



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**GLICOBIOLOGÍA DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

**Parte A-** Caracterización de mucinas, aceptoras potenciales en la reacción de trans-sialidación.

**Parte B-** Biosíntesis de inositolfosfoceramida y glicolípidos durante la diferenciación del estadio trypomastigote al amastigote.

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Orgánica

**Lic. María Laura Salto**

Directores de Tesis

**Dra. Rosa M. de Lederkremer**

**Dr. Roberto Docampo**

Lugares de Trabajo

Departamento de Química Orgánica-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA

Department of Pathobiology-Veterinary Medicine-University of Illinois at Urbana-  
Champaign

Buenos Aires, 2005

# GLICOBIOLOGÍA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

**Parte A-** Caracterización de mucinas, aceptoras potenciales en la reacción de transialidación.

**Parte B-** Biosíntesis de inositolfosfoceramida y glicolípidos durante la diferenciación del estadio trypomastigote al amastigote.

Esta tesis contribuye al conocimiento de la estructura y biosíntesis de moléculas de *Trypanosoma cruzi* que están ausentes en mamíferos. Las estructuras estudiadas son:

1. Mucinas, glicoconjugados de membrana que pueden contener galactofuranosa (Galf) de acuerdo con la infectividad de la cepa.
2. Inositolfosfolípidos, en particular inositolfosfoceramida (IPC) y su “turnover” durante la diferenciación de trypomastigotes a amastigotes.

El trabajo se dividió en dos partes:

**Parte A.** Se desarrollaron procedimientos para el análisis de los oligosacáridos unidos *O*-glicosídicamente en mucinas de *T. cruzi*. Para la separación de los oligosacáridos conteniendo galactofuranosa de los de galactopiranososa se utilizó cromatografía de intercambio aniónico con detección por pulso amperométrico (HPAEC-PAD). Este método se usó para analizar las mucinas del clon CL14 de *T. cruzi*. En las mismas se encontró N-acetilglucosamina y  $\beta$ -Galp1-4GlcNAc. También se encontró, en mucinas recombinantes de epimastigotes de la cepa CL Brener, obtenidas por transfección de un gen con repeticiones en “tandem” en la región central,  $\beta$ -Galp1-4GlcNAc y  $\beta$ -Galp1-4( $\beta$ -Galp1-6)GlcNAc. La ausencia de galactofuranosa en mucinas de la cepa CL está de acuerdo con su clasificación en el grupo 2 de cepas más infectivas.

**Parte B.** Se demostró que la fosfatidilinositol fosfolipasa C (TcPI-PLC), clonada con anterioridad, fue activa sobre IPC liberando ceramida.

Asimismo se demostró la asociación de fosfolipasas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C, IPC-hidrolasa y acil transferasa con membranas de las formas infectivas, amastigotes y trypomastigotes. Estas enzimas serían responsables de reacciones de remodelamiento que tienen lugar sobre lípidos de anclas de glicoproteínas maduras y de GIPLs.

La síntesis de IPC y de GIPLs fue inhibida con Aureobasidin A. El antibiótico inhibió la diferenciación de trypomastigotes a amastigotes.

Los fosfolípidos de los acidocalcisomas de epimastigotes de *T. cruzi* se caracterizaron por espectrometría de masa con ionización por electrospray (ESI/MS). Fueron similares a los fosfolípidos de microsomas, aunque IPC no fue detectada. Los GIPLs de acidocalcisomas, no reaccionaron con un anticuerpo contra Galf. Los acidocalcisomas son almacenamientos de calcio encontrados en microorganismos y recientemente en células de mamíferos.

En conclusión, en esta tesis se confirmó la importancia de galactofuranosa y de IPC para caracterizar cepas, estadios y/o estructuras celulares de *Trypanosoma cruzi*.

La inhibición de IPC sintasa, implicada en la diferenciación de *T. cruzi* y ausente en mamíferos, es un buen target para la quimioterapia.

**Palabras claves:** *Trypanosoma cruzi*, mucinas, fosfolipasas, inositolfosfoceramida, fosfolípidos, acidocalcisomas, galactofuranosa.

# GLICOBIOLOGY OF *TRYPANOSOMA CRUZI*

**Part A-** Characterization of mucins, potential acceptors in the reaction of trans-sialidation.

**Part B-** Biosynthesis of inositolphosphoceramide and glycolipids during differentiation of trypomastigote to amastigote forms.

This thesis contributes to the knowledge of the structure and biosynthesis of *Trypanosoma cruzi* molecules which are absent in mammals. The structures studied are:

1. Mucins, membrane glycoconjugates which may contain galactofuranose (Galf), according to the infectivity of the strain.
2. Inositol phospholipids, in particular inositolphosphoceramide (IPC) and its turnover on differentiation of trypomastigotes to amastigotes.

The work was divided in two parts:

**Part A.** Procedures were developed for analysis of the oligosaccharides *O*-linked in mucins of *T. cruzi*. High pH anion exchange chromatography with pulse amperometric detection (HPAEC-PAD) was used for the separation of galactofuranose-containing oligosaccharides from the isomeric pyranose compounds. This method was used to establish that mucins of a CL clon of *T. cruzi* contained *O*-linked N-acetylglucosamine and  $\beta$ -Galp1-4 GlcNAc. Also, the recombinant mucin obtained in transfected epimastigotes (CL Brener) from a gene with tandem repeats in the central region contained  $\beta$ -Galp1-4GlcNAc and  $\beta$ -Galp1-4( $\beta$ -Galp1-6)GlcNAc. The fact that no galactofuranose was found in mucins of CL strain is in agreement with its classification in the *T. cruzi* II group of more infective strains.

**Part B.** The previously cloned phosphatidylinositol phospholipase C (TcPI-PLC) was found to be active on IPC and glycoinositol phospholipids (GIPLs), releasing ceramide.

The association of phospholipases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C, IPC-fatty acid hydrolase and acyl transferase with membranes of the infective forms, amastigotes and trypomastigotes, was ascertained. These enzymes are acting in remodeling reactions leading to the lipid anchor of mature glycoproteins and GIPLs.

Aureobasidin A inhibited synthesis of IPC and GIPLs. The antibiotic impaired differentiation of trypomastigotes to amastigotes.

Phospholipids in acidocalcisomes from *T. cruzi* epimastigotes have been characterized by electrospray ionization/mass spectrometry (ESI/MS). They were similar to microsomal phospholipids, although IPC was not detected.

The GIPLs of acidocalcisomes, differently than those from membranes do not react with an anti- Galf antibody. Acidocalcisomes are calcium storage organelles found in microorganisms but not in mammalian cells.

In conclusion, it was confirmed the importance of galactofuranose and IPC to characterize strains, stages and/or cellular structures of *Trypanosoma cruzi*. Inhibition of IPC synthase, implicated in *T. cruzi* differentiation provides a good target for chemotherapy.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, mucins, phospholipases, inositolphosphoceramide, phospholipids, acidocalcisomes, galactofuranose.

A la Dra. Lederkremer, quien durante todos estos años y sin descanso, me formó y guió en el pensamiento científico. A quien admiro profundamente por haberme enseñado a dar siempre lo mejor de uno mismo por la ciencia, con entera dedicación y profesionalidad.

A Augusto por su amor, comprensión y por estar siempre a mi lado.

A nuestra hija María Florencia que nos ilumina la vida.

A mis padres, por su apoyo incondicional y por enseñarme el valor de la responsabilidad en el trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires por la formación que me brindó durante la licenciatura y por las Becas de Investigación de Estudiante, Iniciación y Doctorado.

A la Dra. Lederkremer por su empuje, confianza y apoyo permanentes.

Al Dr. Roberto Docampo por permitirme trabajar en su laboratorio y por enseñarme sobre la biología del *Trypanosoma*.

A la University of Illinois at Urbana-Champaign, en particular, al laboratorio de Espectrometría de Masa por la realización de los espectros.

A la Dra. Carola Gallo por los testigos de síntesis con galactofuranosa y por su amistad y apoyo.

A la Dra. Laura Bertello por su amistad y por transmitirme su experiencia en lípidos.

A Carlos Lima por haberme enseñado muchas de las técnicas descriptas en la Parte A de esta tesis.

A Linda Brown por los cultivos de epimastigotes y de trypomastigotes.

A Carlos Lima, Rosalía Agusti, Alicia Couto y a Teresa y Mark Kulenschmidt por sus asesoramientos con el Dionex.

A Anita Tropea por colaborar en la purificación del fosfoglicano.

A Tim Boebel por la realización del espectro  $^{31}\text{P}$  RMN.

A mis compañeros de laboratorio de acá y de allá por las charlas y buenos momentos compartidos.

Los de acá: Laura Bertello, Carola Gallo, Carlos Lima, Carla Marino, Lucía Gandolfi, Karina Mariño, Rosalía Agusti, María Laura Uhrig.

Los de allá: Andrea Montalvetti, Mamfredo Sefferheld, Linda Brown, Yan Lin, Mike Okura, Mauricio Vieira, Shuhong Luo, Jianmin Fang, y Peter Rohloff.

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

# ÍNDICE

---

## **PARTE A**

|   |          |
|---|----------|
| <b><i>Introducción</i></b>  | 1        |
| <i>Trypanosoma cruzi</i>  | 1        |
| Ciclo de vida y Diferenciación de <i>T. cruzi</i>   | 2        |
| Clasificación de las cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>  | 5        |
| Moléculas que intervienen en la interacción parásito-hospedador   | 7        |
| Mucinas   | 8        |
| Consideraciones generales   | 8        |
| Mucinas en <i>Trypanosoma cruzi</i>   | 10       |
| Estructura de los genes de mucinas  | 11       |
| Participación del ácido siálico y la trans-sialidasa en la invasión por <i>T. cruzi</i>   | 12       |
| <b><i>Resultados</i></b>  | 15       |
| Análisis de los disacáridos alditoles de Galp( $\beta$ 1 $\rightarrow$ X)GlcNAcol y Galf( $\beta$ 1 $\rightarrow$ X)GlcNAcol (X= 3, 4 ó 6) por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección por pulso amperométrico (HPAEC-PAD) y por cromatografía en capa delgada (ccd) | 16       |
| Caracterización de los azúcares unidos O-glicosídicamente en mucinas de <i>T. cruzi</i> , clon CL14   | 20       |
| Estudio del producto de un gen tipo mucina (MUC-R) transfectado en epimastigotes, cepa CL Brener  | 25       |
| Marcación de las glicoproteínas de superficie de epimastigotes “wild type” y transfectados con el gen MUC-R, por el método de galactosa oxidasa/ $\text{NaB}^3\text{H}_4$   | 26       |
| Comparación de la estructura de carbohidratos de mucinas endógenas y recombinantes de <i>T. cruzi</i>   | 27       |
| Caracterización de los oligoalditoles liberados de mucinas de la cepa Brener  | CL<br>28 |
| Caracterización parcial de un fosfoglicano  | 35       |

|  |    |
|--|----|
| Análisis de monosacáridos  | 36 |
| Características del fosfoglicano de <i>T. cruzi</i>  | 38 |
| <b>Conclusiones</b>  | 40 |
| Relación con la división de las cepas en los Linajes 1 y 2   | 42 |
| <b>Materiales y Métodos</b>  | 45 |
| Cultivos celulares   | 45 |
| Testigos de oligosacáridos   | 45 |
| Preparación de alditoles marcados y no marcados  | 45 |
| Eliminación reductiva de oligosacáridos en glicoproteínas de 35-50 kDa de células epimastigote de <i>T. cruzi</i>                            | 46 |
| Cromatografía en capa delgada (ccd)  | 46 |
| Separación de los oligosacáridos-alditoles por cromatografía líquida de intercambio aniónico y detección por pulso amperométrico (HPAEC-PAD) | 47 |
| Purificación de mucinas  | 47 |
| Electroforesis en geles de poliacrilamida  | 48 |
| $\beta$ -Eliminación reductiva   | 48 |
| Marcación con galactosa oxidasa/ $\text{NaB}^3\text{H}_4$  | 48 |
| Digestión con $\beta$ -galactosidasa   | 49 |

---

## PARTE B1

|   |    |
|---|----|
| <b>Introducción</b>   | 50 |
| Esfingolípidos en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mamíferos y trypanosomatídeos | 50 |
| Anclas de glicosilfosfatidilinositol (GPI)  | 58 |
| Remodelamiento del lípido del ancla de GPI en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>     | 59 |
| Biosíntesis de esfingolípidos en microorganismos protozoarios                     | 60 |
| Otros fosfolípidos en <i>T. cruzi</i>   | 61 |

|  |     |
|--|-----|
| Funciones de esfingolípidos  | 62  |
| Transporte de proteínas con ancla GPI desde RE al Golgi  | 63  |
| <b>Resultados</b>  | 64  |
| Biosíntesis de inositolfosfoceramida (IPC) y glicolípidos durante la diferenciación de trypomastigotes a amastigotes en células de mioblastos infectados | 65  |
| Síntesis de IPC durante la diferenciación <i>in vitro</i> de trypomastigotes a amastigotes   | 66  |
| Caracterización de las inositolfosfoceramidas (IPCs)   | 68  |
| Caracterización de los lisofosfatidilinositol (liso-PI)  | 70  |
| Caracterización de los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs)   | 73  |
| Remodelamiento de ácidos grasos en PI  | 73  |
| Aumento de inositol libre en la diferenciación   | 74  |
| Fosfolipasas activas sobre PI en amastigotes y trypomastigotes   | 74  |
| Fosfolipasas en amastigotes y trypomastigotes activas sobre IPC  | 78  |
| Análisis de los IPLs durante la diferenciación <i>in vitro</i> de trypomastigotes por Electrospray / Espectrometría de masa (ESI/MS)                     | 78  |
| La inositolfosfoceramida (IPC) es sustrato de la fosfatidilinositol-fosfolipasa C de <i>T. cruzi</i> (TcPI-PLC)  | 90  |
| Efecto de Aureobasidina A en la síntesis de IPC y GIPLs durante la diferenciación de trypomastigotes   | 93  |
| Inhibición de la diferenciación de trypomastigotes por Aureobasidina A   | 95  |
| <b>Conclusiones</b>  | 100 |
| <b>Materiales y Métodos</b>  | 106 |
| Cultivos celulares   | 106 |
| Diferenciación de trypomastigotes de <i>T. cruzi</i> <i>in vitro</i> y marcación radioactiva   | 106 |
| Infección de myoblastos con trypomastigotes de <i>T. cruzi</i>   | 106 |
| Reactivos  | 107 |



|   |     |
|---|-----|
| Extracción y análisis de inositolfosfatos   | 107 |
| Separaciones por cromatografía en capa delgada  | 108 |
| Preparación de membranas y fracciones de sobrenadante   | 109 |
| Extracción y purificación de inositolfosfolípidos (IPLs) de epimastigotes                           | 109 |
| Ensayo de actividad de fosfolipasas en membranas  | 109 |
| Microscopía de inmunofluorescencia  | 110 |
| Microscopía electrónica   | 110 |
| Tratamientos enzimáticos  | 111 |
| Tratamiento con Fosfatasa alcalina  | 111 |
| Degradaciones químicas  | 111 |
| Hidrólisis de amidas  | 111 |
| Saponificación  | 111 |
| Efecto de Aureobasidin A en la diferenciación de trypomastigotes <i>in vitro</i>                    | 112 |
| Análisis de inositolfosfolípidos por Espectrometría de Masa con ionización por Electropray (ESI/MS) | 112 |
| Incorporación de [ <sup>3</sup> H]-uracilo-Trypomastigotes/Amastigotes                              | 113 |

## PARTE B2

|   |     |
|---|-----|
| <b><i>Introducción</i></b>                              | 115 |
| Acidocalcisomas   | 115 |
| Características morfológicas                            | 115 |
| Funciones del acidocalcisoma                            | 119 |
| <b><i>Resultados</i></b>                                | 120 |
| Fraccionamiento celular-Aislamiento de Acidocalcisomas  | 121 |
| Grado de purificación de la Fracción de Acidocalcisomas | 122 |
| Caracterización de los Lípidos de los Acidocalcisomas   | 124 |

|   |     |
|---|-----|
| Análisis de los Lípidos de Acidocalcisomas y de Microsomas por Espectrometría de Masa con ionización por Electropray (ESI/MS) | 124 |
| Distribución de GIPLs en el gradiente de Iodixanol  | 134 |
| Cuantificación de GIPLs en la fracción de Acidocalcisomas   | 134 |
| Caracterización de los GIPLs de Acidocalcisomas   | 135 |
| <b><i>Conclusiones</i></b>  | 137 |
| <b><i>Materiales y Métodos</i></b>  | 139 |
| Fraccionamiento celular. Aislamiento de Acidocalcisomas   | 139 |
| SDS-PAGE y Western blots  | 139 |
| Medición de la Actividad de Adenilato ciclasa   | 140 |
| Medición de la Actividad de Hexoquinasa   | 140 |
| Medición de Colesterol  | 140 |
| Análisis por cromatografía en capa delgada  | 141 |
| Análisis por Espectrometría de Masa con ionización por Electrospray   | 141 |
| Cuantificación de GIPLs en los Acidocalcisomas  | 142 |
| Análisis de azúcares neutros  | 142 |
| <hr/>   |     |
| <b><i>RESUMEN</i></b>   | 143 |
| <hr/>   |     |
| <b><i>REFERENCIAS</i></b>   | 148 |
| <hr/>   |     |

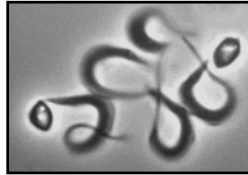
## ABREVIATURAS

---

|        |   |
|--------|---|
| AAG    | alquilacilglicerol  |
| ATP    | adenosinatrifosfato   |
| BSA    | albumina bovina   |
| CCD    | cromatografía en capa delgada                                       |
| CGL    | cromatografía gaseosa   |
| Ci     | Curie   |
| CMP    | citiosinamonofosfato  |
| cpm    | cuentas por minuto  |
| DAG    | diacilglicerol  |
| DEAE   | dietilaminoetil   |
| Dol    | dolicol   |
| DTT    | ditiotreitol  |
| EDTA   | etilendiaminotetraacetato   |
| EGTA   | etilen glicol-bis ( $\beta$ -aminoetil eter) N,N,N',N'-tetraacetato |
| EtN    | etanolamina   |
| EtNP   | etanolaminafosfato  |
| GalNAc | N-acetil-Galactosamina  |
| GBq    | gigaBecquerel   |
| GIPL   | glicoinositolfosfolipido  |
| GlcNAc | N-acetil-Glucosamina  |
| GPI    | glicosilfosfatidilinositol  |
| HCl    | ácido clorhídrico   |
| Hepes  | (N-[2-hydroxietil]piperazina-N'-[2-etansulfonato])                  |
| HPLC   | cromatografía líquida de alta resolución                            |
| IPG    | inositolfosfoglicano  |
| IPL    | inositolfosfolipido   |
| LPG    | lipofosfoglicano  |
| LPPG   | lipopeptidofosfoglicano   |
| MAG    | monoacilglicerol  |
| MBq    | megaBecquerel   |
| M/z    | relación masa/carga   |
| P      | fosfato   |
| PBS    | buffer fosfato salino   |
| PI     | fosfatidilinositol  |
| PI-PLC | fosfatidilinositol fosfolipasa C                                    |
| PLA2   | fosfolipasa A2  |
| PMSF   | fluoruro de fenil-metil-sulfonilo                                   |
| ppm    | partes por millón   |
| PTS    | regiones ricas en Prolina, Treonina y Serina                        |
| RE     | retículo endoplásmico   |
| RMN    | resonancia magnética nuclear  |
| Rpm    | revoluciones por minuto   |
| RP-TLC | cromatografía en capa delgada en fase reversa                       |
| SAPA   | antígeno liberado de fase aguda                                     |
| SDS    | dodecilsulfato de sodio   |

|      |  |
|------|--|
| TFA  | ácido trifluoroacético                   |
| TLC  | cromatografía en capa delgada            |
| TLCK | 1-cloro-3-tosilamida-7-amino-L-2-heptano |
| TS   | trans-sialidasa                          |
| Tris | tris-(hidroximetil)-aminometano          |
| UDP  | uridinadifosfato                         |
| VSG  | glicoproteína variable de superficie     |

---



---

GLICOBIOLOGÍA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

# PARTE A

---

CARACTERIZACIÓN DE MUCINAS, ACEPTORAS POTENCIALES EN  
LA REACCIÓN DE TRANS-SIALIDACIÓN.

# PARTE B1

---

BIOSÍNTESIS DE INOSITOLFOSFOCERAMIDA Y  
GLICOINOSITOLFOSFOLÍPIDOS DURANTE LA DIFERENCIACIÓN  
DEL ESTADÍO TRYPOMASTIGOTE AL AMASTIGOTE

## PARTE B2

---

FOSFOLÍPIDOS EN ACIDOCALCISOMAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*



## INTRODUCCIÓN

El parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es el causante de la Enfermedad de Chagas, que afecta a más de 18 millones de personas en América Latina (Organización Mundial de la Salud, 1998). Pese a los esfuerzos realizados hasta el momento con el fin de controlar la Enfermedad, sólo se disponen de agentes terapéuticos que son efectivos en la fase aguda de la infección. Nuevos blancos de acción de drogas son necesarios para lograr un control más adecuado de la Enfermedad de Chagas.

La siguiente figura muestra los países endémicos:



**Figura 1. Incidencia de la Enfermedad de Chagas en el continente americano-***Organización Mundial de la Salud-* [www.who.int/tdr/diseases/chagas/default.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/default.htm)

### *Trypanosoma cruzi*

Los protozoos son organismos unicelulares eucariotas considerados como un sub-reino dentro del reino Protista. Taxonómicamente hablando, *Trypanosoma cruzi* está clasificado dentro de la familia Trypanosomatidae, sub-orden Trypanosomatina, orden Kinetoplastida, clase Zoomastigofora, Sub-phylum Mastigofora, Phylum Sarcomastigofora (Levine et al. 1980).

## Ciclo de vida y Diferenciación de *T. cruzi*

El parásito *T. cruzi* infecta dos huéspedes muy diferentes, uno invertebrado, insecto hematófago y vector de la enfermedad y otro vertebrado, mamífero en el cual se desarrolla la patología (**Fig. 2**). Los insectos portadores pertenecen a la familia Reduviidae, cuya especie *Triatoma infestans* es la más común en Argentina y está asociada al ciclo doméstico. Las especies más comunes asociadas al ciclo selvático son: *Rhodnius pallescens*, *Triatoma sanguisuga*, *Triatoma sordida* (Lyman et al. 1999). Los hospedadores mamíferos abarcan desde el hombre hasta animales salvajes y domésticos (Brener 1973).

Junto con la ingesta sanguínea de un mamífero infectado, el insecto vector adquiere formas trypomastigotes que se diferencian rápidamente al estadio epimastigote replicativo. Los epimastigotes proliferan gracias al ambiente nutritivo del intestino medio y cuando el número de parásitos aumenta y el ambiente se convierte nutritivamente pobre, se transforman en células más delgadas y más largas, trypomastigotes metacíclicos, estadio no replicativo. Esta diferenciación puede lograrse también *in vitro* privando a los parásitos de determinados nutrientes (Camargo 1964) (Adroher et al. 1988) (Tyler et al. 2000) o sometidos a variaciones en el pH (Caceres et al. 1976) o en la temperatura (Bertelli et al. 1977). El insecto hematófago libera, junto con las heces, trypomastigotes metacíclicos, los cuales entran al torrente sanguíneo del mamífero por proximidad con la lastimadura que ocasiona la ingesta o por heridas en la piel. En cultivos de células epimastigotes, la metaciclogénesis ocurre espontáneamente durante la fase estacionaria del crecimiento (Brener 1973).

Para lograr progreso en la infección, los trypomastigotes que circulan por el torrente sanguíneo del mamífero deben penetrar una célula rápidamente y diferenciarse nuevamente a un estadio replicativo. Son capaces de invadir células fagocíticas y no fagocíticas (Burleigh et al. 1995). El trypomastigote entra la célula huésped en una vacuola endocítica, cuyo pH es ácido. Luego de la fusión con lisosomas, escapa la vacuola y entra en el citoplasma donde se multiplica intracelularmente como amastigotes aflagelados por fisión binaria y diferencia nuevamente al estadio trypomastigote antes de romper la célula huésped y ser liberado al torrente sanguíneo. Entra al torrente sanguíneo por un período indefinido antes de invadir otras células o ser ingerido por un insecto vector, lo cual completa el ciclo de vida (**Fig. 2**).

La fase aguda de la enfermedad se caracteriza por una alta parasitemia. Luego, la infección progresa a la fase crónica, donde los parásitos son casi indetectables al

microscopio. Esta fase puede prolongarse por años sin presentar algún síntoma típico hasta causar las patologías asociadas a la enfermedad. Un 35% de las patologías humanas presentan signos de miocarditis y neurodegeneraciones en el sistema digestivo dando lugar a la Enfermedad de Chagas. *Trypanosoma cruzi* también puede ser transmitido por transfusión sanguínea, trasplante de órganos, por placenta y por accidentes en laboratorios.

La propagación de la infección de *T. cruzi* está estrictamente relacionada con el ciclo de vida del parásito. Por este motivo distintos grupos estudiaron en detalle los pasos que la célula sufre para transitar entre estadios. La transformación del estadio trypomastigote al amastigote implica una reorganización en la membrana celular. La simple observación de la forma de ambas células sugiere que cambios dramáticos ocurren en la membrana del parásito durante este proceso (trypomastigotes flagelados; amastigotes aflagelados y forma redondeada). Andrews et al. (1987) caracterizaron los distintos antígenos presentados durante la transformación: Ssp-1, -2, -3, antígenos característicos del estadio trypomastigote y Ssp-4, antígeno característico del estadio amastigote (Andrews et al. 1988). Este último demostró ser una glicoproteína de peso molecular 70-84 kDa, anclada a la membrana a través de un glicosilfosfatidilinositol cuyo residuo lipídico está formado por una ceramida (Bertello et al. 1996). Ssp-4 es liberado al medio por acción de una fosfolipasa C (Andrews et al. 1988) previamente a la transformación de la célula en trypomastigote. Este último paso liberaría en la membrana lipídica una ceramida que podría actuar como segundo mensajero celular (Bertello et al. 1996). Diversos pasos de regulación celular han sido asociados con un aumento de la ceramida intracelular (Hannun 1994). Al respecto, se ha descrito que la incubación de trypomastigotes de *T. cruzi* con la enzima fosfolipasa C de *Bacillus thurigiensis* causa la diferenciación de las células infectivas a formas amastigotes que son indistinguibles de amastigotes intracelulares (Mortara et al. 2001). La hidrólisis de anclas de GPI en la superficie de trypomastigotes puede promover la liberación de segundos mensajeros que ocasionen la reorganización del citoesqueleto y las estructuras internas y la expresión de antígenos de superficie específicos (Mortara et al. 2001).

La diferenciación del estadio trypomastigote al amastigote puede ser inducida también *in vitro*, a bajo pH (Tomlinson et al. 1995) y los amastigotes generados son indistinguibles de los amastigotes intracelulares. Este tipo de experimento simple favoreció el estudio del proceso de diferenciación.

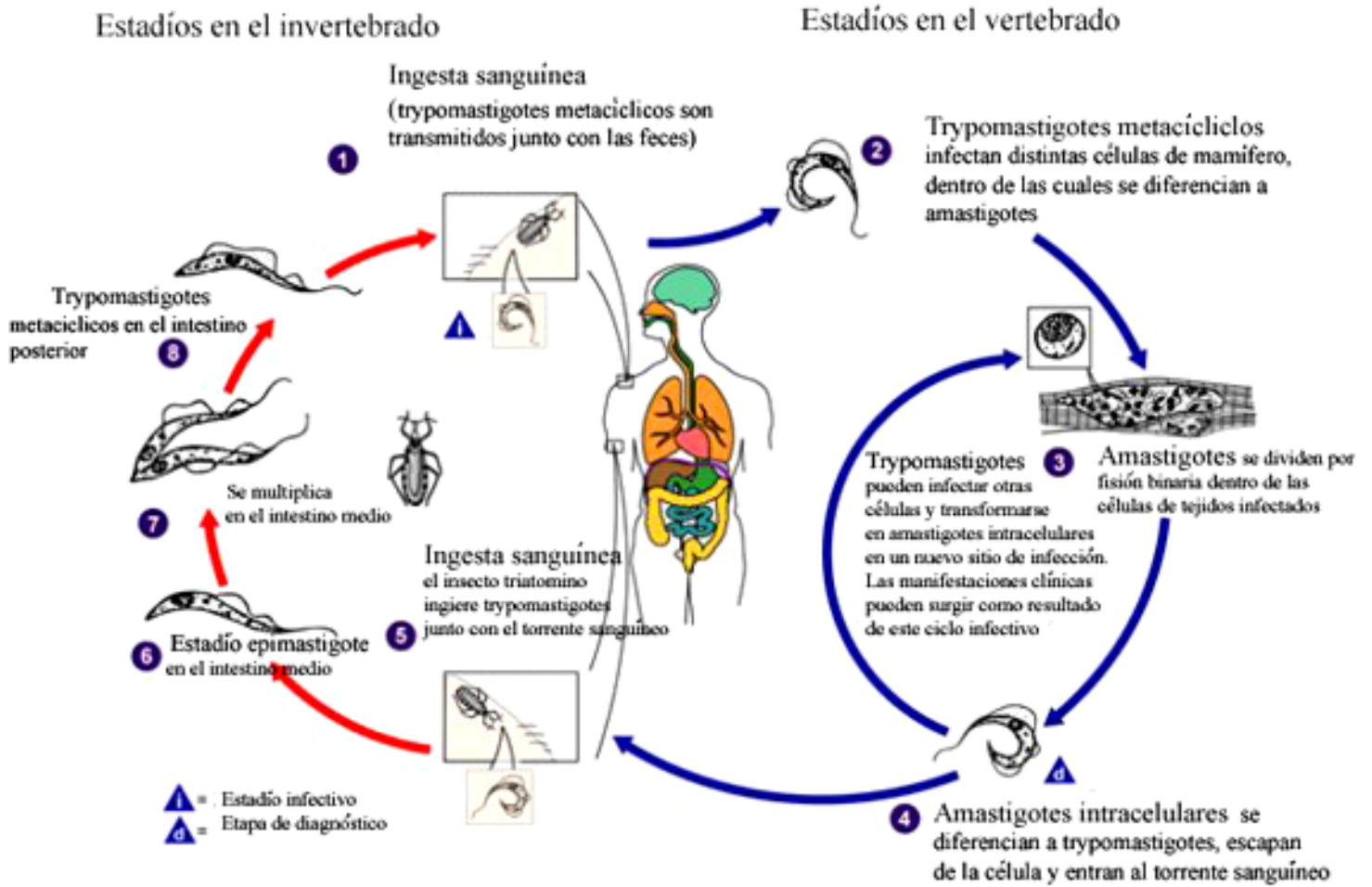


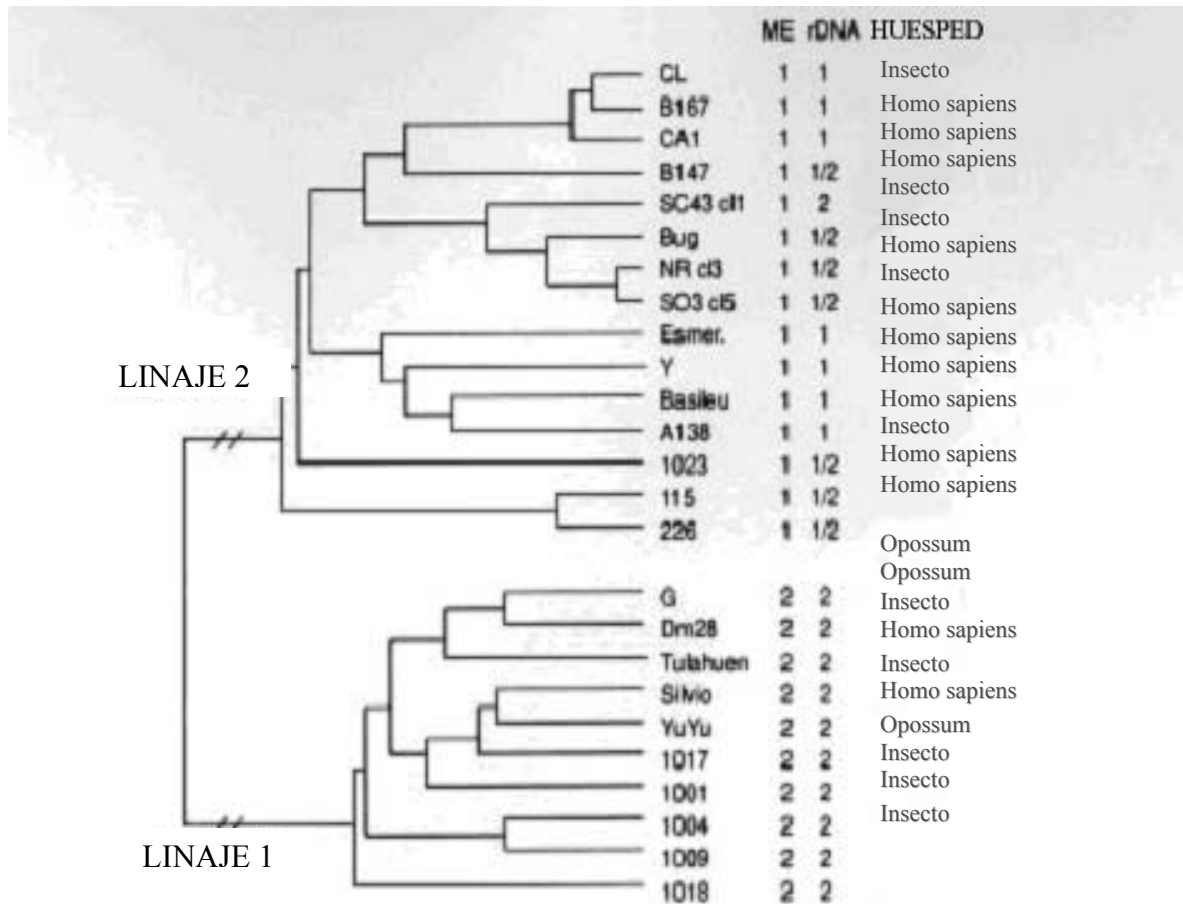
Figura 2. Ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*

En el parásito *Leishmania* la transformación de promastigotes extracelulares flagelados en amastigotes intracelulares también está influenciada por el pH ácido de los fagolisosomas (Zilberstein et al. 1991). Además del cambio de pH, otros factores deben estar involucrados en la transformación necesaria de una célula flagelada a las formas intracelulares aflageladas. El uso de inhibidores de proteosoma (conjunto de proteasas de células eucariotas, encargadas de degradar proteínas citoplasmáticas y nucleares que han sido “marcadas para su destrucción” por la unión covalente a ubiquitina (Orlowski 1990; Coux et al. 1996) reveló que su actividad es necesaria para la transformación, si bien los sustratos degradados no han sido aún identificados (Gonzalez et al. 1996). Otras proteasas también han sido identificadas en *T. cruzi*. El estudio con inhibidores de cruzipaina, una cistein proteasa lisosomal, reveló su participación en la penetración de las células musculares del corazón (Meirelles et al. 1992).

Por otra parte, se demostró que los glicosilfosfatidilinositoles (GPIs) son requeridos también para la transformación de trypomastigotes a amastigotes. Mediante la expresión heteróloga de la GPI-fosfolipasa C de *T. brucei* en *T. cruzi* se demostró que los GPIs son necesarios para la transformación y replicación del estadio intracelular y sugirió que la inhibición de la biosíntesis de GPI puede ser una ruta efectiva para el desarrollo de drogas, ya que las células de mamífero deficientes en algún paso de la biosíntesis de GPI son viables (Garg et al. 1997).

### **Clasificación de las cepas de *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi* comprende una población heterogénea de cepas con distintas características biológicas, bioquímicas e inmunológicas (Andrade et al. 1985; Luquetti et al. 1986; Carneiro et al. 1991). Dichas características incluyen entre otras cosas, la capacidad para infectar distintos huéspedes, el tropismo por diferentes tejidos y la generación de distintos síntomas clínicos y de grados de virulencia. Por estas razones, el análisis detallado de cada cepa tiene importancia no sólo medicinal sino también biológica (Revollo et al. 1998). Un análisis basado en modelos de distancia aditiva (UPGMA, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) utilizando RAPDs (Random Amplified Polimorphic DNA) de las distintas cepas, permite agruparlas en dos grandes linajes: Linaje 1 y Linaje 2 (Souto et al. 1996; Zingales et al. 1999). Estudios filogenéticos basados en la región D7 LSU (Large Subunit) RNA ribosomal también sostienen dicha división (Revollo et al. 1998). El Esquema 2 muestra el árbol de UPGMA basado en las secuencias de DNA ribosomal y mini-exón de más de 200 cepas aisladas de especies triatominas y de mamíferos, originarias a su vez del ciclo selvático o del ciclo doméstico. Dicho diagrama muestra la presencia de dos grupos divergentes. Existe una fuerte asociación del Linaje 2 con la infección humana (ciclo doméstico), mientras que las cepas del Linaje 1 son detectadas preferentemente en el ciclo selvático.



**Esquema 1. Árbol de UPGMA basado en la proporción de bandas RAPDs (Random Amplified Polimorphic DNA) no compartidas entre las distintas cepas.** A la derecha se muestra el correspondiente grupo de rDNA y mini-exón (ME) y el huésped del que ha sido aislada la cepa. (Zingales et al. 1999).

Las evidencias que sostienen esta división no serían solamente a nivel genético. Las cepas del Linaje 1 no producen parasitemia en humanos y generan infecciones leves. Por el contrario, cepas del Linaje 2 poseen propiedades que favorecen la infección humana (Yoshida 1983). Para los linajes 1 y 2 se observaron distintos órdenes de resistencia frente a agentes líticos, como así también distintas reactividades frente a lectinas específicas (Zingales et al. 1999). Por otra parte, recientemente ha sido descrito el primer marcador inmunogénico que permitiría clasificar si las infecciones en pacientes son del tipo 1 o 2 (Di Noia et al. 2002). Todo esto indica una prevalencia de ciertas cepas frente a otras en ambientes diferentes, ie. distintos hospedadores. La división de cepas de *T. cruzi* en dos grupos es evidente no sólo desde el punto de vista genotípico sino también fisiológico.

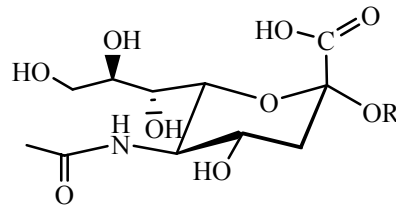
### **Moléculas que intervienen en la interacción parásito-hospedador**

Para comprender el mecanismo por el cual el parásito entra en la célula huésped es necesario estudiar a través de qué moléculas interacciona una célula con otra. La cantidad de estadios que presenta el parásito sumado a que comprende una población heterogénea de cepas y que es capaz de infectar dos huéspedes diferentes, complican el abordaje del problema.

Dentro del insecto, la diferenciación del estadio epimastigote al metacíclico se da luego de la adhesión de los epimastigotes a la pared del intestino gracias a proteínas específicas de 45-50 kDa que se expresan durante la metaciclogénesis (Bonaldo et al. 1988). También, lectinas presentes en el epitelio intestinal pueden interactuar con glicoconjugados de la superficie del parásito (Pereira et al. 1981).

Dentro del mamífero el parásito debe unirse a receptores de la membrana antes de penetrar la célula. Es sabido que puede infectar una gran variedad de células *in vitro* si bien *in vivo* prefiere macrófagos, células musculares y neuronas. El mecanismo por el cual interacciona con células no fagocíticas involucra probablemente receptores y ligandos específicos (Burleigh et al. 1995). Las moléculas descritas como posibles mediadoras de la interacción son glicoproteínas ancladas a la membrana (Andrews et al. 1984; Ramirez et al. 1993), en las cuales el azúcar ha sido en general un componente importante en el reconocimiento.

Los azúcares han sido descritos como mediadores en la interacción entre células en diversos sistemas. En general, las cadenas de carbohidratos de glicoproteínas y de glicolípidos de la membrana plasmática miran hacia fuera de la célula y por esto cumplen roles de interacción entre células. En *T. cruzi*, el ácido siálico ha sido el azúcar que capturó más atención, con respecto a la mediación en la interacción parásito-huésped, por estar involucrado en el proceso de infección (de Titto et al. 1987; Schenkman et al. 1991; Schenkman et al. 1992), y además, por proteger al organismo de la detección y respuesta del sistema inmune del huésped (Belen Carrillo et al. 2000). La sialilación de la célula huésped también sería importante para la infectividad del parásito. El ácido siálico comprende una familia de monosacáridos con 9 carbonos con la estructura general que se muestra en la **Figura 3**.



**Figura 3. Estructura del ácido siálico.**

Típicamente son los residuos terminales de los oligosacáridos de la superficie celular (Varki 1997; Angata et al. 2002). Este es un lugar preferencial para interactuar con otras células y con el entorno. En vertebrados ha sido relacionado con una variedad de procesos importantes: embriogénesis y diferenciación celular, adherencia de células endoteliales a leucocitos e invasión por células tumorales. En glicoconjugados naturales existe solo en la configuración alfa, salvo en el donador CMP-ácido siálico en donde la configuración es beta. *T. cruzi* no sintetiza ácido siálico (Schauer et al. 1983; Previato et al. 1985), pero lo adquiere de glicoconjugados del hospedador a través de una enzima de membrana, trans-sialidasa (TS) que lo transfiere a residuos terminales de galactosas piranósicas presentes en las cadenas *O*-glicosídicas de **mucinas** del parásito (Ferrero-García et al. 1993) (ver más adelante). La trans-sialidasa difiere de otras sialil y glicosil transferasas en que no requiere del azúcar-nucleótido CMP-ácido siálico como donador y además, la transferencia se da con retención de la configuración del carbono anomérico y preferentemente  $\alpha$ -1,3 (Parodi et al. 1992). Vandekerckhove et al. (1992) demostraron que los azúcares  $\beta$ -gal son mejores aceptores que los  $\alpha$ -gal. Y las uniones  $\beta$ -1-4 y  $\beta$ -1-6 son mejores aceptoras que  $\beta$ -1-3. La presencia de fucosa en el oligosacárido aceptor disminuye la capacidad aceptor. Fue sugerido también que TS podía hidrolizar ácido siálico de ligandos selectina (Sialil-Lewis x y a). Sin embargo, los oligosacáridos fucosilados no son buenos sustratos (Vandekerckhove et al. 1992).

## MUCINAS

### Consideraciones Generales

Las mucinas son glicoproteínas con un alto contenido (50-90%) de oligosacáridos de cadenas relativamente cortas, unidos *O*-glicosídicamente a residuos de serina y/o treonina, muy frecuentes en este tipo de proteínas. Presentan también regiones no glicosiladas que abarcan los extremos carboxilo y amino terminales (Gum 1992). El alto número de cadenas de oligosacáridos resultante forma regiones



totalmente desplegadas (o de bastón), muy hidratadas, resistentes a proteasas y que presentan sitios potenciales para unir lectinas, anticuerpos o receptores de otras células para hidratos de carbono (dando lugar a una función de adherencia). Por otra parte, si los oligosacáridos poseen residuos terminales de ácido siálico y/o sustituyentes sulfato que dan a la estructura una carga negativa, pueden funcionar como barrera selectiva y proteger a la célula (función de protección) (Van Klinken et al. 1995).

Actualmente las mucinas de vertebrados se clasifican según su procedencia en dos grandes grupos: mucinas epiteliales y mucinas del endotelio o leucocitos.

Las mucinas epiteliales son glicoproteínas con alto peso molecular (200-900kDa). Se dividen en las de secreción y las asociadas a membrana. Hasta la fecha, catorce genes han sido asignados a este grupo (<http://www.hugo-international.org/hugo/>) (Dekker et al. 2002). Poseen regiones centrales PTS (Prolina, Treonina y Serina) que contienen la mayor parte de los sitios de *O*-glicosilación con un número variable de repeticiones en “tandem”. Las de secreción tienen en los extremos residuos ricos en cisteína, los cuales permiten la dimerización y luego multimerización. Esto forma el “mucus” o barrera de protección en las superficies de mucosas (Perez-Vilar et al. 1999). La homología entre los 14 genes se da sólo en las regiones ricas en cisteína, sin embargo, se los agrupó en la familia denominada “MUC”.

En mamíferos, gran parte de las mucinas se encuentran situadas entre las células epiteliales y la matriz extracelular permitiendo interacciones específicas; por esta razón, han sido centro de atención de investigadores de enfermedades inflamatorias e infectivas, cáncer y metástasis (Tamada et al. 2002; Matsukita et al. 2003; Mollick et al. 2003; Wang et al. 2003). El gran número de genes asociados a esta familia que no presenta alta homología en las secuencias de sus miembros hace que todavía esta clasificación esté en discusión (Porchet et al. 2004).

Las mucinas del endotelio y de leucocitos poseen un peso molecular mucho más bajo (50-240 kDa). Algunas presentan un número pequeño de repeticiones PTS en “tandem”, mientras que otras ni siquiera las tienen. Las regiones PTS pueden estar en el centro como así también en los extremos. Estas mucinas presentan las propiedades físicoquímicas de las mucinas epiteliales pero permiten una función de adhesión entre las células del sistema inmune y el endotelio. La unión está mediada por ácido siálico, por lo que se las denominó sialomucinas. Las sialomucinas son parte fundamental del proceso de migración de linfocitos hacia los distintos órganos linfoides secundarios y frente a la respuesta inflamatoria (Lasky 1995). Los receptores para las sialomucinas

son las selectinas (Lasky 1992) y las lectinas específicas para ácido siálico (Crocker et al. 1998). Hay tres clases de selectinas: L, de linfocitos; E, del endotelio y P, de plaquetas y se unen a estructuras relacionadas con el determinante Sialil-Lewis-X (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\beta$ 1-3)GlcNAc-R) (Van Klinken et al. 1995).

En las mucinas en general, los oligosacáridos están mayoritariamente unidos *O*-glicosídicamente a los aminoácidos serina y treonina a través de  $\alpha$ -*N*-acetilgalactosamina (GalNAc). Típicamente las cadenas poseen Galactosa (Gal), *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), *N*-acetylglucosamina (GlcNAc) y Fucosa (Fuc), pero no Manosa (Man), y generalmente poseen residuos terminales cargados negativamente como ácido siálico y/o sulfato. Además poseen un pequeño número de oligosacáridos unidos *N*-glicosídicamente, ricos en manosas y unidos a Asparagina por medio de GlcNAc, que a veces influyen en las propiedades de estas glicoproteínas. La glicosilación de mucinas es variable entre tejidos y entre especies (Klein et al. 2000). Se cree que dicha variación es función dependiente (Scharfman et al. 1995).

### **Mucinas en *Trypanosoma cruzi***

El parásito *Trypanosoma cruzi* también expresa en su superficie glicoproteínas tipo mucinas cuyos genes asociados conforman una familia extremadamente grande (Di Noia et al. 1998). Su presencia fue determinada por primera vez en extractos fenólicos acuosos (Alves et al. 1975; Lederkremer et al. 1976) durante la caracterización del glicolípido LPPG (lipopéptidofosfoglicano). Presentan características similares a las sialomucinas de vertebrados; secuencias ricas en los aminoácidos Ser, Tre y Pro que forman dominios de alta *O*-glicosilación. Sin embargo, algunas características le son particulares. A diferencia de lo que ocurre en mucinas de mamífero, las cadenas *O*-glicosídicas están unidas a la proteína a través de GlcNAc en lugar de GalNAc. Otra particularidad es la presencia de galactosa furanosa en mucinas de la cepa G (Previato et al. 1994; Serrano et al. 1995) y Dm28 (Agrellos et al. 2003). Dicho azúcar también es componente del glicolípido mayoritario en el estadio epimastigote, el LPPG (Lederkremer et al. 1990; Lederkremer et al. 1995). Por otra parte, la unión de las mucinas de *T. cruzi* a la membrana es a través de un glicosilfosfatidilinositol (GPI), tipo de anclaje que se da con alta frecuencia en parásitos protozoarios (Lederkremer et al. 2001).

Las mucinas se expresan en la membrana del parásito, en epimastigotes (Lederkremer et al. 1976), trypomastigotes metacíclicos (Serrano et al. 1995) y

trypomastigote (Acosta et al. 1994) como una doble o triple banda revelada por SDS-PAGE y con un peso molecular de 35-50 kDa para las de epimastigotes y trypomastigotes metacíclicos y 60-200 kDa para las de la forma trypomastigote sanguínea. Las glicoproteínas de 35-50 kDa están formadas por 60% de carbohidratos y son ricas en treonina, aminoácido que representa un 30% del contenido de la proteína (Schenkman et al. 1993). La única diferencia observada entre las mucinas de trypomastigotes metacíclicos y epimastigotes de la cepa G fue el residuo lipídico. Mientras que para epimastigotes es un alquilacilglicerol, para el estadio metacíclico es una ceramida (Serrano et al. 1995). Los aceptores de ácido siálico en los trypomastigotes metacíclicos son las glicoproteínas de 35-50 kDa; en epimastigotes, también funcionan como aceptoras de ácido siálico, si bien la expresión de la transalidasa en este estadio se da durante la fase estacionaria del crecimiento (Schenkman et al. 1993).

### **Estructura de los genes de mucinas**

Las secuencias peptídicas de las mucinas de *T. cruzi* fueron estudiadas por (Di Noia et al. 1998). Las regiones 5' y 3' no traducibles (5'UTR y 3'UTR) son altamente conservadas entre los distintos miembros de la familia. La región que codifica para proteína (ORF, open reading frame) presenta en su extremo *N*-terminal, un péptido señal para retículo endoplásmico; esta región es altamente conservada entre los distintos miembros. Los siguientes aminoácidos constituyen el extremo *N*-terminal de la proteína el cual es hipervariable, polar y altamente hidrofílico. Por otra parte, el extremo *C*-terminal presenta una secuencia que codifica para un GPI.

El dominio central contiene los sitios potenciales de *O*-glicosilación y permite clasificar a los genes en dos subfamilias. En el primer grupo (MUC-R) dicho dominio muestra secuencias repetitivas (Thr<sub>(8)</sub>-Lys-Pro<sub>(2)</sub>) ricas en Treonina y Prolina pero no Serina. Este grupo se expresa en el estadio trypomastigote infectivo del parásito. El segundo grupo (MUC-NR) presenta un dominio central carente de unidades repetitivas pero rico en Serina, Treonina y Prolina. Los genes pertenecientes a este grupo se expresan en todos los estadios del parásito; lo cual sugiere que conforman el grupo de 35-50 kDa.

Un tercer grupo codifica para una proteína de menor peso molecular que carece de las secuencias degeneradas presentes en los otros dos grupos. Dicho grupo corresponde a un gen de copia única y dimórfico, es decir, constituye un antígeno cuyo epitope varía dependiendo del tipo de cepa del que se trate (Di Noia et al. 2002). Dicho antígeno se

expresa en la superficie de trypomastigotes sanguíneos, es altamente inmunogénico y constituye el primer marcador inmunogénico que permite la identificación del tipo de linaje de los parásitos a partir del suero de humanos infectados con *Trypanosoma cruzi*.

Distintas evidencias sugieren que los genes en dichos grupos expresan glicoproteínas tipo mucinas *in vivo*. Péptidos sintéticos diseñados a partir de las secuencias repetitivas del dominio central de los genes de mucinas fueron excelentes sustratos para la *N*-acetilglucosaminiltransferasa (Previato et al. 1998). Por otra parte, un gen tipo mucina con las secuencias repetitivas Thr<sub>(8)</sub>-Lys-Pro<sub>(2)</sub> fue transfectado en epimastigotes y el producto aislado presentó todas las características de mucina (Pollevick et al. 2000).

El estudio bioquímico es parte de esta Tesis y se presenta en Resultados de la parte A.

### **Participación del ácido siálico y la trans-sialidasa en la invasión por *T. cruzi***

Los genes que codifican para la enzima trans-sialidasa comprenden una familia de 140 miembros. Dicha familia se agrupa en tres sub-familias diferentes, dos de las cuales (TS y TSI) se expresan en trypomastigotes (forma metacíclica en el insecto vector y forma sanguínea) y están ancladas a la membrana a través de un GPI (Agusti et al. 1998). La diferencia entre estas dos sub-familias reside en la actividad de las distintas proteínas; mientras que TS es activa, TSI carece de actividad debido a una única mutación en la Tyr342, reemplazada por una His. Por otra parte la Prolina 231 resultó ser relevante para la actividad enzimática (Cremona et al. 1995). El extremo *N*-terminal constituye el dominio catalítico (aminoácidos 1-371), presenta un 30% de homología con respecto a otras sialidasas (Hoyer et al. 1991) (Cremona et al. 1995) y se conecta al extremo C-terminal a través de una alfa-hélice (aminoácidos 372-394). El extremo C-terminal constituye un dominio tipo lectina que no está directamente involucrado en el mecanismo de reacción y termina en repeticiones en tandem de 12 aminoácidos (DSSAHSTPSTPA) conocido como SAPA (Shed Acute Phase Antigen). El número de miembros es igual en las dos familias (70 genes) y ambos presentan una actividad tipo lectina, (Cremona et al. 1999), que es capaz de unirse a sialomucinas de linfocitos-T del huésped (Todeschini et al. 2002). Se ha demostrado que el dominio tipo lectina de la trans-sialidasa está involucrado en la unión del parásito a la célula huésped (Villalta et al. 2001). Un tercer grupo (TS-e) está formado por genes que se expresan sólo en el estadio epimastigotes. Este grupo carece del dominio SAPA repetitivo pero presenta actividad de trans-sialidasa (Briones et al. 1995).

En infecciones virales y microbianas el ácido siálico puede prevenir o facilitar la adherencia celular y la invasión (Bredt et al. 1982; Nishimura et al. 1988; Babal et al. 1999). Los resultados sobre la participación del ácido siálico en la infección por *T. cruzi* son controvertidos. Según numerosas publicaciones de los últimos 15 años la infección puede ser inhibida o incrementada por ácido siálico. Se determinó que las mucinas de 35-50 kDa del estadio metacíclico son lasceptoras de ácido en la reacción catalizada por trans-sialidasa siálico (Schenkman et al. 1993). Anticuerpos contra estas glicoproteínas previenen la invasión de células Vero (Ruiz Rde et al. 1993). En el estadio trypomastigote sanguíneo la presencia de ácido siálico se da en el epitope Ssp3 (Andrews et al. 1987) correspondiente a las mucinas de 80-200 kDa. Anticuerpos contra el epitope sialilado bloquean la invasión de la célula huésped (Ruiz Rde et al. 1993) (Schenkman et al. 1991). Sin embargo, estudios posteriores postulan que la presencia de ácido siálico sería prescindible para la infección (Yoshida et al. 1997).

En macrófagos, la presencia de ácido siálico en el parásito inhibe la invasión celular posiblemente debido a que la internalización del parásito ocurre vía receptores de galactosa/N-acetilgalactosamina en la superficie (Kempka et al. 1990). De acuerdo con esto, la invasión puede ser inhibida por galactosa y N-acetil-galactosamina (de Araujo Jorge et al. 1984; Araujo-Jorge et al. 1988) y eritrocitos desialilados (Araujo-Jorge et al. 1989; de Araujo-Jorge 1989).

Distintos experimentos realizados por diferentes grupos han sugerido que el ácido siálico del parásito participa en el proceso de invasión de células no-fagocíticas. Se observó un incremento de la infectividad con una pre-incubación del parásito con fetuina pero no con asialofetuina (Piras et al. 1987). La invasión puede ser parcialmente reducida con anticuerpos contra glicoproteínas sialiladas de 85kDa (Alves et al. 1986; Couto et al. 1990).

En el insecto vector, la sialilación del parásito puede protegerlo de la acción de enzimas glicolíticas encontradas en su estómago (Garcia et al. 1991). Por otra parte se describió que la sialilación puede interferir también en la adherencia del parásito a las paredes del intestino (Pereira et al. 1980).

