, sugirió la acción de fosfolipasas tipo A endógenas del *Trypanosoma cruzi*. Con este fundamento se inició un estudio tendiente a confirmar esa hipótesis.

Examinamos la presencia de fosfolipasas de *T. cruzi* que actúan sobre fosfatidilcolina en el estadio epimastigote, utilizando como sustrato PC radiactiva, marcada en la posición *sn*-2. Entonces, la aparición de lisofosfatidilcolina (LPC) radiactiva es indicadora de actividad fosfolipasa A₁, mientras que la aparición de AGL marcado sugiere la actividad fosfolipasa A₂. Se realizaron diversos experimentos para establecer las condiciones óptimas que permitieran determinar dichas actividades, tales como cantidad de enzima, concentración de sustrato, tiempo de incubación y pH del medio de reacción.

Los primeros ensayos efectuados utilizando dos valores de pH diferentes, uno ácido y otro neutro, mostraron que el único producto radiactivo detectable es LPC (Figura 20), confirmando la presencia de una fosfolipasa A₁. La actividad enzimática resultó mucho mayor a pH ácido. No se observaron aumentos de AGL, DG o ácido fosfatídico, indicando que bajo esas condiciones experimentales no se detectan actividad de fosfolipasas A₂, C o D que hidrolicen fosfatidilcolina. Cabe destacar que estos hallazgos concuerdan con los realizados por otros investigadores que señalan que las enzimas que hidrolizan fosfolípidos zwitteriónicos, como fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, son distintas de las que degradan fosfoinosítidos [105-107]. En efecto, se han descripto varias fosfolipasas actuando sobre fosfoinosítidos en tripanosomátidos [69,70,117] pero el presente es el primer estudio dedicado a investigar la acción sobre lípidos zwitteriónicos.

La presencia de fosfolipasa A₁ como única enzima que cataliza la degradación de fosfatidilcolina demuestra que *Trypanosoma cruzi*, es similar a los tripanosomas africanos, donde también se ha hallado que la fosfolipasa A₁ es la enzima predominante que degrada PC, no habiéndose detectado fosfolipasas C y D actuando sobre ese fosfolípido [115].

La siguiente etapa consistió en la purificación de la fosfolipasa A₁. Los primeros ensayos revelaron que la mayor parte de la actividad se recuperaba en forma soluble en el citosol a partir de un homogenato de epimastigotes. Se utilizaron métodos cromatográficos de intercambio iónico sobre Deae-celulosa y CM-Sepharosa y de afinidad a Concanavalina A-Sepharosa, en forma secuencial (Figura 26). El análisis por SDS-PAGE de alícuotas de los diferentes pasos de purificación reveló que la preparación final poseía una banda con un peso molecular de aproximadamente 38 kDa (Figura 27). Estos hallazgos confirmarían nuestros primeros estudios que habían determinado mediante cromatografía en Sephadex G-75 que la actividad eluye como un pico simétrico, con un peso molecular aparente de aproximadamente 40 kDa. Estos datos sugieren que la enzima se presenta como monómero en solución.

Diversos estudios se llevaron a cabo para caracterizar a la fosfolipasa A₁ de *Trypanosoma cruzi*:

(a) Confirmando las observaciones preliminares que indicaban que la enzima tenía un pH óptimo ácido, se estudiaron las variaciones de la actividad en función del pH, determinándose su pH óptimo entre 4 y 5 (Figura 28). Estos resultados concuerdan con las propiedades halladas en fosfolipasas A₁ de otros protozoarios como *Tetrahymena thermophila* [113,114] y tripanosomas africanos [115,116].

(b) Al igual que lo descrito para fosfolipasas A₁ bacterianas [108,195] y de

tripanosomas africanos [115,116], detergentes como el Tritón X-100 mostraron tener efectos notablemente estimulantes de la actividad enzimática en este parásito (Figura 30). Estos hallazgos están relacionados con el concepto de que la velocidad de hidrólisis depende del estado de agregación de los sustratos, ya que éste afecta la unión a la enzima. En este caso, la formación de micelas mixtas de sustrato con detergente favorece la cinética enzimática.

(c) Estudios adicionales con la enzima purificada, demostraron que la actividad fosfolipasa A_1 es independiente de cationes bivalentes, ya que el agregado de EDTA o de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , no afectan dicha actividad (Figura 29). Numerosos autores han señalado características similares en fosfolipasas A_1 de bacterias [108,195] y de células de mamíferos [109,111,172,173]. Las actividades fosfolipasas A_1 halladas en tripanosomas africanos revelaron también su independencia de esos cationes [115,116].

Estos resultados sugieren una importante similitud entre la fosfolipasa hallada en el *Trypanosoma cruzi* y la fosfolipasa A_1 lisosomal ya descrita en hígado de rata [111]. Al igual que esta última, la fosfolipasa A_1 del parásito es una glicoproteína, como se deduce de su unión a Concanavalina A-Sepharosa, tiene un pH ácido óptimo y es independiente de cationes bivalentes. Para determinar si la enzima posee también un origen lisosomal estudiamos su localización subcelular por dos metodologías diferentes. Primero, mediante el análisis de la liberación selectiva de ésta y de otras enzimas de diferentes compartimentos subcelulares luego de la exposición a distintas concentraciones de digitonina (Figura 31). Segundo, comparando la sedimentación diferencial de la fosfolipasa luego de procedimientos de ruptura por congelamiento-descongelamiento y sonicación, con enzimas glicosomales y lisosomales marcadoras (Figura 32). Los resultados demostraron que la fosfolipasa A_1 tiene un patrón de liberación semejante al de las enzimas marcadoras lisosomales cruzipaina y α -manosidasa,

indicando un origen lisosomal para la fosfolipasa A₁ de *Trypanosoma cruzi*

Con una metodología similar a la descrita para epimastigotes se investigó la presencia de fosfolipasas en los otros estadios del parásito: amastigotes, tripomastigotes metacíclicos y tripomastigotes de cultivo celular. En estos experimentos la actividad fosfolipasa A₁ fue el único tipo de fosfolipasa detectado utilizando fosfatidilcolina como sustrato, en todos los estadios (Figura 33). Los valores de las actividades de los estadios tripomastigote, metacíclico y de cultivo celular, y amastigote fueron significativamente más altos ($p < 0.001$) que los medidos con epimastigotes. Mientras que los epimastigotes son formas extracelulares en el insecto vector o en cultivo axénico, los tripomastigotes y amastigotes son formas infectivas o formas intracelulares en el hospedador. El aumento en la actividad fosfolipasa A₁ en estos últimos, sugiere que esta enzima podría estar involucrada en la invasión celular-escape al citoplasma, así como también en otros procesos tales como eventos de remodelación de fosfolípidos que acompañan el pasaje del parásito del insecto poiquiloterma al mamífero homeoterma [196]. En este aspecto la situación es semejante al caso de los tripanosomas africanos, en el que las formas sanguíneas poseen mayor actividad fosfolipasas A₁ comparadas con el estadio procíclico [115,116]. Los estudios mostraron que la actividad de la fosfolipasa A₁ era muy elevada en las especies patógenas como *T. brucei*, pero mucho más baja en las especies no patogénicas como *T. lewisi*.

En otros eucariotas unicelulares, las actividades fosfolipasas están presentes en considerable cantidad [197]. Investigaciones de Florin Christensen y col, demostraron que *Tetrahymena thermophila* secreta fosfolipasas C y A₁ con pH óptimo ácido [113,114,198,199]. La fosfolipasa A₁ de *Tetrahymena* es similar a la enzima encontrada en *Trypanosoma cruzi*, a pesar de la distancia filogenética entre estos dos organismos. Esto podría señalar que las características básicas de la fosfolipasa A₁ lisosomal, podrían haberse definido tempranamente en la evolución de los eucariotas.