Anticuerpos anti- $\alpha$ -galactosa obtenidos de pacientes en el estadio crónico de la enfermedad de Chagas se unen a glicoproteínas de 72kDa en trypomastigotes metacíclicos causando lisis por complemento (Almeida et al. 1991; Travassos et al. 1993). Por el contrario, los mismos anticuerpos causan una intensa aglutinación de trypomastigotes sanguíneos y los destruyen por un camino independiente a la lisis por

complemento. Por microscopía electrónica y tinción con rojo de rutenio (colorante para carbohidratos) se observó que el tratamiento con los anticuerpos anti- $\alpha$ -Gal destruye la membrana (Pereira-Chioccola et al. 2000). El sitio de unión en trypomastigotes sanguíneos fue identificado como mucinas de 60-200 kDa, más específicamente, oligosacáridos con la terminación  $\alpha$ Gal(1-2)Gal,  $\alpha$ Gal(1-3)Gal,  $\alpha$ Gal(1-6) y  $\alpha$ Gal(1-3)Gal (Almeida et al. 1994). En un trabajo posterior, se vio que el ácido siálico “protege” al parásito de la lisis causada por anticuerpos anti- $\alpha$ -Gal; parásitos cuya superficie está sialilada son más resistentes al tratamiento con los anticuerpos líticos que los parásitos no sialilados. Estos resultados serían independientes de la acción de una trans-sialidasa ya que esta utiliza sólo unidades  $\beta$ -galactopiranosil terminales como aceptoras.

De acuerdo con lo expuesto arriba se deduce que la presencia de ácido siálico en la superficie del parásito puede tener un rol dual, promoviendo interacciones entre células a través de proteínas con actividad tipo lectina que unan ácido siálico o inhibiendo este tipo de interacción enmascarando los sitios de reconocimiento o por su carga negativa (Kelm et al. 1997; Varki 1997).

Dado que la trans-sialidasa ha sido asociada con la infección de *T. cruzi* y que está ausente en mamíferos, constituye un blanco para el desarrollo de drogas.

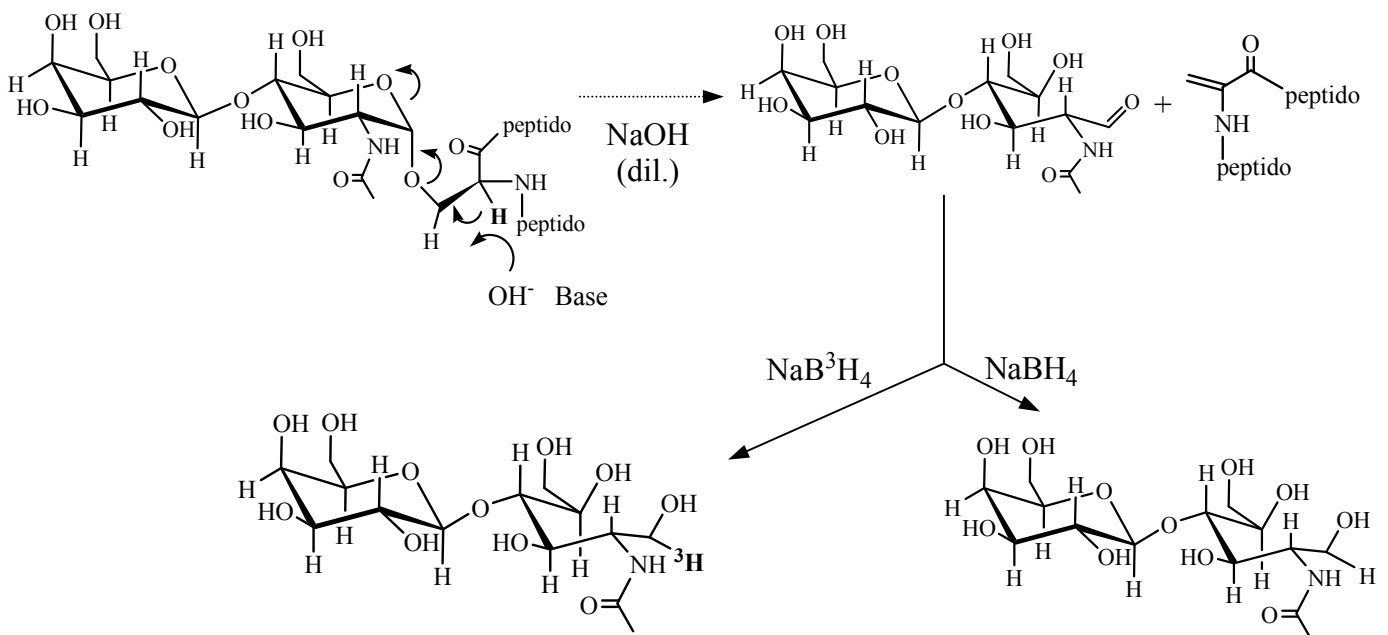
---

## RESULTADOS

### Introducción

Uno de los objetivos de esta tesis era desarrollar un método que permitiera diferenciar los oligosacáridos unidos a las mucinas en *T.cruzi* para, entre otros fines, poder caracterizar las distintas cepas.

Las cadenas *O*-glicosídicas pueden liberarse de la glicoproteína con álcali diluido. La base rompe la unión *O*-glicosídica a serina o treonina por medio de una reacción de  $\beta$ -eliminación dando como producto secundario el aminoácido insaturado, ácido  $\alpha$ -amino acrílico o ácido  $\alpha$ -amino crotonico respectivamente. Al alto pH utilizado durante la reacción, el extremo reductor del oligosacárido liberado y las uniones 1-3 se destruirían. El uso de altas concentraciones de borohidruro de sodio durante la reacción evita estas reacciones adversas reduciendo el glicano inmediatamente y estabilizándolo (Carlson 1968). Las uniones *N*-glicosídicas también pueden cortarse por tratamiento en medio básico pero a una mayor concentración y sólo a altas temperaturas. Por otra parte, el tratamiento con álcali diluido puede resultar en la generación de péptidos y glicopéptidos con uniones *N*-glicosídicas por hidrólisis de la proteína. Por este motivo, la purificación de los oligoalditoles generados previo a su análisis, es una práctica conveniente. El **Esquema 2** detalla la reacción a partir de:  $\beta$ -Galp(1-4)GlcNAc-Ser-proteína. El uso de  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  permite la marcación del oligoalditol liberado.



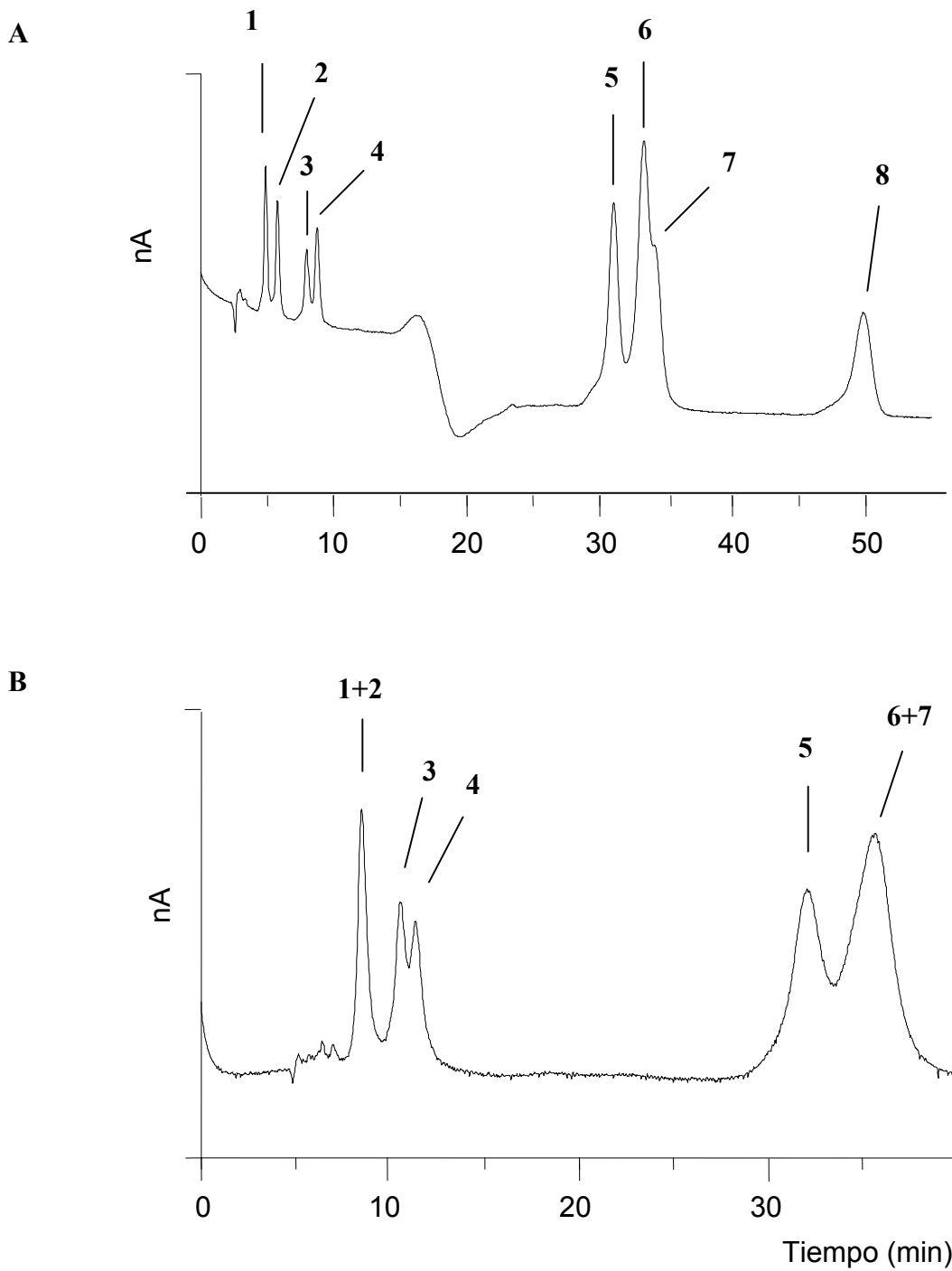
**Esquema 2. Reacción de  $\beta$ -eliminación.**

**Análisis de los disacáridos alditoles de Galp( $\beta$ 1 $\rightarrow$ X)GlcNAcol y Galf( $\beta$ 1 $\rightarrow$ X)GlcNAcol (X= 3, 4 ó 6) por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección por pulso amperométrico (HPAEC-PAD) y por cromatografía en capa delgada (ccd).**

Con el fin de identificar rápidamente galactosa furanósica en mucinas de *Trypanosoma cruzi* desarrollamos dos métodos complementarios que permiten la identificación de las estructuras de los oligosacáridos. La alta sensibilidad que presentan ambos métodos permite el análisis con ng de compuesto. Para la puesta a punto del método utilizamos testigos de oligosacáridos alditoles; los que contienen galactosa furanósica fueron sintetizados previamente en nuestro laboratorio por la Dra Carola Gallo (ver Materiales y Métodos).

Los disacáridos alditoles de Galp( $\beta$ 1 $\rightarrow$ X)GlcNAcol y Galf( $\beta$ 1 $\rightarrow$ X)GlcNAcol se analizaron por HPAEC-PAD en dos columnas diferentes, CarboPac PA-10 (**Fig. 4A**) y CarboPac MA-1 (**Fig. 4B**). Ambas columnas lograron la separación de los galactopiranosil-alditoles de los alditoles conteniendo galactofuranosa. Los galactofuranosil-alditoles presentaron tiempos de retención considerablemente mayores que sus análogos piranósicos. El comportamiento cromatográfico en columnas de intercambio aniónico en HPAEC de oligosacáridos conteniendo galactofuranosa no ha sido descrito, sin embargo, los hexafuranósidos son más fuertemente retenidos en intercambiadores aniónicos fuertes. Los 3 isómeros de Galp( $\beta$ 1 $\rightarrow$ X)GlcNAcol (X= 3, 6 y 4) (**Fig. 4A**, picos 2, 3 y 4, respectivamente) pueden ser separados en la columna PA-10 al igual que los isómeros de Galf( $\beta$ 1 $\rightarrow$ X)GlcNAcol (X= 3, 6 y 4) (**Fig. 4A**, picos 5, 6 y 7, respectivamente). Sin embargo, en este último caso, los  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 y  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6 disacáridos alditoles presentaron tiempos de retención muy cercanos y no lograban separarse tampoco en la columna MA-1 (**Fig. 4B**). El alto tiempo de retención del trisacárido alditol [Galf $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(Galp $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6)]GlcNAcol imposibilita su análisis en la columna MA-1 (**Fig. 4B**). Los isómeros  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 galactofuranosil y  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 galactopiranosil alditoles presentan tiempos de retención menores que sus disacáridos isómeros de posición. Como puede verse en la **Fig. 4** el monosacárido alditol GlcNAcol, que también se encontró como unidad, ligado *O*-glicosídicamente a las mucinas de *T. cruzi* (Previato et al. 1994; Serrano et al. 1995), se separa bien en la columna PA10 (pico 1). Los tiempos de retención en las dos columnas están listados en la **Tabla 1**; sin embargo pueden variar con el tiempo de uso de la columna.





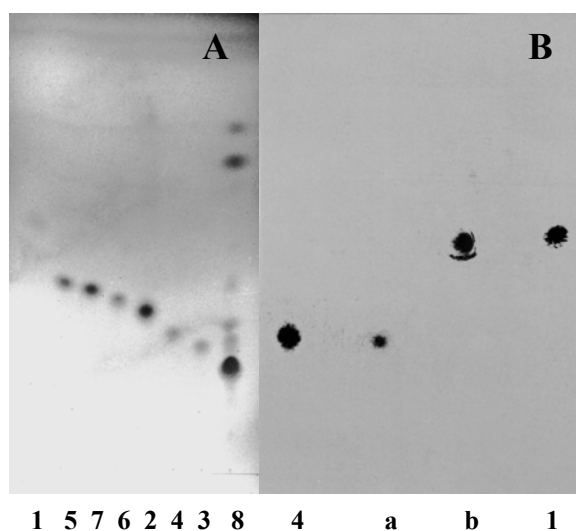
**Figura 4. Análisis de los alditoles de  $\beta$ -Galp(1 $\rightarrow$ X)GlcNAc y  $\beta$ -Galf(1 $\rightarrow$ X)GlcNAc. (A)** Separación en la columna CarboPac PA-10 utilizando la condición 1 descrita en materiales y métodos. **(B)** Separación en la columna CarboPac MA-1 utilizando la condición 2. Los números de los picos corresponden a los alditoles listados en la Tabla 1.

**Tabla 1. Tiempos de retención de GlcNAcol,  $\beta$ -Galp(1→X)GlcNAcol y  $\beta$ -Galf(1→X)GlcNAcol por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección por pulso amperométrico (HPAEC-PAD).** <sup>a</sup> Los compuestos **1**, **2** y **4** son de Sigma; los compuestos **3** y **8** se prepararon según la referencia (Gallo-Rodriguez et al. 1997); los compuestos **5** y **6** según la referencia (Gallo-Rodriguez et al. 1999) y el compuesto **7** según la referencia (Gallo-Rodriguez et al. 1996). <sup>b</sup> Las condiciones de elución están descritas en la sección de materiales y métodos.

| Pico en<br>Figura 1A | Estructura <sup>a</sup>                           | Tiempo de retención<br>(min) <sup>b</sup> |                  |
|----------------------|---|---|------------------|
|                      |   | columna CarboPac                          |                  |
|                      |   | PA-10<br><b>1</b>                         | MA-1<br><b>2</b> |
| <b>1</b>             | GlcNAcol  | 4.88                                      | 8.70             |
| <b>2</b>             | Galp $\beta$ 1→3GlcNAcol                          | 5.77                                      | 8.50             |
| <b>3</b>             | Galp $\beta$ 1→6GlcNAcol                          | 7.97                                      | 10.53            |
| <b>4</b>             | Galp $\beta$ 1→4GlcNAcol                          | 8.75                                      | 11.33            |
| <b>5</b>             | Gal $f\beta$ 1→3GlcNAcol                          | 31.0                                      | 32.67            |
| <b>6</b>             | Gal $f\beta$ 1→6GlcNAcol                          | 33.33                                     | 35.10            |
| <b>7</b>             | Gal $f\beta$ 1→4GlcNAcol                          | 34.13                                     | 35.25            |
| <b>8</b>             | Gal $f\beta$ 1→4GlcNAcol<br>↗<br>Galp $\beta$ 1→6 | 49.82                                     | -                |

Los disacáridos alditoles pueden separarse también por ccd (**Fig. 5**). En este método, los alditoles que contienen Gal $f$  presentan una relación de frente ( $R_f$ ) mayor que los alditoles de Gal $p$ . Todos los disacáridos alditoles pueden diferenciarse usando ccd con doble desarrollo. Para el análisis por ccd-fluorografía los disacáridos Galp $\beta$ 1→4GlcNAc, Gal $f\beta$ 1→4GlcNAc y el trisacárido [Galp $\beta$ 1→6(Gal $f\beta$ 1→4)]GlcNAc se redujeron con NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> como se describe en la parte

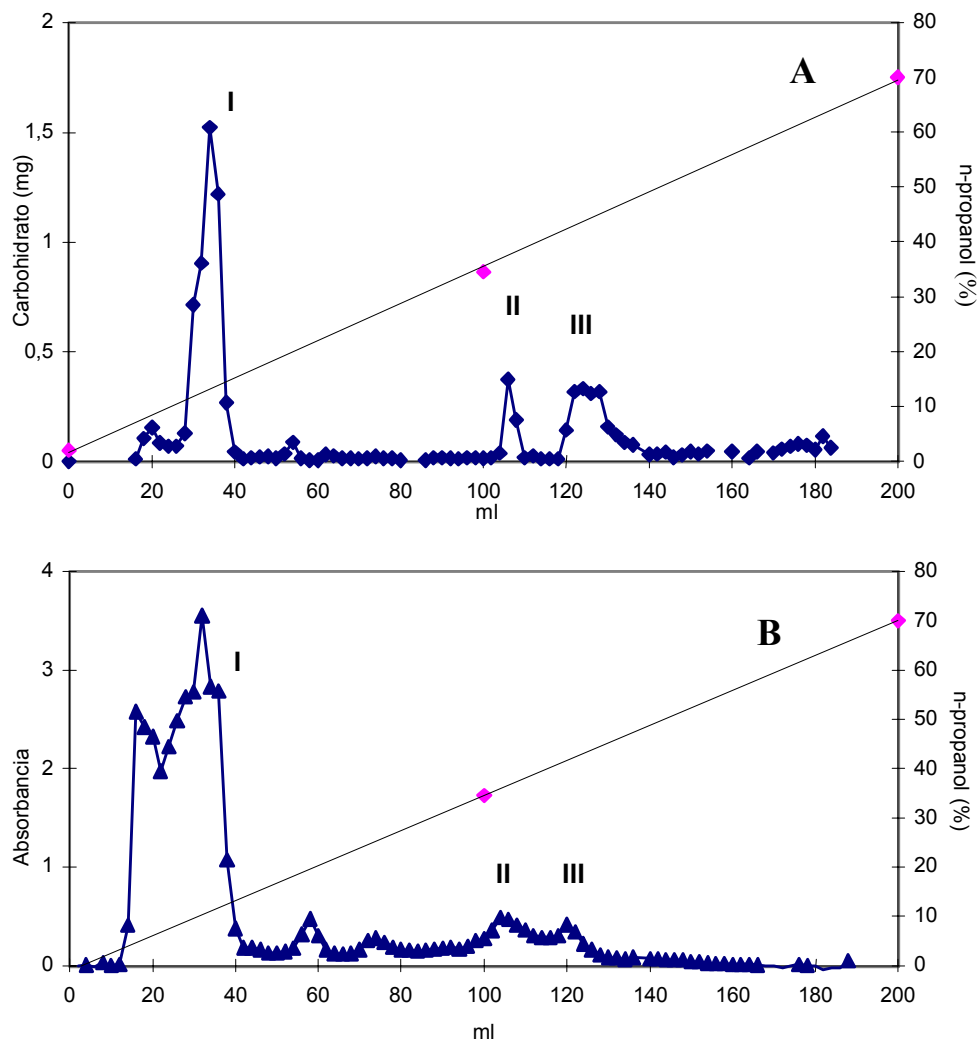
experimental. La separación por esta técnica es muy conveniente para analizar oligosacaritos obtenidos por  $\beta$ -eliminación de glicoproteínas en presencia de  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  y constituye una técnica complementaria al análisis por HPAEC para confirmar las estructuras. Los oligosacáridos alditos de galactofuranosa obtenidos de mucinas de la cepa G fueron previamente analizados por HPTLC con otro solvente de desarrollo (Serrano et al. 1995) sin embargo en ese momento los autores no disponían de los testigos de síntesis.



**Figura 5. Análisis de los alditos: GlcNAcol, Galp1→XGlcNAcol y Galf1→XGlcNAcol por cromatografía en capa delgada (ccd).** La separación de los compuestos fue realizada en placas de silica Gel 60 utilizando 1-propanol/ $\text{NH}_4\text{OH}$ (c)/agua (7:1:2, v/v) doble desarrollo como solvente de elución. (A) Los números corresponden a las estructuras de la Tabla 1. La detección fue realizada según lo descrito en materiales y métodos. El compuesto 8 muestra productos secundarios minoritarios formados durante la reducción del trisacárido con borohidruro. (B) Azúcares unidos *O*-glicosídicamente, liberados de las mucinas de *T. cruzi* CL14 por  $\beta$ -eliminación en presencia de  $\text{NaB}^3\text{H}_4$ . Los azúcares se separaron por Bio-Gel P-2 y dos fracciones (a y b) incluidas se analizaron como en A. Los testigos 4 y 1 corresponden a las estructuras de la Tabla 1, marcadas radioactivamente. Los compuestos marcados con tritio se detectaron por fluorografía (panel B)

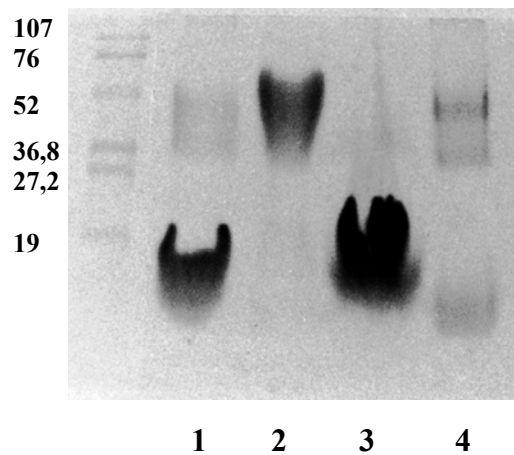
### Caracterización de los azúcares unidos *O*-glicosídicamente en mucinas de *T. cruzi*, clon CL14.

Las técnicas descritas en el párrafo anterior se utilizaron para la caracterización de los azúcares unidos *O*-glicosídicamente a mucinas de epimastigotes de *T. cruzi* CL14. Las glicoproteínas y el lipopeptidofosfoglicano (LPPG) se extrajeron según lo descrito anteriormente (Lederkremer et al. 1991) con agua saturada en 1-butanol y se purificaron por octil-Sefarosa (**Fig. 6**).



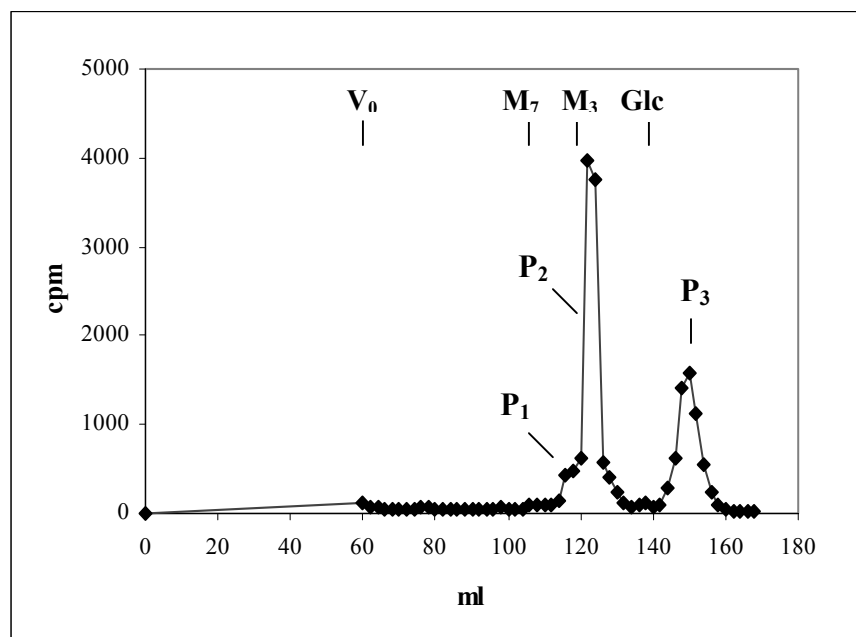
**Figura 6. Cromatografía en Octil-Sefarosa de los glicoconjugados obtenidos de *T. cruzi* CL14.** Una muestra de glicoconjugados obtenida como se indica en materiales y métodos se cromatografió en una columna de octil-Sefarosa CL-4B (Pharmacia). Se juntaron fracciones de 2 ml y se analizó cantidad de azúcar (**A**) y proteína (**B**) en alícuotas de dichas fracciones.

La fracción de mucinas (Fracción II) fue separada completamente de LPPG (Fracción III) como se muestra por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (**Fig. 7**, líneas 2 y 3 respectivamente). La tinción de PAS mostró una banda ancha (línea 2) con mismo peso molecular que las glicoproteínas extraídas de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Y con fenol/agua (línea 4). La fracción I (**Fig. 6**) corresponde a un fosfosacárido como se describe más adelante. El LPPG (Fracción III) fue estudiado anteriormente (Lederkremer et al. 1991).



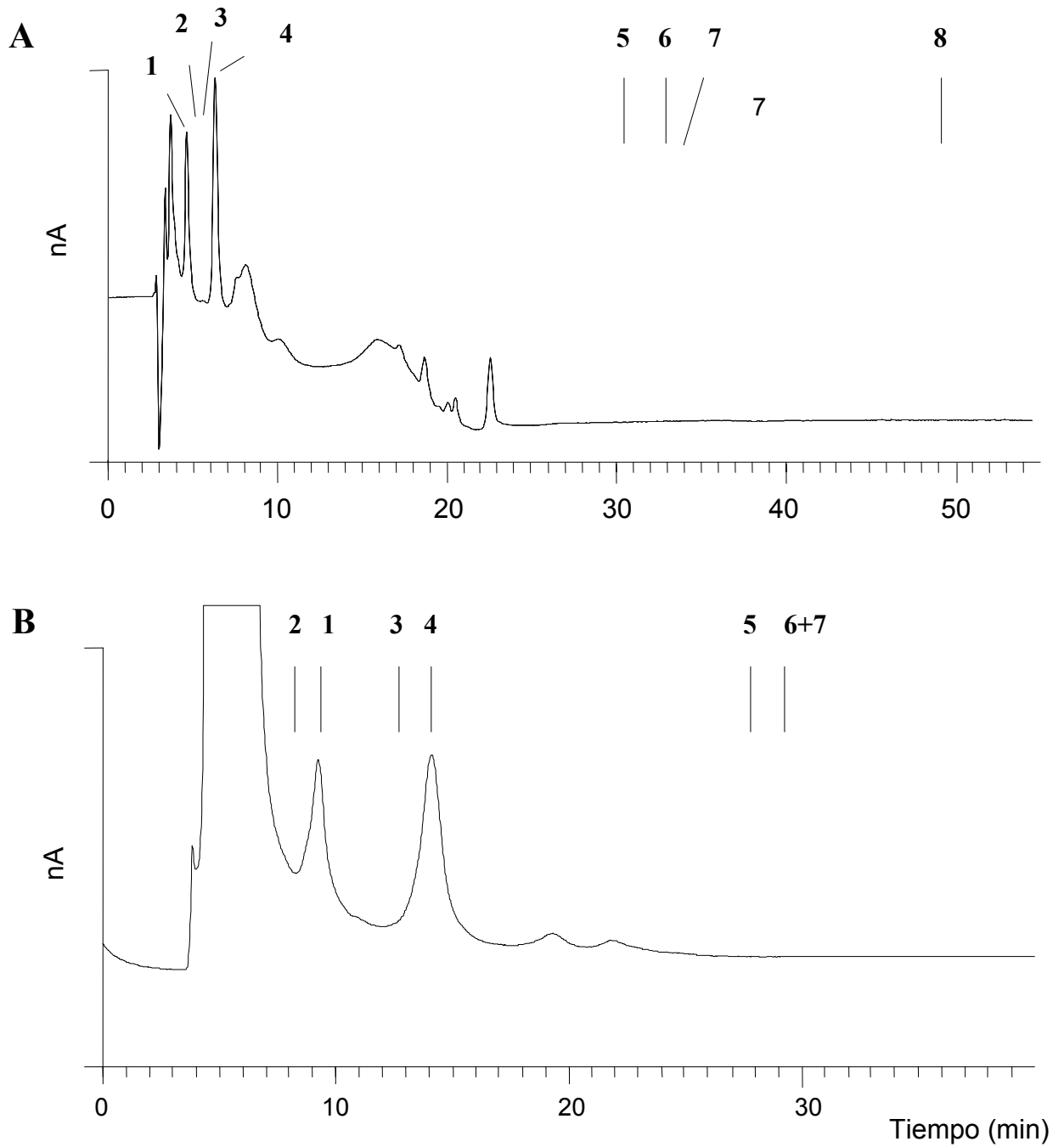
**Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las fracciones de glicoconjugados obtenidas en la purificación por cromatografía en octil-Sefarosa (Fig. 6).** El análisis se realizó en geles de 15% de poliacrilamida y 0.1% SDS. Los geles se tiñeron para azúcar con ácido periódico-base de Schiff. (1) Glicoconjugados de epimastigotes de *T. cruzi* CL14 extraídos con agua saturada en 1-butanol según lo descrito en materiales y métodos; (2) Fracción II (Fig. 6); (3) Fracción III (Fig. 6); (4) extracto fenol/agua de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Y. Los testigos de PM se muestran a la izquierda y corresponden a 107, 76, 52, 36.8, 27.2 y 19 kDa.

Se realizó la reacción de  $\beta$ -eliminación en presencia de  $\text{NaBH}_4$  o  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  de las mucinas de la Fracción II con el fin de analizar los azúcares unidos *O*-glicosídicamente. Los productos de la reacción se desalaron por BioGel P-2. La radioactividad de obtuvo entre los testigos de maltotriosa y glucosa, esto sugirió la presencia de cadenas cortas (**Fig. 8**,  $\text{P}_1$  y  $\text{P}_2$ ).



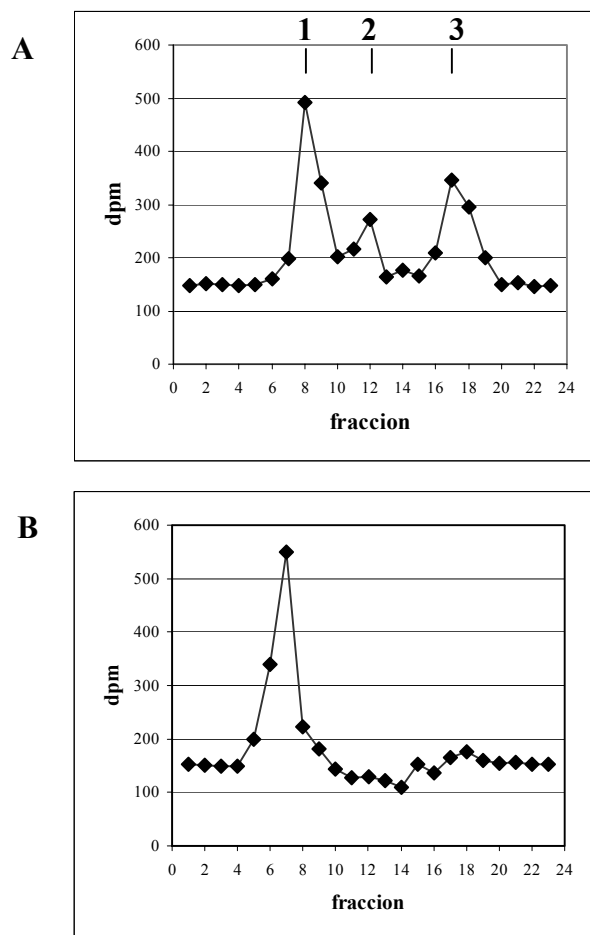
**Figura 8.** Purificación de los oligoalditoles liberados de mucinas de la cepa CL14 de *T. cruzi* (Fig. 7, línea 2) por la reacción de  $\beta$ -eliminación en presencia de  $\text{NaB}^3\text{H}_4$ . Los productos de la reacción de  $\beta$ -eliminación se desalaron por cromatografía de exclusión con BioGel-P2 (BioRad) como fase. Se colectaron 110 fracciones de 1 ml; 10  $\mu\text{l}$  de cada fracción se agregaron a viales con 5 ml de solución centelleo y se contaron en un contador de centelleo. Las fracciones se juntaron según se indica en el cromatograma. P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> se analizaron por ccd (Fig. 5B, a y b respectivamente). P<sub>3</sub> corresponde a sales. Para el caso de la reacción con  $\text{NaBH}_4$  se obtuvo una separación similar; en este caso las fracciones colectadas se analizaron con fenol-sulfúrico (ver materiales y métodos). La elución de los testigos M<sub>7</sub> (maltoheptosa), M<sub>3</sub> (maltotriosa) y Glc (glucosa) se indica sobre el cromatograma.

El análisis por HPAEC-PAD de las fracciones desaladas por BioGel P2, con las columnas PA-10 y MA-1 (Fig. 9A y 9B) mostró dos picos mayoritarios coincidentes con GlcNAcol (pico 1) y Galp( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAcol (pico 4) en relación 1:4 según las respuestas calculadas con los alditoles testigos. Los mismos azúcares alditoles fueron detectados por ccd y fluorografía (a y b, Fig. 5B) de las fracciones separadas en columna de Bio-Gel P-2 (P1 y P2, Fig. 8).



**Figura 9. Análisis de los azúcares unidos *O*-glicosídicamente obtenidos por  $\beta$ -eliminación de mucinas de *T. cruzi* CL14. (A) Columna CarboPac PA-10, condición 1; (B) Columna CarboPac MA-1, condición 2. Los números corresponden a los tiempos de retención de los alditos listados en la Tabla 1.**

Para confirmar la estructura del disacárido, la fracción marcada radioactivamente (a, **Fig. 5B**) se marcó con galactosa oxidasa/ $\text{NaB}^3\text{H}_4$  (ver materiales y métodos) de manera que los dos componentes del disacárido alditol puedan ser identificados. Luego de la digestión de 48 h con una galactosidasa específica que hidroliza la unión  $\beta 1 \rightarrow 4$ , el análisis por ccd (solvente A, **Fig. 10**) mostró radioactividad correspondiente a Galactosa y a GlcNAcol. Un control del disacárido no tratado mostró el compuesto no hidrolizado. Este resultado prueba que el disacárido  $\beta\text{-Gal}p1 \rightarrow 4$  GlcNAc es el disacárido unido *O*-glicosídicamente a las mucinas. La  $\beta$ -galactosidasa fue probada con los otros disacáridos alditoles con uniones 1-6 y 1-3 como control negativo (este resultado no se muestra). El lento progreso de la reacción se debe presumiblemente a que se trata de la hidrólisis de un alditol y no de un azúcar; i.e. una muestra fría del disacárido pudo ser hidrolizada, si bien con bajo rendimiento, en una incubación de una noche. Además, el bajo rendimiento de la reacción, hizo imposible su seguimiento por fluorografía. La **Fig. 10** muestra el análisis de la ccd por contaje de la sílica correspondiente a la línea de siembra de la muestra con (**Fig. 10A**) y sin (**Fig. 10B**) enzima. Si bien en estas condiciones la hidrólisis no es total, sólo la incubación con la enzima permite ver galactosa (2) y GlcNAcol (3) en la placa.



**Figura 10. Caracterización del disacárido (Fig. 5B)** (A) El disacárido obtenido según la Fig. 5B se marcó con galactosa oxidasa/ $\text{NaB}^3\text{H}_4$  y se incubó durante 48 h con una  $\beta$ -galactosidasa específica para la unión  $\beta$ -1-4. El hidrolizado se desaló, concentró y cromatografió en el solvente propanol:etanol:agua 7:1:2 v/v. (B) Igual cantidad de disacárido se incubó en iguales condiciones a A pero sin enzima. Se analizaron fracciones de 0,5 cm desde el origen hasta la ~mitad de la placa de 20x20 cm. La sílica correspondiente a cada una de las fracciones se contó en viales con 5 ml de solución centelleadora en un contador de centelleo. Las  $R_f$  de los testigos se indican arriba del cromatograma: **1**,  $\beta\text{-Gal}p1\text{-4GlcNAcol}$ ; **2**, Gal; **3**, GlcNAcol.



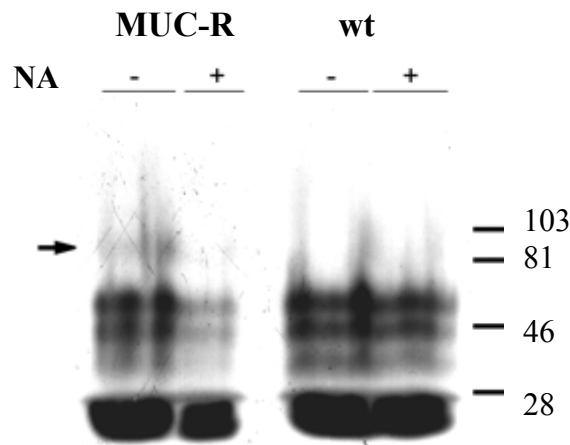
### **Estudio del producto de un gen tipo mucina (MUC-R) transfectado en epimastigotes, cepa CL Brener**

El método de análisis descripto arriba posee una alta sensibilidad (límite de detección HPAEC-PAD: nmoles de oligosacáridos), en consecuencia, permite caracterizar cadenas *O*-glicosídicas a partir de poca cantidad de glicoproteína aislada (en este caso, 100 µg en azúcar, según método de fenol sulfúrico). Históricamente, las mucinas de *T. cruzi* fueron caracterizadas bioquímicamente como el conjunto de glicoproteínas aisladas, en una extracción fenol-agua o también agua saturada en butanol, con peso molecular de 35-50 kDa (Alves et al. 1975; Lederkremer et al. 1976). Si bien esto sugiere que la estructura de las mismas es similar existen más de 500 genes cuya secuencia puede ser asociada a glicoproteínas de tipo mucina (Di Noia et al. 1998). La caracterización de estos productos génicos con anticuerpos contra la estructura proteica resultó imposible debido a la alta cantidad de modificaciones post-traduccionales que sufren este tipo de proteínas y que enmascaran el epítopo proteico (Pollevick et al. 2000). La disponibilidad de un método sensible de caracterización de las cadenas *O*-glicosídicas permitió trabajar sobre los productos de los genes en particular. Este trabajo se realizó en colaboración con el Laboratorio a cargo del Dr Frasc, Instituto de Investigaciones Bioquímicas, UNSAM y todos los experimentos de biología molecular que se mencionan a continuación fueron realizados por dicho grupo.

Se insertó en la región hipervariable del gen MUC-CA2 una secuencia correspondiente a los aminoácidos 21-44 de la proteína core del virus de la hepatitis C humana (*tag*). El uso de un anticuerpo contra esa secuencia permitió seguir el producto de los genes transfectados en *T. cruzi*. La construcción se subclonó en el vector pRIBOTEX y se transfectaron en epimastigotes de la cepa CL Brener. En *E. coli*, el producto del gen presentó un peso molecular de 35 kDa. El alto peso molecular que se observa en *T. cruzi* (85kDa) se debería a la glicosilación post-traducciona que sufre la proteína. Para confirmarlo se realizó una extracción con fenol acuoso de los epimastigotes de *T. cruzi* transfectados. MUC-R se purificó del extracto fenólico utilizando una columna de afinidad, con anticuerpo anti-*tag*. La reacción de  $\beta$ -eliminación sobre la glicoproteína purificada permitió la liberación de los oligosacáridos alditoles y se procedió a su caracterización según el método descripto arriba para mucinas de la cepa CL14.

### Marcación de las glicoproteínas de superficie de epimastigotes “wild type” y transfectados con el gen MUC-R, por el método de galactosa oxidasa/ $\text{NaB}^3\text{H}_4$ .

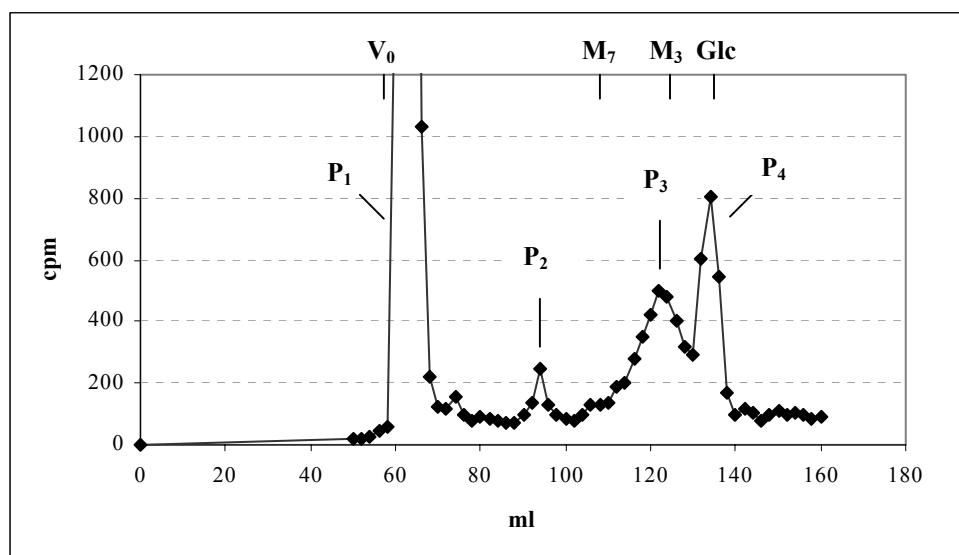
Las mucinas de epimastigotes de la cepa CL Brener, nativas y de parásitos transfectados con el gen MUC-R, se marcaron *in vivo* mediante el método de galactosa oxidasa / $\text{NaB}^3\text{H}_4$  (Zingales et al. 1982). El extracto total de células se analizó por SDS-PAGE y fluorografía. Además de las mucinas endógenas de 35/50 kDa, en los parásitos transfectados se marcó una glicoproteína de 85 kDa (**Fig. 11**). La marcación no mejoró con el tratamiento previo con neuraminidasas. Este tratamiento se realizó pues la sialilación de la galactosa puede interferir con la marcación.



**Figura 11.** Marcación de mucinas de células epimastigotes de *T. cruzi* transfectadas con MUC-R y células “wild type”. Epimastigotes “wild type” y transfectados se marcaron con el método de galactosa oxidasa/ $\text{NaB}^3\text{H}_4$  según lo descrito en materiales y métodos. El lisado total se separó por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10% y se reveló por fluorografía. NA, neuraminidasa de *Clostridium perfringens*. El peso molecular de los testigos se indica a la derecha.

### Comparación de la estructura de carbohidratos de mucinas endógenas y recombinantes de *T. cruzi*.

El análisis de los azúcares obtenidos de las mucinas recombinantes MUC-R y endógenas por reacción de  $\beta$ -eliminación se realizó por HPAEC-PAD y ccd, según lo descrito para la cepa CL14. Las mucinas obtenidas de células “wild type” marcadas con el método de galactosa oxidasa/ $\text{NaB}^3\text{H}_4$  se purificaron por octil-Sefarosa de manera similar a lo descrito en la **Fig. 6**. La mucina MUC-R recombinante se purificó por cromatografía de afinidad según lo descrito en (Pollevick et al. 2000) con el anticuerpo anti-tag. En este caso una cantidad muy baja de radioactividad fue recuperada, por lo cual la reacción de  $\beta$ -eliminación se realizó en presencia de  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  para marcar el extremo reductor de los azúcares como alditoles. Los productos obtenidos se separaron de los contaminantes radioactivos por cromatografía de exclusión en BioGel P-2 (BioRad) de manera similar a lo descrito para la **Fig. 8**. Nuevamente la mayor radioactividad se obtuvo entre los testigos de maltotriosa y glucosa, particularmente un pico que eluía como maltotriosa (**Fig. 12**, P<sub>3</sub>) y otro pico eluyendo como glucosa (**Fig. 12**, P<sub>4</sub>). Luego de contar las fracciones, se juntaron de acuerdo con la radioactividad eluída y se analizaron por ccd en el solvente A.



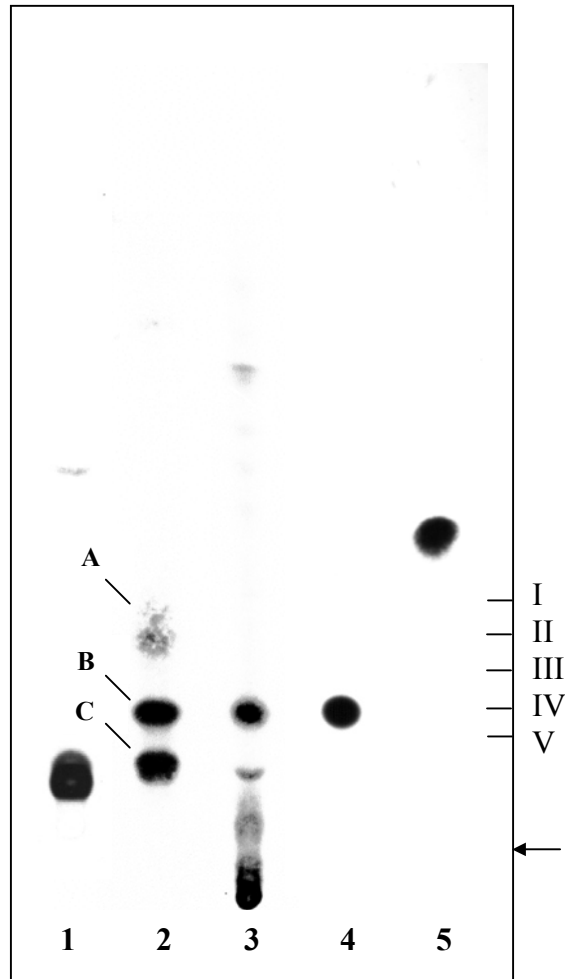
**Figura 12.** Purificación de los oligoalditoles liberados por reacción de  $\beta$ -eliminación a partir de una mucina obtenida de epimastigotes transfectados con el gen MUC-R. La mucina purificada por cromatografía de afinidad se sometió a una reacción de  $\beta$ -eliminación en presencia de  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  y los productos se purificaron por cromatografía de exclusión en una columna de BioGel P2.

### **Caracterización de los oligoalditoles liberados de mucinas de la cepa CL Brener.**

Las fracciones obtenidas a partir de la purificación según la **Fig. 12** ( $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$ ) se analizaron por ccd en el solvente A.  $P_2$  corresponde a una fracción minoritaria de cadenas *O*-glicosídicas que no pudo analizarse con mayor profundidad por falta de material.  $P_3$  y  $P_4$  eluyeron como maltotriosa y glucosa respectivamente.

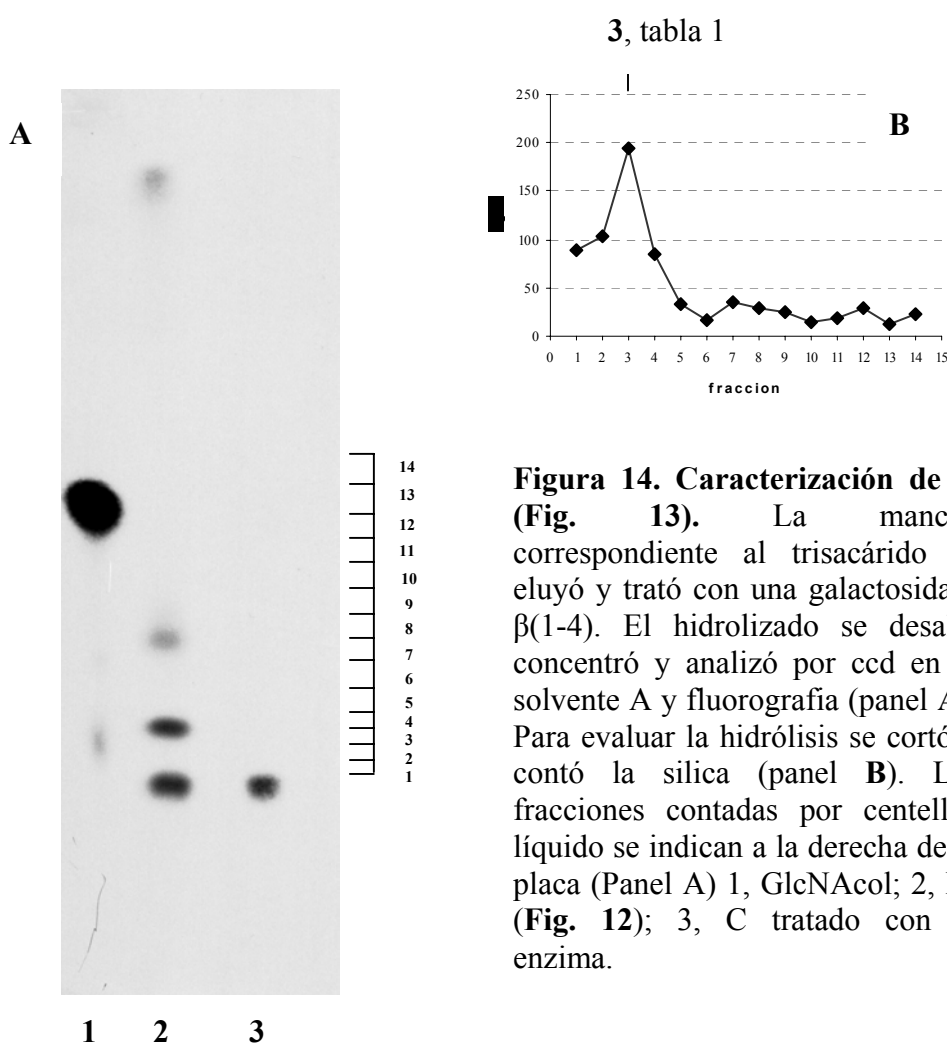
El análisis de  $P_4$  mostró que se trataba de glucitol. La hidrólisis con TFA 2N y con HCl 4 N no cambió su  $R_f$  con respecto al control sin hidrolizar; esto dio la pauta que podía tratarse de un alditol libre; si bien su  $R_f$  era similar al testigo  $\beta$ -Galp(1-3)GlcNAcol, coincidía con el de un testigo de glucitol. Para confirmar,  $P_4$  se analizó en HPAEC-PAD, en la columna MA-1 con NaOH 70mM, junto con los testigos GlcNAcol, Manitol y Glucitol. Se juntaron fracciones de 0.4' y se contaron en un contador de centelleo.  $P_4$  presentó un tiempo de retención como el de un testigo de glucitol. Se concluyó que glucosa libre, presente en el medio de cultivo de las células, se había reducido durante la reacción de  $\beta$ -eliminación. De esta manera se descartó la presencia del disacárido  $\beta$ -Galp(1-3)GlcNAcol en estas mucinas. Este disacárido había sido descrito en la cepa Y (Preato et al. 1995), pero más tarde su presencia fue corregida (Todeschini et al. 2001).

El pico  $P_3$  obtenido en la purificación por Biogel P2 mostró tres manchas por ccd (**Fig. 13**, A, B y C). A coincidía con  $P_4$  por ccd y presentó las mismas características descritas en el párrafo previo para glucitol. B presentó un  $R_f$  que coincidía con  $\beta$ -Galp(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAcol y C un  $R_f$  que coincidía con el trisacárido alditol [ $\beta$ -Galp1 $\rightarrow$ 4( $\beta$ -Galp1 $\rightarrow$ 6)]GlcNAcol.



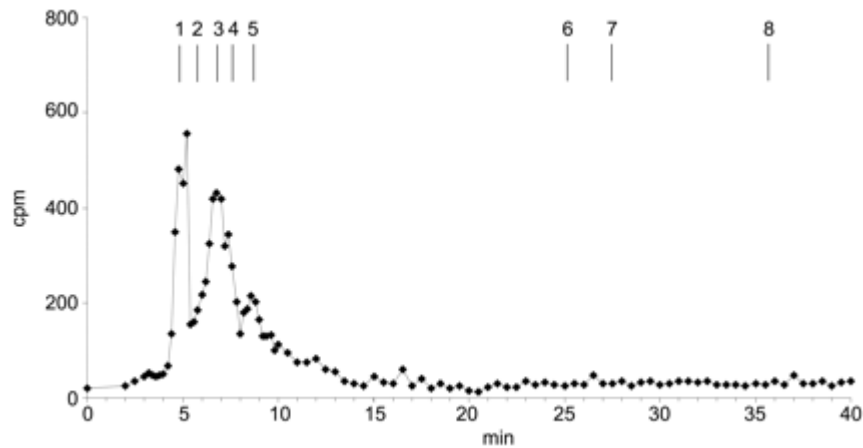
**Figura 13. Cromatografía en capa delgada de los azúcares alditoles obtenidos de las mucinas recombinante y endógena de epimastigotes de *T. cruzi*.** (1) Testigo de Galp( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)[Galp( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6)]GlcNAcol; (2) Azúcares unidos *O*-glicosídicamente liberados de las mucinas recombinantes por  $\beta$ -eliminación en presencia de NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>; (3), azúcares liberados de mucinas marcadas con galactosa oxidase/NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>; (4) testigo de [1-<sup>3</sup>H]- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAcol; (5) testigo de [1-<sup>3</sup>H]GlcNAcol. Los productos se analizaron por ccd en 1-propanol:NH<sub>4</sub>OH:agua (7:1:2), doble desarrollo, seguido de fluorografía. La migración de los testigos no marcados se muestra a la derecha de la placa: I,  $\beta$ -Galp(1 $\rightarrow$ 3)GlcNAcol; II, glucitol; III,  $\beta$ -Galp(1 $\rightarrow$ 3)GlcNAcol; IV,  $\beta$ -Galp(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAcol; V,  $\beta$ -Galp(1 $\rightarrow$ 6)GlcNAcol. El origen está indicado con una flecha.

Los compuestos B y C se eluyeron de la placa individualmente y se sometieron a los siguientes tratamientos. C se hidrolizó con HCl 4N (Fan et al. 1994), *N*-acetiló y corrió en el mismo solvente de desarrollo. Se obtuvo galactosa y GlcNAcol, ambos marcados (no mostrado). También se hidrolizó con la enzima  $\beta$ -galactosidasa que hidroliza específicamente la unión  $\beta$ 1-4 y se obtuvo, aunque con bajo rendimiento, el disacárido alditol  $\beta$ 1-6. Este tiene una movilidad un poco mayor que el trisacárido alditol (**Fig. 13**). Estos resultados se muestran en la **Fig. 14**. Por otra parte, la *N*-acetilación de C no varió su comportamiento cromatográfico.



**Figura 14. Caracterización de C (Fig. 13).** La mancha correspondiente al trisacárido se eluyó y trató con una galactosidasa  $\beta$ (1-4). El hidrolizado se desaló, concentró y analizó por ccd en el solvente A y fluorografía (panel A). Para evaluar la hidrólisis se cortó y contó la silica (panel B). Las fracciones contadas por centelleo líquido se indican a la derecha de la placa (Panel A) 1, GlcNAcol; 2, P3 (**Fig. 12**); 3, C tratado con la enzima.

Por otra parte, C tuvo el mismo tiempo de retención en HPAEC que el testigo  $\beta$ -Galp1 $\rightarrow$ 4( $\beta$ -Galp1 $\rightarrow$ 6)GlcNAcol (**Fig. 15**). Este trisacárido fue previamente obtenido de mucinas de cepa Y (Previato et al. 1995). Se comprobó por este método que no había disacáridos de galactofuranosa.



**Figura 15.** HPAEC-PAD análisis de los azúcares unidos *O*-glicosídicamente obtenidos por  $\beta$ -eliminación en presencia de  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  de mucinas de epimastigotes transfectadas con MUC-R. Las sales se eliminaron por cromatografía en columna de Bio-Gel P-2 (Bio-Rad) y la muestra se analizó en una columna Carbo-Pac PA10 utilizando las condiciones indicadas en materiales y métodos. Los números corresponden a testigos de los siguientes alditoles: 1, glucitol; 2,  $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 3)GlcNAcol; 3,  $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAcol; 4,  $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 3)[ $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)]GlcNAcol; 5,  $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 4)[ $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)]GlcNAcol; 6,  $\beta$ -D-Galf(1 $\rightarrow$ 3)GlcNAcol; 7,  $\beta$ -D-Galf(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAcol; 8,  $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 4)[ $\beta$ -D-Galf(1 $\rightarrow$ 6)]GlcNAcol.

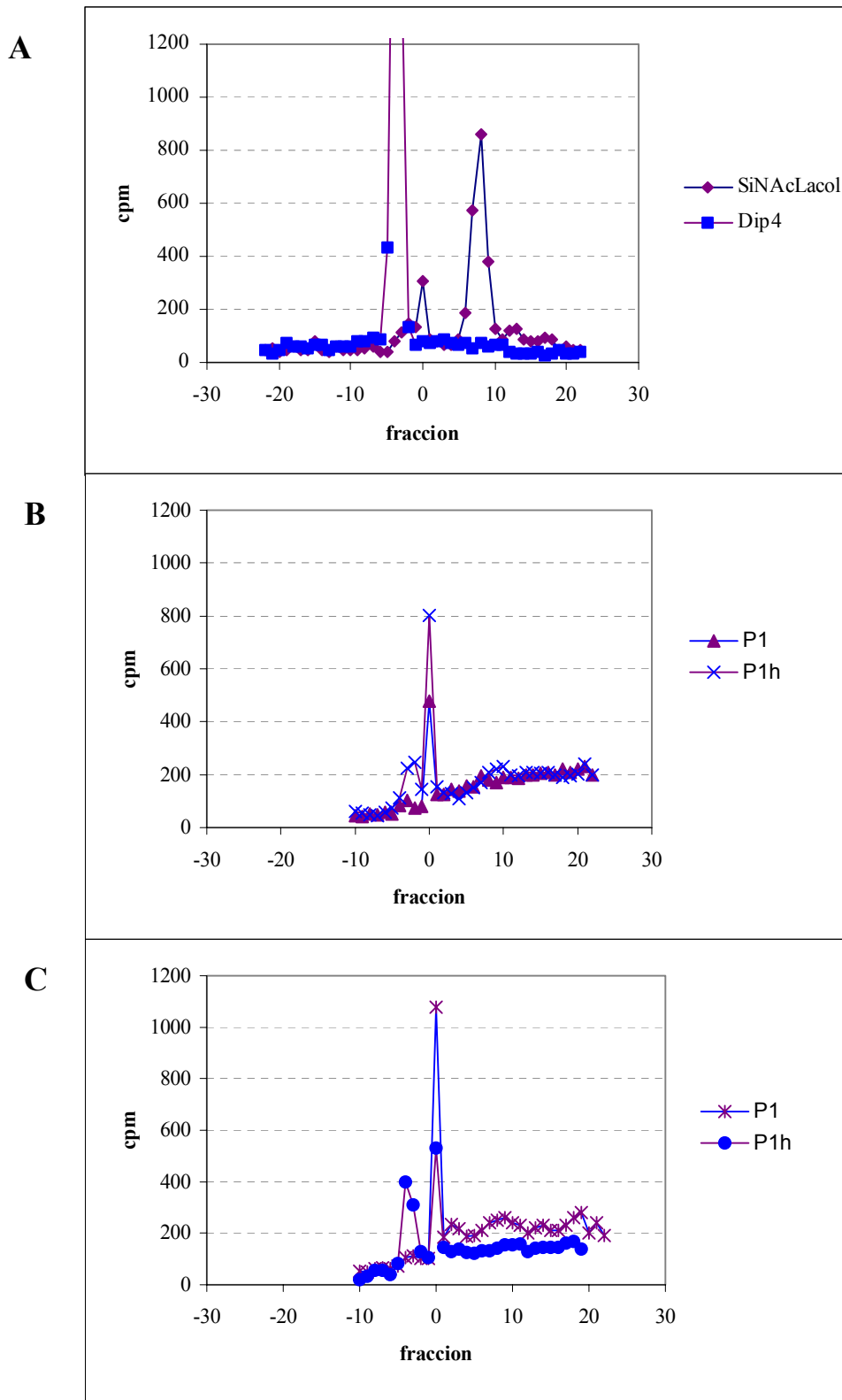
El tratamiento de B (**Fig. 13**) con la enzima  $\beta$ -(1-4)-D-galactosidasa, dio galactosa y GlcNAcol como lo descrito para el clon CL14. Este resultado sumado a que presentaba el mismo  $R_f$  por ccd e igual tiempo de retención por HPAEC-PAD que el testigo marcado  $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAcol permitió concluir que se trataba de ese compuesto.

Se había descrito (Previato et al. 1995; Serrano et al. 1995) la presencia de ácido siálico en cadenas *O*-glicosídicas de mucinas de *T. cruzi*, estas cadenas se excluirían del BioGel P-2 en la elución con agua. Con el fin de analizar la presencia de ácido siálico en las cadenas *O*-glicosídicas de mucinas endógenas y transfectadas se analizaron los picos P1 (**Fig. 12**) correspondientes a la purificación por BioGelP2 de los oligoalditoles liberados por  $\beta$ -eliminación reductiva.

El tratamiento de los P1 (**Fig. 12**) con una neuraminidasa no mostró cambios en las  $R_f$  ni en las muestras correspondientes a las mucinas obtenidas por transfección ni en las endógenas (estos resultados no se muestran). Para confirmar la ausencia de ácido siálico se realizó una electroforesis en papel de los V0 (**Fig. 12**) hidrolizados con HCl 0,1N 80° C durante 1 hora y media comparando con los Vo sin tratar (**Fig. 16**). La radioactividad permaneció en el lugar correspondiente a un azúcar neutro. Se utilizó como testigo SialilNAc-lactosamina reducida con  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  que se sometió al mismo tratamiento. La hidrólisis ácida suave libera selectivamente el ácido siálico.

Los oligosacaritales de menor  $R_f$  obtenidos de mucinas wild type se eluyeron de la placa (**Fig. 13**) y se realizó acetólisis parcial que hidroliza selectivamente la unión 1-6. Se obtuvo un producto mayoritario que co-migraba con  $\text{Galp}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAcol}$ . Estos datos sugieren que estos oligosacáridos tienen la misma estructura base.





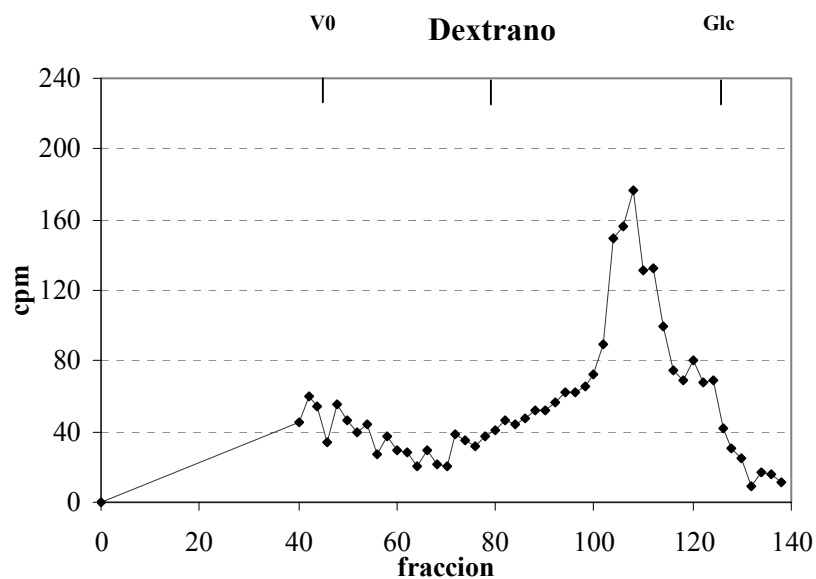
**Figura 16. Análisis de P<sub>1</sub> (Fig. 12) por electroforesis en papel.** P<sub>1</sub> de la Fig. 12 se analizó por electroforesis en papel con acetato de piridina 0,25M, pH 5,5, 1800 V, 1h. (A) Se utilizaron como testigos Sialil-*N*-Acetil-Lactosaminitol marcado, preparado a partir de Sialil-*N*-Acetil Lactosamina por reducción con NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> (500 μCi) como se indica en materiales y métodos y el disacaritol marcado β-Gal(1-4)GlcNacol (Dip4). (B) P<sub>1</sub> obtenido de células “wild type”. (C) P<sub>1</sub>

obtenido de células transfectadas. En ambos casos (**B** y **C**) se corrió también el hidrolizado de  $P_1$  con 0,1N HCl ( $P_{1h}$ ). Las calles sembradas se cortaron de a 1cm y se agregaron a viales con solución de centelleo y se contaron.

## Caracterización parcial de un fosfoglicano

### *Purificación*

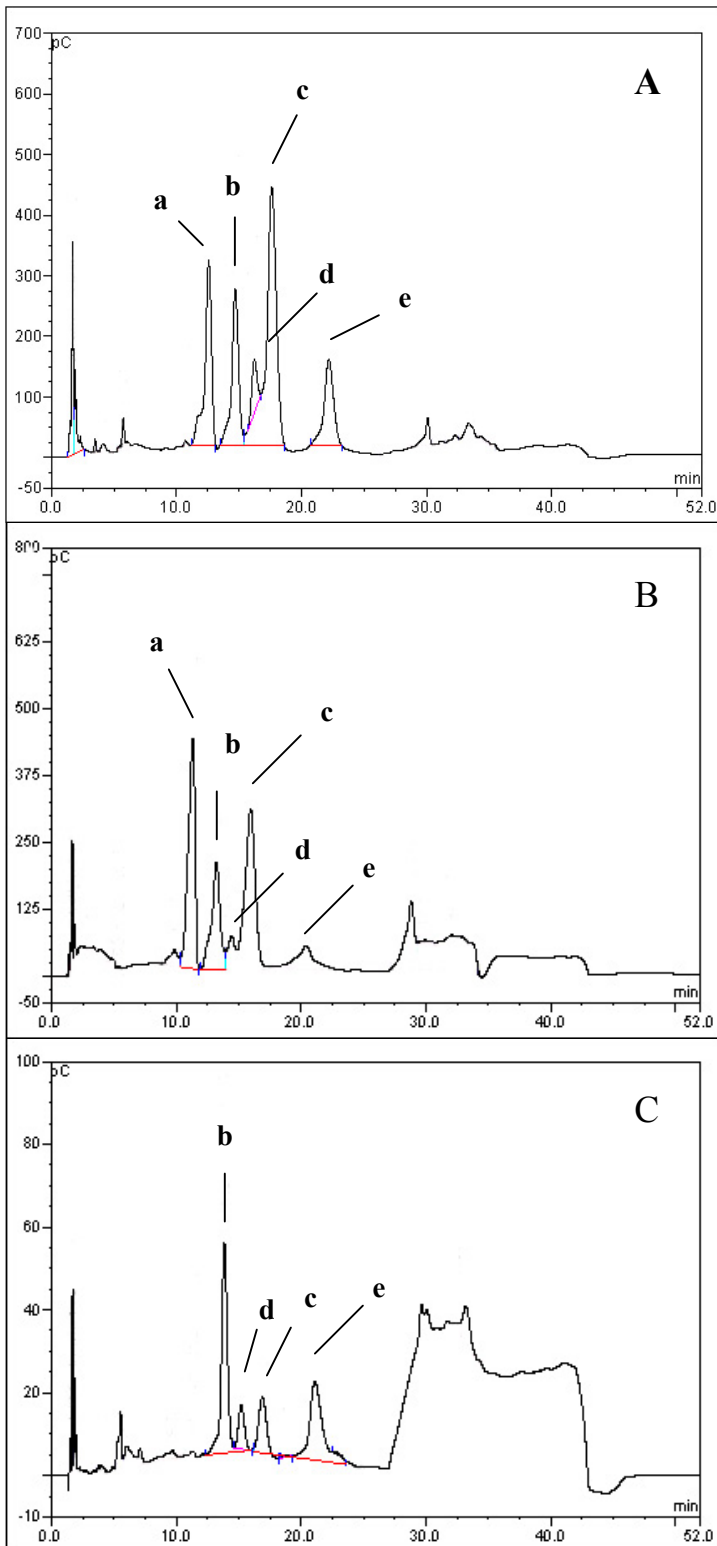
Durante la purificación de mucinas por cromatografía en fase reversa de Octil-Sefarosa se observó alta proporción de carbohidratos en la fracción que eluía junto con el V0 de la columna (**Fig. 6A, I**). A esta fracción se la llamó fosfoglicano (FG). Por SDS-PAGE (15%) I presentó un peso molecular aparente <19kDa; según lo observado por tinción del gel con periodato/Schiff (tinción para carbohidratos), (este resultado no se muestra). Cuando se partía de una muestra de glicoconjugados marcados con el método de galactosa oxidasa/NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> también se observó marcación en el volumen excluido, lo cual sugirió la presencia de galactosa en la estructura. Con el fin de purificar la fracción de posibles contaminantes como oligosacáridos, péptidos y sales se pasó la muestra por columna de Biogel P2 (rango de fraccionamiento = 100-1800Da). Toda la radioactividad eluyó en el volumen excluido. Por Biogel P4 (rango de fraccionamiento = 800-4000 Da), con la fase equilibrada tanto en agua como en el buffer acetato de piridina 0,3M, la radioactividad también eluyó en el volumen excluido. Sólo se logró la inclusión de la fracción en Biogel P30 (rango de fraccionamiento = 2500-40000), equilibrado en el buffer acetato de amonio 0,25M. Se observó un peso molecular de 5000-6000 Da (**Fig. 17**). Este componente presentó un 0,63% de proteína (método de Bradford) y ~97% de azúcar (método fenol-sulfúrico) con respecto al peso seco. Por ccd con distintos sistemas de solventes (a- propanol-etanol-agua (7:1:2) doble desarrollo y b-butanol:acetona:agua (6:5:4) donde corren mananos de hasta 10 unidades (Ralton et al. 2003)) la muestra quedó retenida en el origen y no se observaron oligosacáridos, ni azúcares libres.



**Figura 17. Purificación de la fracción I (Fig. 6) por cromatografía de exclusión en Biogel P30 (BioRad).** La fracción I, excluida durante la purificación de mucinas por Octil-Sefarosa (Fig. 6) se purificó por Biogel P30 (rango de fraccionamiento 2500-40000 Da). La columna se armó y equilibró en acetato de piridina 0,25 M, pH=7. La calibración se realizó con un dextrano de 10000 Da y Glucosa; como marcador del volumen excluido (V0) se utilizó Blue Dextran. La muestra sembrada estaba marcada con galactosa oxidasa/ $\text{NaB}^3\text{H}_4$  (aproximadamente 100mg de muestra + 230000 cpm). Se juntaron fracciones de 1,5 ml, se contaron 10  $\mu\text{l}$  cada dos fracciones en viales conteniendo 5 ml de solución centelleadora.

### Análisis de monosacáridos

El análisis de los carbohidratos se realizó por hidrólisis en medio ácido: TFA 2N (A), HCl 4N (B) y TFA 0,02N (C). Los hidrolizados se analizaron por HPAEC-PAD, en la columna PA-10 con NaOH 18 mM en condición isocrática. Los resultados se muestran en la **Fig. 18**. Componentes principales fueron: Manosa (c), Glucosamina (a) y Galactosa (b) en relación Man:GlcNH<sub>2</sub>:Gal (3:2:1). Componentes minoritarios fueron Glucosa y Ribosa (d y e, respectivamente). La liberación de galactosa en condiciones ácido suaves (C), sugiere configuración furanósica.



**D**

| Monosacárido  | Tiempo de Retención |
|---------------|---------------------|
| Inositol      | 1.897               |
| Fucosa        | 5.882               |
| Galactosamina | 10.881              |
| Glucosamina   | 12.902              |
| Galactosa     | 15.117              |
| Glucosa       | 16.642              |
| Manosa        | 18.152              |
| Ribosa        | 21.083              |

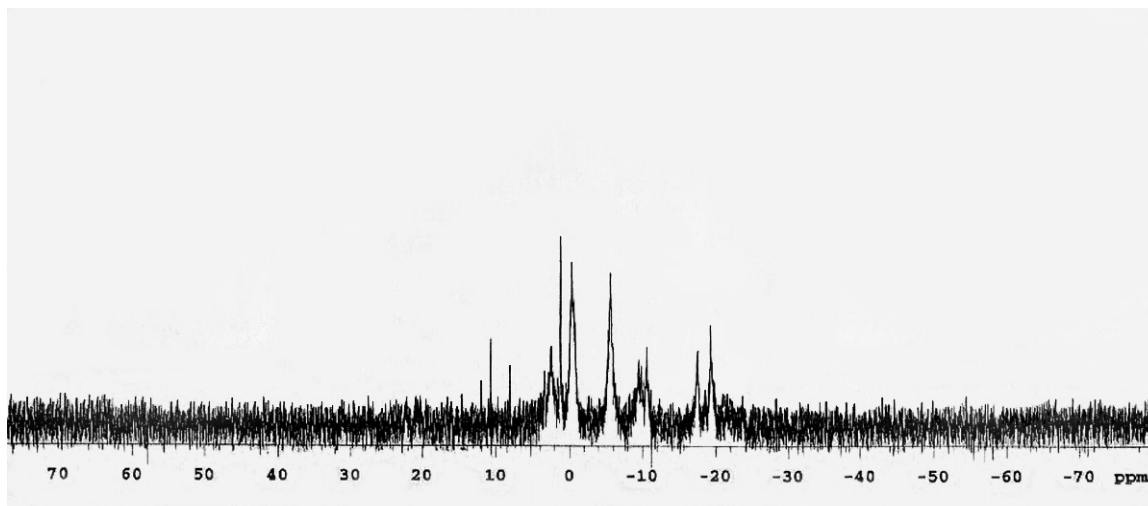
**E**

| Monosacárido    | Cantidad (pmol/100 µg) |
|-----------------|------------------------|
| Inositol        | 642.06                 |
| Glucosamina (a) | 5128.65                |
| Galactosa (b)   | 2329.28                |
| Glucosa (d)     | 726.66                 |
| Manosa (c)      | 8153.43                |

**Figura 18. Monosacáridos presentes en I (Fig. 6).** La fracción purificada según la Fig. 17 se hidrolizó con (A) TFA 2N, (B) HCl 4N y (C) TFA 0,02N. (D) Muestra los tiempos de retención de los monosacáridos testigos. Los hidrolizados se neutralizaron con NH<sub>4</sub>OH 1M, llevaron a seco y resuspendieron en 300 µl de agua. Luego de pasarlos por SepPak C18 y secar en un SpeedVac se resuspendieron en 100 µl de agua y se analizaron por HPAEC en la columna PA10 con NaOH 18 mM. La identidad de los monosacáridos se confirmó por co-inyección de los hidrolizados con el testigo conocido. **a**, Glucosamina; **b**, Galactosa; **c**, Manosa; **d**, Glucosa; **e**, Ribosa. (E) Muestra la cantidad total de cada uno de los monosacáridos que se estudiaron, en 100 µg de I.

### <sup>31</sup>P-RMN

Se llevó a cabo el análisis por <sup>31</sup>P-RMN en D<sub>2</sub>O, para evaluar la posible presencia de fosfatos. El espectro se muestra en la **Fig. 19**.



**Figura 19.** Análisis por <sup>31</sup>P-RMN de la fracción purificada por Biogel P30 (**Fig. 17**). La muestra se analizó por <sup>31</sup>P-RMN en D<sub>2</sub>O. Se observaron señales a ~-20, -10, -5 y 0.

Las señales a  $\delta^{31}\text{P}$  -19 y -17 ppm pueden corresponder a AEP previamente descrito en LPPG de *T. cruzi*. Sin embargo, el espectro obtenido en este caso no se parece al que fue obtenido en aquella oportunidad (Lederkremer et al. 1991). Señales entre  $\delta^{31}\text{P}$  (0-+1) corresponden a fosfodiésteres formados por azúcares 1-fosfato. Las señales entre  $\delta^{31}\text{P}$  (-4-6) ppm podrían corresponder a pirofosfatos de un ácido ribonucleico contaminante (Mirmira et al. 1996).

#### **Características del fosfoglicano de *T. cruzi***

Las moléculas más abundantes de la superficie de *T. cruzi* corresponden al glicolípido LPPG y a una familia de glicoproteínas de tipo mucinas, altamente O-glicosiladas. La estructura descrita arriba no presenta relación de monosacáridos típica de mucinas. El presente glicoconjugado tiene manosa como componenete principal, en cambio las mucinas no tienen manosa y la galactosa es preponderante. Tampoco presenta un peso molecular similar por electroforesis en gel de poliacrilamida. La elución con el frente en la columna de Octil-Sefarosa sugiere ausencia de residuo

lipídico; esto se observó también previamente, un extracto de células marcadas con [<sup>3</sup>H]-palmítico no mostró radioactividad en el V0 (Lederkremer et al. 1993).

Cuando se estaba concluyendo la redacción de esta tesis se publicó un trabajo del grupo de Ferguson (Macrae et al. 2005) en el cual se describía un nuevo glicoconjugado de *T.cruzi* que llamaron NETNES por su secuencia central de aminoácidos (13 en total) y que es un componente menor de membrana. El NETNES está ligado a membrana por un GIPL de la misma estructura que el LPPG y estaría impurificando el mismo en los primeros aislamientos de GIPLs, los cuales contenían una pequeña cantidad de péptido, de ahí su nombre (Lederkremer et al. 1976). El fosfoglicano aislado y parcialmente caracterizado en esta tesis, a diferencia del NETNES, las mucinas y los GIPLs no interacciona con la fase hidrofóbica. La baja proporción de proteína encontrada y la presencia de ribosa indicaría que la absorbancia a 260 nm (**Fig. 6**) podría deberse a una pequeña contaminación con ribonucleico, lo cual estaría corroborado por la presencia de ribosa como componente menor y por la señal a  $\delta^{31}\text{P}$  a  $-5$  correspondiente a pirofosfato (Mirmira et al. 1996) (**Fig. 19**). Como puede observarse las señales principales corresponden a fosfodiéster ( $\delta^{31}\text{P}$  0-1 ppm).

Se puede concluir que se está en presencia de un nuevo glicoconjugado de *T.cruzi* que es un fosfoglicano. No se investigó la estructura fina del mismo pues el objetivo de esta parte de la tesis era el de la identificación de mucinas del parásito.

---

## CONCLUSIONES

La caracterización de glicoconjugados de superficie es importante por la función que estos cumplen en la interacción con la célula huésped. En *T. cruzi* los GIPLs ( $\sim 10^7$ /célula) y las mucinas ( $4 \times 10^6$ ) son los glicoconjugados mayoritarios de su superficie (Lederkremer et al. 1991; Pereira-Chioccola et al. 2000). Las mucinas presentan un nuevo tipo de cadenas *O*-glicosídicas unidas al aminoácido treonina a través de una GlcNAc en lugar de GalNAc como se da en mucinas de vertebrados y otra característica única es la presencia de galactosa en la configuración furanósica en las glicoproteínas tipo mucinas de la cepa G (Previato et al. 1994; Serrano et al. 1995), del clon DM28c (Agrellos et al. 2003) y la cepa Tulauhen (Jones et al. 2004). Este azúcar en dicha configuración es un determinante antigénico importante (Lederkremer et al. 1995). Fue descrito como componente del LPPG de la cepa Y, del lipofosfoglicano de *Leishmania* y de la pared celular de *Mycobacterium* (Mikusova et al. 2000). Unidades de Gal $\beta$  en *T. cruzi* representan un papel importante en el reconocimiento de anticuerpos (De Arruda et al. 1989). La presencia de galactosa furanósica en mucinas podría estar en relación con la reciente división de las cepas de *T. cruzi* en dos grandes linajes (Briones et al. 1999), ver introducción) que estarían relacionados con la infección (**Fig. 20**). En la **figura 20** pueden verse las estructuras de los oligosacáridos-alditoles obtenidos por  $\beta$ -eliminación reductiva de las mucinas de cepas agrupadas según el linaje.

En este trabajo de tesis se desarrolló un método de alta sensibilidad (HPAEC-PAD) para la separación de todos los posibles alditoles  $\beta$ -Gal $\beta$ (1-X)GlcNAcol y  $\beta$ -Gal $\beta$ (1-X)GlcNAcol (X = 3, 4, 6) además de detectar en la misma corrida GlcNAcol y el trisacárido Gal $\beta$ 1-4(Gal $\beta$ 1-6)GlcNAcol que se había descrito en las mucinas de la cepa G (Previato et al. 1994). Se detectaron aproximadamente 100 pmol de los oligosacáridos. El método de HPAEC fue complementario del análisis por ccd lo cual ayudó en la identificación de las unidades encontradas en las mucinas de *T. cruzi* clon CL14. Si bien los oligosacáridos de mayor tamaño no fueron analizados, la identificación de la unidad  $\beta$ -Gal $\beta$ (1-X)GlcNAcol es importante ya que se obtiene de los otros oligosacáridos por tratamientos con  $\beta$ -galactopiranosidasas. Los oligosacáritoles marcados obtenidos por  $\beta$ -eliminación en presencia de borohidruro de sodio tritiado, pueden ser analizados por ambos métodos. Esta técnica sensible es particularmente útil para el estudio de glicoconjugados de microorganismos infectivos cuyo cultivo es dificultoso.



El análisis de las glicoproteínas de epimastigotes de *T. cruzi* CL14 mostró GlcNAc y el disacárido  $\beta$ -Galp(1-4)GlcNAcol. En mucinas de la cepa G (Serrano et al. 1995) se encontró como principal *O*-glicósido GlcNAc no sustituida, además de oligosacáridos conteniendo Galf. Glicosilación con *O*-GlcNAc ha sido encontrada en varias proteínas de células eucariotes, desde hongos hasta humanos (Haltiwanger et al. 1992). Sin embargo, dichas glicoproteínas están distribuidas preferentemente en el citoplasma y en el núcleo (Kearse et al. 1991). Por el contrario, en el primer trabajo realizado con la cepa Y se describió sólo una cantidad minoritaria de GlcNAc junto con los disacáridos  $\beta$ -Galp(1-3)GlcNAcol y  $\beta$ -Galp(1-4)GlcNAcol como componentes mayoritarios (Peviato et al. 1995). En un trabajo posterior los autores corrigieron la presencia de  $\beta$ -Galp(1-3)GlcNAcol atribuyendo su asignación a  $\beta$ -Galp(1-4)ManNAcol que se formaría por epimerización de GlcNAc en las condiciones alcalinas de beta-eliminación (Jones et al. 2000; Todeschini et al. 2001). En esta tesis se demostró que los disacáridos alditoles conteniendo galactofuranosa pueden ser diferenciados fácilmente de sus análogos de galactopiranososa por HPAEC y por ccd.

La sensibilidad del método descrito en esta tesis fue particularmente útil para la caracterización de las cadenas *O*-glicosídicas del producto de un gen tipo mucina expresado en epimastigotes de la cepa CLBrenner. En dicha cepa se secuenciaron genes tipo mucina conteniendo secuencias de *O*-glicosilación. Dos productos representativos de la familia TcMUC (MUC-R y MUC-NR) fueron seguidos *in vivo* con el uso de genes con una secuencia *tag*, transfectados en epimastigotes. El producto del gen MUC-R tuvo un comportamiento de mucina en extracciones fenol-agua y sus cadenas *O*-glicosídicas fueron estudiadas, las mismas consistieron mayoritariamente en  $\beta$ -Galp(1-4)GlcNAc y  $\beta$ -Galp(1-4)[ $\beta$ -Galp(1-6)]-GlcNAc. Esta modificación post-traducciona encontrada en las mucinas recombinantes, la presencia de *N*-glicosilación y de ancla GPI, indica que el gen transfectado MUC-R da como producto una mucina que es capaz de atravesar el camino de secreción. Todos los productos de los genes repetitivos TcMUC, como MUC-R, son altamente conservados y sólo difieren en el número de repeticiones y en la secuencia de la región hipervariable (Di Noia et al. 1998). De manera que se espera que sean procesados de igual manera cuando se los expresa *in vivo*. Las diferencias en el número de repeticiones pueden contribuir a la heterogeneidad en el peso molecular aparente de las mucinas de *T. cruzi*. En este trabajo, los mismos oligosacáridos se obtuvieron de mucinas endógenas y de las del producto de MUC-R, si

bien existen evidencias de que MUC-R codifica para mucinas del estadio trypomastigotes donde los oligosacáridos unidos *O*-glicosídicamente tienen una estructura más compleja (Almeida et al. 1994). Esto está de acuerdo con la *O*-glicosilación de vertebrados, donde las estructuras unidas *O*-glicosídicamente son en general específicas del tejido o de la célula dependiendo de la transferasa que se expresa (Van den Steen et al. 1998) si bien la secuencia puede influir por la estructura secundaria (Varki 1998).

### **Relación con la división de las cepas en los Linajes 1 y 2**

En esta tesis se determinó por primera vez que en las mucinas de la cepa CL no había Galf. Con posterioridad a nuestros trabajos (Salto et al. 2000) (Pollevick et al. 2000) se encontraron los mismos oligosacáridos y también sus productos sialilados (Todeschini et al. 2001). En nuestro trabajo no detectamos productos sialilados pues se trabajó con parásitos en la fase exponencial de crecimiento y la trans-sialidasa se expresa en la fase estacionaria (Schenkman et al 1993). También determinamos que los oligosacáridos superiores de las mucinas CL tenían el “core”  $\beta$ -Galp(1-4)GlcNAc. Las cadenas *O*-glicosídicas obtenidas por  $\beta$ -eliminación reductiva de las mucinas en distintas cepas se representan en la **Figura 20**. Los oligosacáridos encontrados pueden considerarse derivados de dos “cores”  $\beta$  Galp 1-4 GlcNAc ó  $\beta$  Galf 1-4GlcNAc. Las cepas CL e Y presentan el mismo esquema de glicosilación con galactosas piranósicas. El primer oligosacárido-alditol presenta una unión  $\beta$ -(1-4). La próxima sustitución sería en la posición 6 de GlcNAc siguiendo con sustituciones  $\beta$ -(1-2) en la galactosa unida a la posición 6. En las cepas donde se encontró galactosa furanosa, el patrón de sustitución es similar en cuanto a posiciones. Como primera sustitución, la galactosa en la configuración furanósica se encuentra unida a la posición 4 de GlcNAc. La ausencia de disacáridos alditos  $\beta$ -Galp (1-6)GlcNAc sugirió que la primera sustitución es  $\beta$ -(1-4) (Serrano et al. 1995). La segunda sustitución correspondería a Galp $\beta$  (1-6) que luego será sustituida con más Galp en las posiciones-3 y -2. Una sustitución en el *O*-2 de la Galf(1-4) da lugar a oligosacáridos mayores. El patrón de *O*-glicosilación es más complejo en la cepa Tulhauen donde se encontraron las mismas estructuras y otras con una ramificación  $\beta$ -Galf (1-2)  $\beta$ -Galf (1-4).

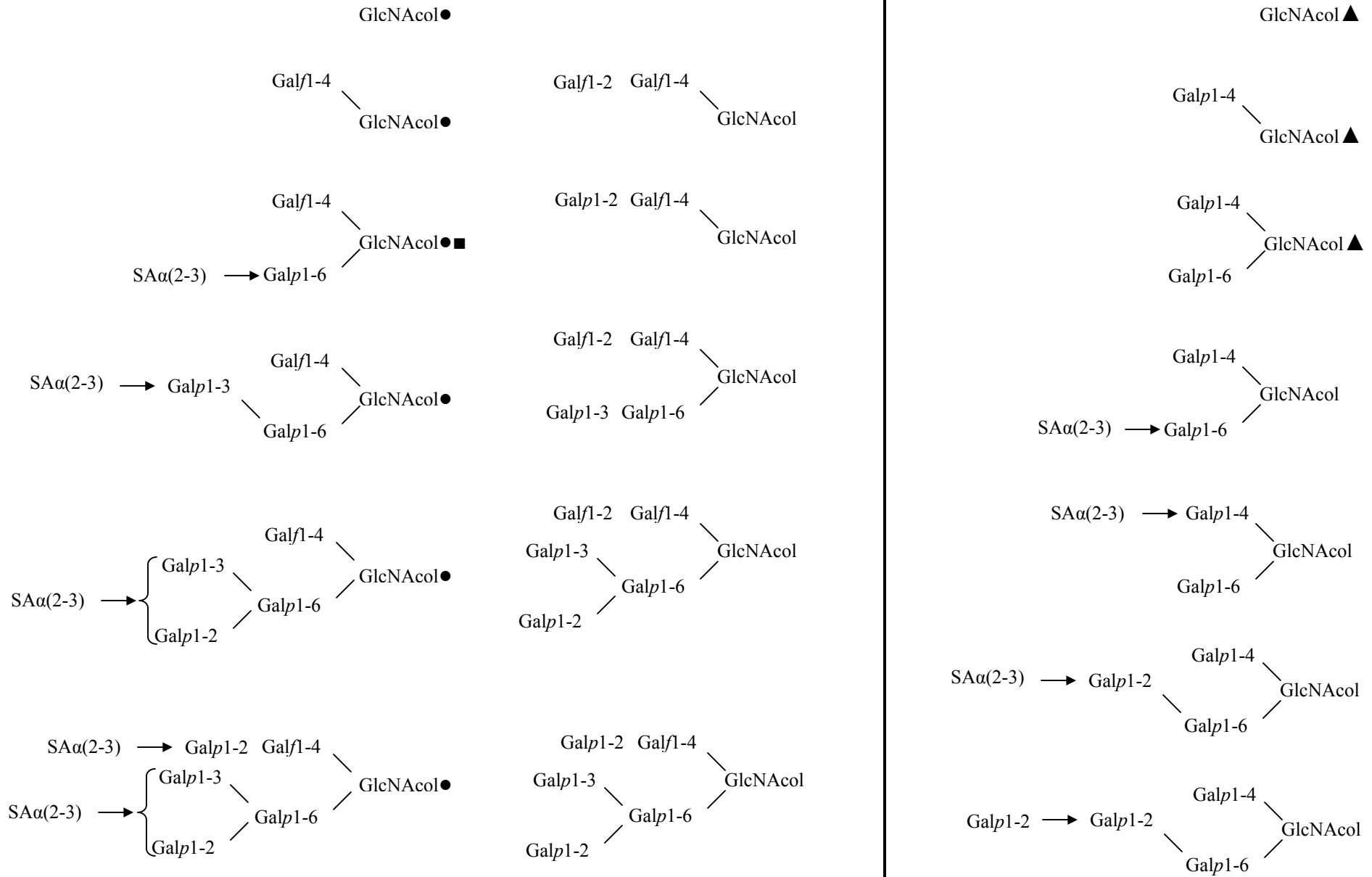
Las cepas Y y CL Brener pertenecen al mismo Linaje 2 (ciclo doméstico), si bien la cepa Y es 20-30 veces más infectiva que la CLBrener, ambas son infectivas en

ratón, mientras que la cepa G no produce parasitemia (Yoshida 1983). Estos datos están de acuerdo con los análisis de sueros aislados de pacientes chagásicos (Fernandes et al. 1998). Al respecto, las cepas del Linaje 2 son cuatro veces más infectivas que las del Linaje 1. La relación con la infectividad de las mucinas se determinó también para dos cultivos T0 y T2 provenientes de una misma cepa Tulahuen, mientras que la primera había perdido su infectividad luego de varios años de mantención en cultivo axénico, T2 se había aislado de ratón más recientemente y replicado luego en medio de cultivo (Segura et al. 1980). Las mucinas de T0 y T2 mostraron distinto perfil de oligosacáridos (Lederkremer & Confalonieri 1994). El tipo de glicosilación que presenta cada linaje puede estar en relación con la reactividad tipo lectina que permite uniones específicas al tracto digestivo de los insectos triatomíneos, lo cual puede proveer ciertas ventajas con respecto al desarrollo de unas cepas sobre otras en los distintos huéspedes (García et al. 1991). La presencia de galactosa furanósica, al ser antigénica favorecería la respuesta inmunológica del huésped. Por otra parte, podría interferir con la sialilación de los oligosacáridos de la superficie, ya que la trans-sialidasa transfiere ácido siálico a galactosas piranósicas terminales. De esta manera, las estructuras de las cadenas O-glicosídicas sirven como marcadores filogenéticos que están de acuerdo con la división recientemente descrita para la familia heterogénea de cepas de *T. cruzi*.

---

LINAJE 1

LINAJE 2



**Figura 20. Cadenas O-glicosídicas de mucinas de *T. cruzi*.** Todas las uniones son β-galactosídicas. Todas las estructuras del Linaje 1 fueron encontradas en la cepa Tulahuen. Las estructuras encontradas en la cepa G se marcan con ●. Las del clon Dm28c, con ■. Las encontradas en el Linaje 2 corresponden a las de la cepa Y y la CLBrenner. Las estructuras encontradas en esta tesis se marcan con ▲.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Cultivos celulares**

Células epimastigotes de *T. cruzi* clon CL14 fueron cultivadas según lo descrito previamente (Castellani et al. 1967) y cedidas generosamente por el laboratorio del Dr Walter Colli (São Paulo, Brazil).

Epimastigotes de la cepa CLBrenner “wild type” se obtuvieron de cultivos axénicos en medio BHT (Life Technologies) con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina a 28°C con agitación, por el grupo Dr Frascch en la Universidad de San Martín.

### *Parásitos transfectados con genes de mucinas:*

Estos parásitos se obtuvieron en el Laboratorio a cargo del Dr Frascch (Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-UNSAM). En la región hipervariable de los genes MUC-CA2 y MUC-RA2 se insertó una secuencia correspondiente a los aminoácidos 21-44 de la proteína core del virus de hepatitis C humana (*tag*). A estas construcciones se las denominó MUC-R y MUC-NR. El producto de estos genes transfectados en *T. cruzi* se siguió con un anticuerpo anti-*tag*. Epimastigotes de la cepa CL Brener fueron transfectados con las construcciones MUC-R y MUC-NR, subclonadas en el vector pRIBOTEX (Martinez-Calvillo et al. 1997).

### **Testigos de oligosacáridos**

Galpβ1→4GlcNAc y Galpβ1→3GlcNAc son compuestos comerciales (Sigma). Los disacáridos Galpβ1→4GlcNAc (Gallo-Rodriguez et al. 1996), Galpβ1→6GlcNAc (Gallo-Rodriguez et al. 1999), Galpβ1→3GlcNAc (Gallo-Rodriguez et al. 1999) y Galpβ1→6GlcNAc (Gallo-Rodriguez et al. 1997) y el trisacárido Galpβ1→4(Galpβ1→6)GlcNAc (Gallo-Rodriguez et al. 1997) fueron sintetizados en nuestro laboratorio como se describió.

### **Preparación de alditoles marcados y no marcados**

Los alditoles correspondientes se prepararon por reducción de 0,2 mmol de disacárido o trisacárido en metanol: agua (9:1, 10 ml) con NaBH<sub>4</sub> (2 mM). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante 16hs y la solución se descationizó en una columna empacada con la resina AG 50 W-X12 (Bio-Rad) (forma H<sup>+</sup>). El eluido se llevó a seco y

el ácido bórico fue eliminado por sucesivas evaporaciones con metanol. La pureza de los alditos fue confirmada por cromatografía en capa delgada (CCD) con 1-propanol/ $\text{NH}_4\text{OH}_{(c)}$ /agua (7:1:2, v/v) como solvente de desarrollo. Para la preparación de los alditos marcados, 100  $\mu\text{g}$  de los azúcares fueron reducidos con 500  $\mu\text{Ci}$  de  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  en agua durante 1 h a temperatura ambiente, seguido del agregado de  $\text{NaBH}_4$  frío y de un proceso similar al descrito para los alditos no marcados.

### **Eliminación reductiva de oligosacáridos en glicoproteínas de 35-50 kDa de células epimastigote de *T. cruzi*.**

Las cadenas de oligosacáridos unidas a los aminoácidos serina y/o treonina fueron liberadas por tratamiento con una solución de  $\text{NaOH}/\text{NaBH}_4$  (0,05M/0,3M) durante 24 hs a  $37^\circ\text{C}$ . Los oligosacáridos alditos se obtuvieron también radioactivos por  $\beta$ -eliminación con una solución de  $\text{NaOH}$  de igual concentración conteniendo 500  $\mu\text{Ci}$   $\text{NaB}^3\text{H}_4$ . Luego de 2 h, la reducción se completó por agregado de igual volumen de solución 0,6 M  $\text{NaBH}_4$  durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$ . Después de neutralizar con ácido acético y N-acetilar (10  $\mu\text{l}$  de piridina y 50  $\mu\text{l}$  de anhídrido acético en 500  $\mu\text{l}$  de metanol, 15 minutos a temperatura ambiente) la reacción se desaló por pasaje por resina AG 50-X12 (forma  $\text{H}^+$ ) y se llevó a seco. El ácido bórico se eliminó por el sucesivo agregado de metanol y evaporación. El residuo se pasó por una columna (1,5x100cm) de Biogel P-2 (Bio-Rad) equilibrada en agua para eliminar las sales. Los alditos radioactivos se detectaron midiendo radioactividad de las fracciones en un contador de centelleo.

### **Cromatografía en capa delgada (ccd)**

Para las cromatografías en capa delgada se utilizaron placas de sílica Gel 60 de vidrio (Merck) y el siguiente sistema de solventes: 1-propanol/ $\text{NH}_4\text{OH}_{(c)}$ /agua (7:1:2), doble desarrollo. Los alditos radioactivos se detectaron por fluorografía. Las placas se rociaron con  $\text{EN}^3\text{HANCE}$  (New England Nuclear) y se expusieron a films Kodak X-Omat A-R5 a  $-70^\circ\text{C}$ . Los compuestos no radioactivos se detectaron rociando la placa con el siguiente reactivo: 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4/0,04$  M  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}/3\text{mM}$   $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  y sucesivo calentamiento a  $200^\circ\text{C}$ .

### **Separación de los oligosacáridos-alditales por cromatografía líquida de intercambio aniónico y detección por pulso amperométrico (HPAEC-PAD).**

El análisis de los oligosacáridos alditales se realizó en el sistema Dionex DX 300 (cromatografía líquida de alta resolución) con detección por pulso amperométrico (PAD). Se utilizaron los eluyentes: 1) NaOH 200 mM y 2) agua desionizada con las siguientes condiciones:

Condición 1: columna analítica de intercambio aniónico CarboPac PA-10 (4 x 250 mm) equipada con una guarda columna PA-10 (4 x 50 mm) con el siguiente programa de elución: NaOH 20 mM (buffer 1, 10%) de 0-10 min; NaOH 20-60 mM (buffer 1, 10-30%) de 10-14 min; esta última concentración se mantuvo durante 30 minutos a un flujo de 0,4 ml min<sup>-1</sup> a temperatura ambiente.

Condición 2: columna analítica de intercambio aniónico CarboPac MA-1 (4 x 250 mm) equipada con una guarda columna MA-1 (4 x 50 mm) con el siguiente programa de elución: NaOH 70 mM (buffer 1, 35%), isocrática con un flujo de 0,4 ml min<sup>-1</sup>.

La sensibilidad del detector por pulso amperométrico fue seleccionada en 100 nA y los potenciales fueron los siguientes:  $E_1 = +0,05$  V,  $E_2 = +0,60$ V y  $E_3 = -0,60$ V.

### **Purificación de mucinas**

Las mucinas de células epimastigotes fueron extraídas con un procedimiento similar al descrito para LPPG (lipopeptidofosfoglicano) (Lederkremer et al. 1991). Los parásitos liofilizados se delipidaron por sucesivas extracciones con cloroformo: metanol (2:1, v/v) y (1:1, v/v) (15 ml, 15', 3X). El residuo delipidado se extrajo con agua saturada en butanol (50 mg/ml) 18h, 4°C con agitación y el extracto se separó por centrifugación (10000 rpm, 4°C). El butanol fue removido por evaporación y la solución acuosa se liofilizó y separó por cromatografía en Octil-Sefarosa CL4B (Pharmacia). Se utilizó un gradiente lineal de 1-propanol 2-70% en TES 0,1 M, pH 7,0. La muestra se disolvió en 2% propanol, 0.1 M TES, pH 7 (buffer A) y se sembró en la columna previamente equilibrada con el mismo buffer. Se juntaron fracciones de 2 ml a las que se les midió cantidad de azúcar por el método de fenol/sulfúrico y proteína por absorción en UV a 280 nm. Las fracciones se juntaron adecuadamente, se dializaron y liofilizaron.

*Mucinas de epimastigotes transfectados.* El pellet obtenido luego de la extracción con agua/butanol se extrajo con 44% fenol en agua según lo descrito previamente (Lederkremer et al. 1991). Los extractos acuosos en cada caso se liofilizaron y purificaron por cromatografía de afinidad utilizando IgG anti-tag unido a Sepharosa 4B.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (15 %), en presencia de 0,1% dodecilsulfato de sodio, (SDS-PAGE). Las fracciones colectadas de la columna de octil-Sefarosa se sembraron junto con testigos de PM preteñidos (BioRad) y un testigo de glicoconjugados totales aislados a partir de la cepa Y (Lederkremer et al. 1976) Los geles se revelaron con la tinción ácido periódico/base de Schiff (PAS) (Fairbanks et al. 1971).

### **$\beta$ -Eliminación reductiva**

Las glicoproteínas (100  $\mu$ g en azúcar) separadas en octil-Sepharosa (Fracción II, Figura 6) se trataron con una solución (1 ml) de NaOH/NaBH<sub>4</sub> (0,1M/0,3M) durante 24hs a 37°C. La muestra se neutralizó con ácido acético 1M, se descationizó por cromatografía de intercambio catiónico con la resina AG 50-X12 (forma H<sup>+</sup>) (Bio-Rad) y se llevó a seco. El ácido bórico se eliminó por co-evaporación con metanol. Los alditoles marcados radioactivamente se prepararon por  $\beta$ -eliminación de las mucinas con 0,1 M NaOH conteniendo 1 mCi de NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>. Luego de 2 horas a temperatura ambiente la reducción se completó con NaBH<sub>4</sub> durante 24 h a 37°C y la solución se desaló como arriba. Los alditoles marcados se purificaron por cromatografía de exclusión en Bio-Gel P-2 (Bio-Rad).

### **Marcación con galactosa oxidasa/NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>**

El oligosacárido alditol, purificado en Bio-Gel P-2, se disolvió en 0,1 ml de buffer fosfato salino conteniendo 10 U de galactosa oxidasa (Sigma) y se incubó a 37°C durante 18 horas. La solución se ajustó a pH 8 con NH<sub>4</sub>OH 2.5M, se agregaron 500  $\mu$ Ci de Na<sup>3</sup>BH<sub>4</sub> en 0,1M NaOH y la incubación se continuó por 3 h más a temperatura ambiente. La muestra se desaló por pasaje por columna mixta formada por 0,2 ml de AG 50 W-X12 (H<sup>+</sup>) sobre 0,2 ml de AG 3-X4 (OH<sup>-</sup>) sobre 0,1 ml de QAE-Sephadex A-25 y se concentró en un evaporador rotatorio.

#### *Marcación in vivo*

10<sup>8</sup> células epimastigotes de *T. cruzi* se resuspendieron en 0,5 ml de PBS conteniendo 22 unidades de galactosa oxidasa (Sigma) y se incubaron durante 90 minutos a 30° C con agitación. Las células se lavaron con PBS (x3), se resuspendieron en 0,5 ml de PBS y se agregó 1 mCi de Na<sup>3</sup>BH<sub>4</sub> y la incubación se prosiguió por 30 minutos más a



temperatura ambiente. La reacción se paró por el agregado de 0,5 ml de PBS y las células se lavaron con una solución 1% NaBH<sub>4</sub> en 7% NaCl. El pellet final se lisó directamente en el buffer de muestra para electroforesis y se sembró en gel de poliacrilamida.

#### *Glicoconjugados aislados*

Una muestra de glicoconjugados (5 µg) de mucinas de epimastigotes, cepa CL Brener se resuspendió en 0,5 ml de PBS conteniendo 20 unidades de galactosa oxidasa (Sigma) y se incubó durante 18 h a 37° C. La solución se ajustó a pH 8 con NH<sub>4</sub>OH 2,5M, se agregó 1 mCi de Na<sup>3</sup>BH<sub>4</sub> y la incubación se continuó por 3 h más a temperatura ambiente. La reducción se completó con NaBH<sub>4</sub> durante 4 h y se dializó contra agua con agitación. La muestra se liofilizó; se agregó 50 µg de material no marcado y purificó por octil-Sepharosa CL-4B. La elución de producto se siguió por contaje de radioactividad.

#### **Digestión con β-galactosidasa**

El oligosacárido alditol obtenido como se describió anteriormente se incubó con 5 mU de una enzima específica, β-galactosidasa (Sigma), en 25 µl de buffer fosfato 0,25 M, pH 6, durante 48 h a 37° C. El producto se desaló y concentró en un evaporador rotatorio.

---

## INTRODUCCIÓN

### **Esfingolípidos en *Saccharomyces cerevisiae*, mamíferos y trypanosomatídeos**

Los esfingolípidos conforman un grupo de moléculas estructuralmente diverso que presenta como estructura común, bases esfingosínicas de cadena larga. Fueron descubiertos por Johann L. W. Thudichum hace más de 100 años en tejido de cerebro (de ahí que los primeros esfingolípidos aislados recibieran el nombre de esfingomielina, cerebrosido, etc). Se han convertido últimamente en lípidos de interés debido a su función en transducción de señales y como segundos mensajeros en el crecimiento, diferenciación y muerte celular. Recientemente, se han descubierto toxinas capaces de interferir en su metabolismo, lo cual proporcionó un creciente interés en el desarrollo de fármacos. Están presentes en todas las células eucariotas; su mayor concentración se da en membrana plasmática pero también se encuentran en membranas internas como la lisosomal, la del retículo endoplásmico, Aparato de Golgi y mitocondrial en menor medida. Son componentes importantes de “lipid rafts”, cuya función más destacada es la de agrupar, en microdominios de membrana, proteínas y lípidos involucrados en señalización celular. Son vastas y frecuentes las publicaciones que involucran esfingolípidos. La **Tabla 2** muestra una actualización sobre las enzimas de la biosíntesis, presentes en los organismos estudiados con mayor detalle.

### **Metabolismo-Esquema 1**

En todos los organismos, la síntesis de esfingolípidos comienza con la condensación de L-serina y palmitoilcoenzima A (CoA) que da como producto 3-cetodihidroesfingosina (Dickson et al. 1999). La reacción es esencial e irreversible, ocurre en retículo endoplásmico (RE), y está catalizada por la enzima serin-palmitoil transferasa (SPT) (Merrill et al. 1990), la cual presenta dos subunidades homólogas necesarias para que la enzima presente actividad, LCB1 y LCB2 (LCBs, long chain bases) (Nagiec et al. 1994).

Luego, 3-ceto dihidroesfingosina es reducida a *eritro*-dihidroesfingosina (esfinganina) también en RE, por la enzima 3-cetodihidroesfingosina reductasa (gen TSC10-“Temperature-sensitive suppressors of calcium sensitivity”), la cual en *S. cerevisiae* es esencial y requiere NADPH como cofactor (Pinto et al. 1992).

El siguiente paso difiere según el tipo de célula. Mientras que tanto en hongos como en plantas dihidroesfingosina y dihidroceramida son hidroxiladas a fitoesfingosina (4-hidroxisfinganina) o fitoceramida (4-hidroxiceramida) respectivamente, en células de mamífero, dihidroesfingosina es *N*-acilada a dihidroceramida (ácidos grasos de 16-24 carbonos) la cual es deshidrogenada rápidamente a ceramida (Haak et al. 1997). No existen pasos de hidroxilación en células de mamíferos. El gen que codifica para la hidroxilasa de *S. cerevisiae* no es esencial (Beeler et al. 1998) lo cual le quita interés desde el punto de vista terapéutico. En hongos, los ácidos grasos de fitoceramida son de 24 a 26 carbonos (Oh et al. 1997). La enzima que cataliza el paso de acilación es una *N*-acil transferasa o ceramida sintetasa. **Esquema 3.**

Las ceramidas de hongos y plantas son incorporadas en fosfolípidos que se diferencian de los de mamíferos también en su grupo polar. Mientras que en hongos y en plantas se biosintetiza inositolfosfoceramida (IPC) a partir de fosfatidilinositol y ceramida o fitoceramida, en mamíferos se biosintetiza esfingomiélna a partir de fosfatidilcolina. La enzima que biosintetiza inositolfosfoceramida (IPC sintetasa) es esencial en *Saccharomyces cerevisiae* (Nagiec et al. 1997) y está ausente en células de mamífero; por este motivo constituye un blanco prometedor para el desarrollo de drogas anti-fúngicas.

En mamíferos, galactosa o glucosa está unida a ceramida por medio de la correspondiente ceramida glicosiltransferasa y estos glicolípidos (galactosilceramida y glucosilceramida) pueden modificarse a su vez por el agregado de otro azúcar o de grupos sulfatos para dar lugar a un gran número de glicoesfingolípidos complejos (Dickson 1998). Por el contrario, en *Saccharomyces cerevisiae*, inositolfosfoceramida es modificada solamente a manosa-inositol-fosfoceramida (MIPC) y manosa-(inositol fosfo)<sub>2</sub>-ceramida (M(IP)<sub>2</sub>C) (Beeler et al. 1997) (Dickson et al. 1997). En los parásitos *Leishmania* y *T. cruzi*, IPC no es sustrato de manosiltransferasas. Tampoco es sustrato para la biosíntesis de anclas de glicosilfosfatidil inositol (GPI) (Bertello et al. 2004), lo cual demuestra que aunque la ceramida es residuo lipídico de glicolípidos (i.e. LPPG) y de anclas de glicoproteínas maduras en *T. cruzi*, se introduce en el glicolípido por un proceso de remodelado. También en *S. cerevisiae* forma parte de anclas GPI de proteínas, pero a diferencia de lo que ocurre en *T. cruzi*, se introduce luego de la unión

del GPI a la proteína por un proceso de remodelado que reemplaza el glicerolípido por ceramida (Conzelmann et al. 1992; Sipos et al. 1997; Reggiori et al. 1998).

Hongos y plantas biosintetizan glicosfingolípidos que contienen inositol y ceramida (GIPC) mientras que galactosilceramida se encuentra solamente en hongos y en mamíferos. Por el contrario, glucosilceramida (GlcCer) es el único glicosfingolípidos común a plantas, hongos y animales (Warnecke et al. 2003), si bien no se encuentra en *Saccharomyces cerevisiae* en particular. En mamíferos, GlcCer representa un papel central en el metabolismo de esfingolípidos ya que es intermediario para la formación de alrededor de 300 glicosfingolípidos diferentes (Hakomori 1981) y podría contribuir al control de los niveles de ceramida libre (van Blitterswijk et al. 2001). Recientemente, se encontraron evidencias de la presencia de una glucosilceramida sintetasa, con especificidad de sustrato particular, en *Plasmodium falciparum* (Couto et al. 2004).

En el **Esquema 4** (Página 57) se muestran las estructuras de los inhibidores de pasos de la ruta biosintética de esfingolípidos.