Alternativamente, estos rasgos pueden representar un patrón óptimo al cual los diferentes organismos arribaron por convergencia. Se ha demostrado que las fosfolipasas de *Tetrahymena* tienen roles biológicos importantes y que sus secreciones parecen estar relacionadas con la composición particular de la membrana de ese organismo [200]. Estas adaptaciones constituirían un mecanismo de defensa contra predadores, enfatizando las variadas funciones que las fosfolipasas puede tener en los eucariotas inferiores.

Para determinar si las fosfolipasas pueden actuar sobre lípidos endógenos se utilizaron parásitos marcados metabólicamente y luego sometidos a autólisis. Los estudios mostraron que luego de este proceso, las células presentaban una rápida y extensa hidrólisis de sus fosfolípidos propios, en los tres estadios investigados: epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes (Figura 18). Las disminuciones de fosfolípidos y acumulaciones de AGL revelaron nuevamente la presencia de fosfolipasas tipo A en todos los estadios parasitarios, que permanecen activas por varias horas, provocando una degradación exhaustiva de los fosfolípidos, aún en presencia de la considerable actividad proteolítica que caracteriza a este organismo. La generación de AGL en epimastigotes no se vio alterada por los agregados de Ca^{2+} o EDTA. Por otro lado, se observó en los epimastigotes una importante acumulación de LPC, conjuntamente con los aumentos de AGL antes mencionados. Sin embargo, la acumulación de AGL fue mucho mayor que la de LPC, indicando la acción de actividad lisofosfolipasa. Se ha señalado la capacidad de ciertas fosfolipasas A_1 de actuar en determinadas condiciones también sobre lisofosfolípidos [109,172,173,201], de modo que no puede descartarse que ambas actividades estén relacionadas a la misma molécula enzimática.

En adición a su rol potencial en señalización, las fosfolipasas de *T. cruzi* que degradan PC son interesantes por otras razones:

(a) Se ha establecido hace algunos años que la degradación producida en los alrededores de los nidos de amastigotes induce una marcada respuesta inflamatoria en los tejidos de pacientes chagásicos. Esto sugiere firmemente que los procesos de autólisis podrían estar generando factores productores de inflamación [202]. Si bien la identidad de estos factores es aún desconocida, hay estudios que señalan que podrían ser productos de la hidrólisis de fosfolípidos. Más aún, se ha determinado que ácidos grasos libres y lisofosfolípidos liberados de tripomastigotes de *T. cruzi* tienen efectos tóxicos en cultivos celulares [203]. Nuestros experimentos de degradación de lípidos endógenos, entonces, concuerdan con esas observaciones, ya que los AGL y lisofosfolípidos que se acumulan durante la autólisis de los parásitos podría contribuir a esos procesos de inflamación [202,203]. La producción de esos compuestos podría generarse por la acción de la fosfolipasa A₁ lisosomal aquí descrita.

Este dato concuerda con el mecanismo patogénico propuesto para las Tripanosomiasis Africanas por Tizard y otros investigadores, quienes demostraron que los tripanosomas en degeneración acumulan ácidos grasos que pueden estar directamente implicados en patogénesis [204-208]. En base a estos hechos proponemos que la deacilación de fosfolípidos, catalizada por la fosfolipasa A₁ podría ser un mecanismo patogénico común a las tripanosomiasis africana y americana

(b) Como *T. cruzi* es un parásito intracelular, durante la invasión y la salida de la célula huésped deben ocurrir mecanismos de ruptura de la membrana plasmática y las fosfolipasas podrían participar en esos procesos.

(c) Trabajos de Florin-Christensen y col [196], en colaboración con nuestro laboratorio, demostraron que cuando epimastigotes de *T. cruzi* crecidos a 28°C son transferidos a 37°C se produce un intercambio entre fosfolípidos y

lípidos neutros, y se observan cambios complementarios en los cocientes entre ácidos grasos saturados e insaturados en los dos grupos de lípidos. Este mecanismo nuevo de adaptación de los lípidos de membrana, sugiere la acción de actividades de fosfolipasa tipo A como parte del ciclo de deacilación-reacilación.

(d) Estos hallazgos realzan el interés de esta enzima como un blanco potencial para combatir a estos parásitos. Esta posibilidad tiene un doble fundamento. En primer lugar las células de los mamíferos hospedadores poseen tres tipos de fosfolipasas lisosomales A₁, C y A₂. El parásito, depende exclusivamente de fosfolipasa A₁ para la hidrólisis de PC. Un inhibidor específico de esta actividad afectaría selectivamente al parásito por esta diferencia bioquímica con el hospedador. En segundo lugar la participación de la fosfolipasa como generador de factores citotóxicos relevantes sugiere que inhibiendo a esta enzima puede moderarse el daño tisular causado por el parásito y mejorar así el curso de la enfermedad.

4.2 MECANISMOS EXÓGENOS DE GENERACIÓN DE AGL

Como hemos discutido previamente, en este estudio detectamos grandes cantidades de AGL en el extracto intestinal de *Triatoma infestans*. Se demostró también que los mismos se generan luego de la digestión de la sangre de gallina. El análisis cromatográfico de los perfiles lipídicos de la sangre de gallina y del *Ei* mostró un notorio aumento en la fracción de AGL, acompañado de una disminución de fosfolípidos en este extracto, comparada con las proporciones halladas en la sangre de gallina (Figura 2). Estos resultados sugerían una intensa actividad fosfolipasa presente en el contenido intestinal.

Una caracterización preliminar de esta actividad fosfolipasa se efectuó utilizando PC marcada en la posición *sn*-2. Los únicos productos radiactivos detectados fueron lisofosfatidilcolina y ácido fosfatídico, señalando la presencia de fosfolipasas A₁ y D en el *Ei*. No se identificaron fosfolipasas A₂

o C ya que no se observó liberación de AGL ni formación de diacilglicerol.

Por otro lado, se demostró que en el contenido intestinal del vector, luego de la ingestión de alimento, se produce un aumento de la actividad fosfolipasa, que crece a un valor tres veces mayor 48 hs después de la ingesta. Cabe recordar que el extracto intestinal usado en los experimentos de diferenciación proviene de insectos alimentados 48 hs antes.

A la luz de estos hallazgos se evidencia que el medio en el que se desarrollan los epimastigotes puede proveer de señales de AGL por acción de fosfolipasas presentes en el contenido intestinal. Estos AGL se sumarían a los generados por acción de las fosfolipasa A_1 endógenas del *Trypanosoma cruzi* con lo cual existiría un doble mecanismo para la formación de estos lípidos metaciclogénicos.

Qué implicancias biológicas pueden subyacer al hecho que los productos de la digestión sean metaciclogénicos?

Una posible explicación que proponemos en esta Tesis es que de esta forma podría coordinarse el ciclo de vida del parásito con la fisiología alimentaria del vector. A medida que progresa la digestión se acerca también un nuevo episodio alimentario por parte del vector. Esta es la oportunidad requerida por el parásito para infectar al hospedador definitivo. Es decir, se trataría de un mecanismo capaz de asegurar que haya formas infectivas en el momento propicio para la infección. Esto puede ser especialmente relevante en aquellos Triatomas cuya alimentación registra un régimen altamente periódico, concertando la fisiología alimentaria del vector con la metaciclogénesis del parásito.

Conclusiones

En el intestino del insecto hematófago, *Trypanosoma cruzi*, se encuentra expuesto a una gran variedad de compuestos. Algunos de éstos inducen la diferenciación del parásito hacia su estadio de tripomastigote metacíclico, que es la forma infectante. Este proceso implica la activación de vías específicas de señalización. En esta Tesis investigamos la generación de moléculas liposolubles con actividad metaciclogénica y su mecanismo de acción. Los resultados obtenidos conducen a las siguientes conclusiones:

- Existen lípidos en el intestino del insecto vector que estimulan la metaciclogénesis de *Trypanosoma cruzi*. El análisis de los lípidos demostró que misma reside en la fracción de ácidos grasos libres (AGL).
- Específicamente los ácidos oleico y esteárico, que son mayoritarios, poseen marcada actividad metaciclogénica.
- Los AGL se acumulan notoriamente en el curso de la digestión de la sangre en el intestino del vector, por acción de fosfolipasas presentes en el contenido intestinal, que así constituyen una fuente exógena de AGL para la diferenciación.
- Los AGL presentes en el intestino del vector inducen la formación de diacilglicerol, un conocido activador de la proteína kinasa C (PKC), y estimulan la biosíntesis de fosfatidilcolina en *T. cruzi*.
- El rol de la PKC en la metaciclogénesis se demostró utilizando cuatro estrategias experimentales distintas. (i) inducción de metaciclogénesis por activadores de la PKC (forbol ésteres y diacilgliceroles permeantes). (ii) bloqueo de la metaciclogénesis inducida por los extractos intestinales mediante inhibidores selectivos de la PKC. (iii) bloqueo de la metaciclogénesis por regulación negativa (*down-regulation*) de la PKC. (iv) demostración de la activación de la PKC en

epimastigotes intactos por extracto intestinal, AGL y diacilglicerol permeante, por comparación de perfiles de fosforilación de proteínas.

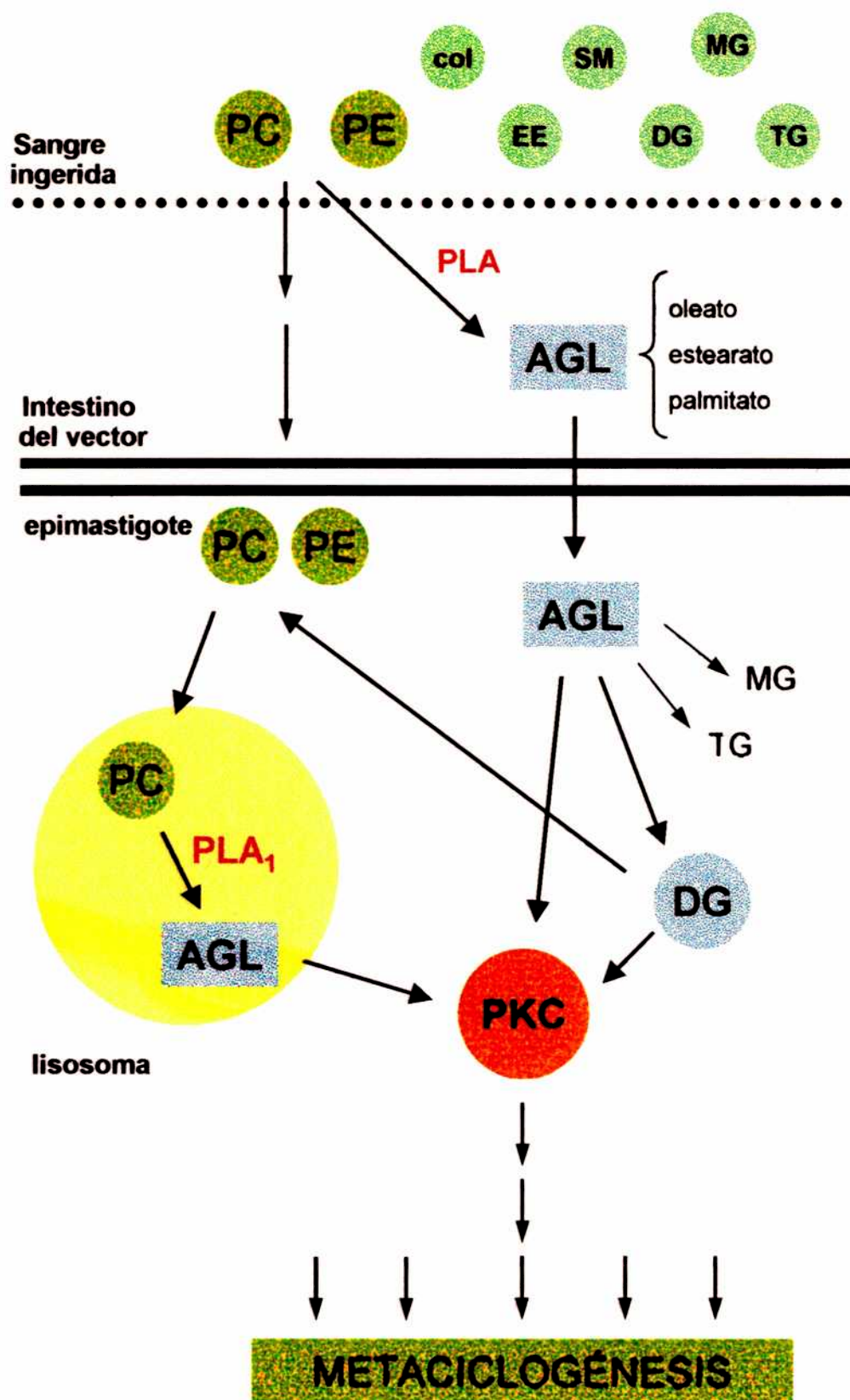
- La diferenciación *in vitro* en el sistema desarrollado en nuestro laboratorio requiere fosfolípidos, los cuales también abundan en la sangre ingerida por el vector hematófago. Aquí demostramos que los fosfolípidos exógenos pueden ser rápidamente convertidos a AGL por acción de fosfolipasas endógenas del parásito. Así éstas constituyen una segunda fuente de AGL para la diferenciación celular, explicando la razón que subyace al requerimiento de fosfolípidos.
- El análisis de las fosfolipasas que actúan sobre fosfolípidos zwitteriónicos demostró la presencia únicamente de fosfolipasa A₁. Se destaca que este sistema es diferente del que cataliza la degradación de fosfoinosítidos.
- La purificación y caracterización de la fosfolipasa A₁ mayoritaria presente en epimastigotes demostró que la enzima es una glicoproteína, de peso molecular de aproximadamente 38 kDa, pH óptimo ácido, independiente de cationes bivalentes. Esta enzima es activada por detergentes y es de origen lisosomal.
- La actividad fosfolipasa A₁ es mayor en tripomastigotes y amastigotes que en epimastigotes, sugiriendo un rol importante para la misma en los estadios correspondientes al hospedador mamífero.
- La fosfolipasa A₁ encontrada aquí en *Trypanosoma cruzi* es capaz de hidrolizar completamente los fosfolípidos endógenos de parásitos en autólisis. Esta degradación genera AGL y lisofosfolípidos. Estos compuestos poseen acción citotóxica y pueden estar involucrados en la patogénesis de la enfermedad de Chagas.

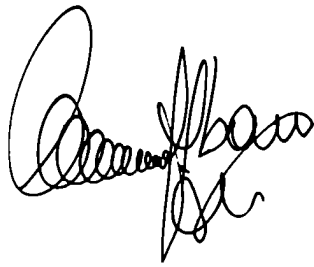
En conclusión, esta Tesis demuestra que los AGL, juegan un rol importante en la metacicloogénesis, el cual puede explicarse por la activación de la PKC.

La generación de esos AGL tiene lugar por efecto de fosfolipasas exógenas (del intestino del vector) y endógenas (del tripanosoma) actuando en forma concurrente. Los AGL estimulan la generación de diacilglicerol, explicando su efecto activador sobre la PKC. Se ha descripto previamente que la interacción con el extracto intestinal induce en el parásito, aumento del calcio citoplásmico. En consecuencia se presentan en forma conjunta los dos mensajeros, diacilglicerol y calcio, involucrados en la activación de la PKC.