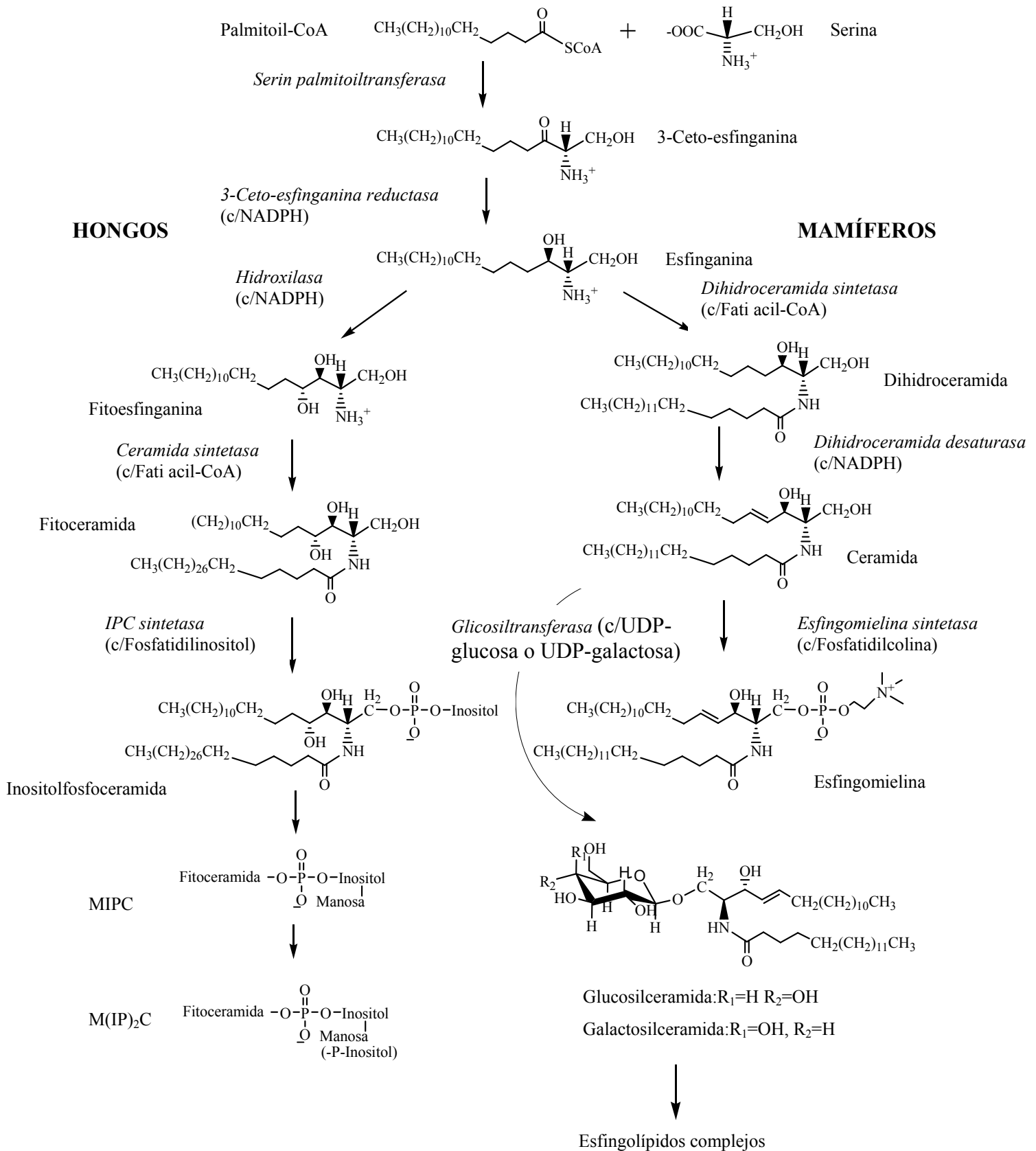
**Tabla 2. Biosíntesis de esfingolípidos.** Actualización sobre los genes de las enzimas involucradas en la biosíntesis de esfingolípidos en distintos organismos.

| Enzima                           | Organismo   | Referencia/Actualización   |
|----------------------------------|---|--|
| Serin palmitoiltransferasa (SPT) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>LCB1<br>LCB2<br>TSC3 (ES) (a temp. elevadas) | (Buede et al. 1991)<br>(Nagiec et al. 1994)<br>(Gable et al. 2000) (Zhao et al. 1994)                          |
|                                  | <i>Candida albicans</i><br>LCB1/LCB2<br>TSC3                                    | <a href="http://alces.med.umn.edu/Candida.html">http://alces.med.umn.edu/Candida.html</a><br>Gen no encontrado |
|                                  | <i>Arabidopsis thaliana</i><br>LCB2<br>TSC3                                     | (Tamura et al. 2001)<br>Gen no encontrado  |
|                                  | Mamíferos/ <i>Homo sapiens</i><br>LCB1<br>LCB2<br>TSC3                          | (Hanada et al. 1997)<br>(Nagiec et al. 1996) (Weiss et al. 1997)<br>Gen no encontrado                          |
|                                  | <i>Leishmania</i><br>SLCB2 NES  | (Zhang et al. 2003) (Denny et al. 2004)  |
|                                  | <i>Trypanosoma cruzi</i><br>Caracterización de la función enzimática            | (Figueiredo et al. 2004)   |
| 3-Cetoesfinganina reductasa      | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>TSC10 (ES)                                   | (Beeler et al. 1998)   |
|                                  | <i>Candida albicans</i>   | Posible homólogo   |
|                                  | <i>Arabidopsis thaliana</i>   | Posible homólogo   |
|                                  | <i>H. sapiens</i><br>Localización: lado citosólico del RE                       | Posible homólogo<br>(Mandon et al. 1992)   |
| Esfingolípido C-4-hidroxilasa    | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>SUR2 (NES)                                   | (Haak et al. 1997)   |
|                                  | <i>Arabidopsis thaliana</i>   | (Sperling et al. 2001)   |
|                                  | <i>Candida albicans</i>   | Posible homólogo   |
|                                  | Mamíferos   | Gen no encontrado  |

| Enzima                                      | Organismo   | Referencia/Actualización  |
|---|---|---|
| Ceramida sintetasa                          | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>LAC1/LAG1<br>(NES)<br><i>Arabidopsis thaliana</i><br><br><i>Candida albicans</i><br><br><i>Homo sapiens</i>            | (Schorling et al. 2001) (Guillas et al. 2001)<br>(Brandwagt et al. 2000)<br><br><a href="http://alces.med.umn.edu/Candida.html">http://alces.med.umn.edu/Candida.html</a><br><br>Posible homólogo (Jiang et al. 1998) |
| Ceramidasas                                 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>YPC1/YDC1<br>(NES)<br><i>Arabidopsis thaliana</i><br><br><i>Candida albicans</i><br><br>Mamíferos/ <i>Homo sapiens</i> | (Mao et al. 2000) (Mao et al. 2000)<br><br>Posible homólogo<br><br>Posible homólogo<br><br>(El Bawab et al. 2000) (Mao et al. 2001) (Mitsutake et al. 2001)   |
| $\alpha$ -hidroxilasa de ácidos grasos      | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>SCS7<br>(NES)<br><br><i>Arabidopsis thaliana</i><br><br><i>Candida albicans</i><br><br>Mamíferos                       | (Haak et al. 1997)<br><br>(Mitchell et al. 1997)<br><br>Posible homólogo<br><br>Posible homólogo  |
| Desaturasas                                 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>   | Genes no encontrados  |
| $\Delta 4$ - & $\Delta 8$ - desaturasas     | <i>Candida albicans</i><br><br><i>Arabidopsis thaliana</i> /<br><i>Lycopersicon esculentum</i><br><br><i>H. sapiens</i>                                   | Posible 4 & 8 desaturasas<br><br>• $\Delta 4$ - gen homólogo/web page la expresión heteróloga en <i>S. cerevisiae</i> no funciona<br>• $\Delta 8$ - (Sperling et al. 2000)<br><br>(Ternes et al. 2002)                |
| Esfingolípido Metil transferasa             | (Warnecke et al. 2003)  | Desconocido   |
| Inositolfosfoceramida sintetasa             | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>AUR1 ES  | (Nagiec et al. 1997)  |
| Genes requeridos para la manosiación de IPC | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>SUR1/CSG2  | (Beeler et al. 1997) (Beeler et al. 1994)   |

| Enzima   | Organismo  | Referencia/Actualización  |
|--|--|---|
| Genes requeridos para la adición de inositol fosfato a MIPC para dar M(IP)2C | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>IPT1  | (Dickson et al. 1997) (Leber et al. 1997)   |
| Glucosilceramida sintetasa   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / <i>Schizosaccharomyces pombe</i><br><br><i>Candida albicans</i><br><br><i>Arabidopsis thaliana</i> /otras plantas<br><br><i>H. Sapiens</i><br><br><i>Plasmodium falciparum</i><br>Caracterización de la actividad enzimática | No se encontró homólogo, lo cual es consistente con la ausencia del producto<br><br>(Leipelt et al. 2001)<br><br>(Leipelt et al. 2000)<br><br>(Ichikawa et al. 1996)<br><br>(Couto et al. 2004) |
| Glucosilceramida galactosiltransferasa                                       | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br><br><i>Candida albicans</i><br><br><i>Arabidopsis thaliana</i><br><br><i>H. Sapiens</i> /mamíferos  | Gen no encontrado<br><br>Posible homólogo<br><br>Posible homólogo<br><br>(Nomura et al. 1998) (Takizawa et al. 1999)  |
| Ceramida galactosiltransferasa   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br><br><i>Candida albicans</i><br><br><i>Arabidopsis thaliana</i><br><br>Mamífero  | Gen no encontrado<br><br>Gen no encontrado<br><br>Gen no encontrado<br><br>(Schulte et al. 1993)  |

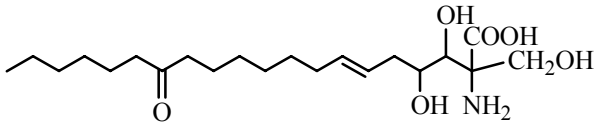
Notas: **1-ES**, gen esencial para el organismo; **NES**, gen no esencial; **2-*Arabidopsis thaliana***, pequeña planta que florece; **3-*Saccharomyces cerevisiae***, levadura de cerveza; *Candida albicans*, patógeno fúngico, causante de infecciones vaginales y bucales; **4**-El genoma de todos los organismos listados en esta tabla está siendo secuenciado. Se han encontrado posibles homólogos de genes descritos con anterioridad, los cuales figuran en la página web de cada uno de los organismos, como se especifica en la tabla. Posibles homólogos son genes con alta similitud de secuencia pero cuya función no ha sido aún confirmada; **5**-Cuando no existe una secuencia homóloga a la del gen, previamente descrito, en la tabla se especifica “Gen no encontrado”; **6**-Para el caso en el que se conoce el producto pero no el gen que cataliza su formación, se especifica “Desconocido”.



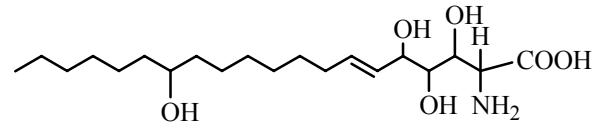
Esquema 3. Biosíntesis de esfingolípidos. Ruta metabólica en hongos y mamíferos.



**Serinpalmitoil-transferasa**

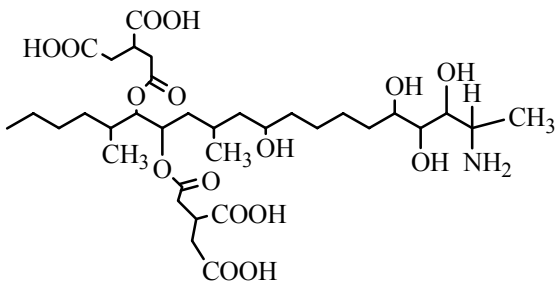


Myriocin

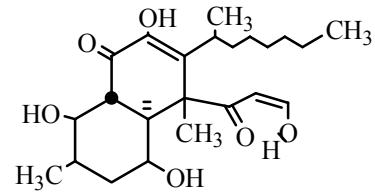


Spingofungin

**Ceramida sintetasa**

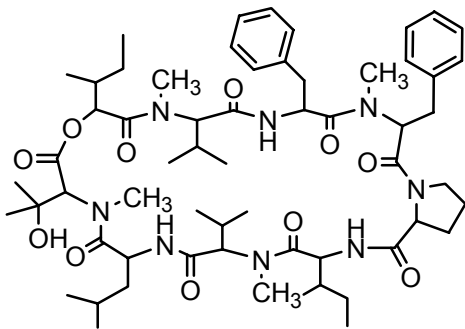


Fumonisin B<sub>1</sub>



Australifungin

**IPC-sintetasa**



Aureobasidina A

**Esquema 4.** Inhibidores naturales y sintéticos de **enzimas** de la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos.

### Anclas de glicosilfosfatidilinositol (GPI)

Una proteína puede estar unida a la membrana de distintas maneras. Un tipo de unión muy común en parásitos protozoarios es a través de un glicosilfosfatidilinositol (GPI). La estructura básica de GPI unida a la proteína es  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-PO}_4\text{H-6Man-}\alpha(1-2)\text{Man}\alpha(1-6)\text{Man}\alpha(1-4)\text{GlcN}\alpha(1-6)\text{D-myoinositol-1-HPO}_4\text{-lípido}$  (**EtNP-Man3GlcN-PI**).

El lípido puede ser diacilglicerol, alquilacilglicerol o ceramida. Esta estructura mínima puede estar decorada con grupos adicionales de fosfato de etanolamina o sustituyentes de carbohidratos que son específicos del tejido y de la especie (Ferguson 1999). Los parásitos protozoarios tienden a expresar altas cantidades de proteínas ancladas a través de un GPI. Por ejemplo, *Trypanosoma brucei*, el agente causante de la enfermedad Africana del sueño, expresa una superficie densa y gruesa que consiste en  $5 \times 10^6$  dímeros de la glicoproteína VSG (Variant Surface Glicoprotein), anclada por medio de un GPI. Esto protege al parásito de lisis por complemento del huésped y la variación antigénica lo protege de la respuesta inmune específica (Cross 1996). Otras estructuras de tipo GPI como lipofosfoglicano, glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) y glicoproteínas tipo mucinas se expresan en otros parásitos protozoarios (Ferguson 1999). *Plasmodium* (Gerold et al. 1996), *Toxoplasma* (Striepen et al. 1997), *Trichomonas* (Singh et al. 1994) y *Entamoeba* (Moody-Haupt et al. 2000) también presentan glicoproteínas ancladas por medio de un GPI y/o GIPLs. Inhibidores de la biosíntesis de GPI o de estructuras de tipo GPI serían de gran utilidad para el desarrollo de drogas antiparasitarias. Esta hipótesis fue validada por lo menos en *T. brucei* donde la delección del gen TbGP110 que codifica para la tercer manosiltransferasa de la biosíntesis de anclas de GPI mostró ser letal para las formas sanguíneas del parásito (Ferguson 2000) (Nagamune et al. 2000). Por otra parte, los GIPLs serían esenciales para la supervivencia de *Leishmania* (Ilgoutz et al. 1999) y *Trypanosoma cruzi* (Garg et al. 1997).

La secuencia de pasos de la biosíntesis de GPI fue estudiada en *T. brucei* (Masterson et al. 1989) (Masterson et al. 1990) (Menon et al. 1990) (Guther et al. 1995) (Morita et al. 2000), *T. cruzi* (Heise et al. 1996) y *Toxoplasma gondii* (Striepen et al. 1999). En todos los casos la biosíntesis de GPI involucra la adición de GlcNAc a fosfatidilinositol (PI) para dar  $\text{D-GlcNAc}\alpha(1-6)\text{D-myoinositol-1-HPO}_4\text{-sn-1,2-diacilglicerol}$  (**GlcNAc-PI**) que luego es de-*N*-acetilada para formar  $\text{D-GlcN}\alpha(1-6)\text{D-myoinositol-1-HPO}_4\text{-sn-1,2-diacilglicerol}$  (GlcN-PI) (Doering et al. 1989) (Milne et al.

1994). La des-*N*-acetilación es un requisito para la manosilación de GlcN-PI (Nakamura et al. 1997). Las enzimas GlcNAc-PI des-*N*-acetilasas de protozoos y mamíferos presentan especificidades similares con respecto al grupo acilo pero difieren en sus especificidades con respecto al *myo*-inositol. La enzima de trypanosomas puede de-*N*-acetilar GlcNAc-PI que contenga D- o L-*myo*-inositol, mientras que la humana (HeLa) requiere D-*myo*-inositol estrictamente (Sharma et al. 1999). Otras diferencias entre la biosíntesis de GPI de *T. brucei* y mamíferos ocurren a partir del intermediario GlcN-PI. Ejemplos de estas diferencias corresponden al momento de la acilación-desacilación del inositol (Guther et al. 1995), la adición de grupos etanolaminafosfato extras a las anclas de GPI de mamíferos (Hirose et al. 1992; Puoti et al. 1993) y el remodelamiento de ácidos grasos del ancla de *T. brucei* (Masterson et al. 1990). La diferencia en el momento de acilación-desacilación del inositol fue explotada con el descubrimiento de la primera generación de inhibidores específicos de la ruta biosintética de GPI (Smith et al. 1999).

Los pasos de biosíntesis para los GPI de mamíferos y las enzimas clonadas pueden verse en el **Esquema 5**.

### **Remodelamiento del lípido del ancla de GPI en *Saccharomyces cerevisiae***

La biosíntesis de anclas de tipo GPI de proteínas respeta una secuencia de pasos similar en todas las células eucariotas (Englund 1993). Sin embargo, el residuo lipídico puede variar dependiendo del tipo de organismo y de la proteína, pudiendo a su vez, diferir del lípido presente en el fosfatidilinositol (PI), el cual sería *a priori* el punto de partida para la biosíntesis de GPI en retículo endoplásmico (RE) (McConville et al. 1993).

En *Saccharomyces cerevisiae* se encontraron, en anclas de GPI de proteínas maduras, dos tipos de lípidos diferentes: ceramida (Cer) y diacilglicerol (DAG). Mayoritariamente se encuentra ceramida, formada por fitoesfingosina (FS) y un ácido graso de 26 carbonos (C26:0). Sin embargo, esta ceramida difiere de la mayoritaria del grupo de inositolfosfoceramidas (IPCs) (Conzelmann et al. 1992) y por otra parte, ningún glicolípido precursor de anclas de GPI posee una ceramida en su residuo lipídico. Mediante el uso de inhibidores específicos de la biosíntesis de esfingolípidos, se demostró que la incorporación de ceramida en el ancla de GPI es a través de una reacción de remodelamiento que introduce una ceramida sintetizada *de novo* en el ancla unida a la proteína madura (Reggiori et al. 1997; Reggiori et al. 1998).

La no detección de ceramida en lípidos precursores de anclas de GPI de *T. cruzi* y su presencia en anclas de proteínas maduras sugería que un mecanismo similar al descrito en *S. cerevisiae* estaría ocurriendo en el microorganismo protozoario (Heise et al. 1996). Recientemente Bertello et al. demostraron, que en efecto la IPC no es sustrato para los primeros pasos de la biosíntesis de GIPLs en *T. cruzi* (Bertello et al. 2004).

### **Biosíntesis de esfingolípidos en microorganismos protozoarios**

En *Saccharomyces cerevisiae*, el análisis de mutantes de la enzima serin-palmitoil transferasa (SPT) reveló que la biosíntesis *de novo* de ceramida es esencial en diversos procesos como endocitosis, respuesta a estrés y tráfico intracelular de moléculas con ancla de glicosilfosfatidilinositol (Zanolari et al. 2000; Funato et al. 2002).

La biosíntesis *de novo* de esfingolípidos también ha sido estudiada en *Leishmania* (parásito protozoario relacionado con *Trypanosoma cruzi*) por dos grupos diferentes (Zhang et al. 2003) y (Denny et al. 2004). Ambos trabajos demostraron que la expresión de la subunidad 2 de SPT está regulada, la proteína se detecta solamente en los estadios no infectivos del parásito y no en metacíclicos y amastigotes intracelulares. Los parásitos knock out (carentes del gen y por lo tanto de la proteína) son igualmente capaces de establecer una infección en ratones, lo cual confirma que el primer paso de la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos es innecesaria para la supervivencia del parásito en la célula de macrófago y para su patogénesis. Sin embargo, las células mutantes tienen dificultad durante la fase estacionaria del crecimiento. En ausencia de SPT, es posible que los amastigotes sinteticen esfingolípidos utilizando precursores de fuentes alternativas; *L. donovani* por ejemplo, estimula el incremento de la producción del precursor ceramida en la célula huésped (Ghosh et al. 2002). Esta teoría no permitiría una regulación en la síntesis de ceramida, ni un rol como segundo mensajero.

En *Cryptococcus neoformans*, parásito relacionado con *Leishmania* (ya que sobrevive también gracias a la infección de células de macrófagos) la delección del gen de inositolfosfoceramida (IPC) sintetasa causa inhibición en el crecimiento del parásito en el macrófago y a pH ácido *in vitro*. Sin embargo, IPC sintetasa no es la primera enzima de la biosíntesis de esfingolípidos, con lo cual su delección podría generar acumulación de ceramida tóxica y de esta manera, no se podría asegurar que la biosíntesis de esfingolípidos en *Cryptococcus neoformans* sea requerida solamente para la supervivencia del parásito dentro del macrófago.

En *Trypanosoma cruzi*, al igual que en *Leishmania*, uno de los componentes principales de los fosfolípidos de membrana es inositolfosfoceramida (IPC). Su presencia fue descrita en células epimastigotes (Bertello et al. 1995) y trypomastigotes (Uhrig et al. 1996). En esos trabajos se demostró la síntesis de *novo* de IPC a partir de [<sup>3</sup>H]-palmítico. El análisis mostró ceramidas formadas por dihidroesfingosina o esfingosina con ácidos grasos de 16 y 18 carbonos en epimastigotes y de 16 carbonos en trypomastigotes.

Por otra parte se postuló que IPC podría ser lípido precursor en la biosíntesis de anclas de GPI. Sin embargo, no resultó ser sustrato en la incorporación de GlcNAc, primer paso de la biosíntesis (Bertello et al. 2004), con lo cual la presencia de ceramida en anclas completas unidas a proteína y en LPPG (glicolípido mayoritario), se debería a una reacción posterior de remodelamiento como ocurre en *Saccharomyces cerevisiae*. La presencia de ceramida ha sido descrita en distintas anclas de *T. cruzi*; Ssp4 (glicoproteína marcadora del estadio amastigote, (Bertello et al. 1996)), mucinas del estadio metacíclico (Serrano et al. 1995), trans-sialidasa del estadio metacíclico (Agusti et al. 1998).

### Otros fosfolípidos en *T. cruzi*

Otros fosfolípidos presentes en *T. cruzi* son fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina y sus correspondientes formas liso; los cuales fueron estudiados por incorporación de <sup>14</sup>C-etanolamina y [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico en formas trypomastigotes (Uhrig et al. 1997). Los ácidos grasos encontrados fueron ácido palmítico, ácido esteárico y C18:1. También se ha descrito la presencia de fosfatidilinositol que presentó, en epimastigotes, un residuo lipídico formado por alquilacilglicerol y diacilglicerol al igual que en trypomastigotes, sin embargo, se observaron algunas variaciones en los ácidos grasos: en epimastigotes el alquilacilglicerol se encontró esterificado por ácidos grasos de C18:2 y C18:1. En trypomastigotes el diacilglicerol contenía principalmente C18:0 y C16:0 en menor proporción y el alquilacilglicerol C18:0 solamente. Ambos fosfolípidos (inositolfosfoceramida y fosfatidilinositol) son posibles precursores de anclas de glicosilfosfatidilinositol. Al respecto, es interesante que el ancla de la glicoproteína 1G7 de formas metacíclicas contiene 1-*O*-hexadecil-2-hexadecanoilglicerol y 1-*O*-hexadecil-2-octadecanoilglicerol.

También se ha descrito la presencia de fosfatidilinositol bi y mono- fosfato y se ha demostrado la funcionalidad de la ruta de señalización celular inositolfosfato

/diacilglicerol en *T. cruzi* (Docampo et al. 1991). Por otra parte ha sido descrita también la presencia de ácido fosfatídico y diacilglicerolpirofosfato (Marchesini et al. 1998).

Las técnicas utilizadas para el estudio de fosfolípidos en *T. cruzi* han sido en general técnicas de cromatografía en capa delgada contra testigos de fosfolípidos conocidos y degradaciones químicas y enzimáticas junto con la caracterización de los productos formados. Por otra parte, la única composición de membrana interna descrita hasta el momento ha sido la de la membrana glicosomal (Quinones et al. 2004).

### **Funciones de esfingolípidos**

Los esfingolípidos han sido involucrados en distintos procesos biológicos, lo cual se demostró gracias al uso de técnicas de biología molecular (por ej: obtención de células carentes de algún gen específico lo cual impide la biosíntesis de alguna estructura particular de esfingolípidos) o al tratamiento con inhibidores específicos de la ruta metabólica (ver **Esquema 4**).

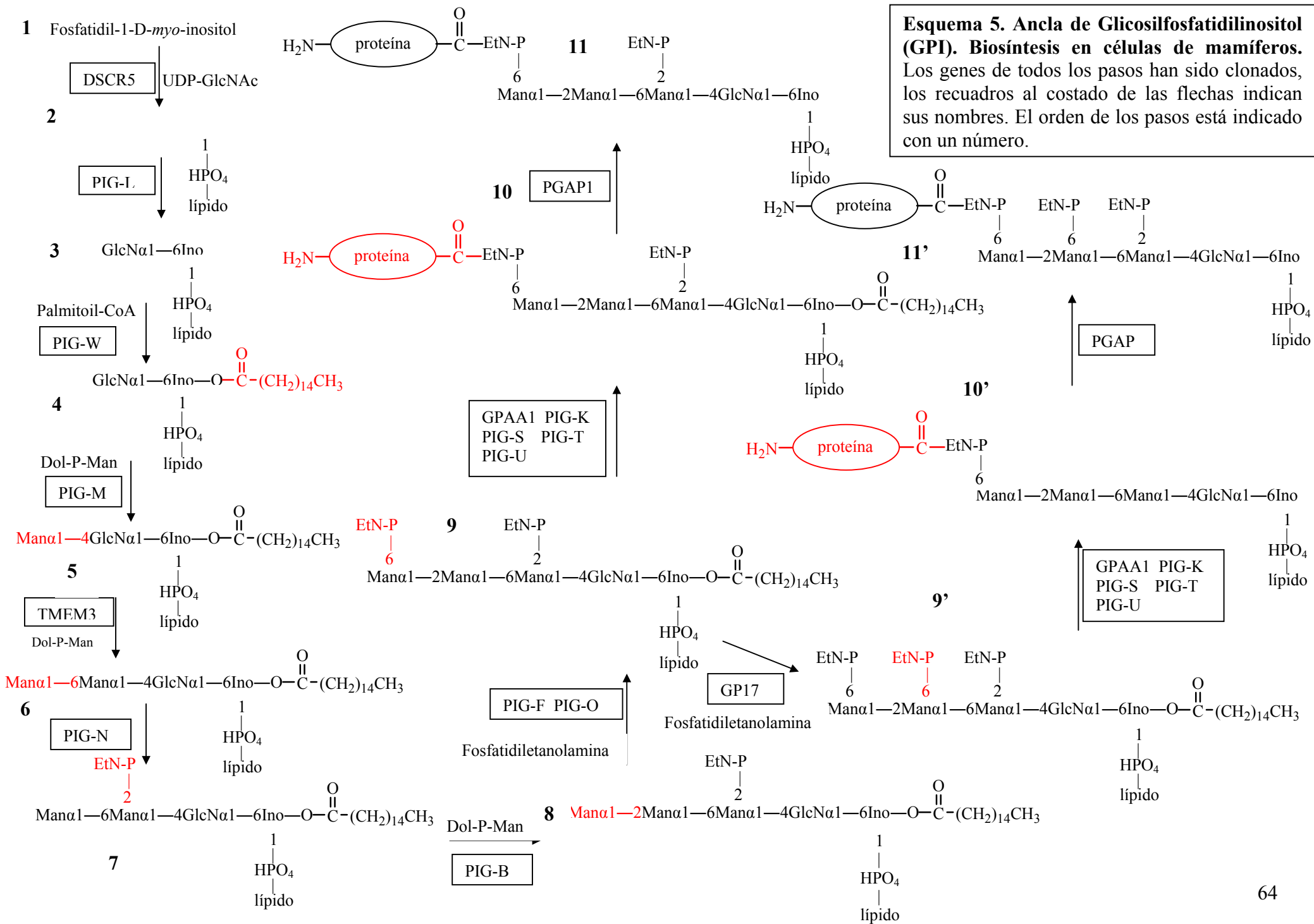
En *S. cerevisiae*, los esfingolípidos han sido involucrados en la respuesta a estrés, homeostasis de calcio, regulación del crecimiento celular, control del ciclo celular, tráfico a la membrana (Dickson 1998) y asociación estable a la membrana de proteínas tipo GPI (Watanabe et al. 2002).

En hongos, los esfingolípidos complejos son esenciales (Nagiec et al. 1997); (Wu et al. 1995). Por otra parte, algunos intermediarios como ceramida y bases de cadena larga poseen un efecto inhibitorio en el crecimiento (Saba et al. 1997; Mandala et al. 1998). Algunos trabajos sugieren que la biosíntesis de esfingolípidos es esencial para el crecimiento en condiciones de estrés. Se ha observado un aumento de 10-100 veces de C20 dihidroesfingosina y fitoesfingosina como consecuencia de un shock de calor (25-30 °C a 37-39 °C) en hongos (Dickson et al. 1997; Jenkins et al. 1997). En otro estudio se demostró que existe un aumento de ceramida de 10 veces como respuesta a un shock de calor, si bien este aumento no ocurre en tiempos cercanos al estímulo presentado (Dickson et al. 1997). Otros esfingolípidos relacionados con la tolerancia al shock de calor han sido dihidroesfingosina-fosfato (DHS-P), fitoesfingosina-fosfato (PHS-P) y ceramida.

**Transporte de proteínas con ancla GPI desde RE al Golgi**

La síntesis de ceramida y de esfingolípidos en el RE es necesaria para el transporte eficiente de proteínas con ancla GPI desde el RE hasta el Aparato de Golgi. En células carentes de esfingolípidos, las proteínas conteniendo el ancla GPI se acumulan en RE (Horvath et al. 1994; Skrzypek et al. 1997; Sutterlin et al. 1997).

---



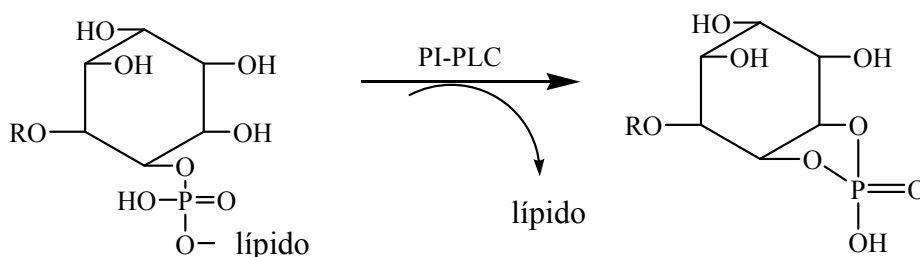
**Esquema 5. Ancla de Glicosilfosfatidilinositol (GPI). Biosíntesis en células de mamíferos.** Los genes de todos los pasos han sido clonados, los recuadros al costado de las flechas indican sus nombres. El orden de los pasos está indicado con un número.



## RESULTADOS

### Biosíntesis de inositolfosfoceramida (IPC) y glicolípidos durante la diferenciación de trypomastigotes a amastigotes en células de mioblastos infectados.

Con el fin de investigar la biosíntesis de IPC durante la diferenciación de trypomastigotes a amastigotes dentro de la célula huésped, se marcaron células de mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> con [<sup>3</sup>H]-inositol (**Fig. 21A**) ó [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico (**Fig. 21B**) durante 24hs y se infectaron con trypomastigotes de *T. cruzi* según lo descrito en materiales y métodos. La **Fig. 21A** muestra el análisis por ccd (solvente A) de los [<sup>3</sup>H]-inositolfosfolípidos ([<sup>3</sup>H]-IPLs) extraídos de células control (líneas 1, 3 y 5) y células infectadas (líneas 2, 4 y 6), luego de distintos tiempos de incubación. Se utilizaron como testigos PI e IPC radioactivos que se obtuvieron según se ha descrito previamente (Bertello et al. 1995). Todos los compuestos con mayor movilidad que [<sup>3</sup>H]-inositol fueron sensibles al tratamiento con PI-PLC, indicando que tienen estructura de IPLs. Esta enzima hidroliza la unión fosfato-lípido según el **Esquema 6**.



IPL: R = H

GIPL: R = glicano

IPC: lípido = ceramida

PI: lípido = alquilacilglicerol (AAG) o diacilglicerol (DAG)

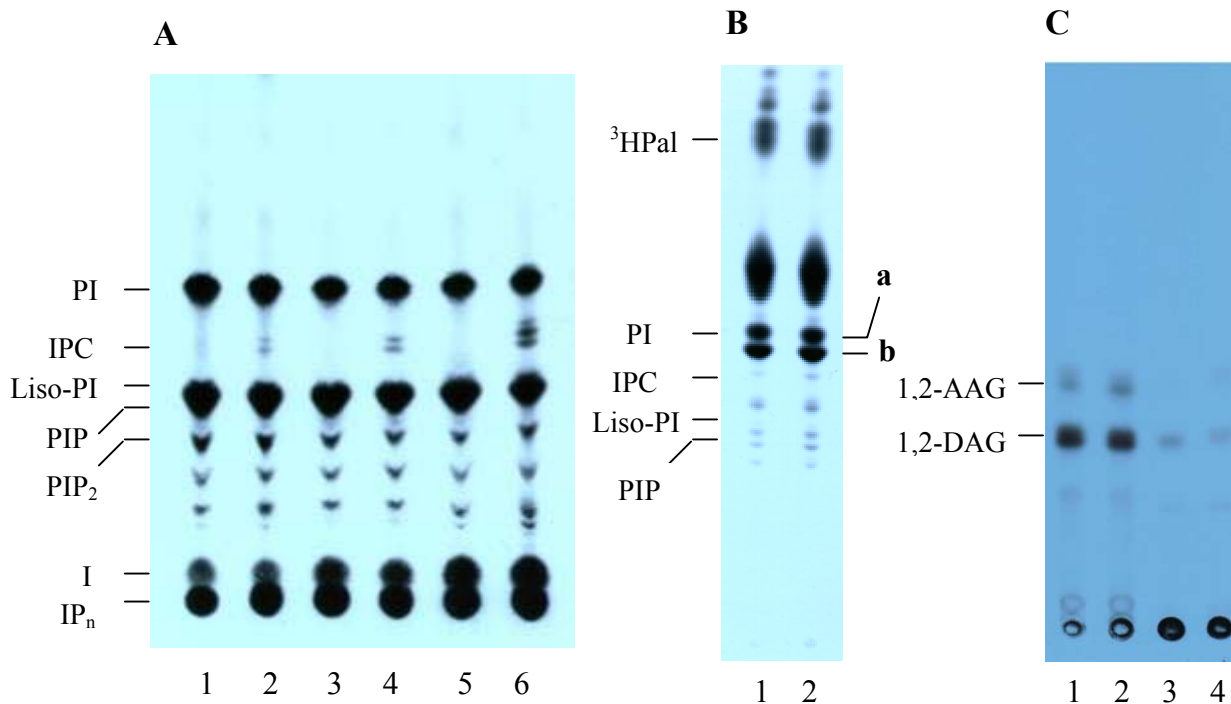
**Esquema 6**

Los compuestos de menor movilidad que PI, correspondientes a IPC, se observaron en las células infectadas (**Fig. 21A**, línea 2), y no en las células control (**Fig. 21A**, línea 1), luego de 18hs de incubación; y su cantidad aumentaba con el tiempo (24 y 48hs, **Fig. 21A**, líneas 4 y 6 respectivamente). El análisis de las muestras de 6 y 12hs de incubación no mostró ninguna diferencia entre las células control y las infectadas y no se incluyen en la **Fig 21**. Cuando estos experimentos se repitieron con mioblastos marcados con [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico en lugar de [<sup>3</sup>H]-inositol, no se observó IPC en las

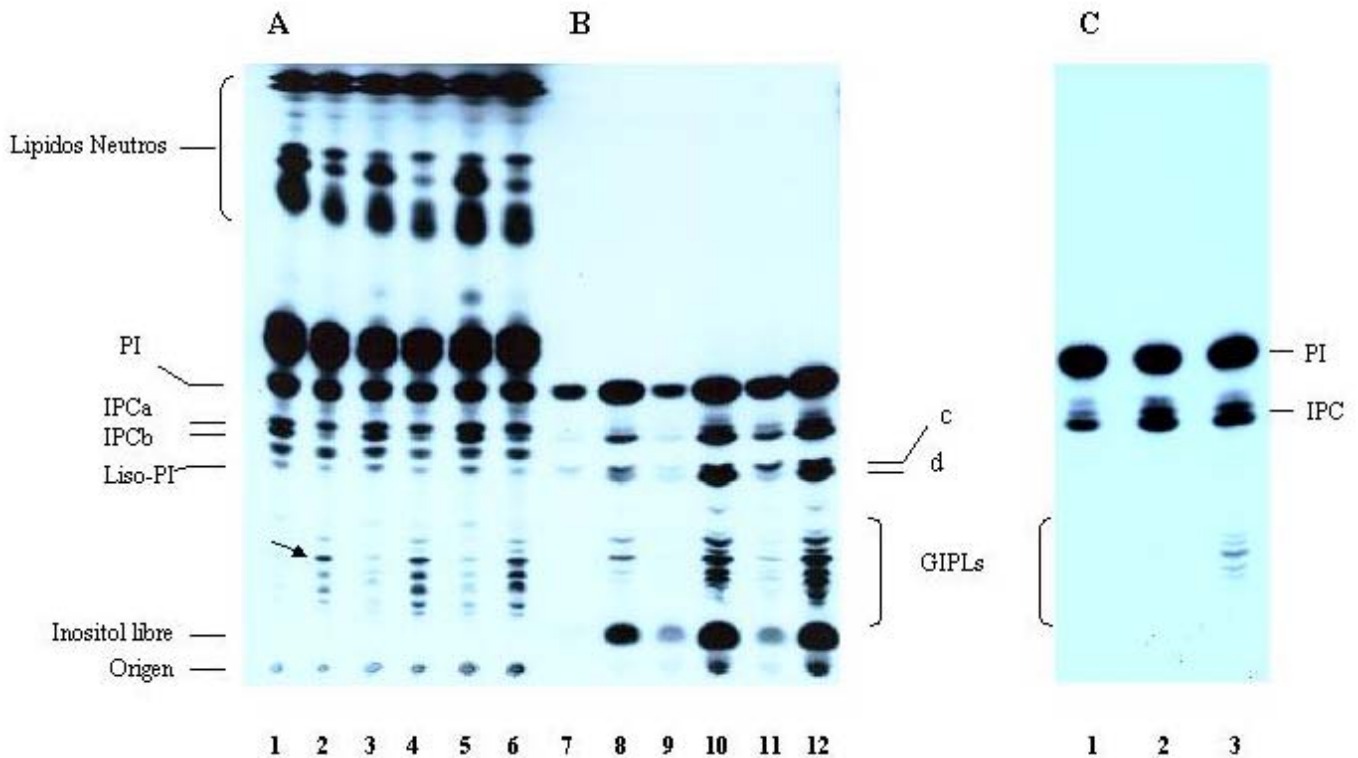
células control ni en las infectadas luego de 24hs de incubación (**Fig. 21B**). Estos resultados sugieren que el inositol incorporado en IPC proviene del [<sup>3</sup>H]-inositol incorporado por mioblastos, mientras que la ceramida es biosintetizada por el parásito. La estructura de [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico-PI, compuesto “a”, (**Fig. 21B**, líneas 1 y 2) se confirmó por elución, tratamiento con PI-PLC y ccd con el solvente D con testigos de AAG y DAG (**Fig. 21C**, líneas 1 y 2). El compuesto “b” no fue sensible al tratamiento con PI-PLC lo cual descartó la posible presencia de IPC (**Fig. 21C**, líneas 3 y 4). La ausencia de ceramida se confirmó por elución del origen (**Fig. 21C**, líneas 3 y 4) y ccd en el solvente C (esta placa no se muestra). Se trataría de un fosfolípido que no contiene inositol, presente en las células de mioblastos. Los resultados de este experimento también confirman la ausencia de IPC sintasa en células de mamífero.

### **Síntesis de IPC durante la diferenciación *in vitro* de trypomastigotes a amastigotes.**

También se estudió la biosíntesis de IPC durante la diferenciación de trypomastigotes a amastigotes *in vitro* inducida a bajo pH extracelular (Tomlinson et al. 1995). Al igual que lo descrito anteriormente (Tomlinson et al. 1995) se observó que ~70% de las células se redondearon, como amastigotes, luego de 5hs de incubación a pH 5,0, sin embargo, no se vieron cambios morfológicos en los trypomastigotes incubados a pH 7,5. [<sup>3</sup>H]-Ácido palmítico (**Fig. 22A**) y [<sup>3</sup>H]-inositol (**Fig. 22B**) se incorporaron en PI e IPC. El análisis por ccd de los lípidos de ambas incubaciones puede verse en la **Fig. 22 (A y B)**.



**Figura 21. Análisis de los inositolfosfolípidos (IPLs) de mioblastos infectados con trypomastigotes de *T. cruzi*.** (A)  $1 \times 10^7$  células de mioblastos se marcaron con [ $^3\text{H}$ ]-inositol durante 24hs. Luego de ese tiempo, las células se lavaron e infectaron con  $5 \times 10^8$  trypomastigotes durante 3 h. Se removieron los trypomastigotes extracelulares junto con el sobrenadante de incubación y los mioblastos infectados se incubaron durante distintos tiempos en medio fresco (18, 24 y 48hs; líneas 2, 4 y 6 respectivamente). Un control de células no infectadas se preparó de la misma manera (líneas 1, 3, y 5). (B)  $1 \times 10^7$  células de mioblastos marcadas con [ $^3\text{H}$ ]-ácido palmítico e infectadas según lo descrito para A se incubaron durante 24hs (línea 2). Un control de células no infectadas se muestra en la línea 1. Luego de las incubaciones (A y B), los lípidos marcados se extrajeron y analizaron por ccd con el solvente de desarrollo A. (C) Los compuestos “a” y “b” (Fig. 21B, líneas 1 y 2) se eluyeron por separado y se trataron con PI-PLC. Luego de extraer con butanol, se cromatografiaron en el solvente D. Líneas 1 y 2, compuesto “a” tratado (Fig. 21B, líneas 1 y 2 respectivamente). Líneas 3 y 4, compuesto “b” con igual tratamiento (Fig. 21B, líneas 1 y 2 respectivamente). Las posiciones de los testigos se indican sobre la izquierda. PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol-4,5-bis-fosfato; I, inositol; IP<sub>n</sub>, inositolfosfatos; PI, fosfatidilinositol; liso-PI, lisofosfatidilinositol; IPC, inositolfosfoceramida; [ $^3\text{H}$ ]-Pal, [ $^3\text{H}$ ]-ácido palmítico.



**Figura 22. Análisis de los IPLs durante la diferenciación *in vitro* de trypomastigotes.**

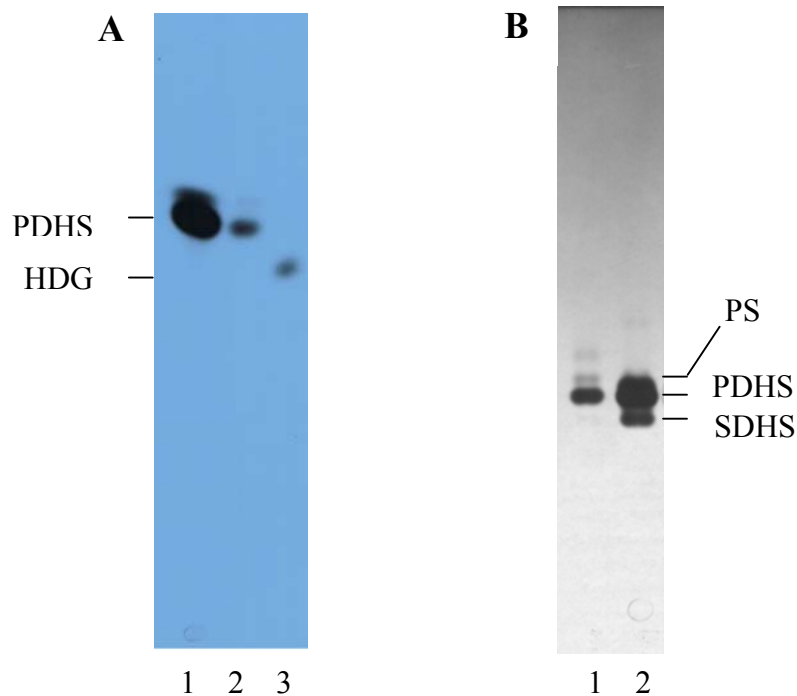
(A y B) Trypomastigotes de *T. cruzi*, obtenidos de cultivos de mioblastos, se incubaron con (A) [ $^3\text{H}$ ]-ácido palmítico, a pH 7,5 durante 2, 4, y 6hs (líneas 1, 3 y 5, respectivamente) o a pH 5,0 durante los mismos tiempos (líneas 2, 4 y 6) o (B) con [ $^3\text{H}$ ]-inositol, a pH 7,5 durante 2, 4 y 6 h (líneas 7, 9 y 11 respectivamente) o a pH 5,0 durante los mismos tiempos (líneas 8, 10 y 12). (C) Trypomastigotes se incubaron con [ $^3\text{H}$ ]-inositol durante 5hs. Luego de ese tiempo,  $10^8$  células se extrajeron (línea 1) o se incubaron por un tiempo adicional de 5hs a pH 7,5 (línea 2) o a pH 5,0 (línea 3). Los lípidos se extrajeron y analizaron por ccd en el solvente A. La flecha muestra el GIPL mayoritario marcado con [ $^3\text{H}$ ]-ácido palmítico. c y d muestran bandas correspondientes a los liso-PIs. Los lípidos menos polares se marcaron solamente con ácido palmítico y corresponderían a lípidos neutros (panel A)

### Caracterización de las inositolfosfoceramidas (IPCs)

Se detectaron dos bandas correspondientes a IPC (IPCa e IPCb), que habían sido descritas con anterioridad en trypomastigotes (Uhrig et al. 1996). Los compuestos se caracterizaron por tratamiento con PI-PLC, PLA<sub>2</sub> y saponificación (Tabla 3). Se observó degradación de las IPCs sólo por PI-PLC. Sus estructuras se confirmaron por identificación de las ceramidas liberadas por la PI-PLC por ccd en fase normal (Fig. 23A) y fase reversa (Fig. 23B) en los solventes C y F, respectivamente.

**Tabla 3. Caracterización de IPCs (IPC<sub>a</sub> + IPC<sub>b</sub>, Fig. 22A).** IPCs se eluyeron de la placa de la Fig. 22A (líneas 1, 3 y 5) y se trataron con PI-PLC (*B. thuringiensis*), NaOH 0,1M, y PLA<sub>2</sub> (*bee venom*). Luego de cada tratamiento, los lípidos se extrajeron con butanol y se analizaron por ccd en el solvente A y fluorografía.

| Tratamiento | control | PI-PLC | NaOH<br>0,1M | PLA <sub>2</sub> |                  |
|-------------|---------|--------|--------------|------------------|------------------|
| Resultado   | -       | +      | -            | IPC <sub>a</sub> | IPC <sub>b</sub> |
|             |         |        |              | -                | -                |



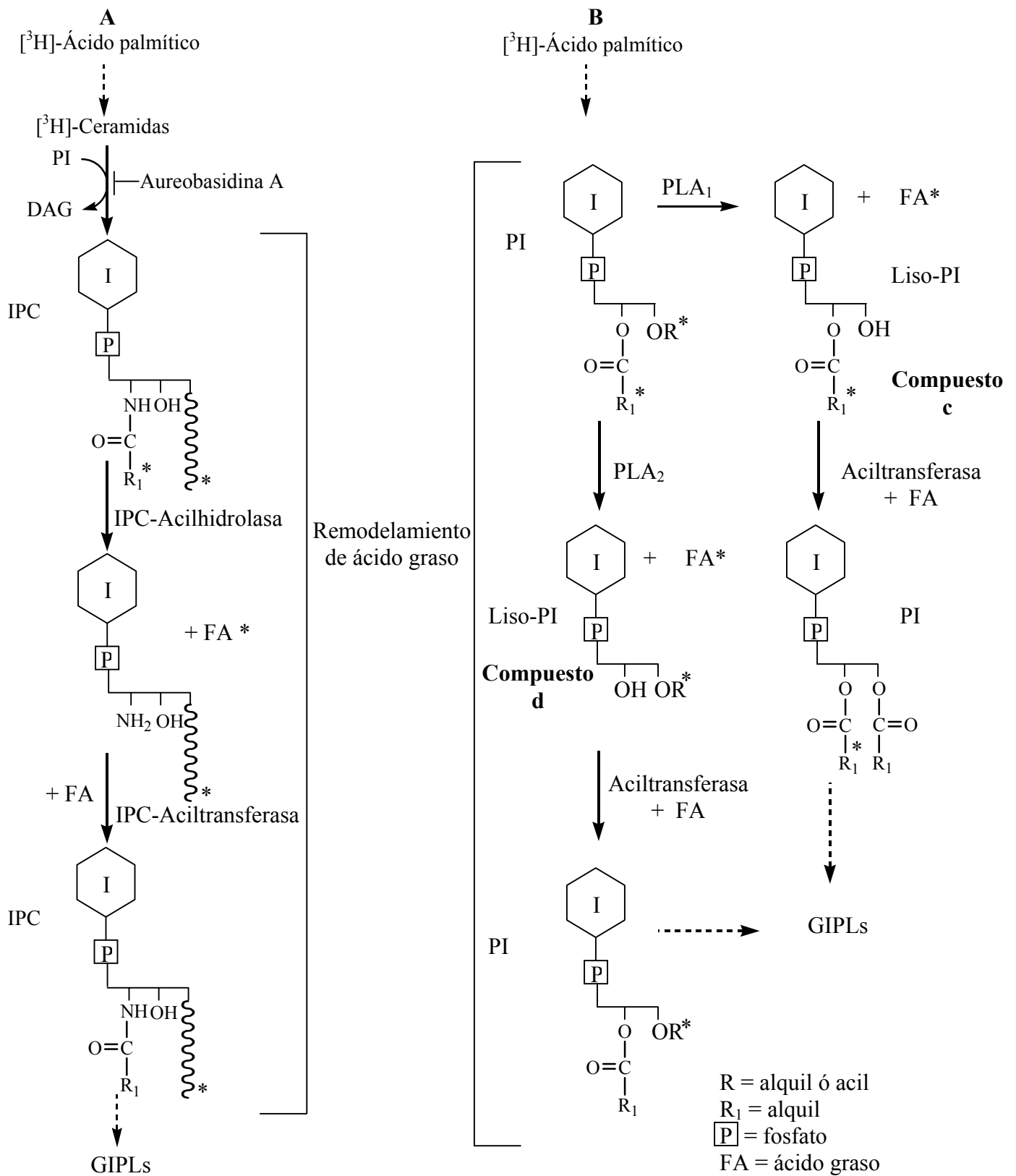
**Figura 23. Análisis de las ceramidas en los IPCs de amastigotes marcados con [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico (Fig. 22A).** Las IPCs se eluyeron de la placa de la Fig. 22A y se trataron con PI-PLC de *B. thuringiensis*. Los lípidos se extrajeron y analizaron por: (A)- ccd-fase normal en el solvente C. **1**, ceramidas liberadas de las IPCs de líneas 1, 3 y 5 de la Fig. 22A; **2**, ceramidas liberadas de IPCs de líneas 2, 4 y 6, Fig. 22A; **3**, testigo de hexadecilglicerol (HDG). (B) ccd-fase reversa, solvente F. **1**, ceramidas liberadas de IPCs de líneas 2, 4 y 6, Fig. 22A. Las ceramidas obtenidas de IPCs de epimastigotes (Bertello et al. 1995) se muestran en la línea 2. SDHS, estearoildihidroesfingosina; PS, palmitoilesfingosina; PDHS, palmitoildihidroesfingosina.

Se determinó que la ceramida correspondía principalmente a palmitoildihidroesfingosina (PDHS) en IPCa, la cual es la más abundante en amastigotes marcados con [ $^3\text{H}$ ]-palmitico (ver **Fig. 22A**) y palmitoilesfingosina (PS) en IPCb (**Fig. 23B**, línea 1).

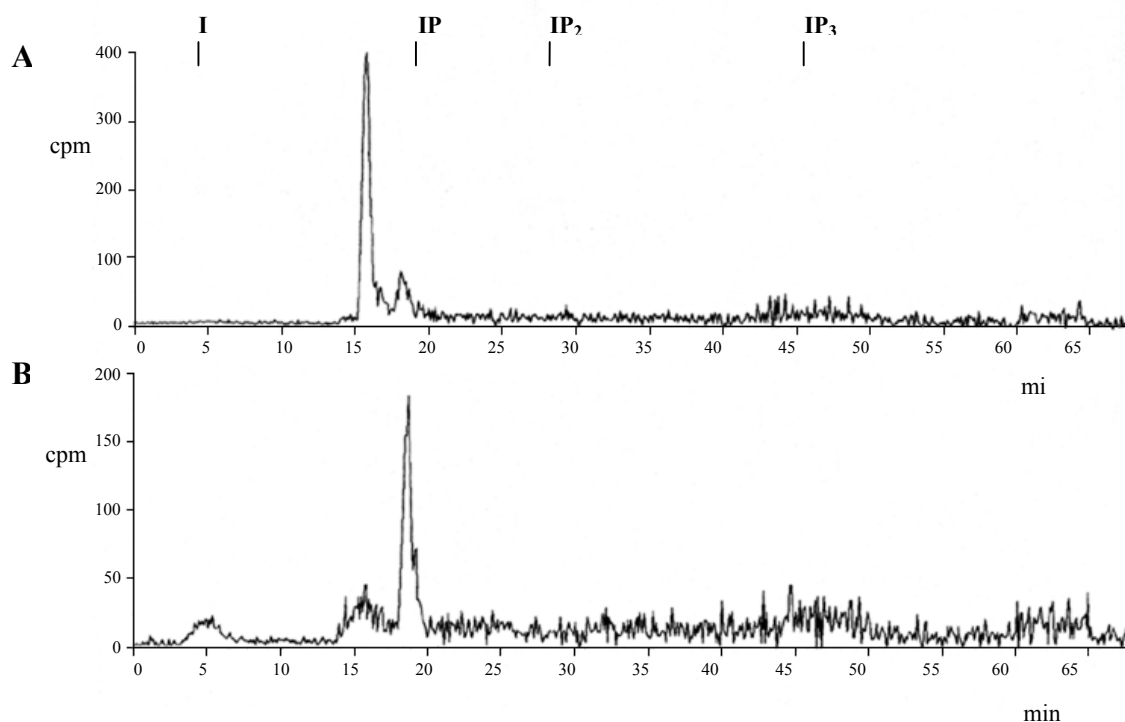
IPCb fue más abundante en las muestras marcadas con [ $^3\text{H}$ ]-inositol luego de 2-6 h de incubación (**Fig. 22B**, líneas 8, 10 y 12), mientras que fue un componente minoritario cuando las células se marcaron con [ $^3\text{H}$ ]-ácido palmítico (**Fig. 22A**, líneas 2, 4 y 6). Esto sugiere que reacciones de remodelamiento, que introducen una ceramida no marcada o un ácido graso no marcado (ácido palmítico u otro ácido graso que no afecte la movilidad de IPCb), ocurren sobre IPCb. La ruta propuesta para el remodelamiento involucra la acción de una IPC acilhidrolasa y de una IPC-acil transferasa (**Fig. 24A**).