Previamente se demostró que la digestión de la hemoglobina genera péptidos metaciclogénicos que actúan a través de la activación de la proteína kinasa A del parásito. Aquí se demuestra que la digestión de los fosfolípidos da lugar a la formación de AGL metaciclogénicos que actúan a través de la PKC. Existen en consecuencia en *Trypanosoma cruzi* mecanismos redundantes que aseguran la diferenciación celular. En ambos casos productos de la digestión de la sangre aparecen como reguladores de la metaciclogénesis. Un posible significado biológico de estas observaciones es que dichos productos desempeñarían un rol coordinador entre la fisiología alimentaria del insecto y la aparición de las formas infectantes del parásito.

Modelo propuesto

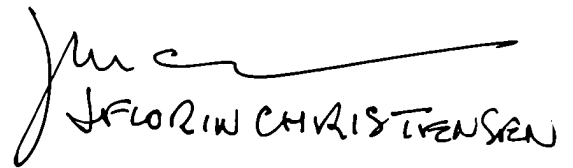




Lic. Marisa
Wainszelbaum



ELVIRA L. DURANTE de ISOLA
PROF. CONSULTA ADJUNTA
DPTO MICROBIOLOGIA
FAC. DE MEDICINA



Bibliografía

- 1.- Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu. Rev. Microbiol. 27:347-382.
- 2.- Storino, R. Milei, J. (1994). Enfermedad de Chagas. Editorial Doyma. Argentina S.A.
- 3.- Organización Panamericana de la Salud. (1992). Enfermedad de Chagas. Boletín Epidemiológico 3:1-5.
- 4.- Curto de Casas, S. (1985). Problemática geográfica de la endemia chagásica y técnicas para su estudio. Capítulo IV, pp 31. "Factores biológicos y ecológicos en la Enfermedad de Chagas". Eds. Carcavallo, R., Rabinovich, J. Tonn, R., Tomo I (Publicación del Servicio Nacional de Chagas), Argentina.
- 5.- 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.
- 6.- UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Tenth Programme report. (1991). Capítulo 7. Chagas' disease.
- 7.- Brener, Z., Andrade, Z.A., Barral-Neto, M. (2000). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda edição. Ed. Guanabara Koogan.
- 8.- Hoff, R., Carvalho, J., Mott, K. (1978) *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. N. England J. Med. 298:604-607.
- 9.- Coura, J.R. (1976). Evolutive pattern in Chagas' disease and the life span of *Trypanosoma cruzi* in human infection. "New approaches in American trypanosomiasis research: proceedings of an international symposium. Washington DC: Pan American Health Organization. 378-383. Scientific Publication 318.
- 10.- Rassi, A., Porto, C.C., Rezende, J.M., (1978). Doença de Chagas. Amato Neto, V., Baldy, J.L.S., (eds). Doenças transmissíveis. Rio de Janeiro: Guanabara Koggan 107-128.
- 11.- Andrade, Z.A. (1983). Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. Evered, D., Collins, C.M., (eds). Cytopathology of parasitic disease (Ciba Foundation symposium 99). London, Pitman Books, pp 214.
- 12.- Rezende, J.M. (1976). Chagasic mega syndromes and regional differences. "New approaches in American trypanosomiasis research:

proceedings of an international symposium. Washington DC: Pan American Health Organization. 195-203. Scientific Publication 318.

13.- Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H., Segura, E. (1994). Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am. Heart. J.* 127(1):151-162.

14.- Hoare, C. (1972). The trypanosomes of mammals. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England. Capítulo 5, pp, 60.

15.- De Souza, W. (1984). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytology* 86:197-200.

16.- Oppendoes, F.R., Michels, P.A.M. (1991). The evolutionary origins of glycosomes. *Parasitol. Today* 7:105-109.

17.- Soares, M.J., Souto-Padron, T., De Souza, W. (1992). Identification of a large prelysosomal compartment in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell. Sci.* 102:157-167.

18.- Docampo, R., Scott, D.A., Vercesi, A.E., Moreno, S.N. (1995). Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 310:1005-1012.

19.- Scott, D.A., Docampo, R., Dvorak, J.A., Shi, S., Leapman, R.D. (1997). In situ compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 272:28020-28029.

20.- Vickerman, K., Preston, T.M. (1976) Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. En: Lumsden WHR, Evans DA (eds). *Biology of Kinetoplastida*, vol I. London: Academic Press, pp 66-102.

21.- Del Ponte, E. (1958). Manual de entomología médica y veterinaria argentina. Ed. Librería del Colegio. Buenos Aires, cap XI, pp 84.

22.- Zeledon, R., Rabinovich, J.E. (1981). Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Review. Annu. Rev. Entomol.* 26:101-133.

23.- Brack, C. (1968) Electron microscopic studies on the life cycle of *Trypanosoma cruzi* with special reference to developmental forms in the vector *Rhodnius prolixus*. *Acta Trop.* 25:289-356.

24.- Pereira, M.E, Andrade, A.F., Ribeiro, J.M.C. (1981). Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science* 211:597-600.

- 25.- Zeledon, R., Bolanos, R., Rojas, M. (1984) Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Acta Trop.* 41:39-43.
- 26.- Tambourgi, D.V., Kipnis, T.L., da Silva, W.D., Joiner, K., Sher, A., Heath, S., Fenton Hall, B., Odgen, G.B. (1993). A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. *Infect. Immun.* 61(9):3656-3663.
- 27.- Castellani, O., Ribeiro, L.V., Fernandes, J.F. (1967) Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Protozool.* 14:447-451.
- 28.- Camargo, E. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 6:93-100.
- 29.- Contreras, V.T., Salles, J.M., Thomas, N., Morel, C.M., Goldemberg, S. (1985). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biolchem. Parasitol.* 16(3):315-327.
- 30.- Rangel-Aldao, R., Allende, O., Triana, F., Piras, R., Henriquez, D, Piras, M. (1987). Possible role of cAMP in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Bol. Parasitol.* 22:39-43.
- 31.- Isola, E.L.D., Lammel, E.M., Katzin, V.J., González Cappa, S.M. (1981). Influence of organ extracts of *Triatoma infestans* on differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 67:53-58.
- 32.- Isola, E.L.D., Lammel, E.M., González Cappa, S.M. (1986a). *Trypanosoma cruzi*: Differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. *Exp. Parasitol.* 62: 329-335.
- 33.- Isola, E.L.D., Lammel, E.M., giovannello, O.A., Katzin, A.M., González Cappa, S.M. (1986b). *Trypanosoma cruzi* morphogenesis: Preliminary purification of an active fraction from hemolymph and intestinal homogenate of *Triatoma infestans*. *J. Parasitol.* 72:467-469.
- 34.- Fraidenraich, D., Peña, C., Isola, E.L.D., Lammel, E., Coso, O., Díaz Añel, A., Pongor, S., Baralles, F., Torres, H. and Flawiá, 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. Nat. Ac. Scien. USA.* 90: 10140-10144.
- 35.- Boshart, M., Mottram, J.C. (1997). Protein phosphorylation and protein kinases in trypanosomatids, in *Trypanosomiasis and Leishmaniasis*. *Parasitol. Today* 13:30-33.

- 36.- Matthews, K.R., Gull, K. (1994). Cycles within cycles: The interplay between differentiation and cell division in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Today* 10(12):473-476.
- 37.- Rangel-Aldao, R., Allende, O., Cayama, E. (1985). A unique type of cAMP-binding protein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14:75-82.
- 38.- Spiegel, S., Foster, D., Kolesnick, R. (1996). Signal transduction through lipid second messengers. *Current Opinion in Cell Biology* 8(2):159-167.
- 39.- Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334:661-665.
- 40.- Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., Nishizuka, Y., (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J. Biol. Chem.* 252:7610-7616.
- 41.- Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., Nishizuka, Y. (1979). Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* 254:3692-3695
- 42.- Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T., Nishizuka, Y. (1979). Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91(4):1218-1224.
- 43.- Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (1980). Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* 255(6):2273-2276.
- 44.- Kikkawa, U., takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S., Nishizuka, Y (1982). Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. Subcellular distribution, purification, and properties. *J. Biol. Chem.* 257:13341-13348.
- 45.- Kishimoto, A., Kajikawa, N. Shiota, M., Nishizuka, Y.(1983). Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease. *J. Biol. Chem.* 258:1156-1164.
- 46.- Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb Journal.* 9:484-496.
- 47.- Newton, A.C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9:161-167.

- 48.- Persons, D.A., Wilkison, W.O., Bell, R.M., Finn, O.J. (1988). Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity of NIH 3T3 fibroblasts transfected with protein kinase C-I cDNA. *Cell*. 52(3):447-458.
- 49.- Melloni, E., Pontremoli, S., Viotti, P.L., Patrone, M., Marks, P.A., Rifkind, R.A. (1989). Differential expression of protein kinase C isozymes and erythroleukemia cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 264(31):18414-18418.
- 50.- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Baltimore, D., Zipursky, L., Darnell, J. (1995). *Molecular Cell Biology*, 3rd edition. Scientific American Books, New York.
- 51.- Gómez, M.L., Erijman, L., Arauzo, S., Torres, H.N., Téllez-Iñón, M.T. (1989). Protein kinase C in *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms: partial purification and characterization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36:101-108.
- 52.- Gómez, M.L., Ochatt, C.L., Kazanietz, M.G., Torres, H.N., Téllez-Iñón, M.T. (1999). Biochemical and immunological studies of protein kinase C from *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 29:981-989.
- 53.- Keith, F., Hide, G., Tait, A. (1990). Characterization of protein kinase C like activities in *T. brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 430:107-116.
- 54.- Parsons, M., Valentine, M., Carter, V. (1993). Protein kinase in divergent eucariotes: identification of protein kinase activities regulated during trypanosome development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:2656-2660.
- 55.- Parsons, M., Valentine, M., Dean, J., Schieven, G.L., Ledbetter, J.A. (1990). Distinct patterns of tyrosine phosphorylation during the life cycle of *T. brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45:241-248.
- 56.- Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature.* 308:693-698.
- 57.- Sivak, A. (1979). Cocarcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 560:67-69.
- 58.- Ashendel, C.L. (1985). The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochem. Biophys. Acta* 822:219-242.
- 59.- Hokin, L.E. (1985). Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 54:205-235.
- 60.- Majerus, P.W., Wilson, D.B., Connolly, T.M., Bross, T.E., Neufeld, E.J. (1985). Phosphoinositide turnover provides a link in stimulus-response coupling. *Trend Biochem. Sci.* 10:168-171.

- 61.- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Saro, K., Kikkawa, U., Nishizuka, U. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257:7847-7851.
- 62.- Wolf, M., LeVine, III H., May, Jr. W.S., Cuatrecasas, P., Sahyoun, N. (1985). A model for intracellular translocation of protein kinase C involving synergism between Ca^{2+} and phorbol esters. *Nature* 317:546-549.
- 63 – Berridge, M.J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 56:159-193.
- 64 – Berridge, M.J., Irvine, R.F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315-321.
- 65.- Borle, A.B. (1981). Control, modulation and regulation of cell calcium. *Reviews in Physiology and Biochemical Pharmacology* 90:13-153.
- 66.- Rasmussen, H., Barrett, P.Q. (1984). Calcium messenger system: An integrated view. *Physiological Review* 64:938-984.
- 67.- Abdel-Latif, A. (1986). Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacology Reviews* 38:227-272.
- 68.- Putney, J.W., Bird, G.St.J. (1994). Calcium mobilization by inositol phosphates and other intracellular messengers. *Trends Endocrinol. Methods.* 5:256-260.
- 69.- Docampo, R., Pignataro, O.P. (1991). The inositol phosphate/diacylglycerol signalling pathway in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biochem.* 275:407-411.
- 70.- Garrido, M., Bollo, M., Machado-Domenech, E. (1996). Biphasic and dose dependent accumulation of InsP3 in *Trypanosoma cruzi* stimulated by a synthetic peptide carrying a chicken α^D globin fragment. *Cell Mol. Biology* 42 (6): 459-464.
- 71.- Moreno, S.N., Jerson, S. Vercesi, A.E., Docampo, R. (1994). Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *Journal of Experimental Medicine* 180:1535-1540.
- 72.- Yakubu, M. A., Majumder, S., Kierszenbaum, F. (1994). Changes in *Trypanosoma cruzi* infectivity by treatments that affect calcium ion levels. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66:119-125.

- 73.- Wilkowsky, S.E., Wainszelbaum, M.J., Isola, E.L.D. (1996). *Trypanosoma cruzi*: participation of intracellular Ca^{2+} during metacyclic trypomastigote-macrophage interaction. Biochemical and Biophysical Research Communications 222: 386-389.
- 74.- Lammel, E. M., Barbieri, M.A., Wilkowsky, S.E., Bertini, F., Isola, E.L.D. (1996). *Trypanosoma cruzi*: Involvement of intracellular calcium in multiplication and differentiation. Exp. Parasitol. 83:240-249.
- 75.- Vercesi, A.E., Moreno, S.N.J., Docampo, R. (1994). $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. Biochemical Journal 304:227-233.
- 76.- Ravdin, J.I., Moreau, F., Sullivan, J.A., Petri. W.A., Mendell, G.L. (1988). Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. Infection and Immunity 56:1505-1511.
- 77.- Ewing, M.S., Hefler, C., Kocan, K.N., Stebler, E. (1991). Extracellular calcium concentration affects infectivity of *Ichthyophthirius* (Ciliophora) *Theronts*. Journal of Protozoology 38:178-181.
- 78.- Olivier, M., Baimbridge, K.G., Reiner, N.E. (1992). Stimulus-response coupling in monocytes infected with *Leishmania*. Attenuation of calcium transients is related to defective agonist-induced accumulation of inositol phosphates. J. Immunol. 148(4):1188-1196.
- 79.- Adovelande, J., Bastide, B., Deleze, J., Schrevel, J. (1993). Cytosolic free calcium in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and the effect of verapamil: a cytofluorimetric study. Exp. Parasitol. 76(3):247-258.
- 80.- Schulman, H. (1993). The multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases. Curr. Opin. Cell. Biol. 5:247-253.
- 81.- Londesborough, J., Nuutinen, M. (1987). Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 219:249-253.
- 82.- Pausch, M.H., Kaim, D., Kunisawa, R., Admon, A, Thomeer, J. (1991). multiple Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase genes in a unicellular eukaryote. EMBO J. 10:1511-1522.
- 83.- Bartelt, D.C., Fidel, S., Farber, L.H., Wolff, D.J., Hammell, R.L. (1988). Calmodulin-dependent multifunctional protein kinase in *Aspergillus nidulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:3279-3283.
- 84.- Ruben, L., Haghghat, N. (1990). Calcium-dependent regulatory pathways in *Trypanosoma brucei*: characterization of 22000-dalton calcium-binding protein, calcimedins, and calmodulin. In: Calcium as an Intracellular

Messenger in Eucaryotic Microbes (O'Day, D.H., ed), pp. 317-342. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

85.- Ruben, L. (1987). Identification of a developmentally regulated calcium-binding protein in *Trypanosoma brucei*. J. Protozool. 34:367-370.

86.- Ogueta, S., Mac Intosh, G., Téllez-Iñón, M.T. (1996). Regulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 78:171-183.

87.- Téllez-Iñón, M.T., Ulloa, R.M., Torruella, M., Torres, H.N. (1985). Calmodulin and Ca^{2+} -dependent cyclic AMP-phosphodiesterase activity in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 17:143-154.