### **Caracterización de los lisofosfatidilinositol (liso-PI)**

El compuesto marcado con [ $^3\text{H}$ ]-inositol que tiene la movilidad de lisofosfatidilinositol (liso-PI) o fosfatidilinositol-mono-fosfato (PIP) (indiferenciables por ccd, banda doble c y d, **Fig. 22B**) se eluyó de la placa y se trató con PI-PLC. Sólo inositol-fosfato (IP) y no inositol-bis-fosfato (IP<sub>2</sub>) fue detectado por HPLC (**Fig. 25**), excluyendo la posible presencia de PIP. En la **Fig. 24** se pueden ver las fórmulas de los liso-PI.



**Figura 24. Remodelamiento de ácidos grasos de IPC (A) y de PI (B) de *T. cruzi*. La inhibición en la biosíntesis de IPC y de GIPLs por Aureobasidina A se muestra en el panel A.**



**Figura 25. HPLC de los compuestos c y d marcados con  $[^3\text{H}]$ -inositol (Fig. 22B) y tratados con PI-PLC.** (A) Los compuestos c y d (Fig. 22B) se eluyeron de la placa con cloroformo-metanol-agua (10:10:3), se trataron con PI-PLC (*B. thuringiensis*, 0.35 U a 37 °C durante 2 h) y se analizaron por HPLC junto con AMP, ADP, y GTP como testigos internos (Docampo et al. 1991). (B) Idem A pero con un tratamiento adicional de ácido (HCl 0,1N, 1 h, temperatura ambiente, seguido de neutralización con NaOH 0,2N) para abrir el fosfato cíclico formado luego de la hidrólisis con PI-PLC (ver Esquema 6). Los tiempos de elución de los testigos de inositol (I), inositol 1-fosfato (IP), inositol 1,4-bis-fosfato (IP<sub>2</sub>) e inositol 1,4,5-tri-fosfato (IP<sub>3</sub>) se muestran sobre el cromatograma.

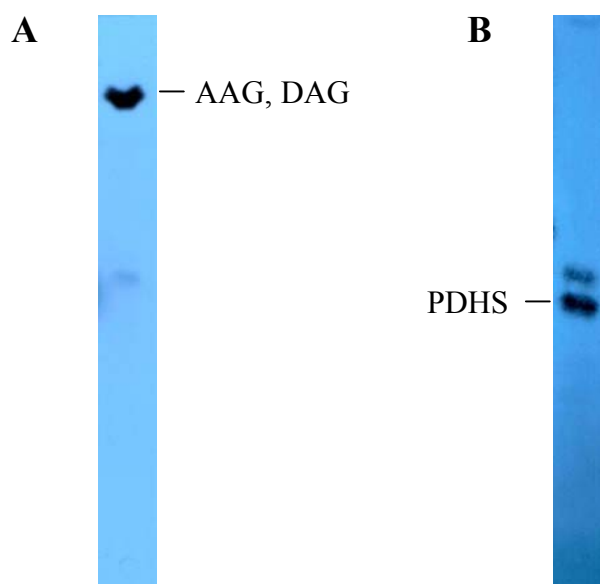
El tratamiento con PLA<sub>2</sub> de la banda doble (c más d), eluida de la placa de la Fig. 22B, mostró una disminución en el R<sub>f</sub> de la banda c. Esta enzima libera el ácido graso de la posición 2 de un fosfolípido que contenga AAG/DAG (Fig. 24). Esto indica que se trataba del 2-*O*-acil derivado, formado por la acción de una PLA<sub>1</sub> endógena sobre PI. Cuando se saponificó la banda d, seguido de partición en agua-butanol, la radioactividad se distribuyó entre las dos fases. La radioactividad de la fase acuosa, correspondería originalmente al 1-*O*-acil-lisoPI que, al saponificarse se extraería en agua y la de la fase butanol correspondería al 1-*O*-alquil-liso PI insaponificable, los dos



originariamente formados por la acción de una PLA<sub>2</sub> endógena. La **Fig. 24B** sugiere un posible mecanismo de remodelamiento. Un resultado similar fue descrito previamente para epimastigotes con IPLs marcados con [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico (Bertello et al. 2000). Los liso-PIs se marcaron fuertemente con [<sup>3</sup>H]-inositol y sólo levemente con [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico (**Fig. 22A y B**), sugiriendo que existe un remodelamiento de los ácidos grasos en PI, o sea, se liberaría un ácido graso marcado por acción de una fosfolipasa A y entraría uno frío del medio por acción de una aciltransferasa.

### Caracterización de los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs)

Ambos precursores también se incorporaron en los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) (**Fig. 22A y B**). El tipo de lípidos presente en los GIPLs fue confirmado por tratamiento con PI-PLC y análisis por ccd en el solvente C (**Fig. 26A y B**).



**Figura 26. Análisis de los lípidos liberados de GIPLs por tratamiento con PI-PLC.** (A)- El GIPL mayoritario (**Fig. 22A**, línea 2, flecha) y (B)- los GIPLs más polares formados en tiempos de incubación más prolongados (**Fig. 22A**, línea 6) se extrajeron y trataron con PI-PLC de *B. thuringiensis*. Los lípidos liberados se analizaron por ccd en el solvente C. Las estructuras fueron confirmadas por elución y análisis por ccd en el solvente D para el caso de AAG y solvente E para el caso de las ceramidas.

### Remodelamiento de ácidos grasos en PI

Cuando se utilizó [<sup>3</sup>H]-inositol como precursor se observó un aumento en la marcación de PI durante la diferenciación (**Fig. 22B**, líneas 8, 10, 12); sin embargo, con

[<sup>3</sup>H]-ácido palmítico como precursor, no se observó un aumento significativo; esto indica nuevamente que un remodelamiento tiene lugar sobre los ácidos grasos de PI por acción de una PLA endógena y de una aciltransferasa (**Fig. 24B**).

### **Aumento de inositol libre en la diferenciación**

La presencia de inositol libre (**Fig. 22B**) fue confirmada por HPLC con iguales condiciones que en la **Fig. 25**. La presencia de inositolfosfatos en la siembra (**Fig. 22B**) fue confirmada por elución, tratamiento con fosfatasa alcalina e identificación de [<sup>3</sup>H]-inositol libre por ccd y HPLC. La gran cantidad de inositol detectada durante la diferenciación (**Fig. 22B**, líneas 8, 10 y 12) sugiere la acción de una PI-PLC más activa, que libera IPs que son subsecuentemente hidrolizados por inositolfosfatasas. Al respecto, se ha demostrado recientemente la importancia de la TcPI-PLC de *T. cruzi* durante la diferenciación de trypomastigotes a amastigotes (Okura et al. 2005).

Con el fin de confirmar que el aumento en la marcación de IPC y de GIPLs en parásitos diferenciados no es el resultado de un aumento en la incorporación de inositol a pH 5,0 se realizó un experimento control, en el cual las células fueron marcadas antes de la incubación a pH 5,0 (**Fig. 22C**, página 68). Trypomastigotes marcados con [<sup>3</sup>H]-inositol durante 4 h (**Fig. 22C**, línea 1) fueron lavados e incubados durante 5h más a pH 7,5 (**Fig. 22C**, línea 2) o a pH 5,0 (**Fig. 22C**, línea 3). No se observó un aumento mayor en la marcación de IPCs a pH 5,0 (**Fig. 22C**, línea 3) con respecto a pH 7,5 (**Fig. 22C**, línea 2). Por el contrario se observó una menor marcación en IPC (**Fig. 22C**, línea 3) lo cual sugiere que las IPCs fueron usadas para la biosíntesis de GIPLs y que las diferencias en la **Fig. 22A** y **B** no se debieron a un aumento en la incorporación de inositol a pH ácido.

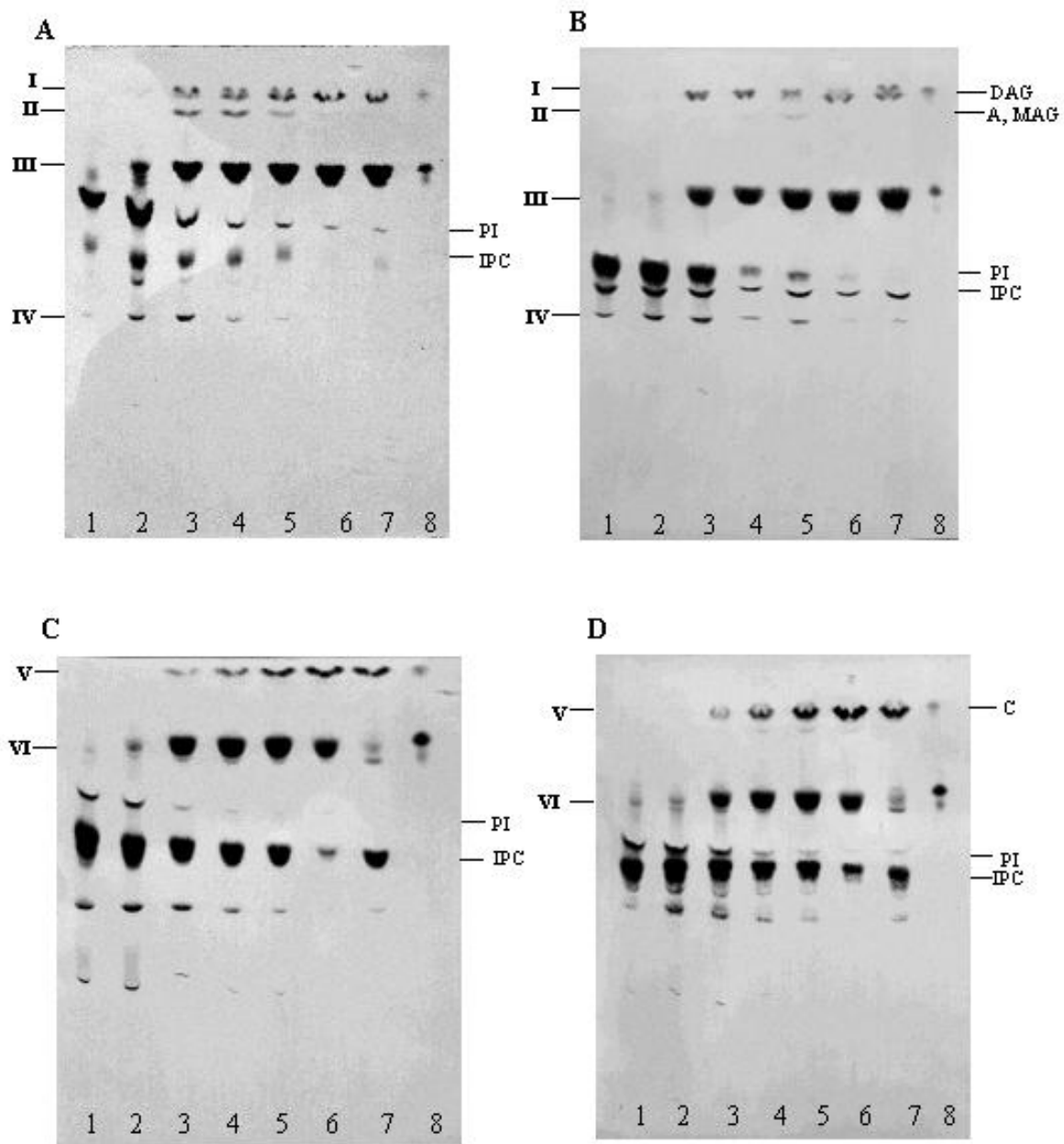
### **Fosfolipasas activas sobre PI en amastigotes y trypomastigotes.**

Con el fin de confirmar la presencia de PI-PLC y PLA en membranas y fracciones solubles de amastigotes y trypomastigotes de *T. cruzi* se usaron [<sup>3</sup>H]-IPLs como sustratos exógenos. Los [<sup>3</sup>H]-IPLs fueron aislados de epimastigotes de *T. cruzi* marcados metabólicamente con [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico y se separaron en PI e IPC (Bertello et al. 1995). La **Fig. 27** muestra los resultados de la incubación de [<sup>3</sup>H]-PI con membranas de amastigotes (**Fig. 27A**, líneas 2-6) y trypomastigotes (**Fig. 27B**, líneas 2-

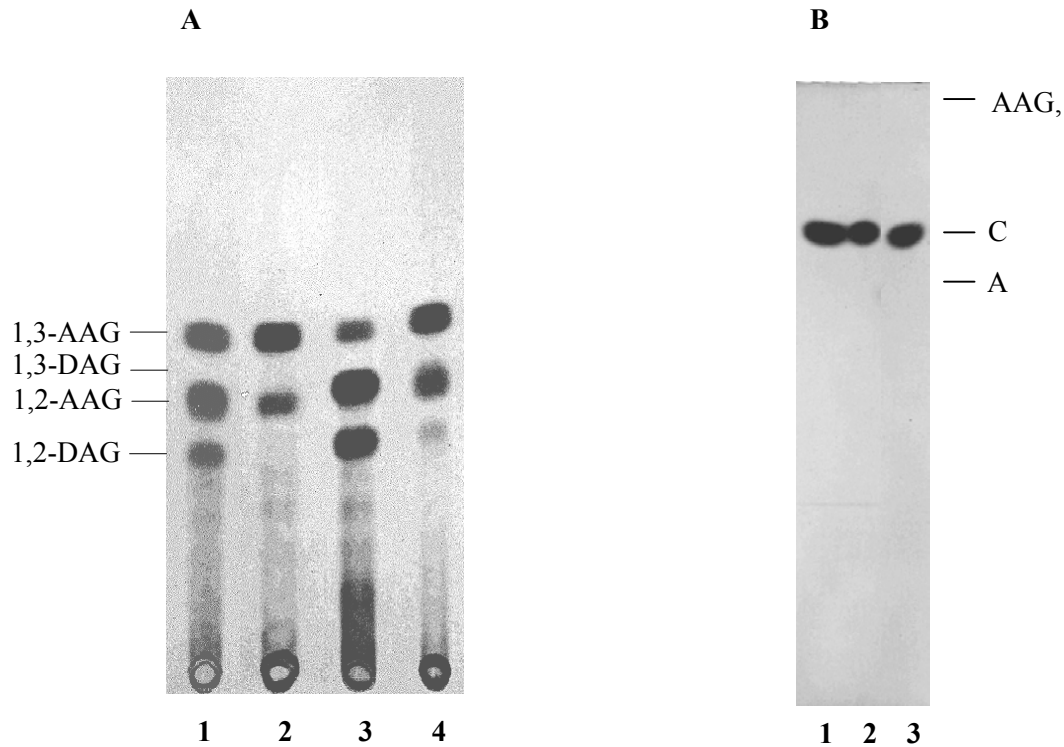
6) durante distintos tiempos (5, 15, 60 y 120 min y 18hs). Además se analizó la actividad en el sobrenadante de la preparación de membranas en una incubación de 18hs (**Fig. 27**, líneas 7). Luego de los tiempos indicados, los lípidos se extrajeron y analizaron por ccd en el solvente E. La formación de lípidos menos polares se observó en todas las líneas menos en aquellas correspondientes a los controles incubados con el buffer sin membranas (**Fig. 27A y 27B**, línea 1).

Los compuestos de mayor movilidad (**I**, **Fig. 27A y B**) se eluyeron de la placa y recromatografiaron en el solvente D (**Fig. 28**). A tiempos cortos de incubación (15-60 minutos, **Fig. 28A**, línea 1) se detectaron 1,2-alquilacilglicerol (AAG) y 1,2-di-*O*-palmitoilglicerol (DAG) (producidos por la acción de una PI-PLC endógena) junto con la formación de 1,3-AAG. La migración del acilo de la posición 2 a la posición 3 más estable fue observada previamente (Kodali et al. 1990). La ausencia de 1,2-DAG luego de 2h de incubación (**Fig. 28A**, línea 2) sugiere que una aciltransferasa introduce un ácido graso no marcado luego de la acción de una PLA<sub>1</sub> y una PLA<sub>2</sub> sobre PI.

La estructura del compuesto **II** de la **Fig. 27** fue confirmada por saponificación. Luego de este tratamiento, la radioactividad se extrajo con butanol y mostró por ccd en el solvente D que correspondía a un ácido graso. La presencia de monoacilglicerol (compuesto **II**, **Fig. 27A**) probablemente se debe a la hidrólisis de un liso-PI por acción de una PI-PLC. Esto sugiere que una PLA de amastigotes, probablemente una PLA<sub>1</sub>, actúa más rápido sobre el DAG del PI marcado que la PI-PLC. Esta actividad sería menor en trypomastigotes (**Fig. 27B**), ya que durante esta incubación se forma menos monoacilglicerol (compuesto **II**). El PI conteniendo AAG no es sustrato para la PLA<sub>1</sub>. En efecto, se observa que la radioactividad total de AAG (1,2 AAG + 1,3 AAG, **Fig. 28**) no cambia significativamente con el tiempo de incubación.



**Figura 27. Fosfolipasas activas sobre PI e IPC en amastigotes y trypomastigotes de *T. cruzi*.** [ $^3\text{H}$ ]-Ácido palmítico-PI (A y B) y [ $^3\text{H}$ ]-Ácido palmítico-IPC (C y D) fueron purificados a partir de epimastigotes marcados metabólicamente con [ $^3\text{H}$ ]-ácido palmítico y se incubaron con la fracción de membranas de amastigotes (A y C) o trypomastigotes (B y D) durante distintos tiempos (5 minutos, línea 2; 15 minutos línea 3; 1 h, línea 4; 2 h, línea 5; 18 h, línea 6). Un sobrenadante de la preparación de membranas se incubó durante 18h con los sustratos radioactivos (línea 7). El experimento control consistió en el sustrato incubado solamente con el buffer durante 18 h (línea 1). Un testigo de [ $^3\text{H}$ ]-ácido palmítico se muestra en la línea 8. Cada una de las incubaciones se realizó con 250,000 cpm de sustrato. Luego de la incubación, los lípidos se extrajeron como lo descrito en materiales y métodos y se analizaron por ccd en el solvente B. La posición de los testigos se indica a la derecha: A, alquilglicerol; MAG, monoacilglicerol; C, ceramida. La caracterización de los compuestos I al VI se describe más abajo.



**Figura 28. Análisis de los lípidos liberados durante la incubación de PI (A) o IPC (B) con membranas de amastigotes y trypomastigotes de *T. cruzi*.** (A) El compuesto I se eluyó de la placa de la Fig. 27A y B y se recromatografió en el solvente D. Línea 1, compuesto I (líneas 3 y 4, Fig. 27A); línea 2, compuesto I (líneas 5 y 6, Fig. 27A); línea 3, compuesto I (líneas 3 y 4, Fig. 27B); línea 4, compuesto I (línea 5 y 6, Fig. 27B). (B) El compuesto V se eluyó de la placa que se muestra en la Fig. 27C y D, y se recromatografió en el solvente C. Línea 1, ceramida obtenida de epimastigotes; línea 2, compuesto V (Fig. 27C) de amastigotes; línea 3, compuesto V (Fig. 27D) de trypomastigotes. C, ceramida; A, alquilcilglicerol. La caracterización de los compuestos I-VI se describe en el texto.

El producto mayoritario liberado durante la incubación de PI marcado con membranas de amastigotes y trypomastigotes fue un ácido graso (compuesto III, Fig. 27A y B). En amastigotes, dicha liberación fue más rápida (5 minutos). También se observa, en el caso de la incubación con membranas de amastigotes, que la mayor parte de PI es degradado luego de 15 min, mientras que una cantidad considerable de PI se observa en una incubación con cantidades equivalentes de membranas de trypomastigotes. El compuesto IV tiene la movilidad de un liso-PI generado por la actividad de una PLA endógena. Para la identificación del lípido IV (Fig. 27A y B), las muestras se eluyeron de la placa y se trataron con PLA<sub>2</sub> de *A. mellifera*. La liberación

de ácido graso se detectó por ccd y se confirmó que un 2-*O*-acil-glicerofosfoinositol es parte del liso-PI y sustrato para la enzima comercial PLA<sub>2</sub>. El 2-*O*-acil derivado se originó por la acción de una PLA<sub>1</sub> endógena sobre el DAG de PI. Parte de los liso-PIs no fueron degradados por la PLA<sub>2</sub>; esto sugiere la acción de una PLA<sub>2</sub> endógena durante la incubación de PI con membranas. En relación con esto, el tratamiento de [<sup>3</sup>H]-inositol-liso-PI eluído de la placa mostrada en la **Fig. 22B** (bandas c y d), muestra que solo la banda superior fue sustrato para la PLA<sub>2</sub> comercial y confirma la acción de una PLA<sub>1</sub> endógena sobre PI (**Fig. 24B**).

Además, las actividades de PI-PLC y PLA están presentes en la fracción soluble de amastigotes y trypomastigotes (**Fig. 27A y B**, línea 7). En referencia a esto, una actividad lysosomal PLA<sub>1</sub> fue detectada en *T. cruzi* utilizando fosfatidilcolina como sustrato (Wainszelbaum et al. 2001) y actividades de PLA<sub>1</sub> y PLA<sub>2</sub> fueron también descritas en membranas de epimastigotes (Bertello et al. 2000).

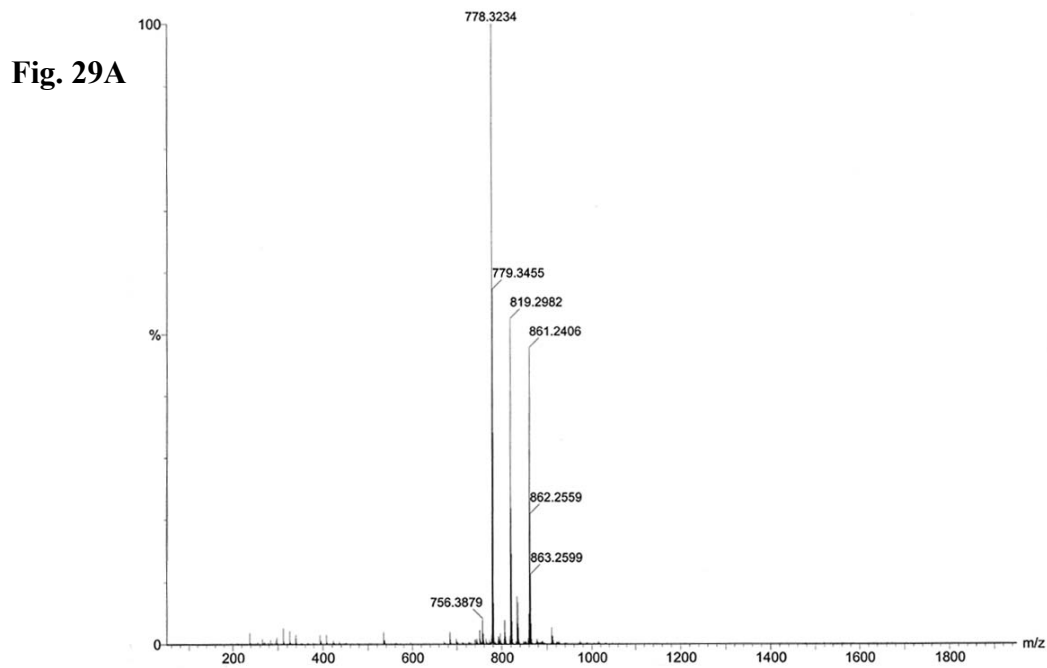
### **Fosfolipasas en amastigotes y trypomastigotes activas sobre IPC.**

Para investigar la presencia de actividades enzimáticas de IPC-fosfolipasas y ácido graso-hidrolasas, se incubó [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico IPC con fracciones de membranas y solubles de amastigotes (**Fig. 27C**) y trypomastigotes (**Fig. 27D**). El compuesto de mayor movilidad (compuesto V; **Fig. 27C y D**) fue identificado como ceramida por elución y análisis por ccd (**Fig. 28B**, líneas 2 y 3, respectivamente). Este lípido se forma por acción de una IPC-PLC endógena. La ceramida liberada en una incubación con membranas de epimastigotes se muestra como control (**Fig. 28B**, línea 1). Durante la incubación de IPC con membranas de amastigotes y trypomastigotes, también se libera ácido graso (banda VI, **Fig. 27C y 27D**). Sin embargo, la actividad de IPC-acilhidrolasa no es soluble (**Fig. 27C y D**, líneas 7). La baja cantidad de ácido graso detectado luego de la incubación con la fracción soluble, puede originarse por las trazas de PI presente en la muestra original de IPC.

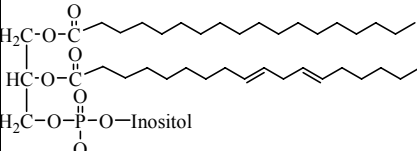
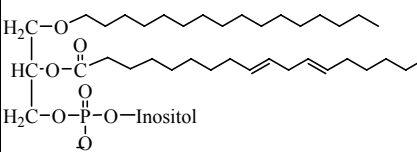
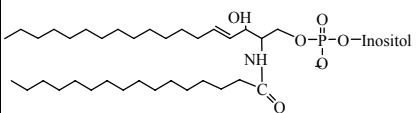
### **Análisis de los IPLs durante la diferenciación *in vitro* de trypomastigotes por Electrospray / Espectrometría de masa (ESI/MS)**

Con el fin de confirmar la existencia de reacciones de remodelamiento sobre PI e IPC, se analizaron los inositolfosfolípidos durante la diferenciación de trypomastigotes *in vitro* por Espectrometría de Masa con ionización por Electrospray, en modo negativo.

Para poner a punto el método y confirmar las estructuras descritas previamente (Bertello et al. 1995), se analizó primero la fracción de inositolfosfolípidos de epimastigotes (**Fig. 29A**). Se observó la presencia de los iones moleculares  $m/z$  778,3, 819,3 y 861,2, correspondientes a inositolfosfoceramida, fosfatidilinositol conteniendo alquilacilglicerol y fosfatidilinositol conteniendo diacilglicerol, respectivamente. La tabla de la **Fig. 29B** muestra las estructuras correspondientes a cada ión molecular. Un análisis detallado de las rupturas que permitió resumir dichas conclusiones se detalla en la **Fig. 31**.



## B

| Ión Molecular [M-H] <sup>-</sup> | Nombre                                   | Estructura  |
|----------------------------------|--|---|
| 861,2                            | 1-Estearoil(2-linoleil)3-fosfoinositol   |  |
| 819,3                            | 1-O-Hexadecil(2-linoleil)3-fosfoinositol |  |
| 778,3                            | Inositolfosfo[N-(palmitoil)esfingosina]  |  |

**Figura 29- Análisis de los inositolfosfolípidos presentes en epimastigotes de *T. cruzi* por Espectrometría de Masa con ionización por Electrospray, en modo negativo. (A)** Los extractos de inositolfosfolípidos de células epimastigotes se obtuvieron como lo descrito en materiales y métodos y se analizaron por Espectrometría de Masa con ionización por Electrospray, en modo negativo. **(B)** Las estructuras de los iones fueron asignadas a partir de los espectros en tandem (MS / MS) de cada ión molecular y análisis de las rupturas. Un análisis detallado de las mismas se muestra en la **Fig. 31**.

Al igual que lo descrito previamente para otros sistemas (Koivusalo et al. 2001), la caracterización de los fosfolípidos por ccd coincide con el análisis por Espectrometría de Masa.

Los inositolfosfolípidos presentes durante la diferenciación de trypomastigotes a amastigotes se analizaron de igual manera que para epimastigotes (ver materiales y métodos). La diferenciación se indujo de manera similar a lo descrito en la **Fig. 22**, pero con un número de células más elevado con el fin de obtener un extracto más concentrado (ver materiales y métodos para mayor detalle). La **Fig. 30** muestra el análisis de los inositolfosfolípidos extraídos a distintos tiempos durante la diferenciación (0h, 1h, 2h y 3h; T0, T1, T2 y T3 respectivamente). En todos los casos se partió de un número equivalente de células. Se observa la presencia de los mismos iones que para el caso de epimastigotes con la sola variación del ión 698,5; correspondiente a ácido fosfatídico (ver **Fig. 31** para análisis de las rupturas por ESI / MS / MS).



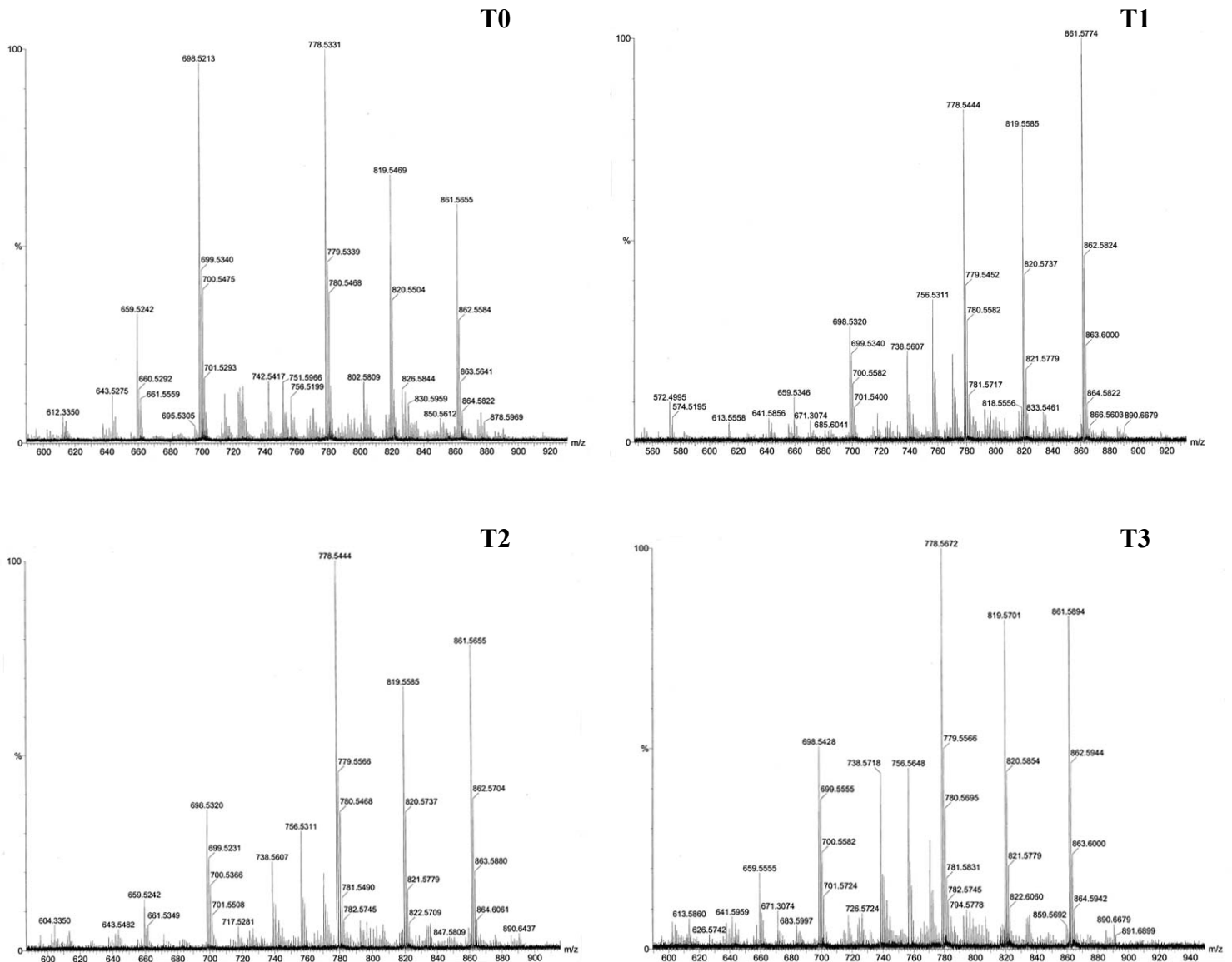
Una vez inducida la diferenciación (**Fig. 30**, T1, 1h) existe un aumento en la abundancia relativa del ión 861,5 y una disminución del 698,5. Durante la diferenciación e incubación con [<sup>3</sup>H]-inositol también se observaba un aumento de PI (**Fig. 22B**) a bajo pH extracelular. El análisis por ESI / MS permite confirmar que el aumento de fosfatidilinositol es real y significativo. En particular, existe un aumento del fosfatidilinositol conteniendo diacilglicerol (m/z 861,5). Por otra parte, durante la diferenciación en presencia de [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico (**Fig. 22A**) se observaba que la cantidad de PI se mantenía constante aún a bajo pH extracelular. Este resultado, sumado al aumento del ión 861,5 durante la diferenciación y al aumento de la marcación de PI durante la diferenciación en presencia de [<sup>3</sup>H]-inositol, no así en presencia de [<sup>3</sup>H] palmítico, permite confirmar que existe remodelamiento de los ácidos grasos de PI durante este proceso. La **Tabla 4** muestra la abundancia relativa de los distintos iones durante la diferenciación.

El fosfatidilinositol conteniendo diacilglicerol (m/z 861,5) es el que aumenta más rápido en función del tiempo y con respecto al ión 819,5. Una explicación para este resultado se puede extraer de la ruta biosintética del alquilacilglicerol, ya que la cantidad de pasos de biosíntesis que lleva al DAG es menor que la cantidad de pasos que lleva al AAG lo cual explicaría por qué el aumento del ión 819 se da más lentamente.

Con respecto a inositolfosfoceramida, en la incorporación con [<sup>3</sup>H]-inositol, se observaba un aumento de IPCb (**Fig. 22B**) o sea del compuesto correspondiente a palmitoilesfingosina (m/z 778). El ión 778,3 se mantuvo constante durante la diferenciación, lo cual confirma que el remodelamiento sobre IPCb se da con ácido palmítico solamente. No se observó una variación significativa en la abundancia relativa del ión 778,3 con la diferenciación. La pequeña disminución luego de una hora de tratamiento puede deberse al aumento en la biosíntesis de GIPLs (con ceramida como unidad lipídica). Como hay saturación de la señal para IPC, no se puede asegurar que exista necesariamente un aumento. Sin embargo, el hecho de que la marca en IPCb incorporada con [<sup>3</sup>H]-palmítico disminuya durante la diferenciación (**Fig. 22**) pero no la cantidad total (marcación con [<sup>3</sup>H]-inositol, **Fig 22B** y **Fig. 31**) confirma que existe remodelamiento de los ácidos grasos sobre IPCb.

**Tabla 4. Abundancia relativa de los iones 698,5, 778,5, 819,5 y 861,5 durante la diferenciación de trypomastigotes *in vitro*.** Observar la variación luego de 1 hora de diferenciación, de la abundancia relativa de los iones 698,5 y 861,5. Ver Resultados para mayor detalle.

|                    |  | <b>Abundancia Relativa (%)</b> |              |              |              |
|--------------------|--|--------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>m/z</b>         |  | <b>698,5</b>                   | <b>778,5</b> | <b>819,5</b> | <b>861,5</b> |
| <b>Tiempo Dif.</b> |  |                                |              |              |              |
| T0                 |  | 96,2                           | 100          | 67,9         | 60,9         |
| T1                 |  | 28,5                           | 82,9         | 78,2         | 100          |
| T2                 |  | 35,9                           | 100          | 67,4         | 77,9         |
| T3                 |  | 50,9                           | 100          | 82,4         | 82,6         |

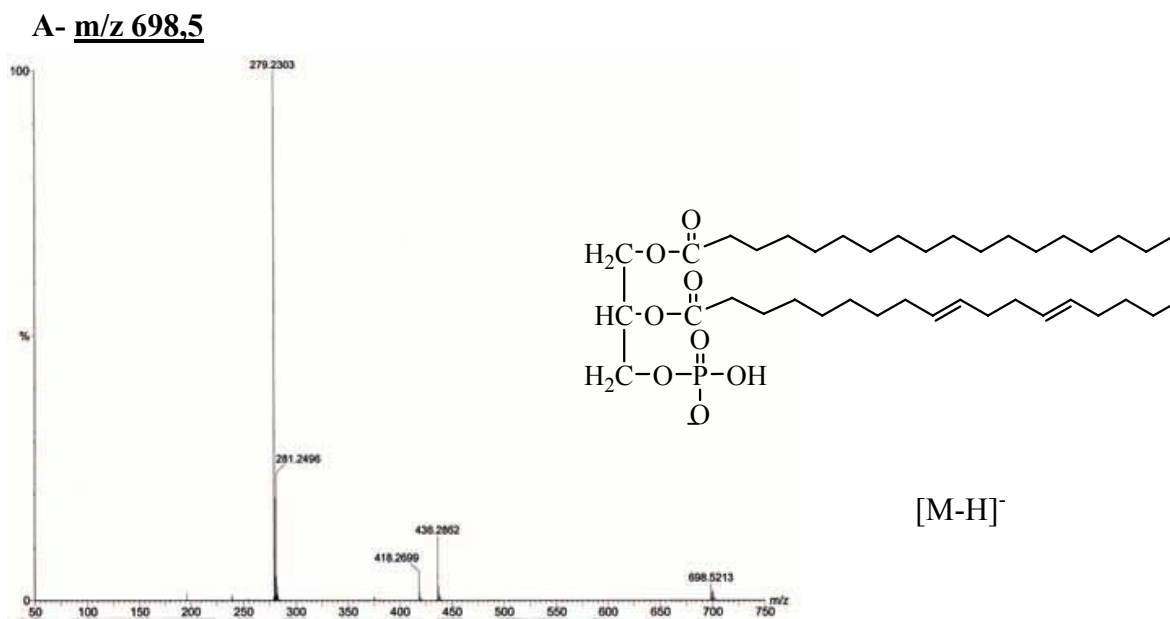


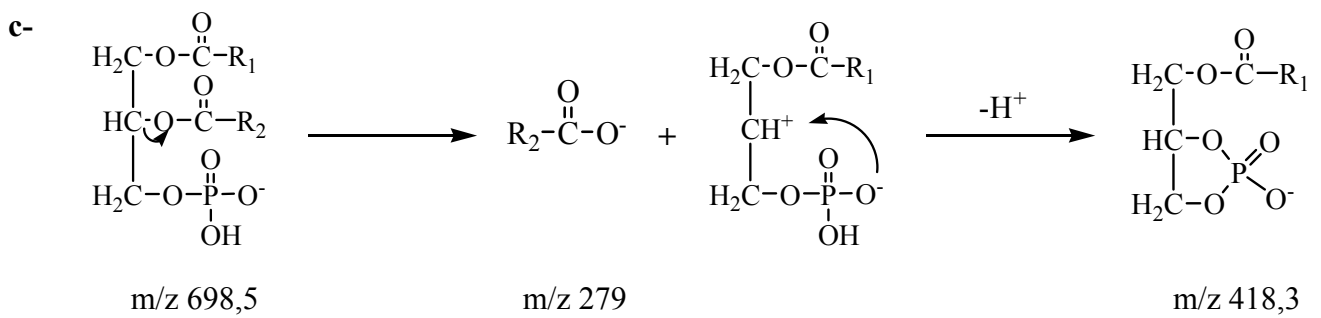
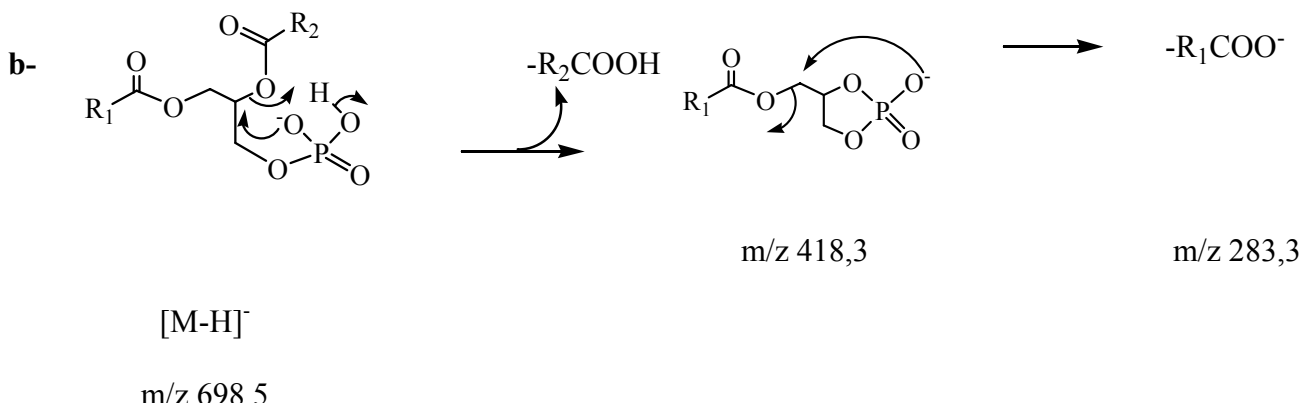
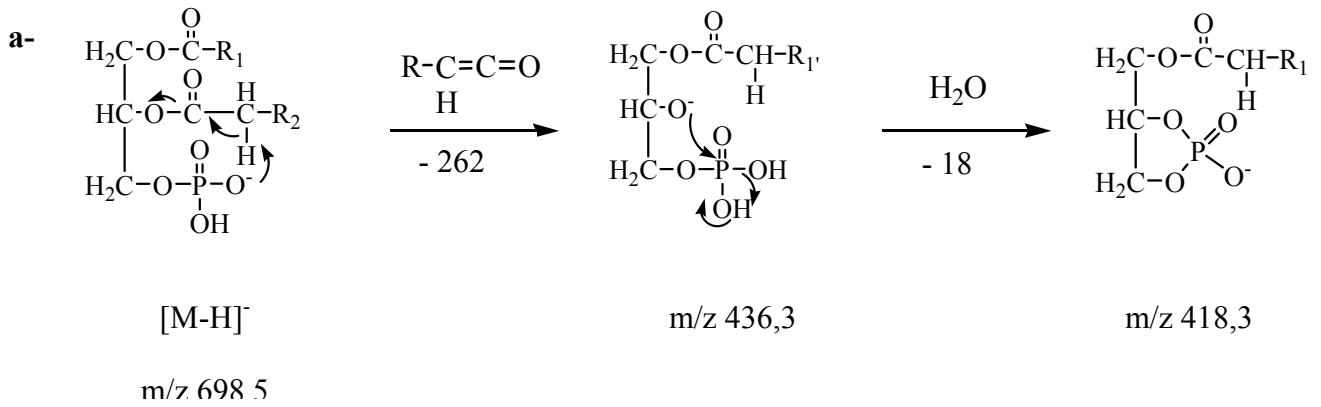
**Figura 30. Análisis de los inositolfosfolípidos durante la diferenciación de trypomastigotes *in vitro* por Espectrometría de Masa con ionización por Electrospray, en modo negativo.**

La diferenciación *in vitro* se realizó de manera similar a lo descrito en la Fig. 22 pero con una concentración más elevada de trypomastigotes. Igual cantidad de células fueron extraídas a distintos tiempos durante la diferenciación, (0, 1, 2 y 3h; T0, T1, T2 y T3, respectivamente), (ver materiales y métodos). Los lípidos se resuspendieron en cloroformo-metanol (1:1, v / v) y se analizaron por Espectrometría de Masa con ionización por Electrospray en modo negativo. Cada espectro ESI / MS fue generado como promedio de las señales obtenidas durante 1/2 minuto.

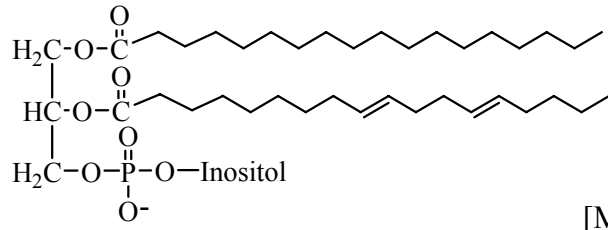
En ESI / MS, la sensibilidad en la detección de fosfolípidos puede depender de varios factores: efectos del largo de la cadena de los acilos, insaturaciones, estructura del grupo polar y concentración (Koivusalo et al. 2001). La validez de la diferencia observada en la **tabla 4** radica en que en todos los casos se compara la abundancia relativa de un mismo ión (con igual espectro ESI / MS / MS, igual solvente y proveniente del mismo cultivo celular). La concentración de fosfolípidos totales fue siempre menor a 1 pmol. Se consideró que a esa concentración se trabajaba en un ámbito lineal (Koivusalo et al. 2001).

**Figura 31. Análisis de las rupturas de los iones moleculares: A-698,5, B-861,5, C-819,5 y D-778,5 por ESI / MS / MS.**

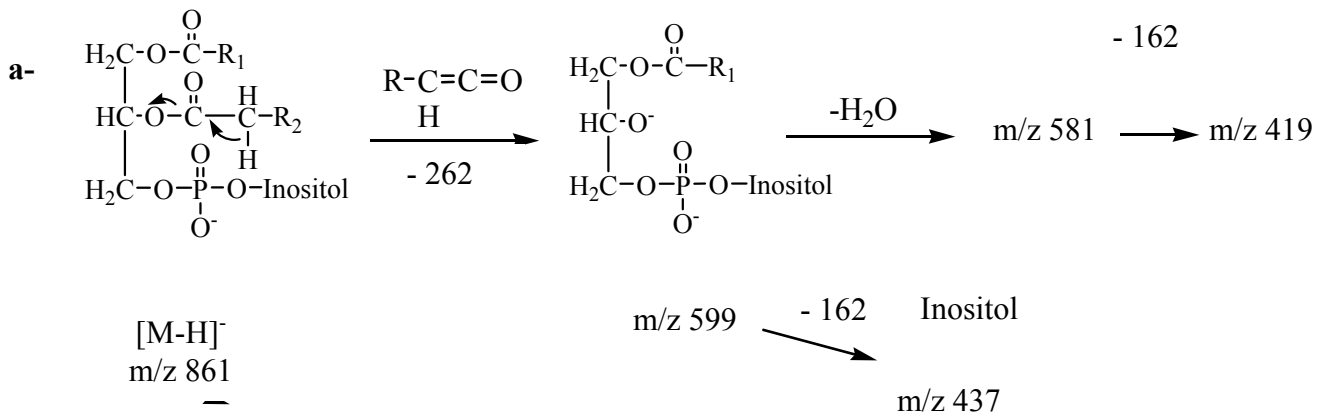
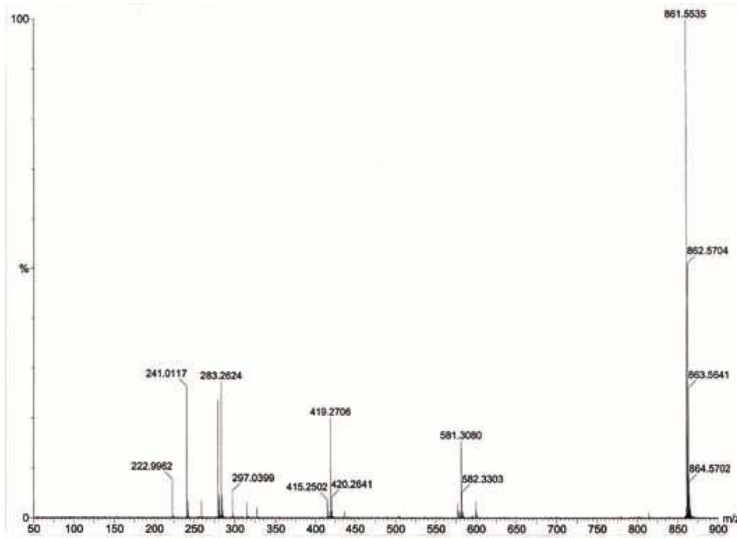


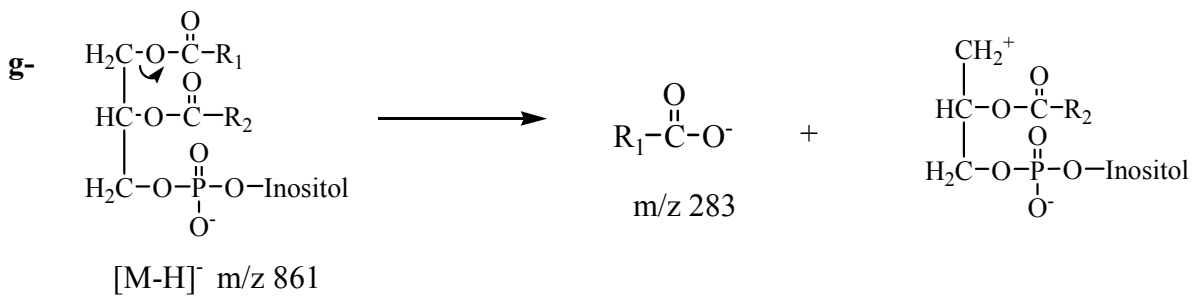
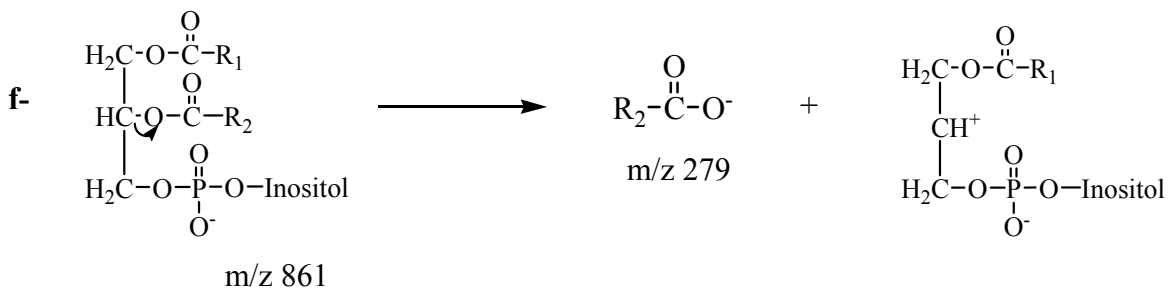
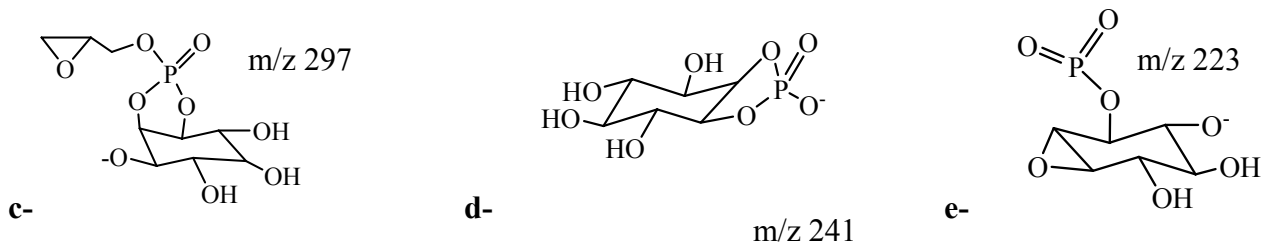
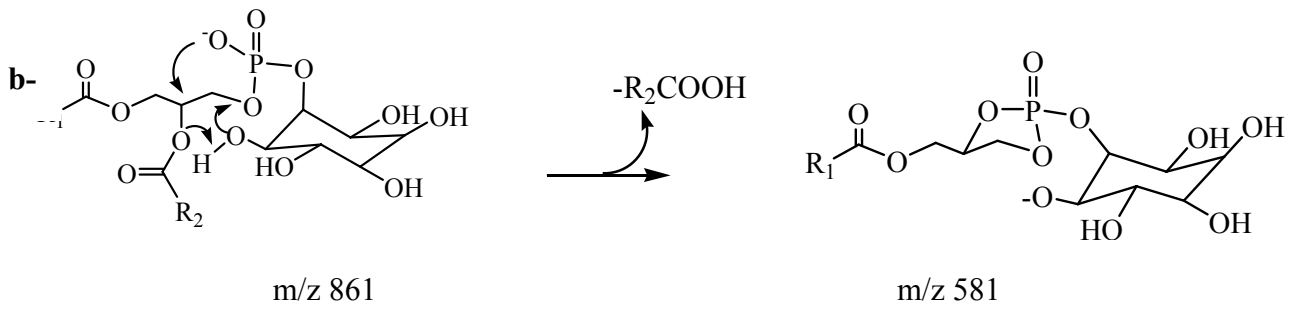


B- m/z 861,5

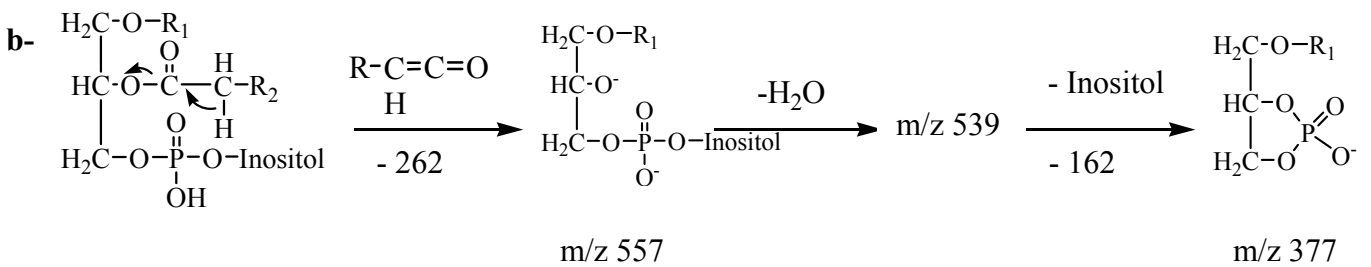
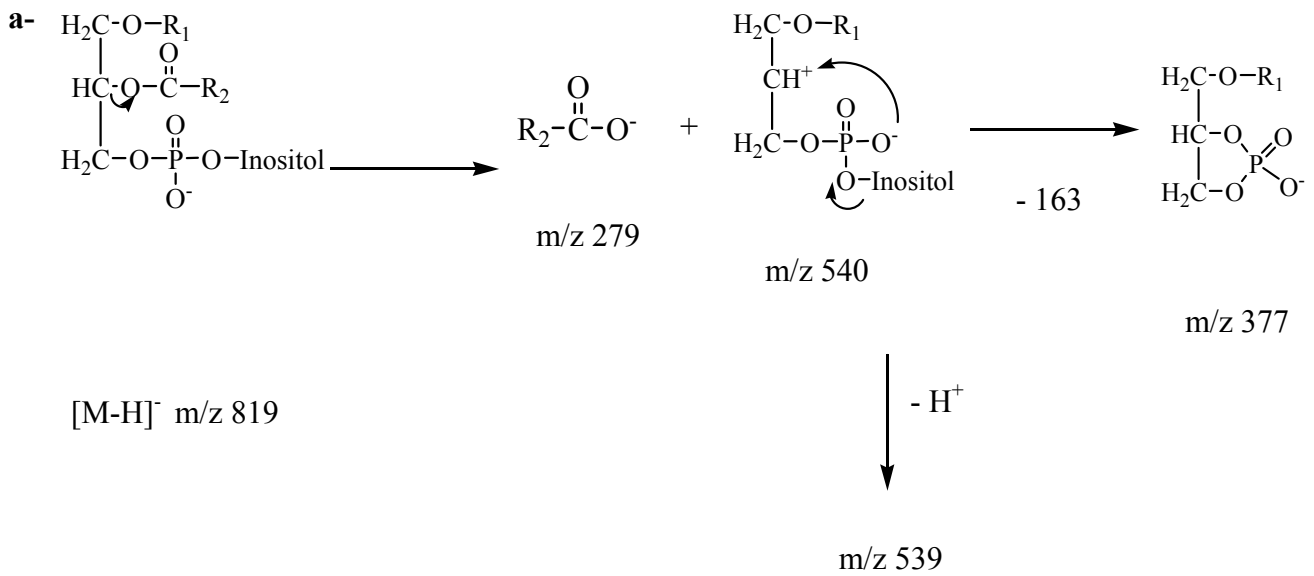
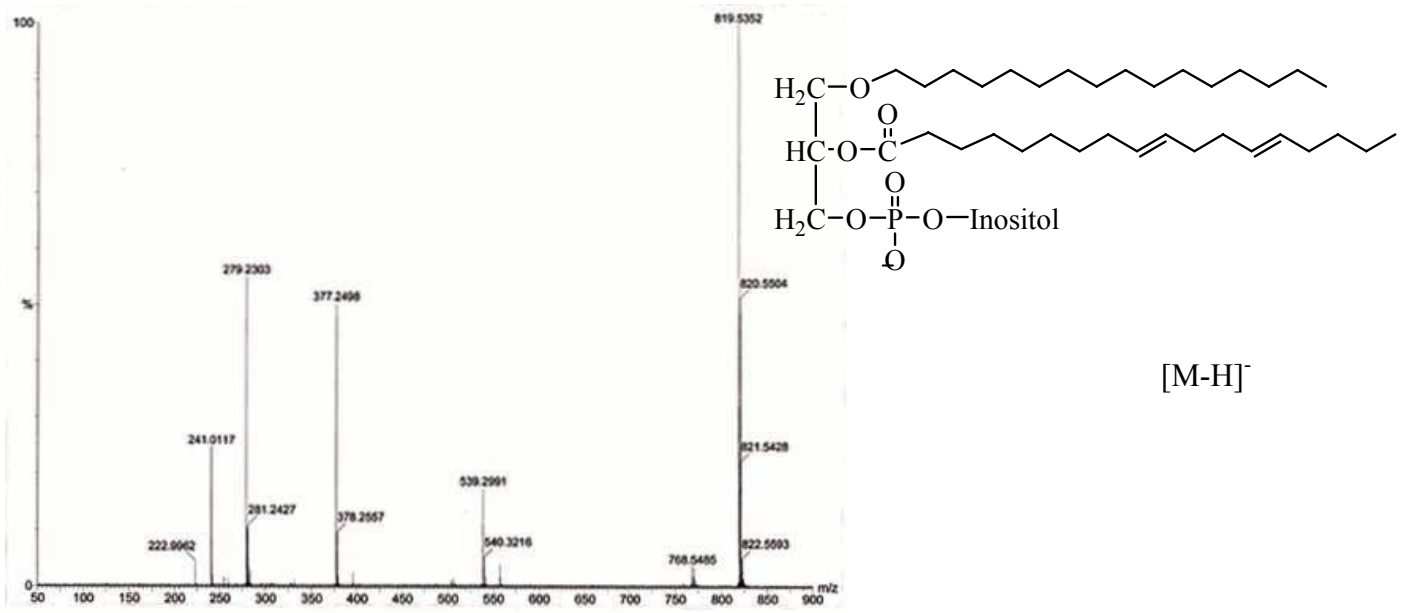


[M-H]<sup>-</sup>



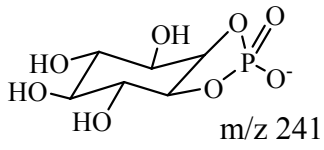


**C-m/z 819,5**

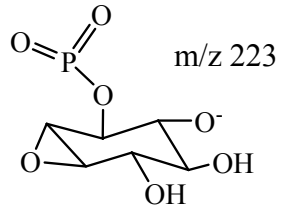




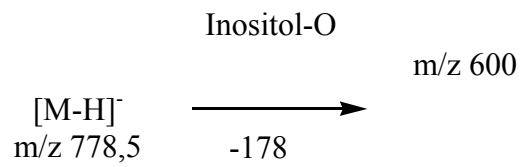
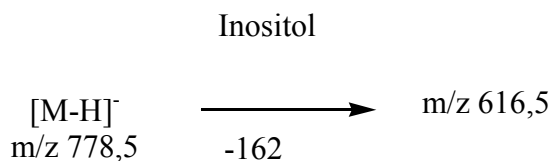
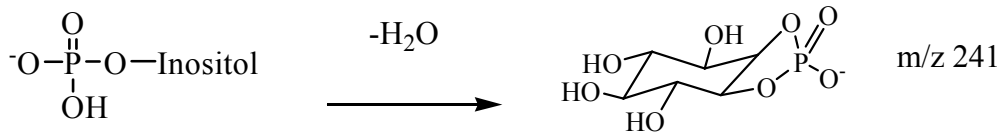
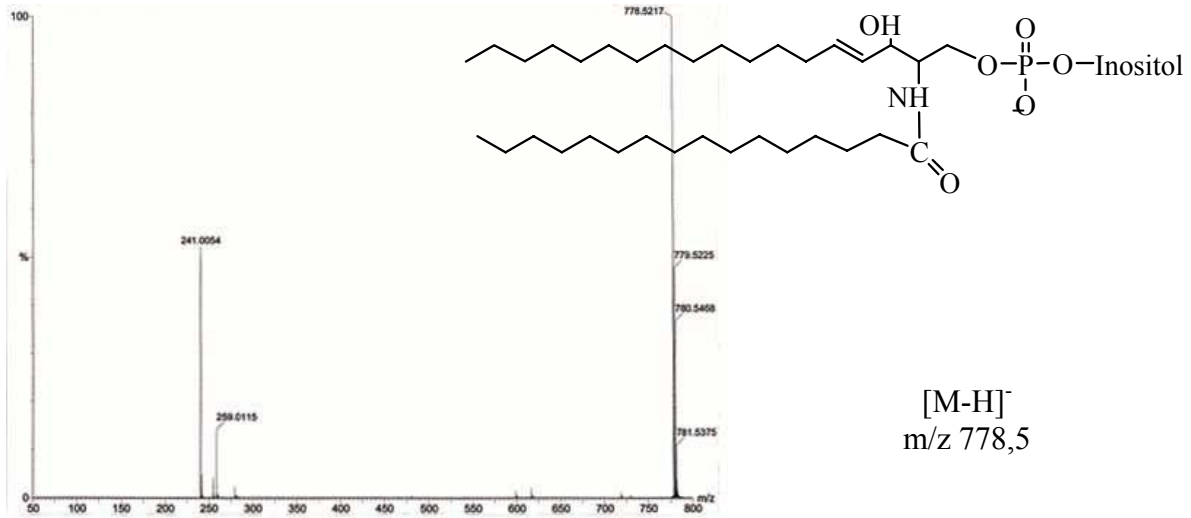
c-



d-

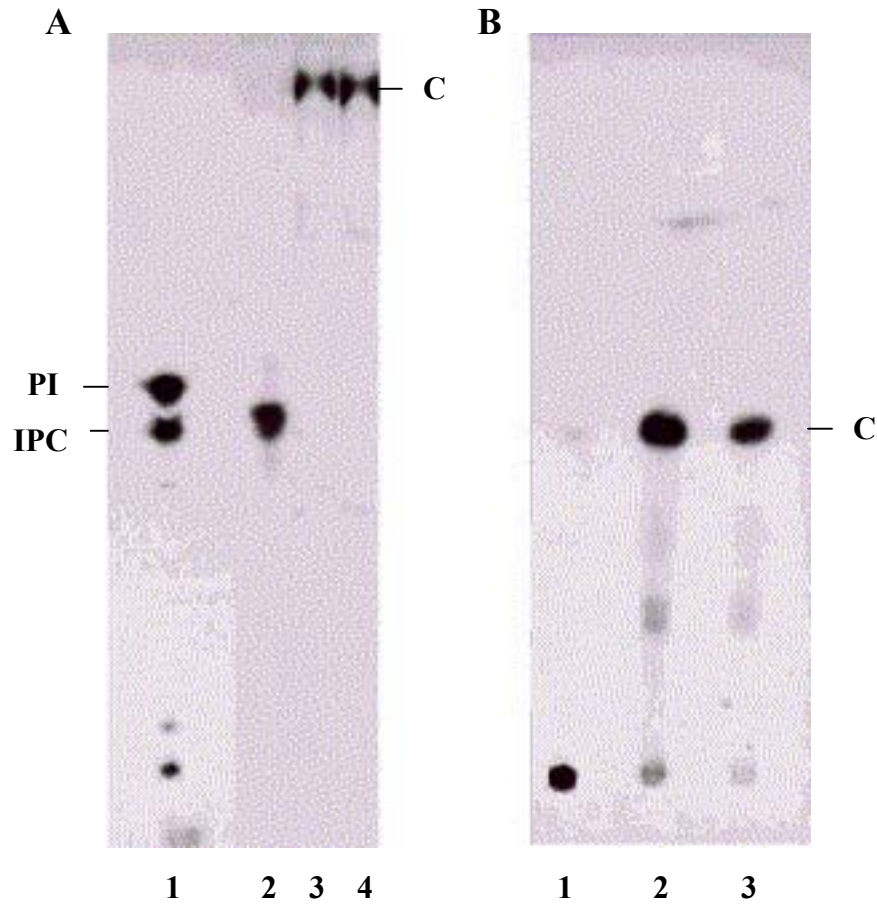


**D-m/z 778,5**

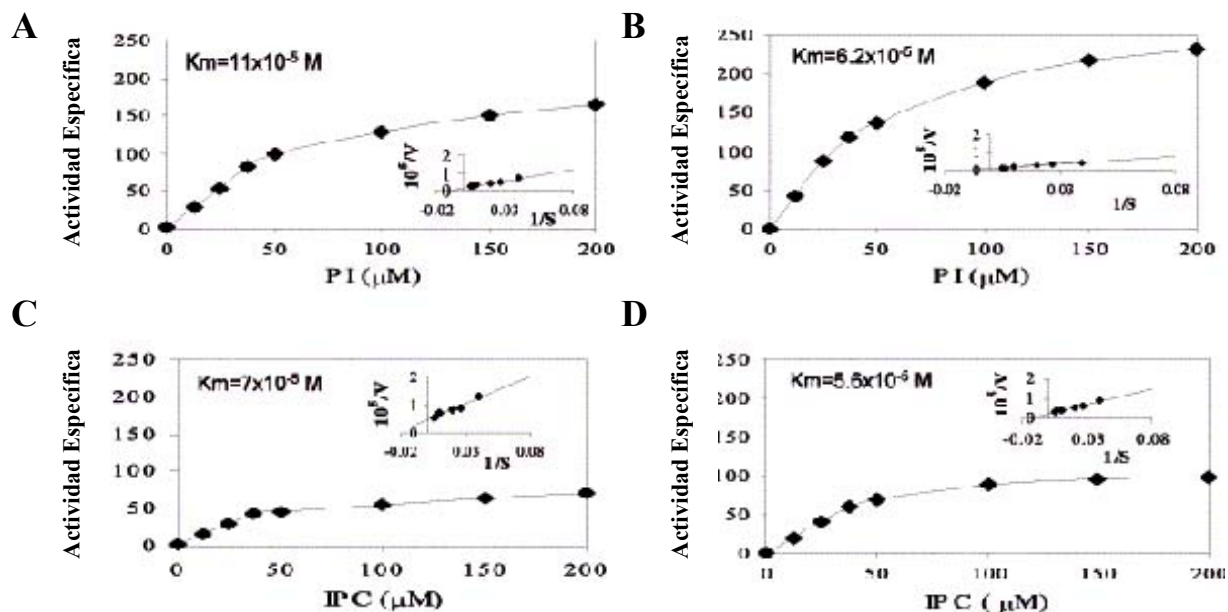


### **La inositolfosfoceramida (IPC) es sustrato de la fosfatidilinositol-fosfolipasa C de *T. cruzi* (TcPI-PLC).**

La expresión de la enzima TcPI-PLC es inducida durante la diferenciación del estadio trypomastigote al amastigote de *T. cruzi* (Furuya et al. 2000). Cuando la célula se diferencia, la enzima se asocia a la membrana plasmática donde aumenta su actividad catalítica. Su gen ha sido clonado y su secuencia se ha expresado en *E. coli* (Furuya et al. 2000). Se había determinado la actividad de la enzima recombinante con PI y PIP<sub>2</sub> como sustratos y su actividad dependía de la concentración de calcio (Furuya et al. 2000). Por otra parte, la superficie del parásito cambia durante la diferenciación. El estadio trypomastigote se caracteriza por la localización del antígeno Ssp3 en la membrana, mientras que en amastigotes, éste es reemplazado por el antígeno Ssp4 (Andrews et al. 1987) que se libera de la membrana celular con el tiempo de incubación. El lípido del ancla de la glicoproteína Ssp4 es una ceramida (Bertello et al. 1996). Estos resultados sugieren que la TcPI-PLC podría ser la responsable de la hidrólisis de Ssp4 con la consecuente liberación de ceramida al medio intracelular. Además, el tratamiento exógeno de trypomastigotes con una fosfolipasa C comercial (fosfatidil inositol específica) produce la diferenciación al estadio amastigote (Mortara et al. 2001). Con el fin de determinar la posible participación de la PI-PLC en la liberación de ceramida como segundo mensajero, se probó su actividad sobre IPC *in vitro* (**Fig. 32 y 33**). Dicha enzima, de actuar sobre IPC durante la diferenciación, sería la responsable de la liberación de ceramida al medio intracelular. En los últimos años se ha desarrollado un creciente interés en los eventos celulares regulados por esfingolípidos (Hannun 1996). La incubación de [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico-IPC con la enzima recombinante liberó ceramida en 1 hora y media, al igual que la enzima comercial. Los productos se extrajeron con butanol y se analizaron por ccd en dos sistemas de solventes diferentes, E (**Fig. 32 A**) y C (**Fig. 32 B**) para confirmar la presencia de ceramida. La **Fig. 33** muestra la actividad específica de TcPI-PLC en función de la concentración de PI (A, B) y de IPC (C, D) y a dos concentraciones diferentes de calcio 10 µM (A, C) o 1 mM (B, D).



**Figura 32. TcPI-PLC recombinante es activa para inositolfosfoceramida (IPC).**  $2 \times 10^9$  epimastigotes (*T. cruzi*) se lavaron en buffer A (116 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Hepes, pH 7,4, 5,5 mM glucose) y se resuspendieron en 25 ml de buffer DMEM (sin inositol, Sigma) conteniendo 50  $\mu$ Ci de *myo*-[2-<sup>3</sup>H]inositol (NEN Research Products, 16,4 Ci mmol<sup>-1</sup>) durante 16hs a 30° C. En ese momento se agregaron 25 ml más de medio conteniendo 50  $\mu$ Ci de *myo*-[2-<sup>3</sup>H]inositol y las células se incubaron durante un total de 48hs a la misma temperatura. La purificación de PI e IPC se realizó como lo descrito previamente (Bertello et al. 1995). La pureza de los sustratos marcados fue determinada por ccd y fluorografía (línea 1, A). [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico-IPC se obtuvo como lo descrito en materiales y métodos (línea 2, A) y se trató con 0.42 mU de TcPI-PLC (línea 4, A) o con 0.35 U de *B. cereus* PI-PLC (línea 3, A) durante 90 min a 30° C. El análisis se realizó en placas de silicagel (Merck) utilizando el solvente de desarrollo E. (B) Las muestras radioactivas se eluyeron de las líneas 2-4 de A y se recromatografiaron en el solvente de desarrollo C. Testigos: PI, fosfatidilinositol, IPC, inositolfosfoceramida, C, ceramida (palmitoildihydrospingosine).

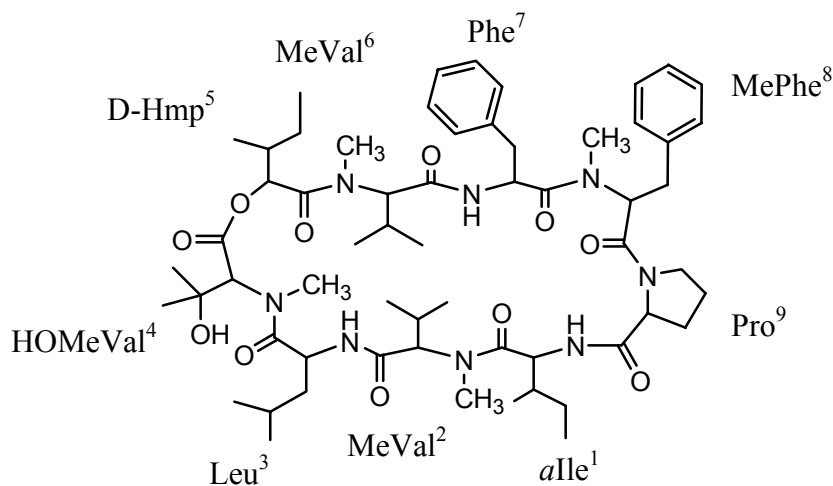


**Figura 33. Actividad específica de TcPI-PLC en función de las concentraciones de PI (A, B) e IPC (C, D).**  $[^3\text{H}]$ -inositol-PI y  $[^3\text{H}]$ -inositol-IPC (línea 1, Fig. 32) fueron purificados y la actividad de TcPI-PLC fue medida por la liberación de radioactividad soluble en fase acuosa, mediante el procedimiento descrito anteriormente (Furuya et al. 2000). Soluciones conteniendo PI (Sigma) o IPC, purificada de epimastigotes, a distintas concentraciones, 2000 cpm de  $[^3\text{H}]$ -PI o  $[^3\text{H}]$ -IPC, 1mg/ml deoxicolato de sodio, 100 mM NaCl, 50 mM Hepes-HCl (pH 7,2) y una concentración de 10  $\mu\text{M}$  (A, C) o 1 mM (B, D) de  $\text{Ca}^{2+}$ , se incubaron con 0.21 mU de enzima recombinante durante 15 minutos a 30° C. La reacción se paró por agregado de cloroformo–metanol–HCl (100:100:0.6) seguido de 0,15 ml de EGTA 5 mM en HCl 1N. Las muestras se mezclaron con vortex durante 30 seg., se centrifugaron a 21000 g durante 2 minutos para separar las fases y se contaron 150  $\mu\text{l}$  de la fase acuosa en el contador de centelleo. Las actividades están expresadas en nmol / min / mg de proteína.

Inositolfosfoceramida es el inositolfosfolípido mayoritario en *Trypanosoma cruzi* (Bertello et al. 1995) y es ancla para el antígeno mayoritario de las formas amastigotes Ssp-4 (Bertello et al. 1996). Los resultados encontrados, demuestran que TcPI-PLC es capaz de hidrolizarla y podría ser la responsable de la liberación del antígeno Ssp-4 al medio extracelular (Andrews et al. 1987). La consecuente liberación de ceramida al medio intracelular, podría ser señal de diferenciación celular. Al respecto, el tratamiento exógeno de trypomastigotes con una PI-PLC comercial produce la diferenciación al estadio amastigote (Mortara et al. 2001).

### Efecto de Aureobasidina A en la síntesis de IPC y GIPLs durante la diferenciación de trypomastigotes.

Aureobasidina A es un antibiótico cíclico nanopeptídico (**Fig. 34**) aislado de *Aureobasidium pullulans* R106 (Takesako et al. 1993). Demostró toxicidad, a bajas concentraciones (0,5 µg/ml), en hongos y levaduras (ie. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* y algunos *Aspergillus*). Su blanco de acción fue demostrado por primera vez en *S. cerevisiae* y corresponde a la ruta metabólica de esfingolípidos, en particular, a la enzima IPC sintetasa (Nagiec et al. 1997). Con este antecedente y debido a la presencia de inositolfosfoceramida tanto en *S. cerevisiae* como en *T. cruzi*, se probó la acción del antibiótico en el parásito protozoario.

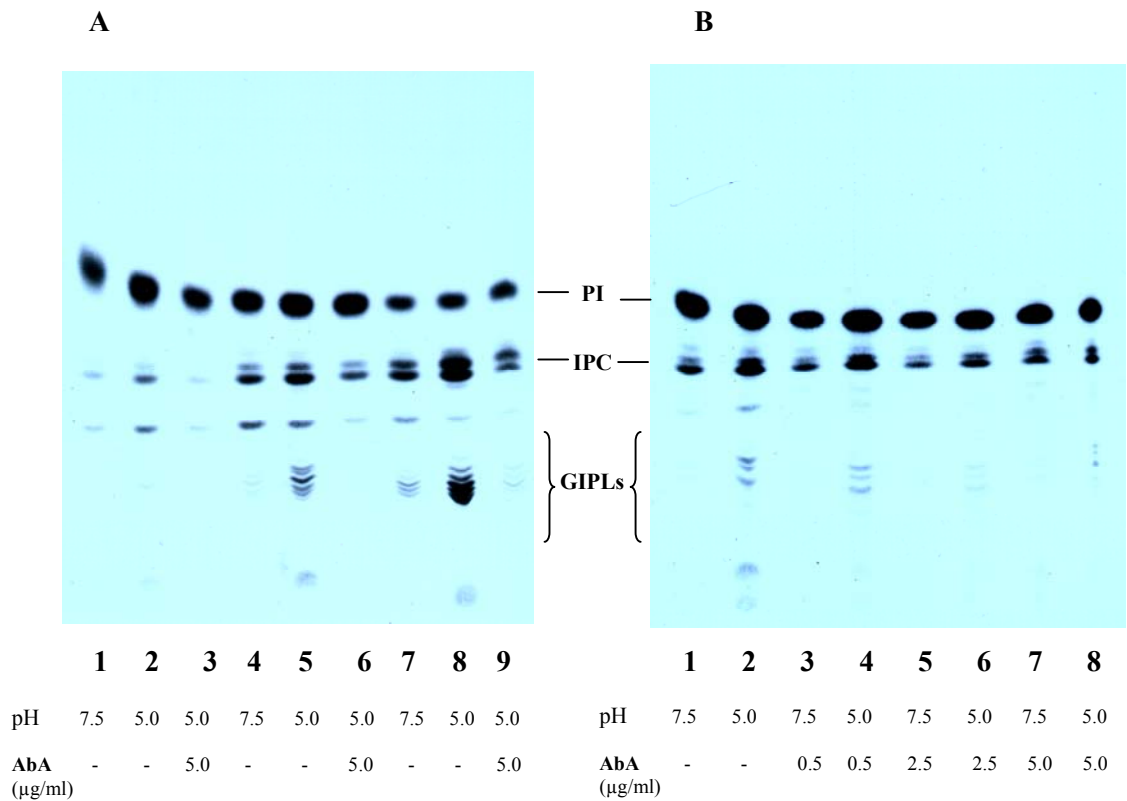


**Figura 34. Estructura de Aureobasidina A.**

La diferenciación de trypomastigotes fue inducida *in vitro* en presencia de [<sup>3</sup>H]-inositol y de 5 µg de Aureobasidina A /ml (**Fig. 35**). En este caso se observó una disminución en la marcación de IPC (**Fig. 35**, líneas 3, 6 y 9), mientras que la marcación de GIPLs se vio inhibida totalmente. En ausencia del antibiótico se observó un aumento, en función del tiempo, de la marcación de GIPLs sensibles al tratamiento con PI-PLC. La marcación de GIPLs en presencia de [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico y en ausencia del inhibidor se mostró anteriormente (**Fig. 22**). El GIPL mayoritario, marcado con [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico durante 2 h (flecha, **Fig. 22A**, línea 2), liberó AAG, mientras que los GIPLs más polares, que aumentan con el tiempo de incubación, liberaron ceramida como lípido más abundante (**Fig. 26**).

La biosíntesis de GIPLs e IPC fue inhibida en función de la concentración de Aureobasidina A (**Fig. 35B**). Esta inhibición fue casi total para GIPLs a 5 µg/ml,

mientras que se observó un 65% de inhibición para IPC (evaluado por escaning de radioactividad de las ccd).



**Figura 35. Aureobasidina A inhibe la biosíntesis de IPC y GIPLs durante la diferenciación de trypanomastigotes *in vitro*.** (A) La diferenciación *in vitro* se indujo igual a lo descrito en la Fig. 22. Trypanomastigotes se incubaron con [<sup>3</sup>H]-inositol a pH 7,5 (líneas 1, 4 y 7) o a pH 5,0 (líneas 2, 3, 5, 6, 8 y 9). Líneas 3, 6 y 9 corresponden a células tratadas con 5 µg de Aureobasidina A durante la diferenciación. El mismo número de células se extrajo a diferentes tiempos: 2h (líneas 1-3), 5h (líneas 4-6) y 18h (líneas 7-9). (B) Inhibición en la biosíntesis de IPC y de GIPLs en función de la concentración de Aureobasidina A. La diferenciación *in vitro* fue inducida como lo descrito para A. Trypanomastigotes se incubaron con [<sup>3</sup>H]-inositol a pH 7,5 (líneas 1, 3, 5 y 7) o a pH 5,0 (líneas 2, 4, 6 y 8) en presencia de 0,5 (líneas 3 y 4), 2,5 (líneas 5 y 6) o 5,0 (líneas 7 y 8) µg de Aureobasidina A /ml.

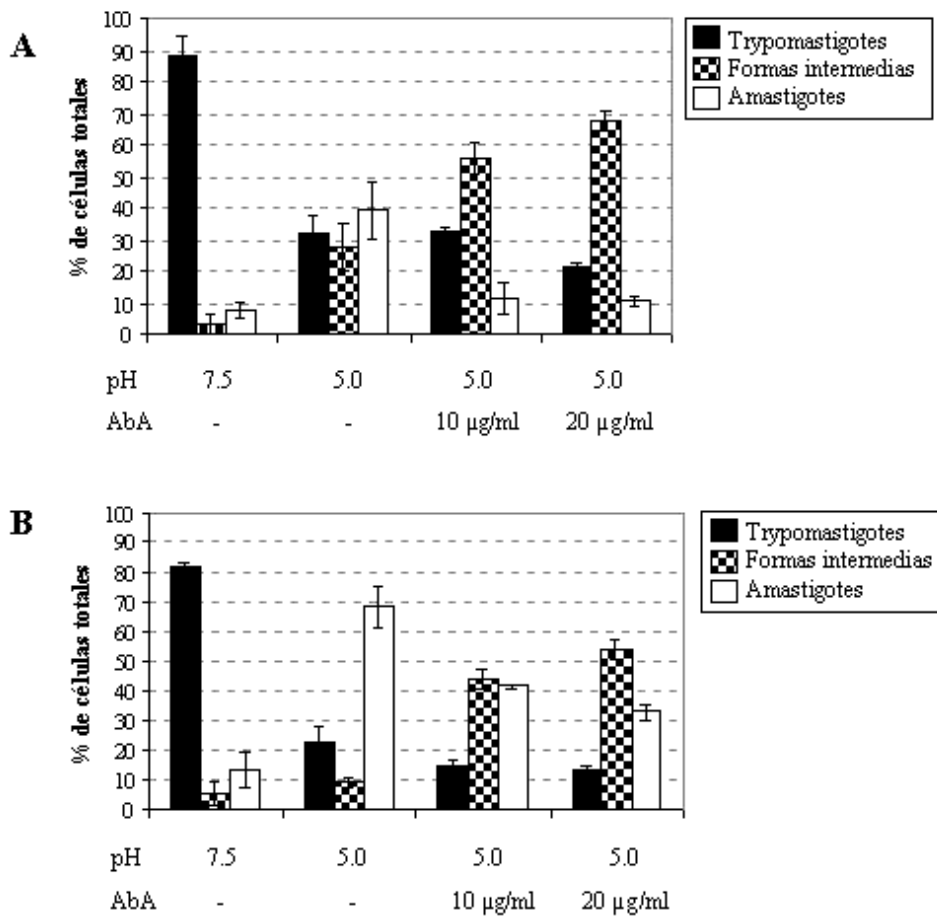
### **Inhibición de la diferenciación de trypomastigotes por Aureobasidina A.**

Aureobasidina A también inhibió la diferenciación de trypomastigotes en un sistema *in vitro*. La **Fig. 36** muestra que luego de 2 (**Fig. 36A**) y 5 h (**Fig. 36B**) de incubación de trypomastigotes a pH 5,0, alrededor de 40 y 70% de las células, respectivamente, presentaron morfología típica de amastigotes (redondeadas y sin flagelo visible). Se observó que Aureobasidina A produce una disminución en el porcentaje de amastigotes y un aumento en el porcentaje de formas intermedias en función de la concentración y del tiempo (**Fig. 36**).

Por otra parte, se realizaron inmunofluorescencias para la detección del epitope Ssp4, característico de formas amastigotes (Andrews et al. 1987) (**Fig. 37**) durante la diferenciación con y sin droga, lo cual mostró que bajo el tratamiento, pocas células expresaban Ssp4 y se observaban más formas intermediarias (**Fig. 37B y C**) comparando con los controles (**Fig. 37A**). Cuando la Aureobasidina A se usaba a altas concentraciones los parásitos mantenidos a pH ácido mostraban signos de toxicidad (**Fig. 37C**).

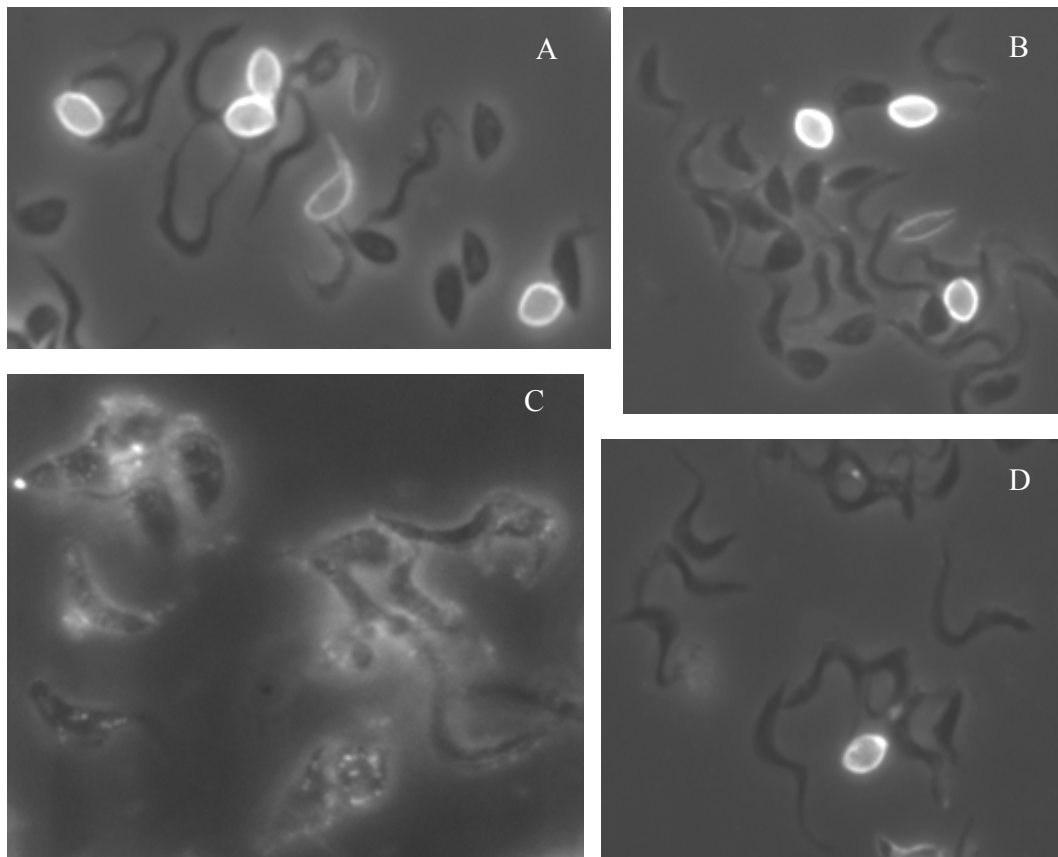
Esto se ilustra mejor en las microscopías electrónicas de la **Fig. 38**. Los parásitos tratados con Aureobasidina A mostraron alteraciones en el Golgi y un aumento del tamaño de vacuolas lipídicas cercanas al retículo endoplásmico (**Fig. 38B y C**, flechas) mientras que las células mantenidas a pH 7,5 en presencia de Aureobasidina A fueron normales (**Fig. 38D y E**). La mayoría de las células tratadas con Aureobasidina A correspondían a formas intermediarias, lo cual fue evaluado por la proximidad del kinetoplasto con el núcleo y la apariencia “tipo canasta” del kinetoplasto en la mayoría de los casos (típica de trypomastigotes) (de Souza 1984).

Por otra parte, Aureobasidina A también inhibió la diferenciación *in vivo*. Células de mioblastos se infectaron con trypomastigotes como lo descrito en materiales y métodos y la droga disminuyó la replicación de amastigotes como se observa en la **Fig. 39**.

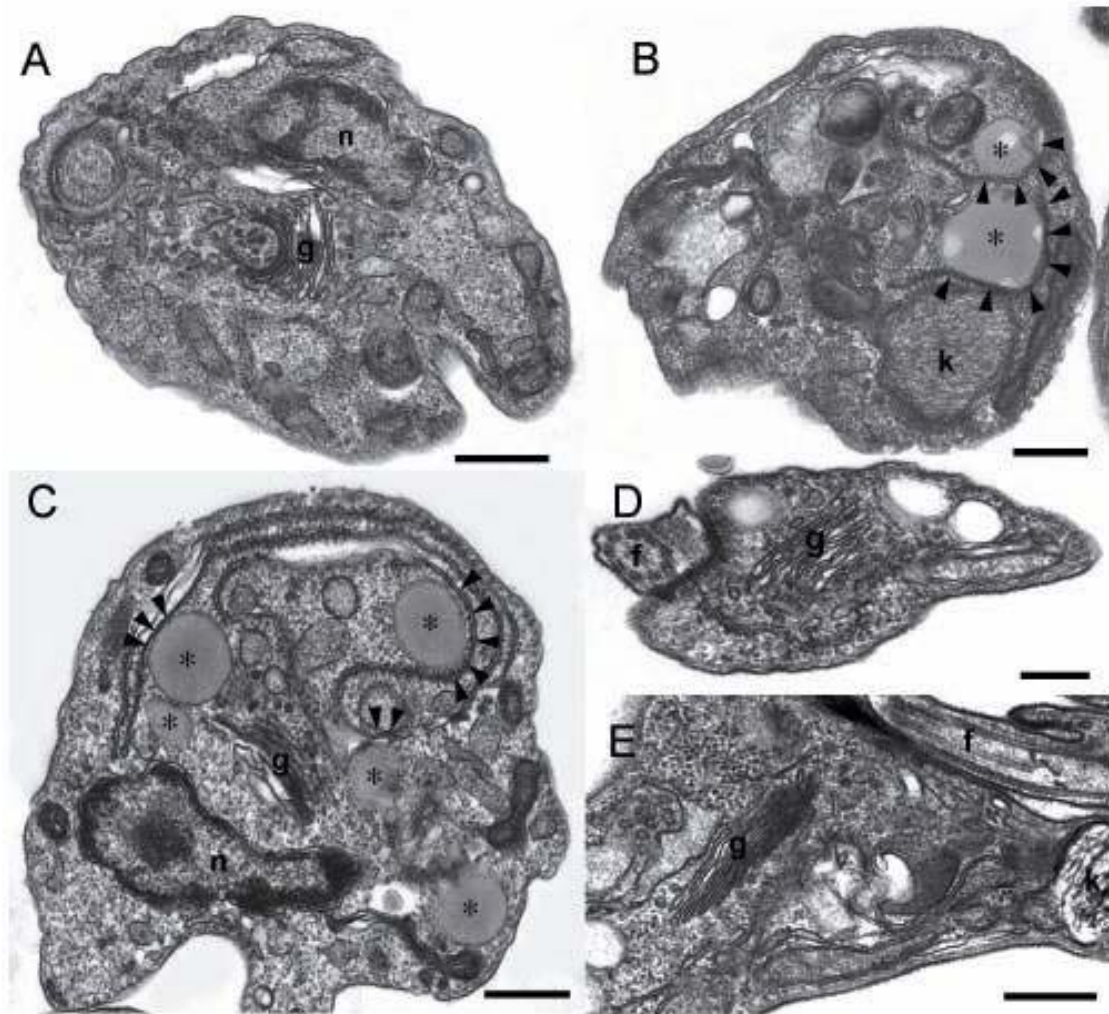


**Figura 36. Aureobasidina A aumenta el número de formas intermediarias en un sistema de diferenciación *in vitro*.** Se indujo la diferenciación de trypomastigotes durante 2 y 5 h, (A y B, respectivamente) como lo descrito en Materiales y Métodos. La concentración de Aureobasidina A se indica bajo cada gráfico. Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos independientes.

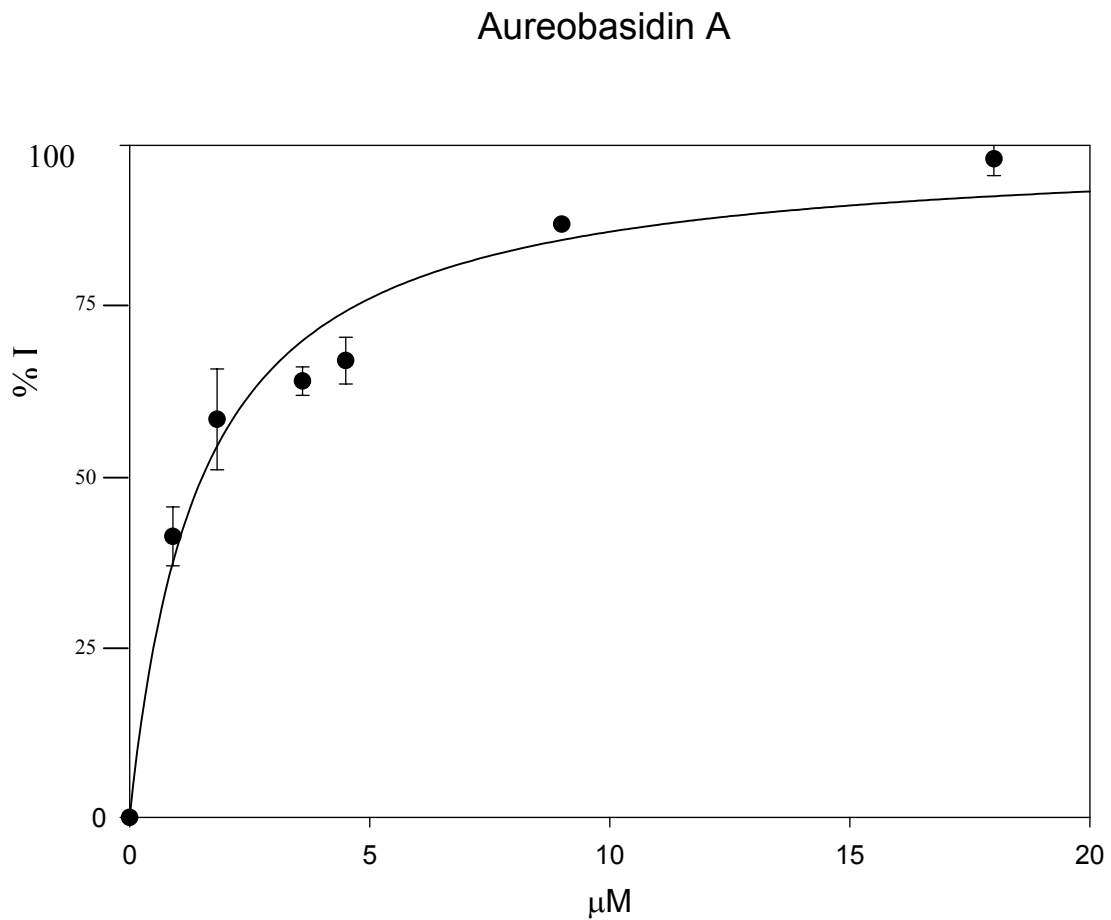




**Figura 37. Efecto de Aureobasidina A en la morfología y expresión del epítotope Ssp4** (marcador de amastigotes). La diferenciación de trypanomastigotes fue inducida como lo descrito para la Fig. 22. Luego de 5h, se trataron los parásitos de manera apropiada para inmunofluorescencia (ver materiales y métodos), con el anticuerpo monoclonal contra Ssp4. **(A)** Control de trypanomastigotes incubados a pH 5,0 durante 5hs; **(B)** trypanomastigotes incubados a pH 5,0 con 10 µg de Aureobasidina A/ml; **(C)** trypanomastigotes incubados a pH 5,0 con 20 µg de Aureobasidina A/ml; **(D)** trypanomastigotes incubados a pH 7,5 con 20 µg de Aureobasidina A/ml.



**Figura 38. Efecto de Aureobasidina A en la ultraestructura de los trypomasigotes diferenciados.** La diferenciación de trypomastigotes fue inducida como lo descrito en la Fig. 22. Luego de 5 h, los parásitos se prepararon para microscopía electrónica (ver materiales y métodos). (A) Trypomastigotes control incubados a pH 5,0 durante 5hs; (B y C) trypomastigotes incubados a pH 5,0 con 10 µg de Aureobasidina A/ml; (D y E) trypomastigotes incubados a pH 7,5 con 10 µg de Aureobasidina A/ml. Abreviaturas: n, núcleo; k, kinetoplasto; g, Golgi; er, retículo endoplásmico; f, flagelo. Los asteriscos indican inclusiones lipídicas. Las flechas muestran puntos de aparente contacto entre las inclusiones lipídicas y el retículo endoplásmico. Barras, 0,4 (A y B), 0,5 (C), 0,25 (D) y 0,6 (E) µm.



**Figura 39. Inhibición de la replicación de amastigotes en la infección de mioblastos con trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.**

Células de mioblastos obtenidas según lo descrito en materiales y métodos fueron infectadas con trypomastigotes de *T. cruzi* (5X) durante dos horas. En ese momento se aspiró el sobrenadante para eliminar los trypomastigotes que no lograron infectar células y se agregó  $^3\text{H}$ -uracilo y Aureobasidin A en distintas concentraciones. Se realizaron controles de células sin infectar e infectadas con trypomastigotes sin el agregado de droga.

## CONCLUSIONES

El parásito *Trypanosoma cruzi* al igual que otros parásitos protozoarios presenta su superficie cubierta por glicoproteínas y glicolípidos anclados a la membrana a través de un glicosilfosfatidilinositol (GPI). Este tipo de anclaje le confiere al parásito protección y resistencia frente a las adversidades que debe soportar durante su ciclo de vida. La ruta biosintética de anclas de GPI ha sido validada, por lo menos en *T. brucei*, como blanco para el desarrollo de drogas (Smith et al. 2004). En mamíferos, el punto de partida para la biosíntesis de anclas es fosfatidilinositol (PI) (**Esquema 5**). En *T. cruzi* a diferencia de *T. brucei* se encontró ceramida como lípido en los GPI de algunas glicoproteínas, en particular las que se secretan al medio, como Trans-sialidasa y Ssp4 (Lederkremer et al. 2001). Por otra parte, en *T. cruzi* (al igual que en *Leishmania* y *S. cerevisiae*) se describieron dos inositolfosfolípidos, PI e IPC, posibles precursores de anclas de GPI (Bertello et al. 1995). La ausencia de IPC en células de mamífero aumenta el interés en la biosíntesis de este inositolfosfolípido como blanco de acción de drogas. Recientemente se ha descrito que, mientras que IPC es residuo lipídico de anclas de glicoproteínas maduras y de glicolípidos, no es punto de partida para la biosíntesis de GPI, ya que no acepta GlcNAc (Bertello et al. 2004). Esto sugiere, que de manera similar a lo que ocurre en *S. cerevisiae*, la introducción de ceramida en el ancla de la proteína madura o en glicolípidos se da por un proceso de remodelamiento.

La diferenciación de células trypomastigotes al estadio amastigote es un proceso que se da dentro de la célula huésped pero también puede lograrse *in vitro* por incubación a pH 5 (Tomlinson et al. 1995). Los cambios morfológicos que se dan en *T. cruzi* durante la diferenciación son dramáticos y una reorganización de la membrana debe ocurrir para que el parásito pueda pasar de ser alargado con un largo flagelo, a redondeado con un flagelo muy corto.

En este trabajo de tesis se mostró que la diferenciación de trypomastigotes a amastigotes de *T. cruzi*, dentro de las células de mioblastos, conlleva la biosíntesis de IPC. Células de mioblastos marcadas con [<sup>3</sup>H]-inositol e infectadas con trypomastigotes (**Fig. 21A**) mostraron un aumento en la marcación de IPC con el progreso de la infección. Cuando la diferenciación ocurre dentro de mioblastos marcados con [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico, no se detecta IPC marcada (**Fig. 21B**). Este resultado sugiere que la ceramida de IPC no proviene de los mioblastos sino del parásito. Sin embargo, el

inositol marcado probablemente provenga del PI en los mioblastos, si la síntesis en *T. cruzi* ocurre como lo descrito para *S. cerevisiae* (Reggiori et al. 1998). En *S. cerevisiae*, IPC se forma a partir de PI por acción de una IPC sintetasa que cataliza la transferencia de inositolfosfato a ceramida (Reggiori et al. 1998) (fosfatidilinositol+ceramida  $\rightarrow$  IPC+diglicérido). La síntesis *de novo* de inositolfosfato por el parásito a partir del [ $^3$ H]-inositol libre presente en los mioblastos infectados, no puede descartarse, sin embargo dicha biosíntesis es poco probable, ya que la cantidad de inositol libre aumenta y no disminuye durante la diferenciación (**Fig. 21A**). La glicoproteína de superficie Ssp4 que aparece luego de la diferenciación de trypomastigotes a amastigotes presenta una ceramida en su ancla de GPI (Bertello et al. 1996). Debido a que una PI-PLC de *T. cruzi* se activa durante la diferenciación (Furuya et al. 2000) y es capaz de hidrolizar IPC (**Fig. 32 y 33**), es posible que la ceramida liberada sea usada para sintetizar IPC luego de 18 h de infección (**Fig. 21A**, línea 2). La ruta biosintética de IPC en *T. cruzi* no fue aún elucidada, tampoco ha sido descrita una IPC-sintetasa. Hasta el momento, no hay secuencias homólogas con la IPC-sintetasa de *S. cerevisiae* en la base de datos de *T. cruzi* (<http://TcruziDB.org/>).

La biosíntesis de IPC también fue monitoreada durante la diferenciación de trypomastigotes *in vitro* a bajo pH extracelular. También en este caso el perfil obtenido fue diferente, dependiendo del precursor radioactivo utilizado, [ $^3$ H]-ácido palmítico o [ $^3$ H]-inositol. Dos IPCs mayoritarias se detectaron durante la diferenciación de trypomastigotes. La estructura de las de trypomastigote, por incorporación de [ $^3$ H]-ácido palmítico fue estudiada anteriormente (Uhrig et al. 1996). Cuando las células se incubaron con [ $^3$ H]-inositol, en un medio de diferenciación, los niveles de IPCs marcada aumentaron significativamente en 6 horas, en particular IPC con menor  $R_f$  conteniendo palmitoilesfingosina (PS) (**Fig. 22B**). Por el contrario, cuando los trypomastigotes inducidos a diferenciarse se marcaron con [ $^3$ H]-ácido palmítico, la marcación de IPCb disminuyó con el tiempo (**Fig. 22A**, líneas 2, 4 y 6) mientras que se mantuvo constante en los trypomastigotes que no se diferenciaban (**Fig. 22A**, líneas 1, 3 y 5). Estos resultados indican que el ácido graso radioactivo unido a través de una unión amida está siendo reemplazado sucesivamente por uno no marcado, por medio de reacciones llamadas de “remodelamiento”, las cuales están teniendo lugar particularmente en IPCb. Se encontraron evidencias de la presencia de una IPC-acilhidrolasa en membranas de amastigotes y trypomastigotes (**Fig. 27**). Es interesante que la actividad de IPC acilhidrolasa no fue soluble. Durante la incubación, no se forma ni liso-esfingolípidos ni

esfingosina, esto indicaría que una IPC-aciltransferasa que introduce un ácido graso endógeno puede estar actuando. La misma enzima puede ser la responsable de las dos actividades. Al respecto, una enzima que cataliza la hidrólisis de ceramida y también su síntesis, fue clonada en ratón (Tani et al. 2000).

También fueron evidentes las reacciones de remodelamiento de los ácidos grasos de PI (**Fig. 22A y B**), lo cual estuvo de acuerdo con la presencia de actividades enzimáticas en membranas y en las fracciones solubles de los dos estadios del parásito (**Fig. 27**). Los siguientes resultados sugieren que actividades de fosfolipasa A (PLA) hidrolizan ácidos grasos seguidas por aciltransferasas que catalizan la transferencia de ácidos grasos fríos en PI, dando lugar al remodelamiento de PI y liso-PI (**Fig. 24**).

- (i) La marcación con [<sup>3</sup>H]-inositol de PI y liso-PI aumenta con el tiempo de diferenciación, por el contrario, no hay aumento de la marcación de PI con [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico (**Fig. 22A y B**).
- (ii) El aumento de PI durante la diferenciación *in vitro* también se demostró por análisis de los inositolfosfolípidos por ESI/MS (**Tabla 4**).
- (iii) La incubación de [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico-PI con membranas de dos estadios del parásito (**Fig. 27A y B**) mostraron más liberación de ácido graso radioactivo que presencia de liso-PI radioactivo. Previamente fue demostrado que el alquilglicerol, presente en el mayor componente de PI, se marcaba abundantemente con [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico (Bertello, 2000). El liso-PI formado luego de la hidrólisis del ácido graso debería marcarse de igual manera a menos que la transferencia de un ácido graso frío haya tenido lugar.
- (iv) El análisis de los glicerolípidos liberados por una PI-PLC endógena luego de un período corto de incubación (15 a 60 min) mostró 1,2-AAG y 1,2-DAG (**Fig. 28A**, línea 1). Sin embargo, no se detectó marcación del 1,2-DAG luego de 2hs (**Fig. 28A**, línea 2).
- (v) No se detectó ceramida libre radioactiva en el frente, en el análisis por ccd, del medio de incubación (**Fig. 22A**). Los lípidos de menor polaridad se eluyeron y cromatografiaron en el solvente cloroformo: metanol 38:3 y no se observó ceramida en ningún caso. Se demostró que la marcación presente correspondía, a [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico, AAG, AG y DAG. Esto indicaría que, para el caso de la incubación a bajo pH, el intercambio de ácidos grasos es

mas rápido que la hidrólisis por una PLC lo cual está de acuerdo con la **Fig. 27** donde se ve más liberación de ácido graso que ceramida marcada. A pH 7,5, tampoco se observa liberación de ceramida, posiblemente debido a que a ese pH la fosfolipasa no está activa (Furuya et al. 2000).

Según estos resultados, el mecanismo de remodelamiento de los ácidos grasos del PI sería reversible. Este proceso podría estar relacionado con el remodelamiento que debe darse en la membrana para la diferenciación celular ya que aparentemente se da de manera más abundante a pH 5,0. Acilhidrolasas capaces de hidrolizar ácidos grasos de PI están presentes en epimastigotes (**Fig. 27**), por lo que no se puede descartar que el proceso se de a pH 7,5. Por otra parte, este proceso podría colaborar con otros mecanismos reversibles de acilación, por ejemplo la palmitoilación de proteínas, la cual participa en la localización de las proteínas en la membrana. Al respecto, la fosfolipasa C de *T. cruzi* se activa, acila y localiza en la membrana durante la diferenciación (Furuya et al. 2000).

La disminución de ácido fosfatídico durante la diferenciación, detectada por ESI/MS, parecería estar relacionada con el aumento observado en el mismo experimento, de fosfatidilinositol conteniendo diacilglicerol o alquilacilglicerol. Al respecto, en mamíferos, la biosíntesis de fosfatidilinositol ocurre a partir de ácido fosfatídico el cual se activa en presencia de CTP para formar el compuesto CDP-diglicérido y luego la citosina es reemplazada por el inositol para formar fosfatidilinositol y CMP. Por otra parte, una disminución de ácido fosfatídico también fue demostrada en epimastigotes de *T. cruzi* como consecuencia del contacto del parásito con eritrocitos (Garrido et al. 2000).

Se observó la presencia de un ácido graso conteniendo dos dobles enlaces en la posición-2 del fosfatidilinositol. Podría tratarse del ácido linoleico, que también fue descrito con anterioridad en fosfatidilinositol y fosfatidilinositol mono y bisfosfato (Racagni et al. 1995; De Lema et al. 1986) y como componente de PI de epimastigotes de *T. cruzi* (Bertello et al. 1995). La presencia de linoleico sería interesante ya que es un ácido graso esencial en células de mamífero.

Se encontraron también actividades de PI-PLC y de IPC-PLC en membranas y en fracciones solubles de amastigotes y trypomastigotes (**Fig. 27**). La PI-PLC previamente clonada (Furuya et al. 2000), capaz de hidrolizar tanto PI como IPC (**Fig. 32 y 33**) podría ser responsable de ambas actividades.

Los eventos regulados por ceramida, dentro de los cuales puede mencionarse la inducción de la célula a la diferenciación (Hannun, 1996), han recibido mayor atención en los últimos años (Ghosh, 1997) (Hannun, 1996). Se ha observado la diferenciación de trypomastigotes *in vitro*, por incubación con una PI-PLC comercial de *Bacillus thuringiensis* (Mortara et al. 2001). Los resultados descritos en esta tesis sugieren que IPC puede cumplir una función similar a la de los esfingolípidos de células de mamíferos mediante la generación de segundos mensajeros.

También fue demostrada la activación de la biosíntesis de GIPLs durante la diferenciación a amastigotes (**Fig. 22 y 35**). El hecho de que los glicerolípidos sean los lípidos mayoritarios en los GIPLs detectados en los primeros pasos de la diferenciación, que las ceramidas sean los mayores lípidos luego de tiempos de incubación más largos (**Fig. 26**) y que sólo ceramida se haya encontrado como ancla de la glicoproteína Ssp4 (Bertello et al. 1996), confirma que la introducción de ceramida en amastigotes tiene lugar también por una reacción de remodelamiento. En *S. cerevisiae*, mediante el uso de Aureobasidina A, un inhibidor de IPC sintetasa, se demostró que la ceramida necesaria para el remodelamiento de GIPLs unidos a la proteína no es generada por hidrólisis de IPC (Reggiori et al. 1998). En el caso de *T. cruzi* encontramos inhibición de la síntesis de IPC por Aureobasidina A, pero al contrario de lo que ocurre en levaduras, la droga también inhibe la biosíntesis de GIPLs, lo cual sugiere que la ceramida usada para remodelamiento es generada por hidrólisis de IPC. Por otra parte, en levaduras, la ceramida es introducida sólo en los GIPLs que ya están unidos a la proteína. En un trabajo posterior de caracterización de la actividad de inositolfosfoceramida sintetasa se describió que AbA no inhibía esta actividad *in vitro*, cuando utilizaban PI comercial de soja como donador de inositol y una hexanoil ceramida marcada con un sustituyente fluorescente de aceptor (Figueiredo et al. 2004).

Previamente fue demostrado que la expresión heteróloga de *T. brucei* GPI-PLC en *T. cruzi* resulta en una limitada proliferación e inhibición de la diferenciación de amastigotes a trypomastigotes. Además se ha sugerido que las proteínas ancladas a través de un GPI o los GIPLs libres del parásito pueden actuar como segundos mensajeros dando señales necesarias para el desarrollo de amastigotes (Mortara et al. 2001). Teniendo en cuenta nuestros resultados, esto puede ser relacionado con la presencia de ceramida en las anclas de GPI de glicoproteínas específicas del estadio amastigote. Es interesante que sólo los trypomastigotes inducidos a diferenciarse y no los trypomastigotes mantenidos a pH neutro, mostraron signos de toxicidad luego del



tratamiento con concentraciones altas de Aureobasidina A. Esto sugiere que, como la PI-PLC (Furuya et al. 2000), una enzima IPC-sintetasa es inducida durante la diferenciación. La inhibición de esta enzima durante la diferenciación de los parásitos llevaría a la acumulación de precursores como ceramida que podrían ser tóxicos para las células. La IPC sintetasa, o un camino equivalente, ausente de células de mamíferos, podría ser un buen blanco para el desarrollo de la quimioterapia.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivos celulares

Células trypomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) se obtuvieron del medio de cultivo de myoblastos L<sub>6</sub>E<sub>6</sub> infectados por el método de (Schmatz and Murray 1982). La contaminación de trypomastigotes con amastigotes y formas intermedias de amastigotes fue siempre menor que 5%. Las células epimastigotes se crecieron a 28°C en el medio infusión hígado triptosa suplementado con 5% de suero de ternera.