88.- Benaim, G. Losada, S., Gadelha, F.R., Docampo, R. (1991). A calmodulin-activated (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase is involved in Ca^{2+} transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*. Biochem. J. 280:715-720.

89.- Ogueta, S.B., Solari, A., Téllez-Iñón, M.T. (1994). *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms possess a Ca^{2+} -calmodulin dependent protein kinase. FEBS Lett. 337:293-297.

90.- Gonzalez, G.A., Montminy, M.R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. Cell. 59(4):675-680.

91.- Boynton, A.L., Whitfield (1983). The role of cyclic AMP in cell proliferation. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 15:193-294.

92.- Pall, M.L. (1981). Adenosine 3':5' monophosphate in Fungi. Microbiol. Rev. 45:462-480.

93.- Strickler, J.E., Patton, C.L. (1975). Adenosine 3':5' monophosphate in reproducing and differentiated Trypanosomes. Science 190:1110-1112.

94.- Mancini, P.E., Patton, C.L. (1981). Cyclic 3':5' adenosine monophosphate levels during the developmental cycle of *Trypanosoma brucei brucei* in the rat. Mol. Biochem. Parasitol. 3:19-31.

95.- Walter, R.D., Buse, E., Ebert, F. (1978). Effect of cAMP on transformation and proliferation of *Leishmania* cells Tropenmed. Parasitol. 29:439-442.

96.- Rangel-Aldao, R., Tovar, G., Ledezma de Ruiz, M. (1983). The cAMP-receptor protein of *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem. 258:6979-6983.

- 97.- Murakami, K., Routtenberg, A. (1985). Direct activation of purified protein kinase C by unsaturated fatty acids (oleate and arachidonate) in the absence of phospholipids and Ca^{2+} . FEBS Lett. 192(2):189-193.
- 98.- Murakami, K., Chan, S.Y., Routtenberg, A., (1986). Protein kinase C activation by *cis*-fatty acid in the absence of Ca^{2+} and phospholipids. J. Biol. Chem. 261(33):15424-15429.
- 99.- Seifert, R., Schächtele, C., Rosenthal, W., Schultz, G. (1988). Activation of protein kinase C by *cis*- and *trans*-fatty acids and its potentiation by diacylglycerol. Biochem. Biophys. Res. Commun. 154(1):20-26.
- 100.- Bell, R.L., Kennerley, D.A., Stanford, N., Majerus, P.W. (1979). Diglyceride lipase: a pathway for arachidonate release from human platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:3238-3241.
- 101.- Schmalzing, G., Kutshcera, P. (1982). Modulation of ATPase activities of human erythrocyte membranes by free fatty acids or phospholipase A_2 . J. Membr. Biol. 69(1):65-76.
- 102.- Taverna, R.D., Hanaha, D.J. (1980). Modulation of human erythrocyte $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity by phospholipase A_2 and proteases. A comparison with calmodulin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 94(2):652-659.
- 103.- Oishi, K., Raynor, R.L., Chapp, P.A., Kuo, J.F. (1988). Regulation of protein kinase C by lysophospholipids. Potential role in signal transduction. J. Biol. Chem. 263(14):6865-6871.
- 104.- Lenninger, A.L. (1984). Bioquímica. 2da edición. Worth publishers, Inc. y Ediciones Omega SA, Barcelona.
- 105.- Ransac, S., Aarsman, A.J., van den Bosch, H., Gancet, C., de Haas, G.H., Verger, R. (1992). Rat platelet phospholipase A_2 . Kinetic characterization using the monomolecular film technique. Eur. J. Biochem. 204(2):793-797.
- 106.- Janssen, M.J., Vermeulen, L., Van der Helm, H.A., Aarsman, A.J., Slotboom, A.J., Egmond, M.R. (1999). Enzymatic properties of rat group IIA and V phospholipases A_2 compared. Biochim. Biophys. Acta 1440(1):59-72.
- 107.- Ghomashchi, F., Yu, B.Z., Berg, O., Jain, M.K., Gelb, M.H. (1991). Interfacial catalysis by phospholipase A_2 : substrate specificity in vesicles. Biochemistry 30(29):7318-7329.
- 108.- Tamori, Y., Nishijima, M., Nojima, S. (1979). Properties of purified detergent-resistant phospholipase A of *Escherichia coli* K-12. Inactivation,

- p and protection with detergents and phospholipids. J. Biochem. 86(4):1129-1138.
- 109.- Mellors, A., Tappel, A.L. (1967). Hydrolysis of phospholipids by a lysosomal enzyme. J. Lipid. Res. 8(5):479-485.
- 110.- Pete, M.J., Ross, A.H., Exton, J.H. (1994). Purification and properties of phospholipase A₁ from bovine brain. J. Biol. Chem. 269(30):19494-19500.
- 111.- Hostetler, K.Y., Yazaki, P.J. and van den Bosch, H. (1982) Purification of lysosomal phospholipase A. Evidence for multiple isoenzymes in rat liver. J. Biol. Chem. 257: 13367-13373.
- 112.- Hostetler, K.Y., Gardner, M.F., Giordano, J.R. (1986). Purification of lysosomal phospholipase A and demonstration of proteins that inhibit phospholipase A in lysosomal fraction of rat kidney cortex. Biochemistry 25:6456-6461.
- 113.- Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Rasmussen, L., Knudsen, J., Hansen, H.O. (1986) Phospholipase A₁ and triacylglycerol lipase: Two novel enzymes from *Tetrahymena* culture medium. Comp. Biochem. Physiol. 85B: 149-155.
- 114.- Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Knudsen, J., Rasmussen, L. (1985) Cytolytic Activity Released from *Tetrahymena*. J. Protozool. 32:657-660.
- 115.- Hambrey, P.N., Mellors, A., Tizard, I. (1981). The phospholipases of pathogenic and non-pathogenic *Trypanosoma* species. Mol. Biochem. Parasitol. 2: 177-186.
- 116.- Opperdoes, F.R. and van Roy, J. (1982). The phospholipases of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and cultured procyclics. Mol. Biochem. Parasitol. 5: 309-319.
- 117.- Bertello, L.E., Alves, M.J.M., Colli, W., de Lederkremer, R.M. (2000). Evidence for phospholipases from *Trypanosoma cruzi* active on phosphatidylinositol and inositolphosphoceramide. Biochem. J. 345:77-84.
- 118.- Wittcoff, H. (1951). "The phosphatides". Van Nostrand-reinhold, Princeton, New Jersey.
- 119.- Dennis, E.A. (1997) The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. Trends Biochem. Sci. 22(1):1-2.
- 120.- Roberts, M.F. (1996). Phospholipases: structural and functional motifs for working at an interface. FASEB J. 10(10):1159-1172.

- 121.- Hostetler, K.Y., Hall, L.B. (1980) Phospholipase C activity of rat tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96(1):388-393.
- 122.- Hofmann, S.L., Majerus, P.W. (1982). Modulation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity by phospholipid interactions, diglycerides, and calcium ions. *J. Biol. Chem.* 257(23):14359-14364.
- 123.- Shukla, S.D. (1982) Minireview. Phosphatidylinositol specific phospholipases C. *Life Sci.* 30(16):1323-1335.
- 124.- Meldrum, E., Parker, P.J., Carozzi, A. (1991) The PtdIns-PLC superfamily and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1092(1):49-71.
- 125.- Rhee, S.G., Suh, P.G., Ryu, S.H., Lee, S.Y. (1989). Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science.* 244(4904):546-550.
- 126.- Furuya, T., Kashuba, C., Docampo, R., Moreno, S.N.J. (2000). A novel phosphatidylinositol-phospholipase C of *Trypanosoma cruzi* that is lipid modified and activated during trypomastigote to amastigote differentiation. *J. Biol. Chem.* 275(9):6428-6438.
- 127.- Exton, J.H. (1997) Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation, and function. *Physiol. Rev.* 77:303-230.
- 128.- Leslie, C.C. (1997) Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 272(27):16709-16712.
129. Snyder, F. (1985) Chemical and biochemical aspects of platelet activating factor: a novel class of acetylated ether-linked choline-phospholipids. *Med. Res. Rev* 5:107-140.
- 130.- Hullin-Matsuda, F., Tsujishita, Y., Nishizuka, Y. (1997). Ca²⁺-independent cytosolic phospholipase A in HL-60 cells differentiating to granulocytes. *FEBS Letters* 419:117-120.
- 131.- Eintracht, J., Maathai, R., Mellors, A., Ruben, L. (1998). Calcium entry in *Trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A₂ and arachidonic acid. *Biochem. J.* 336:659-666.
- 132.- Catisti, R., Uyemura, S.A., Docampo, R., Vercesi, A.E. (2000). Calcium mobilization by arachidonic acid in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105:261-271.
- 133.- Lee, S.B., Rhee, S.G. (1995). Significance of PIP₂ hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:183-189.

- 134.- Moreno, S.N.J., Vercesi, A.E., Pignataro, O.P., Docampo, R. (1992) Calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes: presence of inositol phosphates and lack of an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium pool. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52(2):251-261.
- 135.- Docampo, R., Moreno, S.N.J., Vercesi, A.E. (1993) Effect of thapsigargin on calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59(2):305-313.
- 136.- Exton, J.H. (1994). Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* 1212:26-42.
- 137.- Stasek, J.E.Jr., Natarajan, V., García, J.G.N. (1993). Phosphatidic acid directly activates endothelial cell protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191:134-141.
- 138.- Kahn, R.A., Yucel, J.K., Malhotra, V. (1993). ARF signaling: a potential role for phospholipase D in membrane traffic. *Cell* 75:1045-1048.
- 139.- Billah, M.M., Anthes, J.C. (1990). The regulation and cellular functions of phosphatidyl-choline hydrolysis. *Biochem. J.* 269: 281-291.
- 140.- Asaoka, Y., Yoshida, K., Sasaki, Y., Nishizuka, Y. (1993). Potential role of phospholipase A₂ in HL-60 cell differentiation to macrophages induced by protein kinase C activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4917-4921.
- 141.- Higgs, H.N. and Glomset, J.A. (1994). Identification of a phosphatidic acid preferring phospholipase A₁ from bovine brain and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 9574-9578.
- 142.- Tizard, I.R., Mellors, A., Holmes, W.L., Nielsen, K. (1978). The generation of phospholipase A and hemolytic fatty acids by autolysing suspensions of *Trypanosoma congolense*. *Tropenmed. Parasit.* 29: 127-133.
- 143.- Bowes, A.E., Samad, A.H., Jiang, P., Weaver, B., Mellors, A. (1993). The acquisition of lyso-phosphatidylcholine by African trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 268:13885-13992.
- 144.- Sage, L., Hambrey, P.N., Werchola, G.M., Mellors, A., Tizard, I.R. (1981). Lysophospholipase 1 in *Trypanosoma brucei*. *Tropenmed. Parasit.*, 32: 215-220.
- 145.- Gomez-Munoz, A., Hamza, E.H., Brindley, D.N. (1992). Effects of sphingosine, albumin and unsaturated fatty acids on the activation and translocation of phosphatidate phosphohydrolases in rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1127(1):49-56.

- 146.- Schoonderwoerd, K., Broekhoven-Schokker, S., Hulsmann, W.C., Stam, H. (1990). Properties of phosphatidate phosphohydrolase and diacylglycerol acyltransferase activities in the isolated rat heart. Effect of glucagon, ischaemia and diabetes. *Biochem. J.* 268(2):487-492.
- 147.- Freeman, M., Mangiapane, E.H. (1989). Translocation to rat liver mitochondria of phosphatidate phosphohydrolase. *Biochem. J.* 263(2):589-595.
- 148.- Walton, P.A., Possmayer, F. (1986). Translocation of Mg^{2+} -dependent phosphatidate phosphohydrolase between cytosol and endoplasmic reticulum in a permanent cell line from human lung. *Biochem. Cell. Biol.* 64(11):1135-1140.
- 149.- Martin-Sanz, P., Hopewell, R., Brindley, D.N. (1984). Long-chain fatty acids and their acyl-CoA esters cause the translocation of phosphatidate phosphohydrolase from the cytosolic to the microsomal fraction of rat liver. *FEBS Lett.* 175(2):284-288.
- 150.- Grace T.D.C. (1962). Establishment of four strains of cells from insect tissues grown "in vitro". *Nature* 195:788-789.
- 151.- Junker C.E., Vaughn J., Cory J. (1967). Adaptation of an insect cell line (Grace's *Antheraea* cells) to medium free of insect hemolymph. *Science* 155: 1565-1566.
- 152.- Leguizamón M.S., Campetella O., González Cappa S.M., Frasch A.C.C. (1994). Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity. *Infect. Immun.* 62(8):3441-3446.
- 153.- Katzin, V., Añasco, N., Isola, E.L.D., González Cappa, S.M. (1983) Characterization of *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms differentiated from epimastigotes. A comparative study between both stages. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 25: 55-61.
- 154.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- 155.- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- 156.- Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Delfino, J.M., Stegmann, T., Rasmussen, H. (1992). Metabolic fate of plasma membrane diacylglycerol and phosphatidic acid in NIH 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 267: 14783-14789.

- 157.- Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Delfino, J. M., Rasmussen, H. (1993). New patterns of diacylglycerol metabolism in intact cells. *Biochem. J.* 289: 783-788.
- 158.- Baron, C.B., Cunningham, M., Strauss, J.F. 3rd, Coburn, R.F. (1984). Pharmacomechanical coupling in smooth muscle may involve phosphatidylinositol metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(21):6899-903.
- 159.- Way, K.J. (2000). Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends in Pharmacological Sciences* 21:181-187.
- 160.- Hidaka, H., Kobayashi, R. (1992). Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:377-397.
- 161.- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., Duhamel, L., Charon, D., Kirilovsky, J. (1991). The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266(24):15771-15781.
- 162.- Kawamoto, S., Hidaka, H. (1984) 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125(1):258-264.
- 163.- Neveu, I., Jehan, F., Houlgatte, R., Wion, D., Brachet, P. (1992). Activation of nerve growth factor synthesis in primary glial cells by phorbol 12-myristate 13-acetate: role of protein kinase C. *Brain. Res.* 570(1-2):316-322.
- 164.- Crowley, M.R., Fineman, J.R., Soifer, S.J. (1994). HA1004, an intracellular calcium antagonist, selectively attenuates pulmonary hypertension in newborn lambs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23(5):806-813.
- 165.- Jarvis, W.D., Turner, A.J., Povirk, L.F., Traylor, R.S., Grant, S. (1994). Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res.* 54(7):1707-1714.
- 166.- Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Meinardi, E., Calle, R. (1996). Diversity of roles of protein kinase C α in the proliferation of Swiss 3T3 cells. *Biochem. J.* 315:513-516
- 167.- Nishizuka, Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C *Science* 233:305-312.