### Diferenciación de trypomastigotes de *T. cruzi* *in vitro* y marcación radioactiva

La transformación de trypomastigotes a amastigotes fue inducida en medio ácido según lo descrito previamente (Tomlinson, Vandekerckhove et al. 1995). Resumiendo, los trypomastigotes se lavaron dos veces en medio 199, pH 7,5, suplementado con 3,7 g de NaHCO<sub>3</sub>/litro y 0,4% de sero albúmina bovina. Las células se resuspendieron a una concentración de 10<sup>7</sup> células/ml en medio fresco a pH 7,5 o 5,0 conteniendo [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico o 2-[<sup>3</sup>H]-*myo* inositol y 0,4% sero albúmina bovina. El pH fue controlado con MES 20 mM (pH 5,0) o HEPES 20 mM (pH 7,5). Para los experimentos sin compuestos radioactivos (**Fig. 36**), la diferenciación fue inducida en medio DMEM bajo las mismas condiciones que las descritas para el uso del medio 199. Los parásitos se incubaron a 35°C durante distintos tiempos, se lavaron dos veces en PBS y se extrajeron con cloroformo-metanol-agua (10:10:3). Los extractos se secaron en un evaporador rotatorio (Speed-Vac) y se purificaron por partición en agua-1-butanol (1:1, v/v). La fase orgánica se secó y se almacenó a -20°C.

### Infección de myoblastos con trypomastigotes de *T. cruzi*

~10<sup>7</sup> células de myoblastos se marcaron con <sup>3</sup>H-inositol (10 µCi/ml) durante 24 h en el medio 199 (Sigma) enriquecido con 20% de suero fetal bovino dializado (Atlanta biologicals, PM<sub>(de corte)</sub> =10.000). Las células se lavaron tres veces con 4 ml de medio Hanks (Sigma), para quitar el exceso de [<sup>3</sup>H]-inositol libre, e infectaron con 5x10<sup>8</sup> trypomastigotes durante 3 h. Sólo un 1% de radioactividad se detectó en los trypomastigotes del sobrenadante luego de 3hs de infección. Igual cantidad de células de myoblastos fueron tratadas en condiciones equivalentes pero sin infección. Células control e infectadas se incubaron durante 6, 12, 18, 21, 24, 30, 48, 72hs. Tres horas

antes de cada extracción se agregó LiCl 15 mM al medio de cultivo como inhibidor de fosfatasas.

*Incorporación con [<sup>3</sup>H]-palmítico de células de myoblastos:* células de myoblastos se incorporaron con [<sup>3</sup>H]-palmítico (5 μCi/ml) e infectaron con trypomastigotes en iguales condiciones a las descritas en el párrafo anterior.

*Incorporación con [<sup>3</sup>H]-palmítico de trypomastigotes T. cruzi:* 5 x10<sup>8</sup> trypomastigotes de *T. cruzi* se incorporaron durante 3 hs con [<sup>3</sup>H]-palmítico en iguales condiciones a las descritas para myoblastos. Los parásitos marcados con [<sup>3</sup>H]-palmítico se utilizaron en la infección de myoblastos no marcados.

### **Reactivos**

DMEM, PBS, Hanks, gelatina de pescado, suero fetal bovino y suero de ternera, cloruro de litio, fosfolipasa A<sub>2</sub> de veneno de abeja (*Apis mellifera*) (1.200 U/mg de sólido, 1.350 U/mg de proteína) y MES se compraron en Sigma Chemical Co (St. Louis, MO).

[<sup>3</sup>H]-ácido palmítico (39 Ci/mmol), 2-[<sup>3</sup>H]-*myo*-inositol (10-25 Ci/mmol) y En<sup>3</sup>Hance se compraron en NEN Life Science Products (Boston, Mass.)

El medio 199 GIBCO-BRL, en Life Technologies (Grand Island, NY).

Aureobasidin A en Takara Biomedicals (Shiga, Japón). Fosfatidilinositolfosfolipasa C (PI-PLC) de *Bacillus thuringiensis* en Oxford GlycoSciences (Abingdon, Oxford, Reino Unido). El resto de los reactivos que se utilizaron fueron de grado analítico.

### **Extracción y análisis de inositolfosfatos**

Los inositolfosfatos se purificaron según lo descrito previamente (Docampo and Pignataro 1991). Células control e infectadas fueron colectadas en 1,5 ml (0,5 ml de medio Hanks y 1 ml HClO<sub>4</sub> 0,5 M) y mantenidas en hielo durante 20 minutos. Los inositolfosfatos se recuperaron en el sobrenadante de la centrifugación a 1,500 x g (10 minutos), el cual se llevó a pH neutro con solución 0,72M KOH/0,6M KHCO<sub>3</sub>, centrifugó y analizó por HPLC con las siguientes condiciones: se utilizó un sistema de gradiente ternario (ISCO), con columna de intercambio aniónico 0,46 cm x 25 cm Partisil Sax (10 μm, Alltech) y dos detectores acoplados (UV y radioactividad). El volumen final de las muestras se ajustó a 2,5 ml conteniendo una mezcla (ATP, ADP,

AMP, GTP) 0,04 mM como testigos internos, los cuales aseguraron la reproducibilidad del método. Luego de cada corrida la columna se lavó con 7,5 ml de agua. Para la separación de los inositolfosfatos (IP, IP<sub>2</sub>, IP<sub>3</sub>) se utilizó un gradiente de formiato de amonio. A partir de una solución concentrada (1,7 M) de formiato de amonio y pH 3,8 (por agregado de ácido fosfórico), la concentración de formiato de amonio en la corrida fue modificada de la siguiente manera: **1**-aumento linear hasta 0,75 M durante 24 minutos; esta concentración se mantuvo durante 2 minutos; **2**-aumento linear hasta 1 M durante los siguientes 6 minutos; esta concentración se mantuvo otros 6 minutos; **3**-aumento linear hasta 1,7 M que termina a los 63 minutos de corrida.

Los inositolfosfatos marcados con [<sup>3</sup>H]-inositol fueron detectados con un detector de radioactividad (Hewlett Packard) acoplado al sistema cromatográfico, con contaje de 0,5 ml de muestra en 5 ml de solución centelladora (BudgetSolve, Research Products International). La recuperación de la radioactividad de la columna fue por lo menos de 75%.

#### **Separaciones por cromatografía en capa delgada.**

Las separaciones de lípidos y fosfolípidos se realizaron por cromatografía en capa delgada (ccd) en placas de silicagel 60-Merck con los siguientes sistemas de solventes: **A)** para el caso de la separación de fosfolípidos, las placas se sumergieron en una solución de oxalato de potasio 1,3 % y EDTA 2 mM en metanol/agua (2:3, v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se dejaron secar a temperatura ambiente durante la noche y se calentaron a 110°C 30 minutos antes de usar (Docampo and Pignataro 1991). Las muestras se disolvieron en cloroformo/metanol/agua (10:10:3, v/v) y fueron cromatografiadas en el sistema de solventes cloroformo-metanol-acetona-ácido acético-agua (45:15:18:13.5:8.5, v/v). Otros sistemas de solventes utilizados fueron **B)** cloroformo-metanol-NH<sub>4</sub>OH 2,5 M (15:10:2, v/v), **C)** cloroformo-metanol (38:3, v/v), **D)** hexano-acetato de etilo (4:1, v/v), y **E)** cloroformo-metanol-NH<sub>4</sub>OH 2,5M (40:10:1, v/v). Las cromatografías en fase reversa se realizaron con placas RP-18 F<sub>254</sub> de Merck cloroformo-metanol-agua (40:100:3, v/v; solvente **F)**. Los inositolfosfolípidos se eluyeron de la sílica con cloroformo-metanol-agua (10:10:3, v/v). Para la detección de los lípidos marcados las placas se impregnaron con En<sup>3</sup>Hance (Dupont-New England Nuclear) y se expusieron a films para auto radiografía (Midwest Scientific) durante 4-5 días a -80°C antes de su revelado. Los testigos no radioactivos se detectaron rociando

las placas con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% en etanol o con el revelador de Mo/Ce (ver Materiales y Métodos Parte A).

### **Preparación de membranas y fracciones de sobrenadante**

Amastigotes y trypomastigotes fueron lisados en medio hipotónico conteniendo 0,5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES (pH 7,4), 1mM EGTA, 1mM ditioneitol y 10 µg/ml de leupeptina. La suspensión se mezcló y agitó con vortex durante 30 segundos, se dejó 15 minutos a 0°C y se homogeneizó con un homogenizador para tejidos, de teflón. El homogenato se centrifugó a 37000 g durante 12 minutos a 4°C. El sobrenadante y el pellet se guardaron por separado a -80°C en alícuotas correspondientes a 10<sup>8</sup> células.

### **Extracción y purificación de inositolfosfolípidos (IPLs) de epimastigotes**

Células epimastigotes en fase de crecimiento logarítmica (2 días de cultivo; 2x10<sup>8</sup> células) fueron marcadas con [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico durante 18hs. Luego de lavar dos veces las células con PBS, el pellet resultante se liofilizó y extrajo con mezclas de cloroformo-metanol 2:1 (v/v; 20ml) y 1:1 (v/v; 20ml). Los extractos se secaron y los lípidos conteniendo inositolfosfatos se separaron de los lípidos neutros por cromatografía en columna de DEAE-Sephadex A25 (forma acetato) (Ledeen and Yu 1982). Los lípidos neutros se eluyeron con 50 ml de metanol-cloroformo-agua (30:15:4, v/v ) y los lípidos ácidos con 50 ml de metanol-cloroformo-acetato de sodio 0,8 M (30:15:4, v/v). La última fracción se evaporó y el extracto se purificó de sales por pasaje por cartucho C<sub>18</sub> (United Chemical Technologies). Las sales se eluyeron con agua y los inositolfosfolípidos con metanol. La fracción conteniendo inositolfosfolípidos se repurificó por cromatografía en columna de sílica gel 60 equilibrada con cloroformo, eluyendo con mezclas de cloroformo-metanol 4:1 (v/v) y 1:1 (v/v).

### **Ensayo de actividad de fosfolipasas en membranas**

[<sup>3</sup>H]-ácido palmítico-PI y [<sup>3</sup>H]-ácido palmítico-IPC se aislaron según lo descrito en el párrafo anterior y se usaron como sustratos para los siguientes experimentos. Una mezcla estándar de incubación consistió en el sustrato radioactivo (250,000 cpm) y la fracción de membranas (10<sup>8</sup> equivalentes de células) de *T. cruzi* resuspendida en el buffer A (50mM HEPES, pH 7,0; 0,1% desoxicolato; 3mM MgCl<sub>2</sub>; 10 µM CaCl<sub>2</sub>). El sustrato disuelto en cloroformo-metanol (1:1) se secó en los tubos de incubación con N<sub>2</sub> y se agregó la fracción de membranas resuspendida en 100 µl del

buffer de incubación. Luego de la incubación a 30°C durante distintos tiempos (5, 15, 60 y 120 min y 18 h) la reacción se paró por agregado de 660µl de cloroformo-metanol (1:1). Se realizó un control del sustrato en el buffer de incubación sin membranas pero en iguales condiciones. Para evaluar la actividad en el sobrenadante de la preparación de membranas se realizó una incubación con el sobrenadante correspondiente a  $10^8$  células durante 18 h. Luego de la incubación, las membranas se extrajeron (x2) con cloroformo-metanol-agua (10:10:3). Los extractos orgánicos se secaron en un evaporador rotatorio y se purificaron por partición 1-butanol/agua. Los lípidos marcados se recuperaron en la fase 1-butanol, que se lavó con agua, secó y analizó por ccd en el solvente B.

### **Microscopía de inmunofluorescencia**

Los parásitos fijados con una solución recientemente preparada de formaldehído 4% se adhirieron a cubreobjetos previamente tratados con poli-L-Lisina y se permeabilizaron con Tritón X-100 0,5% durante 5 minutos. El bloqueo se realizó con gelatina de pescado 0,45% en PBS y se prepararon para inmunofluorescencia utilizando una dilución 1:50 del anticuerpo monoclonal 2C2 (anti-Ssp4; cedido gentilmente por Norma W. Andrews, Yale University) y una dilución (1:100) de inmunoglobulina G anti-ratón conjugada con rodamina como anticuerpo secundario. Las imágenes inmunofluorescentes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX-60.

### **Microscopía electrónica**

Células trypomastigotes fueron inducidas a diferenciarse por incubación a pH 5,0, como lo descripto arriba. Los controles se mantuvieron a pH 7,5. Luego de 5 h, los parásitos se lavaron con buffers del correspondiente pH y se fijaron en la solución de Karnovsky. Las muestras fijadas se lavaron con una solución de ácido cacodílico 0,1M, pH 7,2 y se post fijaron en tetróxido de osmio 1% y ferrocianuro de potasio 1,5% a temperatura ambiente en el mismo buffer. Luego de lavarlas con etanol 10%, las muestras se deshidrataron por incubación en concentraciones crecientes de etanol (25, 50, 75, y 100%) a temperatura ambiente. La infiltración e inserción se realizaron en Epon y los bloques se polimerizaron a 60°C. Secciones ultra finas se colectaron en mallas de cobre, se tiñeron con acetato de uracilo y citrato de plomo, y se observaron por microscopía de transmisión electrónica.

### **Tratamientos enzimáticos**

#### *Tratamiento con Fosfatidilinositol-fosfolipasa C.*

Las muestras de IPLs se resuspendieron en 100  $\mu$ l del buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,2, conteniendo desoxicolato 0,1% y se incubaron con 0,35 U de la enzima PI-PLC de *B. thuringiensis* durante 90 minutos a 37° C. Los lípidos se extrajeron con 1-butanol (tres veces, 0,5 ml cada vez) y se analizaron por ccd en el solvente C o D.

#### *Tratamiento con Fosfolipasa A<sub>2</sub>*

La reacción con PLA<sub>2</sub> se realizó en el mismo buffer con agregado de CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM. Las muestras se incubaron con 25 U de PLA<sub>2</sub> de *A. mellifera* durante 2-4 h a 37°C. Luego de la reacción los lípidos se extrajeron con 1-butanol y se analizaron por ccd en el solvente B.

### **Tratamiento con Fosfatasa alcalina**

Las muestras se resuspendieron en 50  $\mu$ l de buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, conteniendo 0,3 U de Fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* (Sigma, Tipo III, 60 U/mg de proteína) y se incubaron durante 2h a 30° C. Se realizó un control con *p*-nitrofenilfosfato como sustrato. Luego del tiempo de incubación las muestras se extrajeron con butanol y la fase orgánica se cromatografió en el solvente A junto con testigos de IP<sub>3</sub> e IP<sub>4</sub>.

### **Degradaciones químicas**

#### **Hidrólisis de amidas**

IPC radioactiva se hidrolizó durante 18 h a 70-78°C con HCl-metanol-agua (3:29:4, v/v). El hidrolizado se extrajo con eter etílico. Las bases de cadena larga se analizaron por ccd en el solvente E.

#### **Saponificación**

Los lípidos originales o los lípidos aislados luego del tratamiento con PI-PLC se hidrolizaron con NaOH 0,1 M en metanol 90% durante 1 h a 37°C. Luego de neutralizar con ácido acético glacial 10% (v/v) los lípidos se extrajeron con 1-butanol y se analizaron por ccd.

**Efecto de Aureobasidin A en la diferenciación de trypomastigotes *in vitro***

Trypomastigotes ( $10^7$  células/ml) se incubaron con 10  $\mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]-inositol/ml o 10  $\mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]-ácido palmítico en presencia de 5 a 20  $\mu\text{g}$  de Aureobasidin A/ml etanol durante distintos tiempos. A una concentración final de 0,05% a 0,2% no se observaron efectos significativos del etanol en la diferenciación. Sin embargo, concentraciones de etanol de 1% o mayores resultaron en un aumento de formas intermediarias. La diferenciación *in vitro* fue realizada como lo descrito anteriormente.

**Análisis de inositolfosfolípidos por Espectrometría de Masa con ionización por Electrospray (ESI/MS)***Preparación del extracto de epimastigotes:*

Extractos microsomales (1mg de proteína aprox.) obtenidos según lo descrito en materiales y métodos, PARTE B2, se lavaron por partición en agua / butanol; la fase orgánica se secó y resuspendió en cloroformo-metanol (4:1, v / v). El extracto se separó en una columna de Silica gel 60 Å (Sigma) de 5 x 1,1 cm, mediante el uso de distintas proporciones de cloroformo-metanol: a) 4:1, 12 ml; b) 3:1, 12 ml; c) 2:1, 12 ml; d) 1:1, 12 ml y e) cloroformo-metanol-agua (10:10:1,5). Se colectaron fracciones de 1,5 ml. La columna fue monitoreada por ccd en el solvente A. La fracción conteniendo fosfatidilinositol e inositolfosfoceramida que eluyó con la proporción 1:1 se concentró y guardó a  $-20^\circ\text{C}$ , bajo atmósfera de nitrógeno, hasta futuro análisis.

*Preparación de los extractos de trypomastigotes inducidos a diferenciarse:*

$10^9$  trypomastigotes obtenidos según lo descrito arriba se lavaron con Medio 199, pH 7,5 conteniendo 0,4% sero albúmina bovina y se resuspendieron en 50 ml de igual medio pero con pH 5,0.  $2,5 \times 10^8$  células se separaron a distintos tiempos (0h, 1h, 2h y 3h), se lavaron con buffer fosfato-salino (PBS, x3) y los pellets se guardaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta próximo análisis. Los lípidos se extrajeron con cloroformo-metanol (1:2; 3,75 ml), seguido por 1,25 ml de cloroformo y 1,25 ml de agua. Los extractos se juntaron y luego de una centrifugación rápida, se separó la fase acuosa y la fase orgánica se lavó con agua. Finalmente, la fase orgánica se secó con nitrógeno y los lípidos se disolvieron en cloroformo y se guardaron a  $-20^\circ\text{C}$  bajo atmósfera de nitrógeno hasta el próximo análisis.



*Análisis de los inositolfosfolípidos por ESI / MS:*

El análisis por espectrometría de masa con ionización por electrospray se realizó con un equipo “Micromass Q-ToF Ultima” que contiene un analizador cuadrupolo híbrido de tiempo de vuelo, con capacidad de análisis en tandem (MS / MS). El instrumento se controla desde una PC con el software MassLynx. La interfase consiste en una fuente Z-spray. La muestra se perfundió a 5 µl / min. El análisis se llevó a cabo en modo negativo y la ionización se logró con 3,5 KV en la fuente electrospray. La asignación de los iones moleculares se basó en el análisis en tandem de los iones precursores disociados por colisión (Hsu and Turk 2000) (Hsu and Turk 2002). Los espectros ESI / MS / MS se produjeron por selección del ión precursor ( $[M-H]^-$ ) en el primer cuadrupolo (Q1), aceleración (energía de colisión 35-40 eV) al segundo cuadrupolo (Q2), celda de colisión con gas argon (2,3 mtorr) y análisis de los iones hijo en el tercer cuadrupolo (Q3). Típicamente, los espectros ESI / MS o ESI / MS / MS se generaron por promedio de las señales escaneadas durante 1 minuto.

**Incorporación de  $[^3H]$ -uracilo-Trypomastigotes/Amastigotes.** Células de mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub> gamma( $\gamma$ )-irradiadas ( $1 \times 10^7$  células /placa) resuspendidas en medio DMEM conteniendo 20 % de suero (calf) fetal se sembraron en placas de cultivos de tejido de 12 celdas (Corning Glass Works, Corning, NY) y se incubaron a 37° C con 7% CO<sub>2</sub> durante 24 h. Luego de 24 h., las celdas se lavaron una vez y se agregó medio fresco conteniendo  $4,17 \times 10^6$  trypomastigotes o amastigotes / celda. Una celda se deja sin infectar como control. Luego de 2 h de incubación a 37°C y 7% CO<sub>2</sub>, los cultivos se lavaron dos veces con Dulbecco's PBS (Sigma) y el medio de cultivo se reemplaza para remover los parásitos extracelulares. A ese tiempo se agregó 0,5-1 µCi de  $[5,6-^3H]$ -uracilo /celda (actividad específica, 40-50 Ci /mmol; NEN Research Products, Boston) y los cultivos se incubaron durante 48-72hs. La cantidad de  $[^3H]$ -uracilo puede variar entre 6-12 µl por placa de cultivo. Para estudiar inhibición en la replicación se agrega la droga en este momento (cada concentración por triplicado). Al tercer día se mide la incorporación de  $[^3H]$ -uracilo en el material precipitable con ácido tricloroacético (TCA). Los sobrenadantes de las monocapas se transfieren a un tubo, se agrega 1ml de dodecil sulfato de sodio 1% conteniendo 100g de uracilo / ml a cada celda y la suspensión se transfiere a un tubo de vidrio. Las celdas se lavan con 3 ml de TCA 0,3 N (5%) (frío) y se combina con la suspensión previa.

Las muestras se mantienen en hielo durante 15 minutos y se colectan en filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/D) con un “sampling manifold” (Millipore, Bedford, Massachussets); los tubos se lavan 2-3 veces con 4-5 ml de TCA 0,3N y los filtros 2 veces con TCA y una vez con etanol 95%.

Luego de dejar secar los filtros se colocan en 5 ml de solución centelladora Ecolume. Los viales conteniendo los filtros y la solución centelladora se mezclan vigorosamente con vortex durante 20 segundos y se cuentan con un contador de centelleo. Las cuentas de los controles de mioblastos sin infectar se sustraen de todos los puntos. El 100% de replicación está dado por las cuentas obtenidas de los mioblastos infectados sin agregado de droga. La curva de % Inhibición vs. concentración del inhibidor ( $\mu\text{M}$ ) así como el valor de  $\text{IC}_{50}$  se obtuvieron con el programa Sigmaplot.

---

## INTRODUCCIÓN

### Acidocalcisomas

Dada la importancia de los fosfolípidos en la biosíntesis de estructuras tipo ancla de glicoproteínas y como no se conocía la composición lipídica del acidocalcisoma, organela importante en *T. cruzi*, se hizo un estudio de los mismos además de compararlos con la fracción microsomal.

El parásito *Trypanosoma cruzi* alterna su vida entre dos huéspedes muy diferentes, el insecto vector y el mamífero hospedador. El éxito de la propagación de la infección radica en la capacidad de adaptación del parásito a los ambientes que estos huéspedes le presentan. Para ello desarrolló mecanismos que le permiten soportar las variaciones como ser osmolaridad, pH y densidad iónica. Al respecto, los Acidocalcisomas son organelas que han demostrado recientemente una asociación con la respuesta a estrés celular.

Los Acidocalcisomas son organelas acídicas con alto contenido en polifosfatos, calcio, pirofosfato, magnesio, y otros elementos. La presencia a su vez de intercambiadores iónicos y al menos un transportador en esta organela, sugiere la importancia en la homeostasis de diferentes elementos. Son las únicas organelas que han sido conservadas durante la evolución desde procariotes a eucariotes y por presentar distintas características en diferentes organismos constituyen blancos potenciales para la terapia contra enfermedades parasitarias (Docampo et al. 2005).

### Características morfológicas

Los Acidocalcisomas fueron visualizados por primera vez por microscopía de fluorescencia en tripanosomatídeos vivos o permeabilizados con el indicador naranja de acridina (Docampo et al. 1995) (Vercesi et al. 1994). Por microscopía electrónica, la estructura se observa con un contenido electron-denso unido a una membrana. Dependiendo del método de fijación, se observa más o menos cantidad del material electron-denso. Tienen forma redondeada con un diámetro promedio de  $200\pm 90$  nm y una membrana de 8nm de espesor en *T. cruzi* (Miranda et al. 2000). En *T. cruzi*, la vacuola se visualiza en general a lo largo de la célula pero parece preferir la parte central o cercana a la vacuola contractil (Montalvetti et al. 2004). En amastigotes, las vacuolas son más abundantes, alrededor de 40 distribuidas a lo largo de la célula.

Similar estructura se observa en otros tripanosomatídeos: *Trypanosoma brucei*, *Leishmania*, *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium falciparum* merozoitos.

### **Presencia de intercambiadores y canales en los Acidocalcisomas (Fig. 40, Tabla 5)**

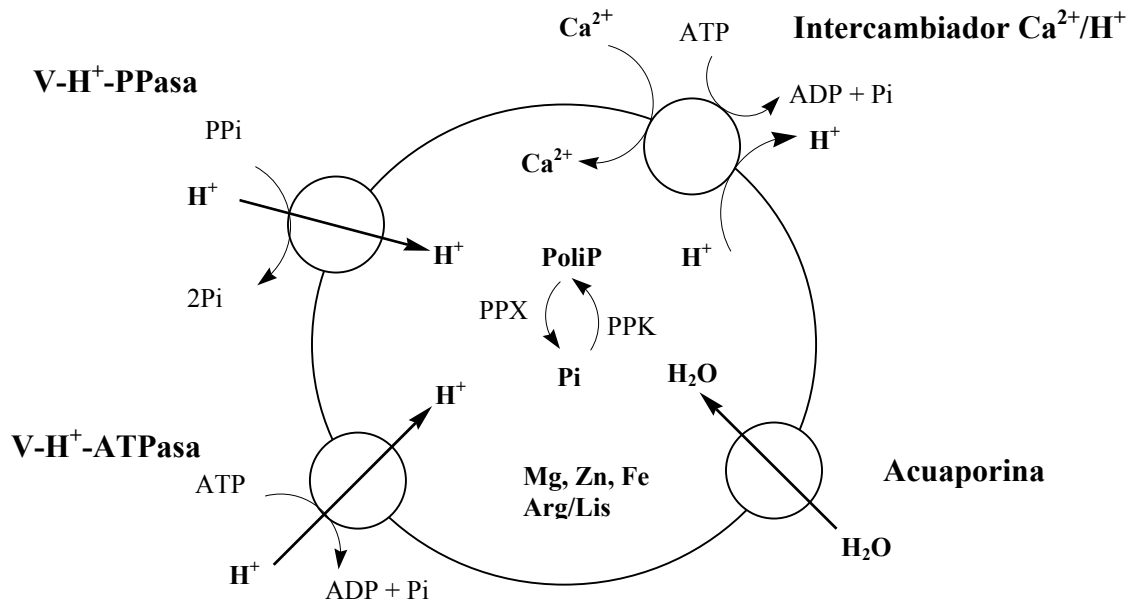
*Bombas de calcio.* La presencia de una  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -ATPasa fue descrita en *T. brucei* (Vercesi et al. 1994) y *T. cruzi* (Docampo et al. 1995) y luego esta actividad fue confirmada en los acidocalcisomas aislados (Scott et al. 2000). Se describieron genes de *T. cruzi* (Lu et al. 1998), *T. brucei* (Luo et al. 2004) y *Toxoplasma gondii* (Luo et al. 2001) que codifican para esta bomba y que son capaces de complementar una levadura deficiente en el gen PMC1 que codifica para la  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -ATPasa vacuolar, lo cual confirma la funcionalidad de la proteína. Existen a su vez otros genes en *T. cruzi* y *T. brucei* que codifican para  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -ATPasa pero que localizan en membrana.

*Bombas de protones.* Inhibidores específicos de las  $\text{H}^{+}$ -ATPasas vacuolares permitieron su identificación en células permeabilizadas e intactas de *T. brucei* (Vercesi et al. 1994) y *T. cruzi* (Docampo et al. 1995). Se demostró co-localización con  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -ATPasa en *T. cruzi* (Lu et al. 1998). V- $\text{H}^{+}$ -PPasas localiza también en los acidocalcisomas y fueron usadas como marcadores en la purificación de acidocalcisomas (Scott et al. 2000). Esta actividad también está presente en membrana plasmática y en el Aparato de Golgi pero su concentración es mayor en esta organela.

*Intercambiadores  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .* Si bien el intercambiador  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  está presente en células procíclicas de *T. brucei* (Vercesi et al. 1996) y en promastigotes de *L. donovani* (Vercesi et al. 2000), está ausente en *T. cruzi*. Se ha postulado que la toma de  $\text{Na}^{+}$  en esta organela *in situ* o *in vitro* podría colaborar en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  ya que segundos mensajeros como inositol tris-fosfato no liberan  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenamientos de calcio en estos organismos (Moreno et al. 1992).

*Acuaporina.* Una acuaporina se ha encontrado recientemente en los acidocalcisomas de *T. cruzi* (Montalvetti et al. 2004). Esta proteína funciona como un canal de agua en

oocytos de *Xenopus*. Se localiza en la vacuola contractil y en el acidocalcisoma, lo cual podría indicar un rol en la osmoregulación.



**Figura 40. Acidocalcisoma en *Trypanosoma cruzi*.** Una Ca<sup>2+</sup> ATPasa vacuolar, sensible a vanadato, permite la entrada de calcio mediante el intercambio de H<sup>+</sup>. La alta concentración de protones dentro de la organela está dada por la acción de una H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar, sensible a bafilomicina A1 y una H<sup>+</sup>-PPasa vacuolar, sensible a amino-metilen-difosfonato (AMDP). Una acuaporina transporta agua. El Acidocalcisoma posee altas concentraciones de pirofosfato, polifosfatos, magnesio, calcio, sodio, zinc, arginina y lisina. Para realizar esta figura se tomó como modelo la figura 4 de (Docampo et al. 2005).

**Tabla 5. Intercambiadores presentes en los acidocalcisomas de los distintos microorganismos estudiados.** La presencia de los intercambiadores en los acidocalcisomas de los distintos microorganismos fue confirmada por mediciones de actividad con inhibidores específicos y /o anticuerpos contra la proteína y microscopía electrónica y de fluorescencia o clonación del gen correspondiente y verificación de la localización por expresión de la proteína conjugada con GFP (green fluorescent protein) (Docampo et al. 2005).

| <b>Intercambiador presente en Acidocalcisomas</b> | <b>Microorganismo</b>  |
|---|--|
| Ca <sup>2+</sup> -ATPasa                          | <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Dictyostelium discoideum</i>  |
| V- H <sup>+</sup> -PPasa                          | <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Leishmania donovani</i> , <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>Phytomonas francai</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Plasmodium berghei</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Dictyostelium discoideum</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Rhodospirillum rubrum</i> |
| V-H <sup>+</sup> -ATPasa                          | <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>Trypanosoma evansi</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Dictyostelium discoideum</i> , <i>plateletas humanas</i>   |
| Acuaporina  | <i>Trypanosoma cruzi</i>   |
| Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>                   | <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Leishmania donovani</i>   |

## Funciones del acidocalcisoma

El acidocalcisoma es el principal almacenamiento de calcio, magnesio, sodio, potasio, zinc, hierro, pirofosfato, polifosfatos y aminoácidos básicos. El bajo contenido de azufre indicaría poca presencia de proteínas. Distintas funciones han sido deducidas a partir del conocimiento de los elementos que almacena (Docampo et al. 2005). Por ejemplo, siendo el principal almacenamiento de calcio dentro de la célula podría contribuir con la señalización en determinados procesos. La presencia a su vez de una ATPasa  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ , que libera calcio<sup>2+</sup> del acidocalcisoma en presencia de agentes alcalinizantes, en la célula entera (Docampo et al. 1995) o en los acidocalcisomas aislados (Scott et al. 2000), sugiere también dicha funcionalidad. El aumento del calcio intracelular en *T. cruzi* tiene importancia a nivel de la infección y se asocia con la célula huésped (Moreno et al. 1994). Con respecto al parásito, este aumento está sustentado por dos experimentos: el agregado de complejantes de calcio (BAPTA or Quin 2) y el tratamiento previo del parásito con complejantes inhiben la invasión. Además, el tratamiento con ionomycina, que eleva el calcio intracelular, aumenta la infección (Schettino et al. 1995). El aumento del calcio intracelular puede deberse a una movilización del catión de los almacenamientos intracelulares pero también puede provenir del medio extracelular (Moreno & Docampo, 2002). Sin embargo, las señales y receptores que estarían involucrados en este último mecanismo no han sido investigadas excepto por una publicación que sugiere la estimulación por ácidos grasos, en particular el ácido araquidónico (Catisti et al. 2000). Si bien el camino de señalización a través de inositol-1,4,5-trisfosfato/diacilglicerol está presente en los distintos estadios del parásito, no se sabe como se libera  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico o del acidocalcisoma (Docampo et al. 2001). La presencia de araquidónico en la fosfatidilcolina aislada del acidocalcisoma (ver Resultados de esta tesis), sugiere que una fosfolipasa A<sub>2</sub> estaría involucrada en el camino de señalización.

Durante su ciclo de vida el parásito está exigido a adaptarse a las distintas condiciones que sus huéspedes le ofrecen; por ejemplo, debe poder responder favorablemente a condiciones de estrés hipo e hiperosmótico. La reproducción de estas condiciones *in vitro* produce la hidrólisis o síntesis de polifosfatos respectivamente, lo cual sugiere que existe una relación entre la organela y la osmoregulación (Ruiz et al. 2001), ya que el acidocalcisoma es el almacenamiento más importante de polifosfatos. En condiciones de estrés hipoosmótico, la célula aumenta su volumen por incorporación de agua y recupera su volumen inicial mediante la liberación de iones y aminoácidos.

Sin embargo, esta liberación no puede sustentar todo el volumen recuperado (Rohloff et al. 2003). Por otra parte, el fosfato producido en estas condiciones a partir de polifosfato, no es liberado al citosol (Ruiz et al. 2001). La presencia de una acuaporina en el acidocalcisoma que incorpora agua del citoplasma celular, permite que la célula recupere su volumen natural (Rohloff et al. 2004). La incorporación de agua en el acidocalcisoma provoca además translocación de la organela a través de los microtúbulos y fusión con la vacuola contractil, en un proceso dependiente de AMPc (Rohloff et al. 2004).

Durante la diferenciación del trypomastigote al amastigote y en la fase exponencial de crecimiento de epimastigotes se da un aumento en las concentraciones de polifosfatos lo cual puede indicar la necesidad de estos compuestos como fuente de energía para estabilizar el crecimiento. Los cambios observados durante la diferenciación pueden indicar la adaptación a la vida intracelular (Docampo et al. 2005).

La presencia de polifosfatos en el Acidocalcisoma sugiere un rol en la regulación del pH, la hidrólisis de la unión anhídrica de fosfato genera protones que pueden neutralizar cambios en el pH en *S. cerevisiae* (Castro et al. 1995). La presencia de actividades de exopolifosfatasas y polifosfato quinasas sugieren un rol similar en el acidocalcisoma de *T. cruzi* (Ruiz et al. 2001). Por otra parte, en *T. brucei*, la reducción de la actividad de V-H<sup>+</sup>-PPasa mediante interferencia de RNA resultó en células incapaces de regular su pH ante una exposición a un pH externo mayor a 7,4 (Lemerrier et al. 2002).

---

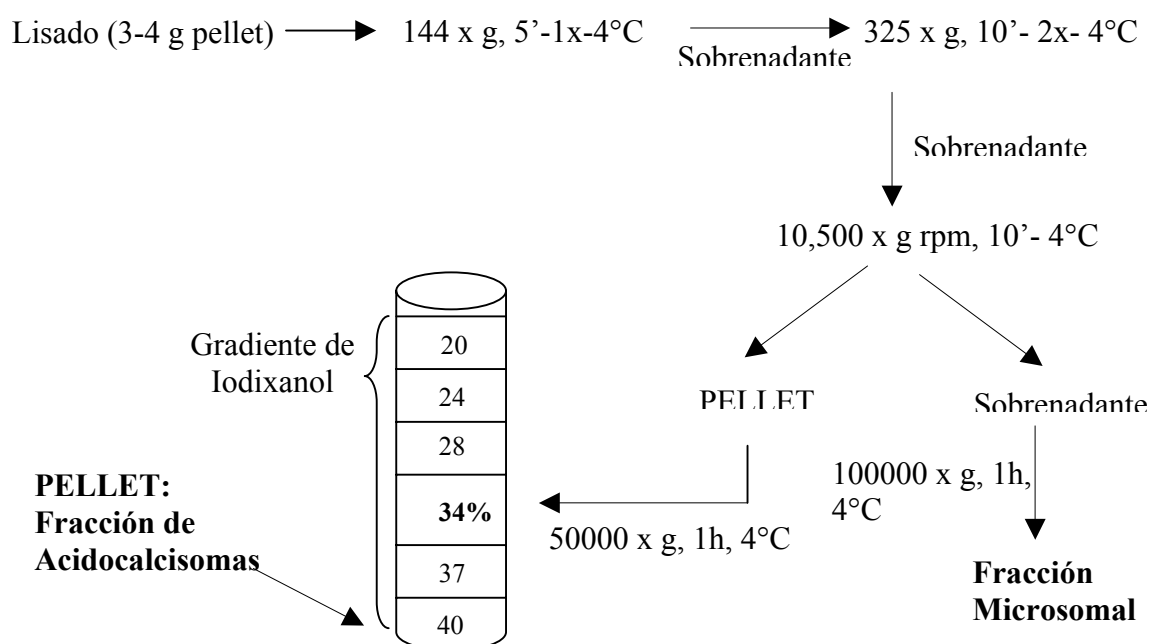


## RESULTADOS

### Fraccionamiento celular-Aislamiento de Acidocalcisomas

El método de aislamiento de Acidocalcisomas fue desarrollado por (Scott et al. 2000) con el fin de confirmar como inherentes a los mismos, actividades (o transportadores) previamente caracterizadas en células permeabilizadas. Dicho método utiliza un gradiente de Iodixanol, en el cual se obtiene una fracción más pura que la aislada en un gradiente de Percoll (Scott et al. 1998). Según el marcador de membrana plasmática ( $H^+$ -ATPasa) (Vanderheyden et al. 1996; Luo et al. 2002), la contaminación de la fracción con membrana es del 25% (Scott et al. 2000); no se observó contaminación significativa con organelas, salvo un 5% de contaminación glicosomal.

Espectros de pérdida de energía electrónica han sugerido la presencia de azúcares o lípidos en los acidocalcisomas (Scott et al. 1997). Estos componentes podrían ser parte del material electrón denso que se observa por microscopía electrónica (Docampo et al. 2001). Con el propósito de estudiar la composición de los Acidocalcisomas se modificó la técnica de aislamiento de manera de minimizar la contaminación de membrana (**Fig. 41**) y obtener una fracción con mayor pureza, la cual fue evaluada según la **Fig. 42**.



**Figura 41. Fraccionamiento celular. Aislamiento de Acidocalcisomas.** Los Acidocalcisomas se obtuvieron según el método de (Scott et al. 2000), con algunas

modificaciones para minimizar la contaminación de membrana. Resumiendo la técnica, la lisis celular se realizó en el buffer: (sacarosa 125mM, KCl 50mM, Hepes 20mM, MgCl<sub>2</sub> 4mM, EDTA 0.5mM, DTT 5mM, pH 7.2, conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas), con carburo de silicio, el cual se removió por centrifugación a 144 x g durante 5'. El sobrenadante se centrifugó dos veces más a 325 x g para remover las células enteras remanentes y luego a 10,500 x g. El pellet de la última centrifugación se resuspendió en 3,46 ml de buffer de lisis y se aplicó en la capa 34% de un gradiente de Iodixanol (Sigma) compuesto por 5 capas (20, 24, 28, 34, 37, 40%). Se centrifugó a 50,000 x g durante 1 hora. El gradiente se fraccionó en 16 muestras de 1,8 ml. El sobrenadante de la centrifugación de 10,500 x g se recentrifugó a 100000 x g durante 1 hora para obtener la fracción microsomal.

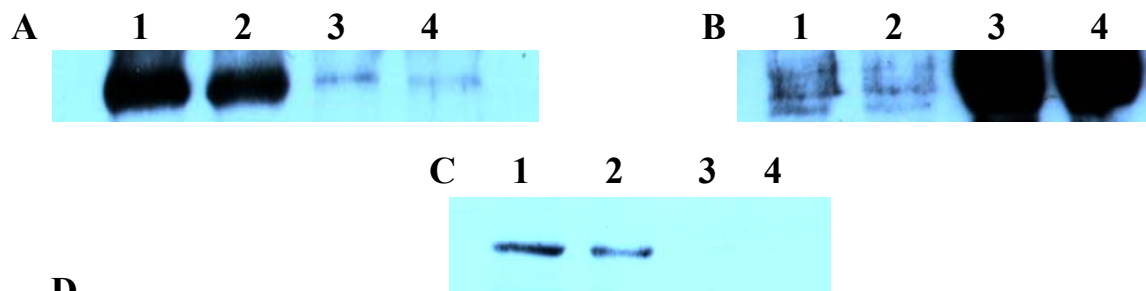
### Grado de purificación de la Fracción de Acidocalcisomas

Los Acidocalcisomas se aislaron según la **Fig. 41** y la pureza de la fracción se evaluó con marcadores de membrana plasmática (Adenilato ciclasa, H<sup>+</sup>-ATPasa y LPPG), de glicosomas (Hexoquinasa) y de Acidocalcisomas (H<sup>+</sup>-PPasa) (Scott et al. 1998). Los resultados pueden verse en la **Fig. 42**. Distintas cantidades de proteína: 1 (2 y 4) y 2 (1 y 3) µg correspondientes a la fracción Microsomal (1 y 2) y de Acidocalcisomas (3 y 4), aisladas según la **Fig. 41**, se analizaron por SDS-PAGE y Western blot. La misma membrana (Western) se trató con el anticuerpo anti-H<sup>+</sup>-ATPasa (*T. cruzi*) (**A**), anti-H<sup>+</sup>-PPasa (*T. cruzi*) (**B**) y anti-LPPG (**C**) por separado. Iguales resultados se obtuvieron en por lo menos 3 experimentos independientes más. Como se esperaba, la fracción así obtenida es rica en Acidocalcisomas (**Fig. 42B**), según el marcador de la organela H<sup>+</sup>-PPasa (Scott et al. 2000). La incubación de la misma membrana con un anticuerpo anti-LPPG (glicolípido mayoritario de la superficie de epimastigotes) que no da reacción, confirma la riqueza de la fracción (**Fig. 42C**). Según el marcador de membrana H<sup>+</sup>-ATPasa (**Fig. 42A**), la contaminación es del 8,5-9,9% (determinado por densitometría del film). Por otra parte, la medición de la actividad de Adenilato ciclasa sugirió un 9,4% de contaminación (**Fig. 42D**, Tabla). Por lo tanto, se concluyó que la fracción de Acidocalcisomas, obtenida según este método, contiene no más de un 10% de contaminación de membrana.

Con respecto a la contaminación glicosomal, se detectó sólo un 2% de actividad de Hexoquinasa en la fracción de Acidocalcisomas. Dado que el porcentaje

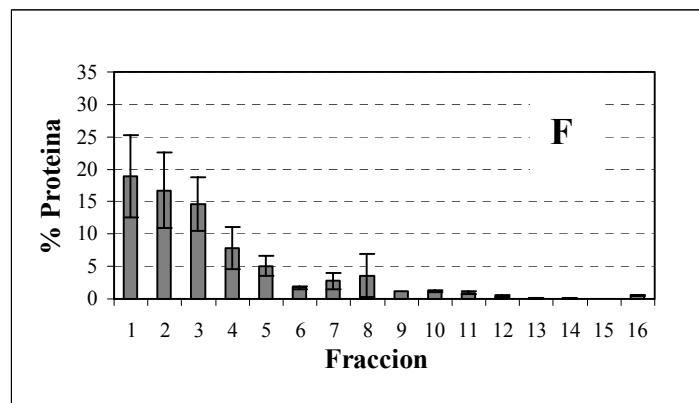
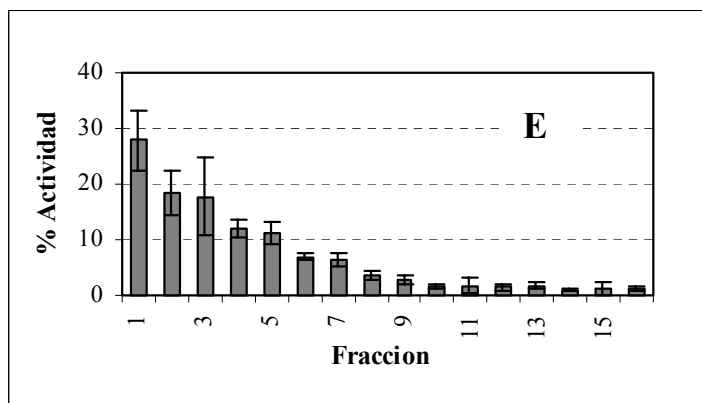
de proteína total recuperado en la fracción es 0,6%, la contaminación glicosomal (o la purificación de hexoquinasa) sería del 3,5% (Fig. 42E y F).

Estos resultados motivaron el estudio de la composición de la fracción. Se consideró que para formar parte de los Acidocalcisomas, la recuperación de un compuesto tiene que ser mayor al 10% (Fig. 42).



D

| Fracción:                                 | Lisado total | Microsomas           | Acidocalcisomas    |
|---|--------------|----------------------|--------------------|
| Adenilato ciclasa (fmol cAMP/μg proteína) | 99,2 +/- 4,0 | 79,6 +/- 1,2 (80,2%) | 9,3 +/- 0,7 (9,4%) |



**Figura 42. Grado de purificación de la fracción de Acidocalcisomas.** 1 (2 y 4) y 2 (1 y 3) μg de proteína de la fracción Microsomal (1 y 2) y de Acidocalcisomas (3 y 4) se analizaron por SDS-PAGE y Western blot con los Anticuerpos anti-H<sup>+</sup>-ATPasa (*T. cruzi*) (A), anti-H<sup>+</sup>-PPasa (*T. cruzi*) (B) y anti LPPG (C). La cantidad de proteína fue determinada por el método de Bradford en presencia de 0,01% de SDS. (D) La actividad de Adenilato ciclasa (marcador de membrana) se midió en el Lisado total y en las fracciones Microsomal y de Acidocalcisomas mediante una reacción de dos pasos: la generación de cAMP se indujo en Tris-HCl 25mM, EDTA 1mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, BSA 0,35 mg/ml, pH 7,5, ATP 3mM y fosfocreatina/creatin quinasa 10mM como sistema de regeneración de fosfato. La concentración de cAMP se midió con un Kit de Pharmacia (Enzyme Immunoassay). (E)

Distribución de la actividad de Hexoquinasa (marcador de Glicosomas) en un gradiente de Iodixanol. (F) Distribución de proteína total en un gradiente de Iodixanol.

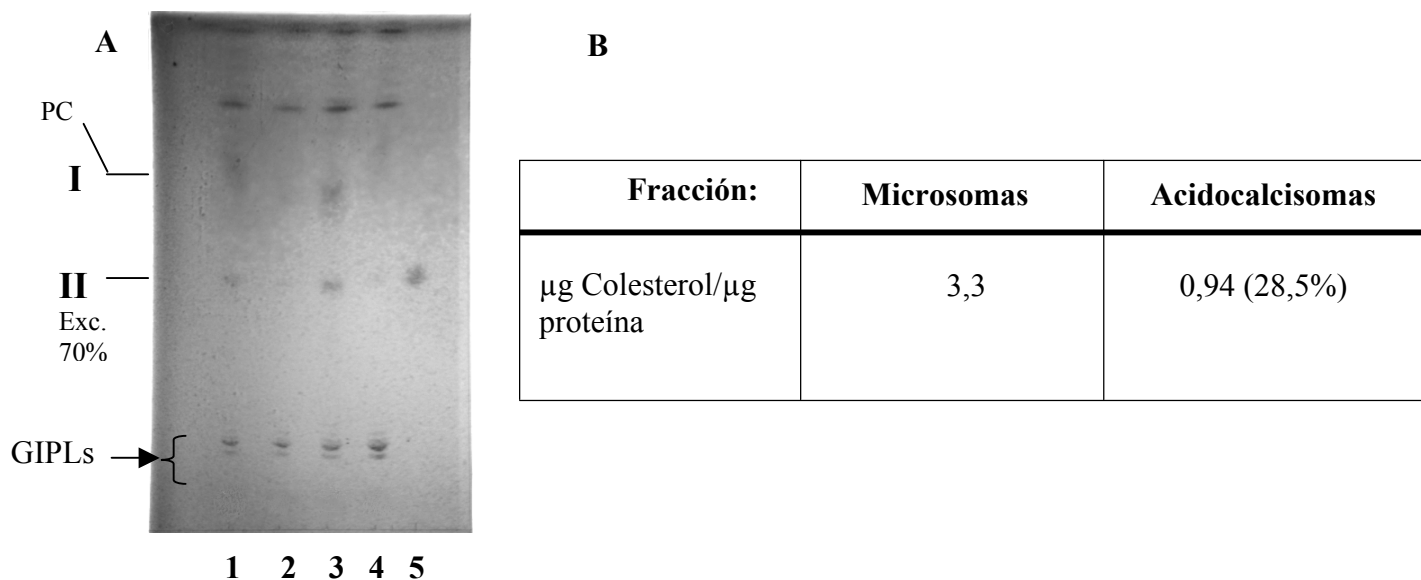
### **Caracterización de los Lípidos de los Acidocalcisomas**

Igual cantidad en proteína de las fracciones Microsomal y de Acidocalcisomas se extrajeron con butanol saturado en agua, según lo descrito en Materiales y Métodos, y el extracto se caracterizó por ccd en el solvente A (**Fig. 43A**). Se observó mayor concentración de los lípidos I y II en la fracción de Acidocalcisomas (70% de enriquecimiento, según la evaluación de la placa por densitometría). Dichos lípidos fueron caracterizados como fosfatidilcolina y fosfatidilinositol, respectivamente, en un sistema de solventes que permite una buena separación de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol (cloroformo, metanol, Ácido Acético, agua (25:30:8:4)), (Methods in Enzymology, XIV). Por otra parte, se analizó también la cantidad de colesterol total en ambas fracciones mediante un sistema de Boheringer-ROCHE (**Fig. 43B** y ver Materiales y Métodos). La concentración en la fracción de Acidocalcisomas resultó 1/3 de la de Microsomas con respecto a la cantidad de proteína. Estos resultados sugieren una alta concentración de fosfolípidos en los Acidocalcisomas.

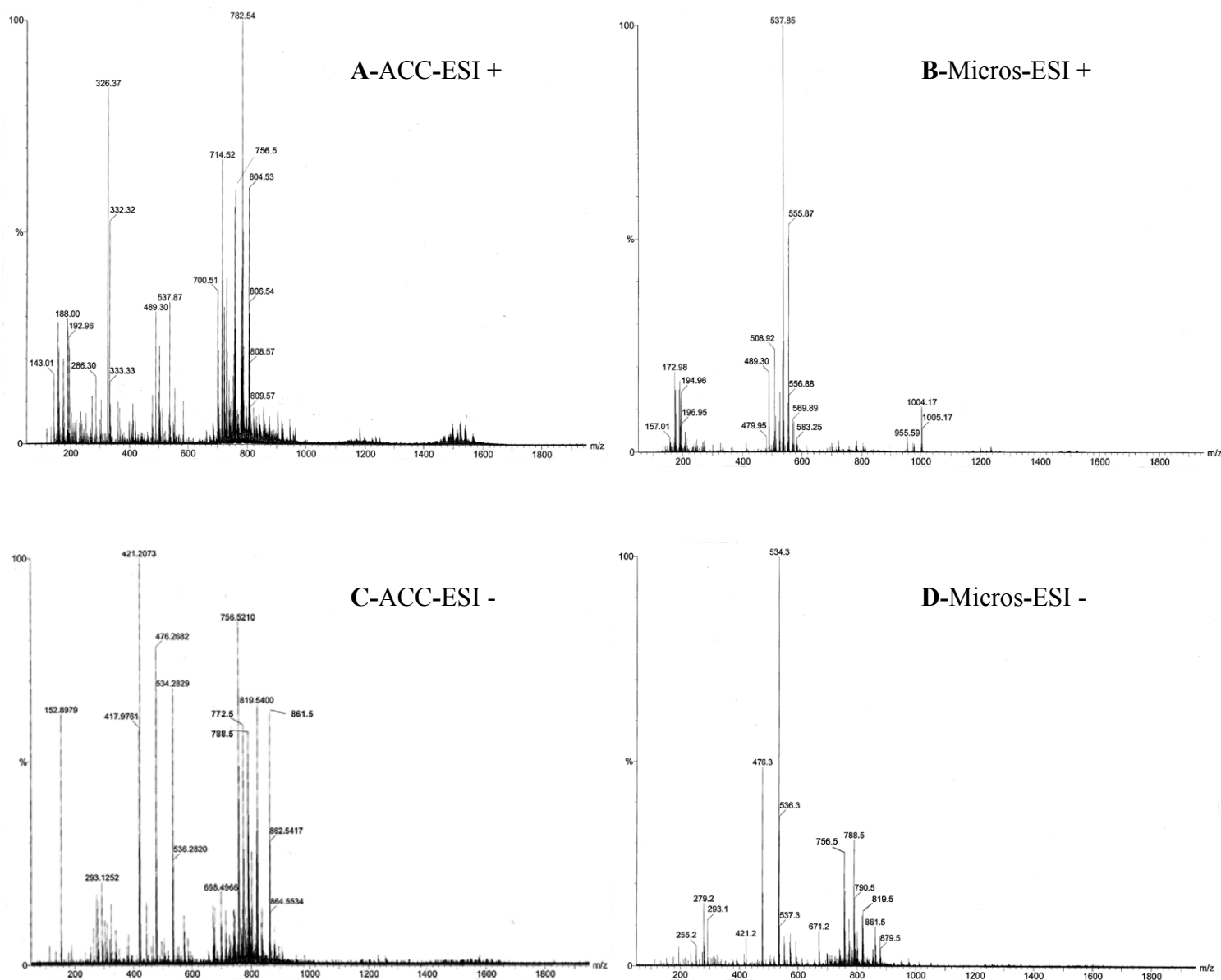
### **Análisis de los Lípidos de Acidocalcisomas y de Microsomas por Espectrometría de Masa con ionización por Electrospray (ESI/MS).**

Ambas fracciones fueron analizadas por ESI/MS en modo positivo y negativo (**Fig. 44**). Como se esperaba, la fracción de Acidocalcisomas presentó mayor concentración de iones moleculares entre 700-800, correspondientes a fosfolípidos. Los iones mayoritarios fueron analizados por ESI/MS/MS con el fin de confirmar su estructura. La **Fig. 45** muestra el análisis en modo negativo. Los iones 819,5 y 861,5 fueron identificados como Alquil-acil fosfatidilinositol (16:0/18:2) y Diacil-fosfatidilinositol (18:0/18:2); se obtuvieron espectros similares a los de la Parte B1 (Páginas 87 y 85, respectivamente). Los picos 788,5; 772,5 y 756,5 fueron identificados como provenientes del mismo ión molecular de Fosfatidilcolina (18:0/18:2). La **Fig. 45C** muestra el análisis de las rupturas. En modo positivo, los iones 714,5; 758,5; 782,5 y 804,5 fueron los más característicos (**Fig. 46**). Los mismos se identificaron como Fosfatidiletanolamina (16:0/18:2); Fosfatidilcolina

(16:1/18:2); Fosfatidilcolina (18:2/18:2) y Fosfatidilcolina (20:4/18:2), respectivamente. La Fig. 46C muestra el análisis de las rupturas.

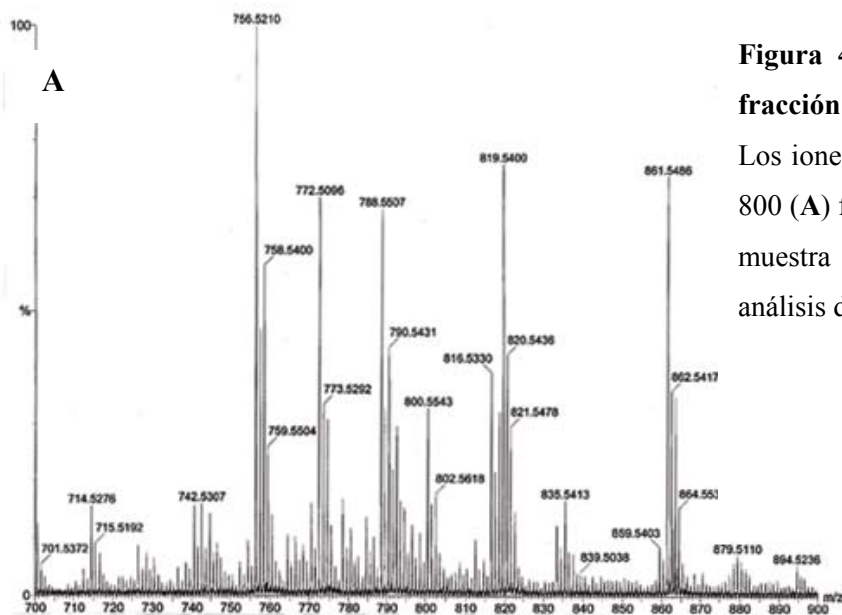


**Figura 43. Caracterización de los Lípidos de los Acidocalcisosomas.** **A.** 20 µg de proteína de la fracción Microsomal y de Acidocalcisosomas se extrajeron con butanol saturado en agua (600 µl, 3X), como lo descripto en Materiales y Métodos. Los extractos se resuspendieron en cloroformo, metanol, agua (10, 10, 3 v/v; (70 µl)) y se analizaron por ccd en el solvente A. **1** y **3**, 20 y 30 µl respectivamente de la fracción de Acidocalcisosomas. **2** y **4**, 20 y 30 µl respectivamente de la fracción microsomal. Los lípidos se detectaron con orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en etanol y calentamiento a 200 °C. Se observó un 70% de enriquecimiento de los compuestos I y II en la fracción de Acidocalcisosomas según el análisis por densitometría de la placa. **5**, testigo de fosfatidilinositol. PC, Fosfatidilcolina. **B.** 250 µg de proteína de la fracción Microsomal y de Acidocalcisosomas se extrajeron como en A y se resuspendieron en 50 µl de isopropanol. 3/10 de la muestra se usaron para medir colesterol según kit de Boehringer-ROCHE (ver Materiales y Métodos).