- 168.- Brattsand, G., Friedrich, B., Gullberg, M. (1989). A rapid separation procedure to analyse phosphorylation of two putative protein kinase C substrates in intact lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 30:233-240.
- 169.- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-684.
- 170.- Studier, F.W. (1973). Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.* 79:237-248.
- 171.- Merril, C.R., Goldman, D., Sedman S.A., Elbert, M.H. (1981). Ultrasensitive Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels Shows Regional Variation in Cerebrospinal Fluid Proteins. *Science*, 211:1437-1440.
- 172.- Franson, R., Waite, M. La Via, M. (1971). Identification of phospholipase A₁ and A₂ in the soluble fraction of rat liver lysosomes. *Biochemistry*. 10(10):1942-1946.
- 173.- Waite, M., Rao, R.H., Griffin, H. Franson, R., Miller, C., Sisson, P., Frye, J. (1981). Phospholipases A₁ from lysosomes and plasma membranes of rat liver. "Methods in Enzymology", 71:674-689.
- 174.- Cazzulo, J.J., Valle, E. Docampo, R. and Cannata, J.J.B. (1980). Intracellular distribution of carbon dioxide-fixing enzymes in *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. *J. of General Microbiol.* 117: 271-274.
- 175.- Cazzulo, J.J., Cazzulo Franke, M.C., Martinez, J., Franke de Cazzulo, B.M. (1990). Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta* 1037:186-191.
- 176.- Avila, J.L., Casanova, M.A., Avila, A., Bretaña, A. (1979). Acid and neutral hydrolases in *Trypanosoma cruzi*. Characterization and assay. *J. Protozool.* 26:304-311.
- 177.- Juan, S.M., Cazzulo, J.J. and Segura, E.L. (1977). The citrate synthase from *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 63:921-922.
- 178.- Joshi, M.D. and Jayannathan, V. (1966). Hexokinase. I. Brain. In: *Methods in Enzymology*, (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds) vol 9:371-375. Academic Press, New York.
- 179.- Cannata, J.J.B., Frasch, A. Cataldi de Flombaum, C., Segura, E., Cazzulo, J.J. (1979) Two forms of "malic" enzyme with different regulatory properties in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 184:409-419.
- 180.- Salvaney, M.S., Cannata, J.J.B., Cazzulo, J.J. (1989). Phosphoenolpyruvate carboxykinase from the moderate halophile *Vibrio*

corticola. Purification, physicochemical properties and the effect of univalent-cation salts. *Biochem. J.* 260:221-230.

181.- Bradford, M. Anal. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

182.- Rodriguez-Pena, A., Rozengurt, E. (1984). Disappearance of Ca^{2+} -sensitive, phospholipid dependent protein kinase activity in phorbol-ester-treated 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120:1053-1059.

183.- Tsai, C.H., Hung, L.M., Chen, J.K. (1995) Perturbation of the platelet-derived growth factor receptor signaling by dibutyl-cAMP in human astrocytoma cells. *J. Cell. Physiol.* 164(1), 108-116.

184.- Leszczynski, D., Zhao, Y., Luokkamaki, M., Foegh, M.L. (1994). Apoptosis of vascular smooth muscle cells. Protein kinase C and oncoprotein Bcl-2 are involved in regulation of apoptosis in non-transformed rat vascular smooth muscle cells *Am. J. Pathol.* 145(6), 1265-1270.

185.- Yoshida, K., Asaoka, Y., Nishizuka, Y. (1992). Platelet activation by simultaneous actions of diacylglycerol and unsaturated fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89(14):6443-6446.

186.- Kaibuchi, K., Sano, K., Hoshijima, M., Takai, Y., Nishizuka, Y., (1982) Phosphatidylinositol turnover in platelet activation; calcium mobilization and protein phosphorylation. *Cell Calcium* 3:323-335

187.- Kaibuchi, K., Takai, Y., Sawamura, M., Hoshijima, M., Fujikura, T., Nishizuka, Y. (1983). Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation. *J. Biol. Chem* 258:6701-6704.

188.- Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334:661-665.

189.- Pouyssegur, J., Seuwen, K. (1992). Transmembrane receptors and intracellular pathways that control cell proliferation. *Annu. Rev. Physiol.* 54:195-210.

190.- Parsons, M., Valentine, M., Deans, J., Schieven, G., Ledbetter, J.A. (1991). Distinct patterns of tyrosine phosphorylation during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45(2):241-248.

191.- Parsons, M., Carter, V., Muthiani, A., Murphy, N. (1995). *Trypanosoma congolense*: Developmental regulation of protein kinases and tyrosine phosphorylation during the life cycle. *Exp. Parasitol.* 80:507-514.

- 192.- Dell, K.R., Engel, J.N. (1994). Stage-specific regulation of protein phosphorylation in *Leishmania major*. Mol. Biochem. Parasitol. 64:283-292.
- 193.- Pelech, S., Vance, D. (1984). Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 779:217-251.
- 194.- Racagni, G., de Lema, M.G., Hernández, G., Machado-Domenech, E.E. (1995). Fetal bovine serum induces changes in fatty acid composition of *Trypanosoma cruzi* phosphoinositides. Can. J. Microbiol. 41:951-954.
- 195.- Scandella, C.J., Kornberg, A. (1971) A membrane-bound phospholipase A₁ purified from *Escherichia coli*. 10(24):4447-4456.
- 196.- Florin-Christensen, M., Florin-Christensen, J., Isola, E.D., Lammel, E., Meinardi, E., Brenner, R.R., Rasmussen, L. (1997). Temperature acclimation of *Trypanosoma cruzi* epimastigote and metacyclic trypomastigote lipids. Mol. Biochem. Parasitol. 88: 25-33.
- 197.- van den Bosch, H. (1982) Phospholipases, in Phosphonolipids. (Hawtherorne, J.N. and Ansell, G.B., eds.), pp 313-357. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- 198.- Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Rasmussen, L., Knudsen, J. (1986) An acid phospholipase C from *Tetrahymena* culture medium. Comp. Biochem. Physiol. 85B:143-148.
- 199.- Guberman, A., Hartmann, M., Tiedke, A., Florin Christensen, J. Florin Christensen, M.(1999) A method for the preparation of *Tetrahymena thermophila* phospholipase A₁ suitable for large-scale production. J. Appl. Microbiol. 86:226-230.
- 200.- Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Knudsen, J. Rasmussen, L. (1986) Phospholipases and Phosphonolipids in a Ciliate: An Attack and Defense System? TIBS Trends Biochem. Sci. 11:354-355.
- 201.- Nishijima, M., Akamatsu, Y., Nojima, S. (1974). Purification and properties of a membrane-bound phospholipase A₁ from *Mycobacterium phlei*. J. Biol. Chem. 249(17):5658-5667.
- 202.- Tafuri, W.L. (1979). Pathogenesis of *Trypanosoma cruzi* infections. In: Biology of the Kinetoplastida. Lumsden, W.H.R. and Evans, D.A., eds., Academic Press, London.
- 203.- Asahi, H., Kawabata, M., Moribayashi, A., Okumura, H. (1986). Cytotoxic factors toward neuroblastoma cells in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Can. J. Microbiol. 32: 711-718.

- 204.- Tizard, I., Nielsen, K.H., Seed, J.R., Hall, J.E. (1978). Biological active products from African trypanosomes. *Microbiol. Rev.* 42: 661-681.
- 205.- Tizard, I.R., Nielsen, K., Mellors, A., Assoku, R.K.G. (1977). Free fatty acids, lysophospholipases and the pathogenesis of African trypanosomiasis. *Lancet* 2:750.
- 206.- Tizard, I.R., Nielsen, K.H., Mellors, A., Assoku, R.K.G. (1977) Free fatty acids, lysophospholipases, and the pathogenesis of African trypanosomiasis. *The Lancet* July 9:91.
- 207.- Assoku, R.K.G., Tizard, I.R., Nielsen, K.H. (1977). Free fatty acids, complement activation, and polyclonal B-cell stimulation as factors in the immunopathogenesis of African trypanosomiasis. *The Lancet*, November 5: 956-959.
- 208.- Roberts, C.J., Clarkson, M.J. (1977). Free fatty acids, lysophosphatidylcholine, and pathogenesis of trypanosomiasis. *The Lancet*, April 30:52.