**Figura 44. Análisis de los Lípidos de Acidocalcisomas y de Microsomas por Espectrometría de Masa con ionización por Electropray (ESI/MS).**

Las fracciones Microsomal (**B** y **D**) y de Acidocalcisomas (**A** y **C**) se extrajeron según lo descrito en Materiales y Métodos y se analizaron por Espectrometría de Masa con ionización por Electropray en modo negativo (**C** y **D**) en el solvente cloroformo, metanol (1/3, v/v) y en modo positivo (**A** y **B**) en igual solvente pero con el agregado de 1% de Ácido Acético. Los picos con peso molecular de 700 a 800 fueron analizados por ESI/MS/MS (**Fig. 45**).



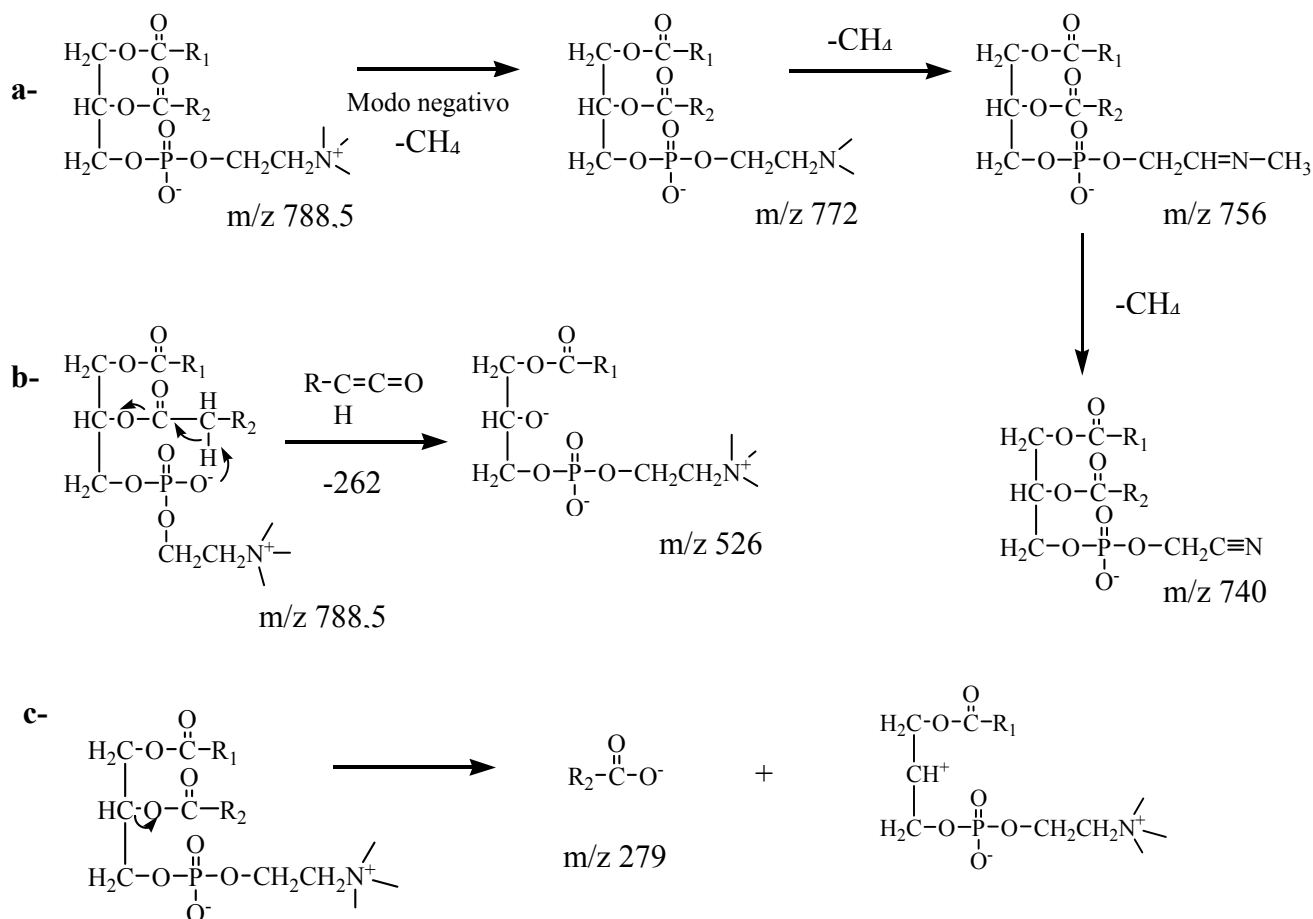
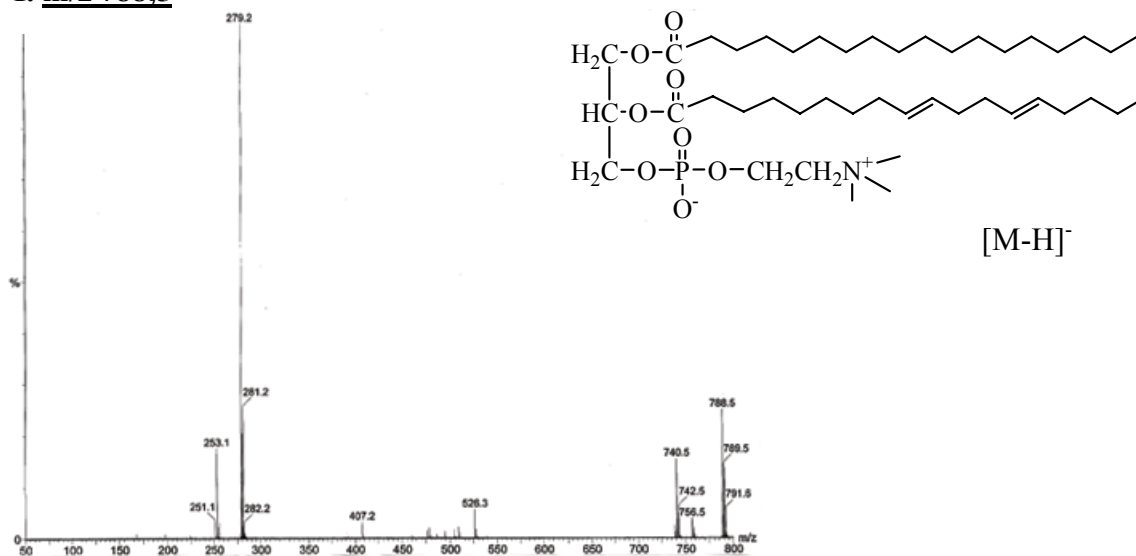
**Figura 45. Fosfolípidos mayoritarios en la fracción de Acidocalcisomas, modo negativo.** Los iones mayoritarios de peso molecular 700-800 (A) fueron analizados por ESI/MS/MS. (B) muestra las estructuras asignadas y (C) el análisis de las rupturas

**B**

| Ión Molecular [M-H] <sup>-</sup> | Nombre                                       | Estructura  |
|----------------------------------|--|---|
| 861,5                            | 1-Estearoil- (2-linoleil)-3-fosfoinositol    | $  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_{17}\text{H}_{35} \\    \\  \text{HC}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_{18}\text{H}_{33} \\    \\  \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)-\text{Inositol}  \end{array}  $                            |
| 819,5                            | 1-O-Hexadecil (2-linoleil)3-fosfoinositol    | $  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}_{16}\text{H}_{33} \\    \\  \text{HC}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_{18}\text{H}_{33} \\    \\  \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)-\text{Inositol}  \end{array}  $  |
| 788,5                            | 1-Estearoil- (2-linoleil)-3-fosfocolina      | $  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_{17}\text{H}_{35} \\    \\  \text{HC}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_{18}\text{H}_{33} \\    \\  \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+  \end{array}  $  |
| 772,5                            | 1-Estearoil-(2-linoleil)3-fosfocolina (hijo) | $  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_{17}\text{H}_{35} \\    \\  \text{HC}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_{18}\text{H}_{33} \\    \\  \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}  \end{array}  $    |
| 756,5                            | 1-Estearoil-(2-linoleil)3-fosfocolina (hijo) | $  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_{17}\text{H}_{35} \\    \\  \text{HC}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_{18}\text{H}_{33} \\    \\  \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}=\text{NCH}_3  \end{array}  $ |

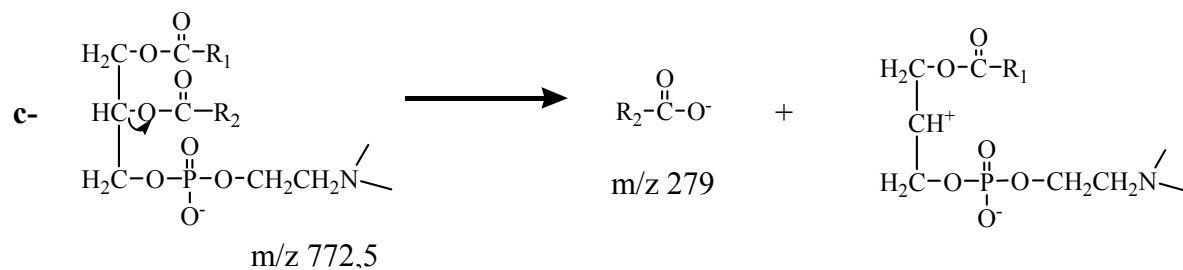
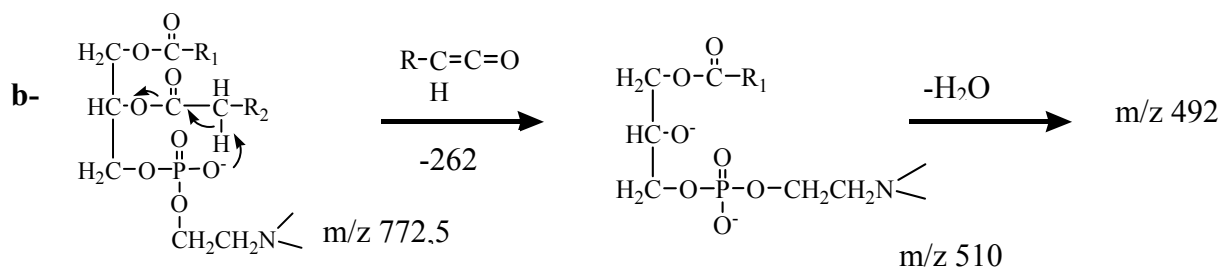
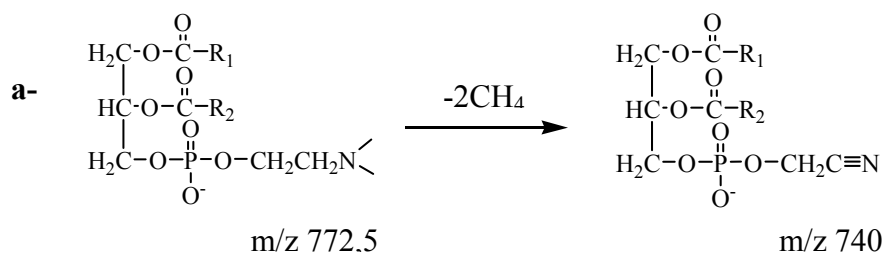
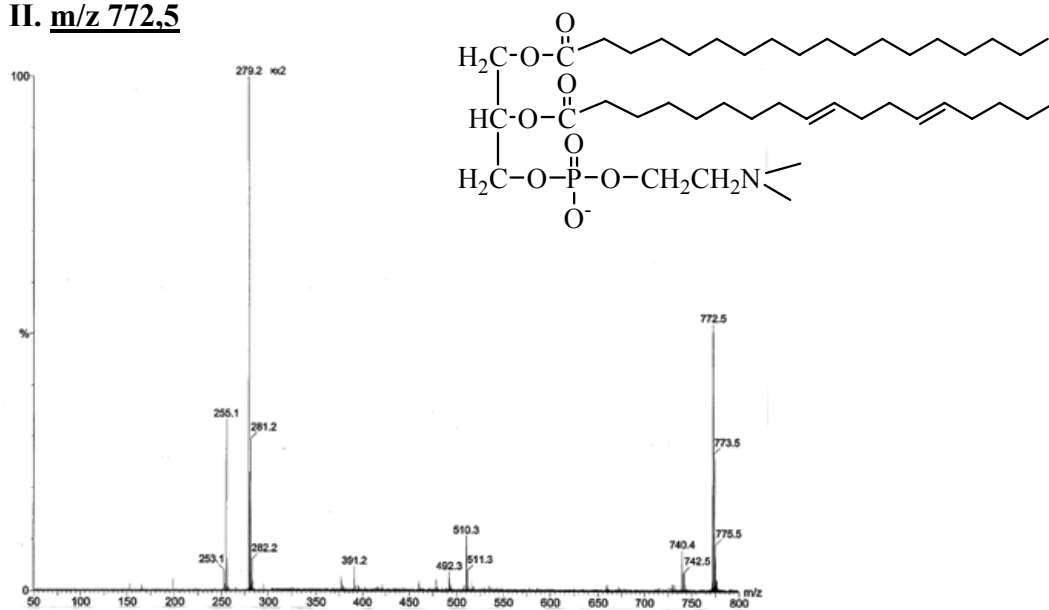
**C. Análisis de las rupturas de los iones moleculares: I-788,5, II-772,5, III-756,5 por ESI / MS / MS (modo negativo).**

**I. m/z 788,5**

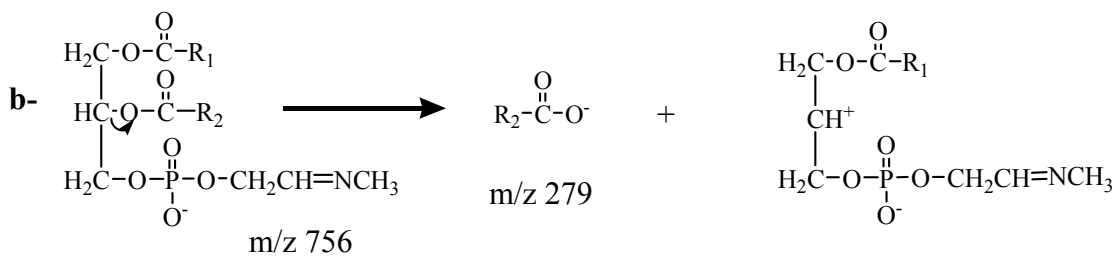
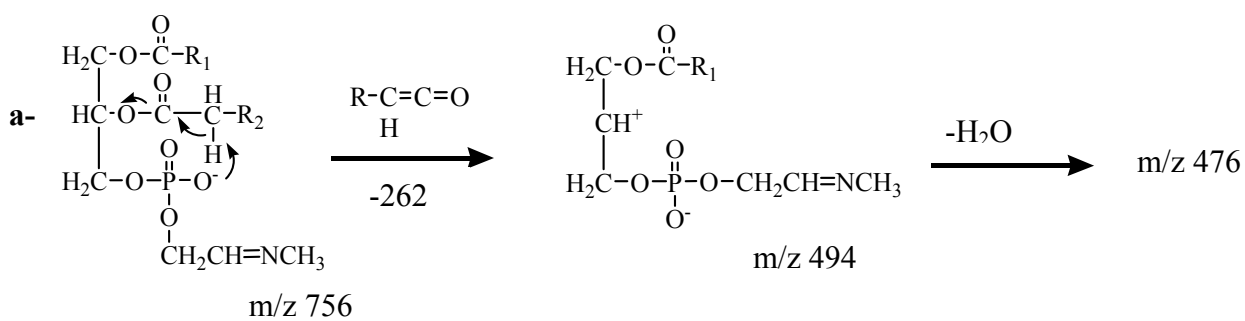
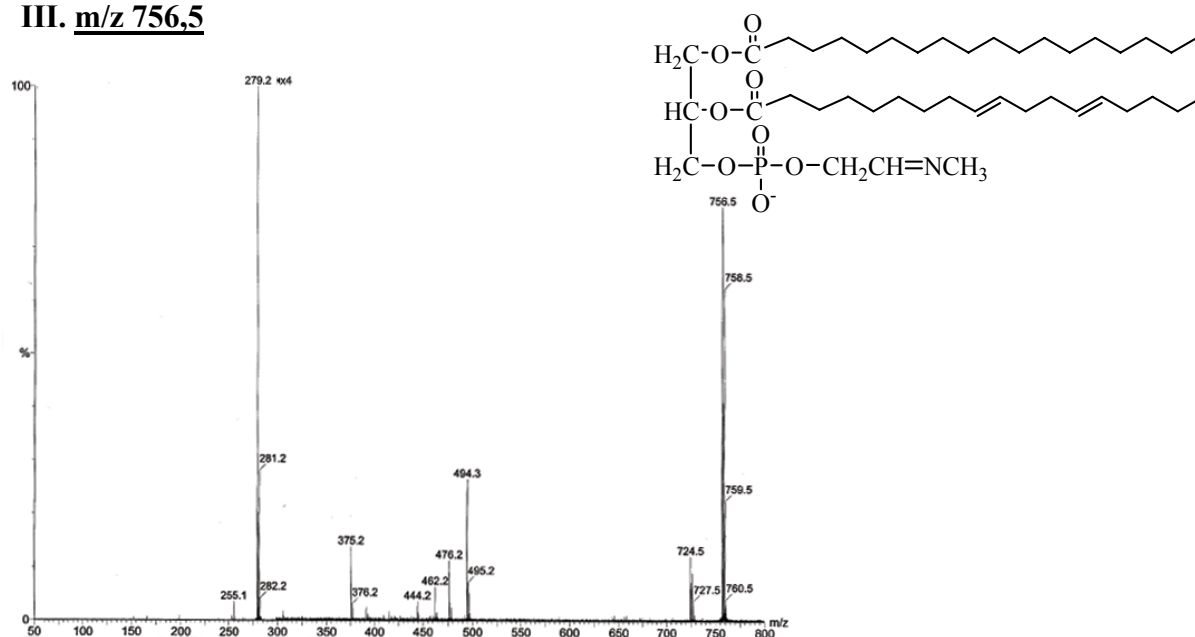


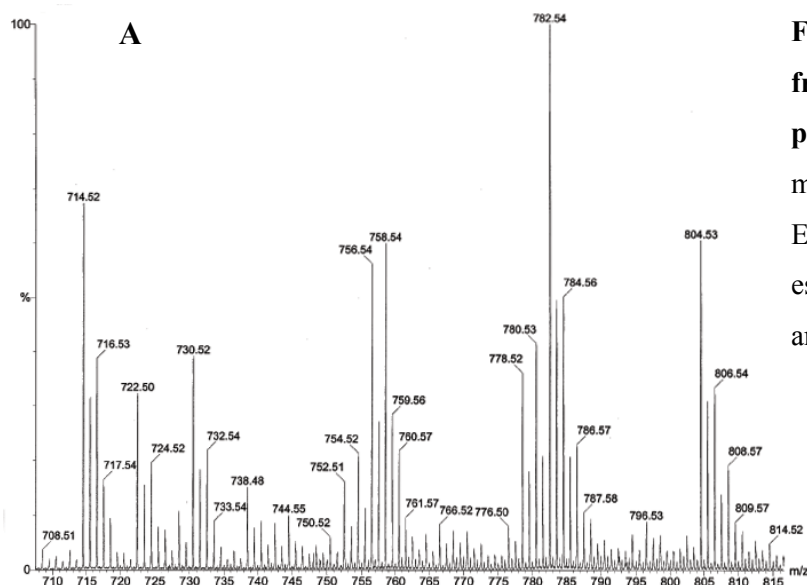


II. m/z 772,5



III. m/z 756,5



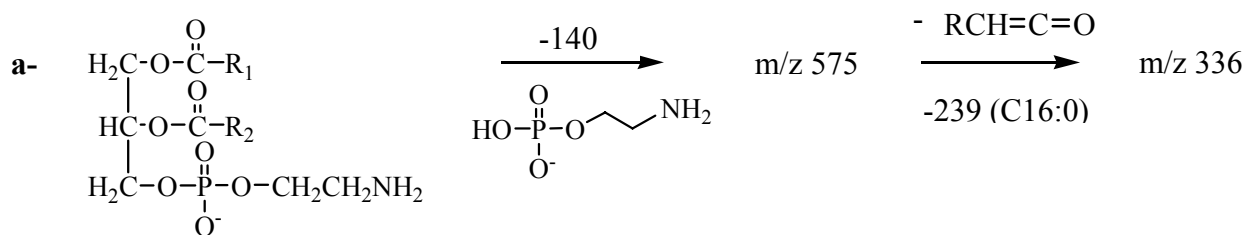
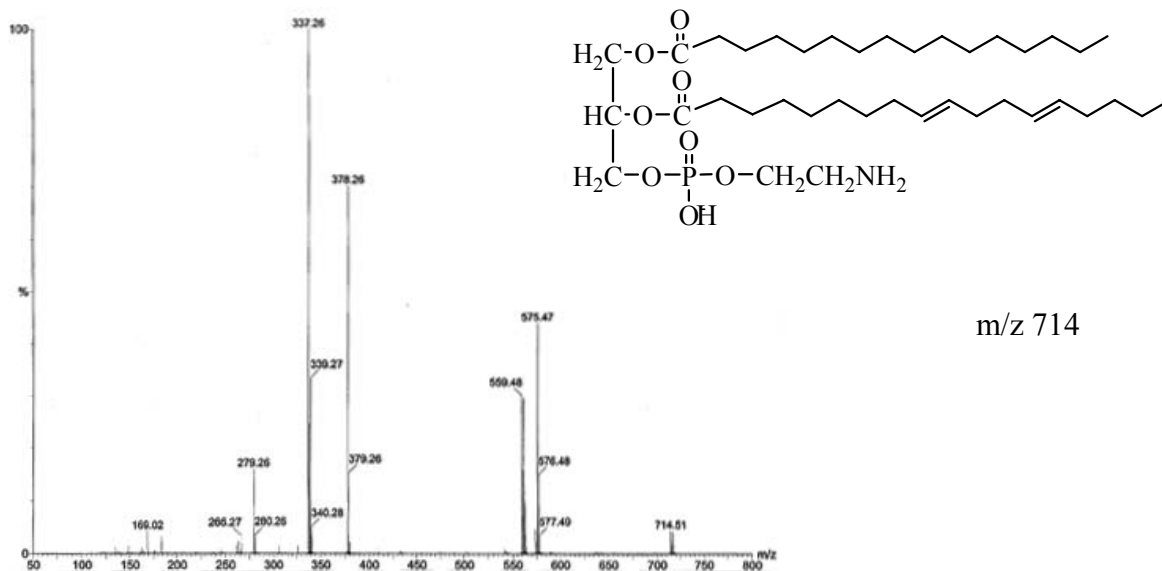


**Figura 46. Fosfolípidos mayoritarios en la fracción de Acidocalcismos, modo positivo.** Los iones mayoritarios de peso molecular 700-800 (A) fueron analizados por ESI/MS/MS. La tabla (B) muestra las estructuras asignadas y en (C) se muestra el análisis de las rupturas

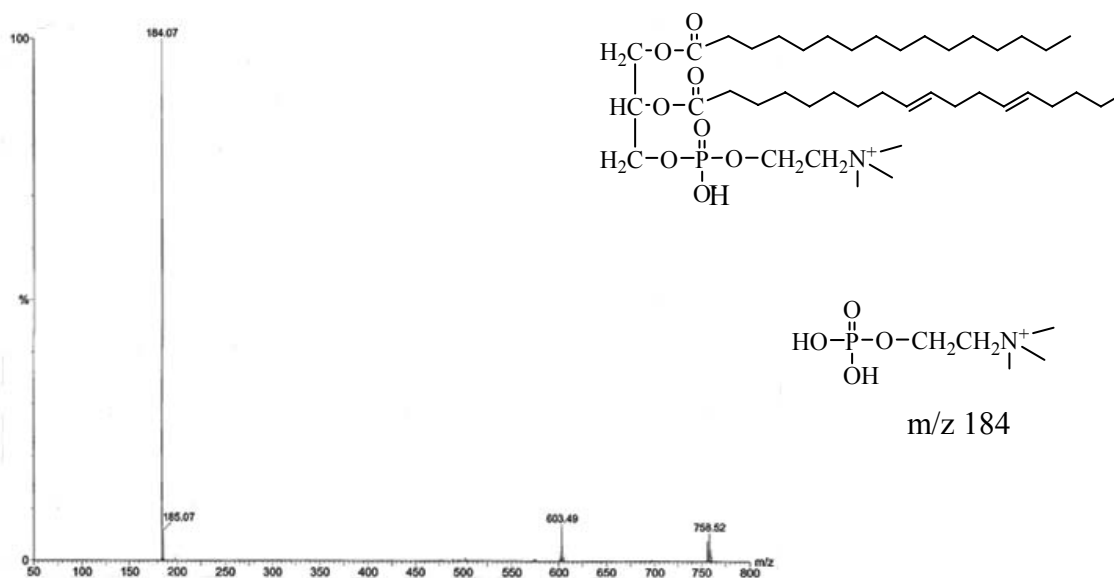
**B**

| Ión Molecular [M-H] <sup>-</sup> | Nombre                                      | Estructura |
|----------------------------------|---|------------|
| 714,5                            | 1-Palmitoil-(2-linoleil)3-fosfoetanolamina  |            |
| 758,5                            | 1-Palmitoil-(2-linoleil)-3-fosfocolina      |            |
| 782,5                            | 1,2-Linoleil-3-Fosfocolina                  |            |
| 804,5                            | 1-Eicosatetraenoil-2-Linoleil-3-Fosfocolina |            |

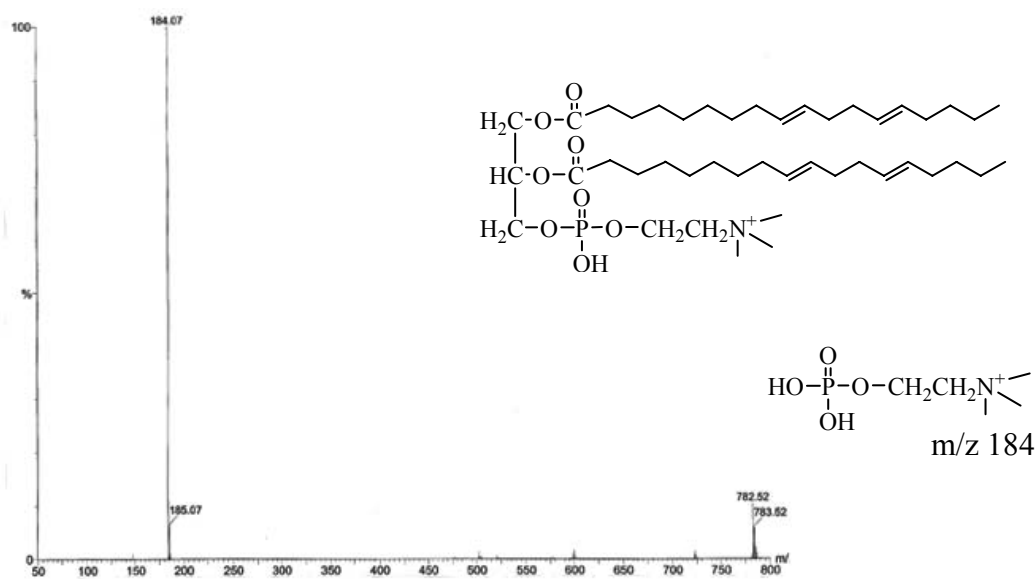
**A. m/z 714,5**



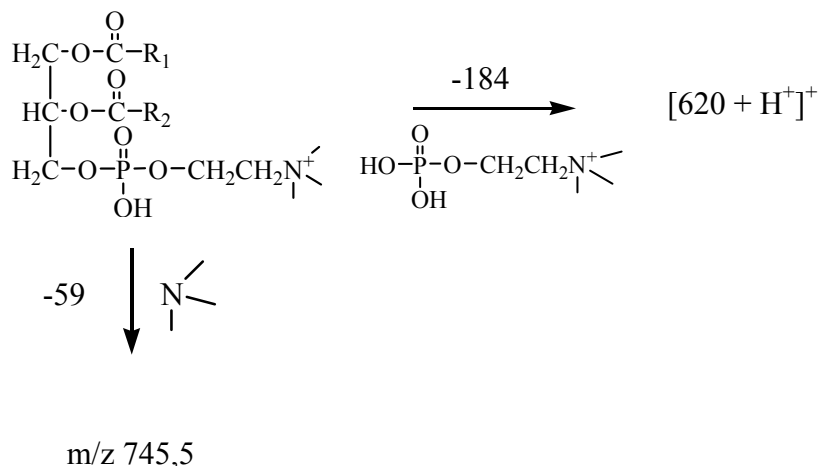
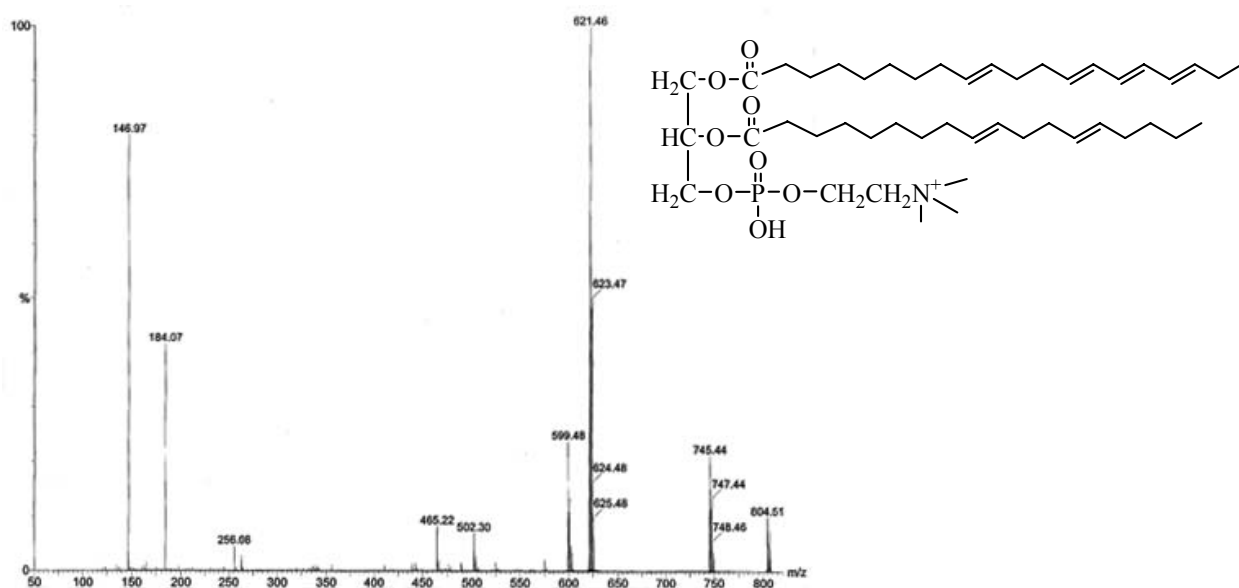
**B. m/z 758,5**



C. m/z 782,5:



D. m/z 804,5:



A modo de comparación se analizó un extracto microsomal más concentrado (correspondiente a 300 µg de proteína). En modo negativo se observaron los siguientes iones moleculares: 756,5 (Fosfatidilcolina); 778,5 (Inositolfosfoceramida); 819,5 (1-O-Hexadecil(2-linoleil)3-fosfoinositol) y 861,5 (1-Estearoil(2-linoleil)3-fosfoinositol). En modo positivo se observaron los siguientes 804,5; 758,5; 782,5. Es decir que el ion 714,5 fue el único que se observó en la fracción de acidocalcisomas y en las condiciones utilizadas no se observó inositolfosfoceramida.

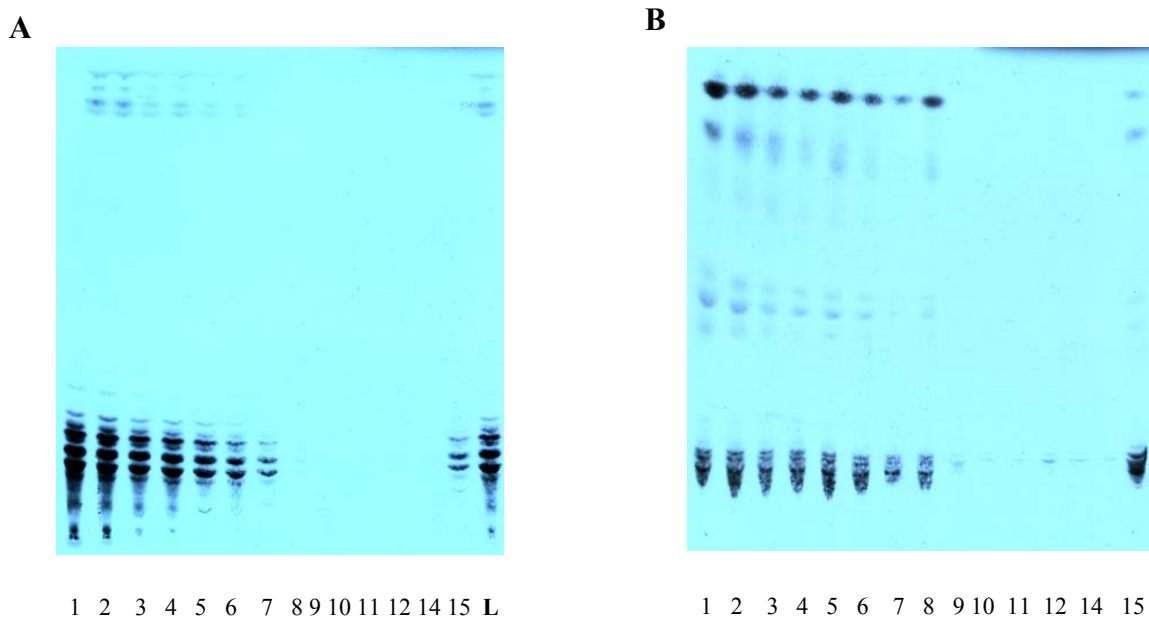
### **Distribución de GIPLs en el gradiente de Iodixanol.**

Se había descrito la presencia de glicolípidos conteniendo Galf en organelas ácidas, por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico para Galf (Suzuki et al. 2001). Resultó interesante estudiar su presencia en acidocalcisoma. Células epimastigotes se incubaron con [<sup>3</sup>H]-Manosa y [<sup>3</sup>H]-Galactosa según lo descrito en Materiales y Métodos. Las células se lavaron, para eliminar el sustrato radioactivo, lisaron y aplicaron a un gradiente de Iodixanol como se describe en la **Fig. 41**. Luego de la centrifugación se colectaron fracciones con igual volumen y los lípidos se extrajeron con butanol saturado en agua y analizaron por ccd y fluorografía. Con ambos precursores se observó un aumento en la concentración de GIPLs en la fracción de Acidocalcisomas (**Fig. 47**).

### **Cuantificación de GIPLs en la fracción de Acidocalcisomas**

Con el fin de descartar que la presencia de GIPLs en la fracción de acidocalcisomas se deba a la contaminación glicosomal o de membrana y considerando que existe una molécula de inositol por molécula de GIPL se evaluó la cantidad de inositol total proveniente de GIPLs en las distintas fracciones con respecto a la cantidad de proteína. 163 µg en proteína del lisado total y de las fracciones microsomal y de acidocalcisomas se extrajeron con butanol saturado en agua y analizaron por ccd en el solvente A. La fracción correspondiente a GIPLs se extrajo de la silica con cloroformo, metanol, agua (30:60:20, v/v) y se hidrolizó con HCl 6N, 110 °C durante 16 h. El inositol libre se analizó por HPAEC-PAD en la columna MA-1 con 80 mM NaOH como solvente de desarrollo. La **Fig. 48** muestra los resultados obtenidos. Se observó un 28,9% de GIPLs en la fracción de acidocalcisomas con respecto a la microsomal. Un 20% de los GIPLs no puede

justificarse por contaminación (**Fig. 42**). La **Fig. 48B** muestra un cromatograma típico de cuantificación.



**Figura 47. Distribución de GIPLs en un gradiente de Iodixanol.** Células epimastigotes se incubaron con [ $^3\text{H}$ ]-Manosa (**A**) y con [ $^3\text{H}$ ]-Galactosa (**B**) como se describe en Materiales y Métodos, se lisaron y aplicaron a un gradiente de Iodixanol. Se juntaron 15 fracciones con igual volumen, las cuales se extrajeron con butanol saturado en agua y analizaron por ccd como en la **Fig. 43**. L (panel **A**) corresponde al lisado total, que es un extracto de la muestra aplicada al gradiente.

### Caracterización de los GIPLs de Acidocalcisomas

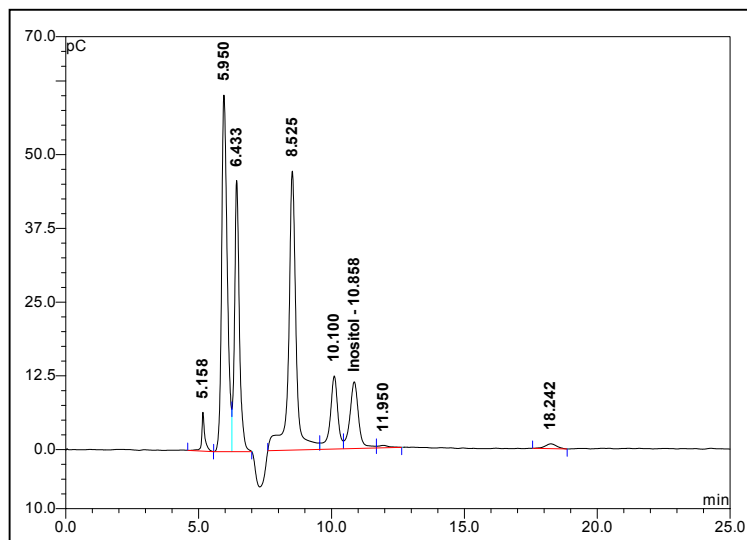
Los azúcares presentes en GIPLs se caracterizaron por hidrólisis ácidas (TFA 2N, azúcares neutros; HCl 4N, aminoazúcares y TFA 0,02N, galactofuranosa). Los resultados pueden verse en la **Tabla 6**.

Ambas fracciones contienen cantidades similares de cada azúcar, sin embargo, la cantidad de inositol difiere, lo cual sugiere que la estructura sería diferente. Otro resultado que estaría de acuerdo con esto es que el anticuerpo anti-LPPG, no reacciona con la fracción de Acidocalcisomas (**Fig. 42**).

A

| Fracción                                 | Lisado       | Microsomias | Acidocalcismas                            |
|--|--------------|-------------|---|
| Inositol<br>(pmol inos/ $\mu$ g protein) | 32.2 +/- 4.4 | 45.3 +/- 16 | 13 +/- 5 (28.7% +/-6.9<br>de Fr. Micros.) |

B



**Figura 48. Cuantificación de GIPLs en la fracción de Acidocalcismas.** (A) 163  $\mu$ g de proteína del lisado total y de las fracciones microsomal y de acidocalcismas se extrajeron con butanol saturado en agua y analizaron por ccd como en la Fig. 43. Los GIPLs se eluyeron de la placa, hidrolizaron y el inositol libre se cuantificó por HPAEC-PAD en la columna MA-1 con 80 mM NaOH como solvente de desarrollo. (B) Cromatograma típico de cuantificación.

**Tabla 6. Caracterización de los GIPLs de acidocalcismas.** Los azúcares presentes en GIPLs se caracterizaron por hidrólisis ácidas (TFA 2N, azúcares neutros; HCl 4N, aminoazúcares y TFA 0,02N, galactofuranosa).

| Carbohidrato         | Fracción Microsomal<br>(pmol/ $\mu$ g prot.) | Acidocalcismas<br>(pmol/ $\mu$ g prot.) |
|----------------------|--|---|
| Manosa               | 161,64 +/- 4,66                              | 153,62 +/- 2,06                         |
| Glucosamina          | 64,45 +/- 7,54                               | 56,29 +/- 3,2                           |
| Galactosa furanósica | 53,37 +/- 0,69                               | 38,94 +/- 1,6                           |
| Man/GlcN             | 2,5  | 2,7                                     |
| Gal $f$ /GlcN        | 0,8  | 0,6                                     |
| Man/Gal $f$          | 3,0  | 3,9                                     |



## CONCLUSIONES

Con el fin de estudiar los lípidos en el acidocalcisoma, se cuantificó la pureza de la fracción aislada. Según el método de aislamiento de acidocalcisomas desarrollado previamente (Scott et al. 2000), la purificación del marcador de la organela (pirofosfatasa) es del 60% mientras que la purificación de marcadores de otras organelas fue 5% (hexoquinasa; glicosomas), <1% (alfa-manosidasa; lisosomas), 1% (alanina y aspartato aminotransferasa; mitocondria y citosol, respectivamente). Por otra parte, el porcentaje de membrana coaislada fue del 25%, según el marcador V-H<sup>+</sup>ATPasa. Con el fin de confirmar la contaminación de membrana y de glicosomas que se obtiene en la fracción aislada, se utilizaron tres marcadores de membrana y se volvió a medir actividad de hexoquinasa. Mediante variaciones en los pasos de centrifugación se logró una fracción de acidocalcisomas con un 3,5% de contaminación glicosomal. Se determinó un 16.5% de contaminación con membrana en base a la recuperación de la actividad de adenilato ciclasa que fue del 9,4%. Según el marcador V-H<sup>+</sup>ATPasa la contaminación fue del 10% (**Fig. 2**, Resultados). La reacción negativa con un anticuerpo anti-LPPG, glicolípido mayoritario de la superficie del parásito específico para galactofuranosa, indicó también baja contaminación con membrana celular. La fracción obtenida fue rica en acidocalcisomas, según el marcador H<sup>+</sup>-Ppasa y se procedió al estudio de la composición en fosfolípidos y azúcares. En todos los casos se usó igual cantidad de proteína de la fracción microsomal y de acidocalcisomas, la cual se midió en presencia de 0,01% de SDS, que eliminó la interferencia por insolubilidad de los acidocalcisomas.

La mayoría de las publicaciones sobre lípidos de *Trypanosoma cruzi* describe el conjunto de lípidos aislados de la célula, sin discriminación de organelas excepto por una reciente publicación sobre la composición de glicosomas (Quinones et al. 2004) y otra previa en donde se estudió la composición de mitocondria (Rodrigues et al. 2001). Sin embargo, en estos casos sólo se analizaron los fosfolípidos por clases y no la composición en ácidos grasos. La presencia de fosfolípidos en *Trypanosoma cruzi* fue descrita previamente (Bertello et al. 1995), (Racagni et al. 1992), (Docampo et al. 1991). Los métodos utilizados para la asignación de estructuras fueron cromatografías contra testigos conocidos; en algunos trabajos se usó CGL para caracterizar los ácidos grasos en los lípidos totales y en los PI (Racagni et al, 1992) o

CGL-masa para identificar los productos de degradación de los inositolfosfolípidos (Bertello et al. 1995).

En el presente trabajo, la fracción de acidocalcisomas demostró un enriquecimiento en fosfolípidos, los cuales se caracterizaron por espectrometría de masa con ionización por electrospray, comparando con los de la fracción microsomal. Por otra parte, la concentración de colesterol demostró ser ~3 veces menor que la encontrada en microsomas con respecto a la cantidad de proteína. La composición de fosfolípidos fue similar a la observada en la fracción microsomal. Los fosfolípidos encontrados fueron fosfatidilinositol, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Siempre se observó linoleico en la posición 2. El ácido linoleico había sido identificado como componente principal en los lípidos totales de *T. cruzi* (formas epimastigote) y en particular en los PI (Racagni et al, 1992). Por otra parte las anclas GPI de mucinas de trypomastigote, contienen alquilacil glicerol con ácidos oleico y linoleico en la posición sn-2. Los autores concluyen que estos ácidos insaturados serían esenciales para la bioactividad de los GPI. En concordancia con esto último, en los GPI de las mucinas de epimastigotes, no infectantes, sólo se encontraron ácidos grasos saturados (Almeida et al. 2000). Los estudios con homogenatos de epimastigotes (Bertello 1995) y con la fracción microsomal (esta Tesis) mostraron la presencia de PI con ácido linoleico, lo cual indicaría que si estos son sustrato para la biosíntesis de GPI, se produciría un remodelamiento de ácido graso en alguna etapa posterior de la biosíntesis, como sucede en *T. brucei* (Masterson et al. 1990).

La alta proporción de ácidos grasos insaturados, la ausencia de esfingolípidos y la baja concentración de colesterol sugiere ausencia de “lipid rafts”. No se encontró inositolfosfoceramida (IPC) en la fracción de acidocalcisomas. Esto contrasta con la presencia de una proporción importante de IPC en los IPLs aislados de un homogenato total de la célula (Bertello et al. 1995).

La presencia de GIPLs fue confirmada por cuantificación del inositol liberado de los mismos. Con respecto a la cantidad de proteína, la concentración de GIPLs fue un ~30% de la presente en la fracción microsomal. Un 20% no puede justificarse por contaminación. La estructura de los GIPLs sería diferente, presentan una mayor concentración de azúcares con respecto a la cantidad de inositol. Otra evidencia de la diferencia estructural sería la ausencia de reacción contra un anticuerpo anti LPPG, específico para galactofuranosa.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Fraccionamiento celular. Aislamiento de Acidocalcisomas.**

Los Acidocalcisomas se obtuvieron según el método de (Scott and Docampo, 2000), con algunas modificaciones para minimizar la contaminación con membrana. Se trabajó con 800 ml de cultivo de células epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) en fase estacionaria (5 días de cultivo). Las células se colectaron, lavaron dos veces con PBS y una en el siguiente buffer de lisis: sacarosa 125mM, KCl 50mM, Hepes 20mM, MgCl<sub>2</sub> 4mM, EDTA 0,5mM, DTT 5mM, pH 7.2, conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas para células de mamífero (Sigma). La lisis se completó en un mortero con carburo de silicio (SiC, Sigma) y el porcentaje de células rotas se evaluó al microscopio. El lisado se clarificó por centrifugación a 144 x g durante 5'. El sobrenadante se centrifugó dos veces más a 325xg para remover las células enteras remanentes y luego a 10,500 x g. El pellet de la última centrifugación se resuspendió en 3,46 ml de buffer de lisis y se aplicó a un gradiente de OptiPrep<sup>TM</sup>, (Iodixanol 60% m/v en agua). Iodixanol = (5,5'-[(2-hidroxi-1-3 propendiil)-bis(acetilamino)] bis [N,N'-bis(2,3dihidroxiopropil-2,4,6-triiodo-1,3-bencencarboxiamida]. El gradiente formado por 5 capas 20, 24, 34, 37 y 40% (el lisado se aplicó al 34%), se centrifugó a 50.000xg en una ultracentrífuga Beckman con el rotor SW 28 durante 1 hora. Se fraccionó en 16 muestras de 1,8 ml, las cuales se guardaron a -80 °C. El sobrenadante de la centrifugación de 10.500xg se recentrifugó a 100.000xg durante 1 hora para obtener la fracción microsomal.

### **SDS-PAGE y Western blots.**

Las fracciones de Acidocalcisomas y Microsomal se resuspendieron en buffer de lisis y se midió proteína en presencia de 0,01% de SDS. Distintas cantidades de proteína: 1 y 2 µg correspondientes a la fracción Microsomal y de Acidocalcisomas, aisladas según arriba, se analizaron por SDS-PAGE 10%. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (NitroPure, MSI, Westborough, MA) con un equipo de Bio-Rad (Bio-Rad Mini Transblot apparatus). La membrana se bloqueó en Gelatina de pescado 5% (Fish gelatin, Sigma), Tween 20 0,1% en PBS durante toda la noche a 4°C. La misma membrana se trató por separado con los anticuerpos anti-H<sup>+</sup>-ATPasa (*T. cruzi*) (1:5000), anti-H<sup>+</sup>-PPasa (*T. cruzi*) (1:10000) y anti-LPPG (*T. cruzi*) (1:10000) disueltos en PBS conteniendo 2,5% de Gelatina de pescado y Tween 20 0,1%. Como anticuerpo

secundario se utilizó el anti-ratón o anti-conejo correspondiente conjugado con peroxidasa y disuelto en PBS conteniendo 2,5% de Gelatina de pescado y Tween 20 0,1%. Las incubaciones con anticuerpos se realizaron a temperatura ambiente, durante 1 hora, en un “rocker”. Los ciclos de lavado fueron de 15, 10 y 5 minutos con PBS conteniendo Tween 20 0,1%. Los inmunoblots se visualizaron por detección por quimioluminiscencia utilizando el ECL “quimioluminiscence kit” (Amersham Pharmacia Biotech) y exposición a un film fotográfico durante 4 segundos. Iguales resultados se obtuvieron en por lo menos 3 experimentos independientes más.

### **Medición de la Actividad de Adenilato ciclasa**

La actividad de Adenilato ciclasa (marcador de membrana) se midió en el lisado total y en las fracciones microsomal y de acidocalcisomas por medio de una reacción de dos pasos (Krin, Sismeiro et al. 2002). La generación de cAMP fue inducida en Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, BSA 0,35mg/ml, pH 7,5, ATP 3mM y fosfocreatina/creatinquinasa 10 mM como sistema de regeneración, durante 15 minutos a 37 °C en 100 µl finales. Luego de ese tiempo, las muestras se hirvieron durante 3 minutos y centrifugaron 1 minuto a 14000 rpm. Una alícuota de 50 µl se usó para medir la concentración de cAMP con el kit de Pharmacia (Enzyme Immunoassay) según el protocolo del fabricante (con un paso previo de acetilación para aumentar la sensibilidad del ensayo). La cantidad de proteína (0,3-3 µg) se ajustó en cada reacción para trabajar en el ámbito lineal del ensayo.

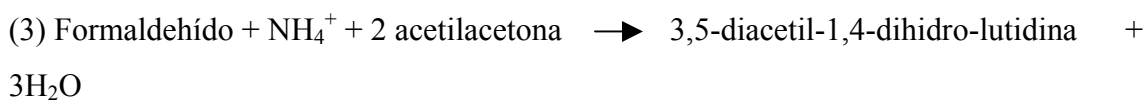
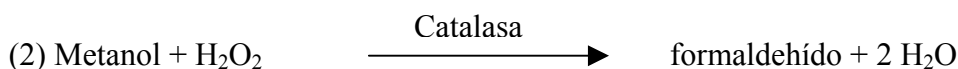
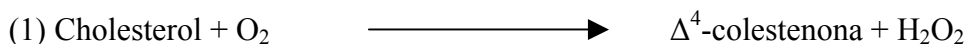
### **Medición de la Actividad de Hexoquinasa**

La actividad de Hexoquinasa (marcador de glicosomas) se midió como fue descrito (Scott, de Souza et al. 1998) en K-Hepes 50mM (pH 7,8), MgCl<sub>2</sub> 10mM, glucosa 10mM, ATP 0,6mM, NAD<sup>+</sup> 0,6mM y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa 2,5 U/ml. Se mezclaron 3 µl de muestra con 100 µl del buffer de reacción en una celda de microtitulación. Las variaciones en absorbancia se siguieron a 340 nm.

### **Medición de Colesterol**

La cantidad de colesterol se midió de acuerdo con el kit de Boehringer-ROCHE en un extracto lipídico correspondiente a iguales cantidades en proteína de las fracciones microsomal y de acidocalcisomas. Los extractos se disolvieron en iso-propanol y una

alícuota de la muestra (3/10) se usó en el ensayo. El principio del ensayo se basa en la oxidación de colesterol por colesterol oxidasa (1). En presencia de catalasa, el peróxido de hidrógeno producido en esta reacción oxida metanol a formaldehído (2), el cual reacciona con acetilacetona dando color amarillo en presencia de iones amonio (3).



La concentración del colorante formado (3,5-diacetil-1,4-dihidro-lutidina) es estequiométrica a la cantidad de colesterol y se mide por el aumento de absorbancia en el visible a 405nm.

### **Análisis por cromatografía en capa delgada**

20 µg en proteína de la fracción microsomal y de Acidocalcisomas se extrajeron con butanol saturado en agua (600 µl, 3X). Las fases orgánicas se lavaron con agua (500 µl, 2X), se secaron en un evaporador rotatorio, resuspendieron en cloroformo, metanol, agua (10/10/3, v/v; 70 µl) y sembraron en una placa de silicagel activada con oxalato de potasio. La placa se corrió en el sistema de solventes A (cloroformo, metanol, acetona, ácido acético, agua 90/30/18/27/17, v/v) y se reveló con orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en etanol y calentamiento a 200°C.

### **Análisis por Espectrometría de Masa con ionización por Electrospray**

Iguals cantidades en proteína de la fracción de Acidocalcisomas y Microsomal se extrajeron con cloroformo/metanol (1/2, v/v), seguido de cloroformo y agua. Luego de centrifugar (1000g, 10 min), la fase acuosa superior se removió y la orgánica se lavó con agua, se secó con nitrógeno, se disolvió en cloroformo y se guardó a -20 °C, bajo atmósfera de nitrógeno. El análisis por ESI/MS se realizó en modo positivo y negativo y los espectros ESI/MS o ESI/MS/MS corresponden al promedio de la señal generada durante un minuto. Para la generación de espectros en modo negativo, las muestras se diluyeron en metanol (1:3) y se inyectaron en la fuente ESI con una bomba de inyección

(1  $\mu$ l/min). Los espectros en modo positivo se generaron de igual manera pero con el agregado de 1% de ácido acético. La aguja de electrospray fue seteadada a 4,5 kV. Los espectros ESI/MS/MS se produjeron por selección de un ión precursor en el primer cuadrupolo (Q1), aceleración al segundo cuadrupolo (Q2) y análisis de los iones hijos en el tercer cuadrupolo (Q3).

### **Cuantificación de GIPLs en los Acidocalcisomas**

163  $\mu$ g en proteína del lisado total, y de las fracciones microsomal y de acidocalcisomas se extrajeron y analizaron por ccd como arriba. Los GIPLs se extrajeron de la silica con cloroformo/methanol/agua (30/60/20, v/v). Los sobrenadantes se secaron, hidrolizaron con HCl 6N, 110 °C, 16 h y analizaron por HPAEC-PAD en un sistema Dionex DX-600 equipado con una columna MA-1 y con 80 mM NaOH como eluyente. El inositol se cuantificó por integración del área bajo el pico de 10 minutos.

### **Análisis de azúcares neutros**

Los GIPLs se extrajeron como lo descripto arriba e hidrolizaron bajo diferentes condiciones ácidas: TFA 2N (4h), TFA 0,02N (2h) y HCl 4N (4h). Luego del correspondiente tiempo de hidrólisis se neutralizó y secó en un evaporador rotatorio. Los azúcares neutros se analizaron por HPAEC-PAD en un sistema Dionex DX-600 equipado con una columna PA-10 y con 18mM NaOH como solvente de elución. Los azúcares se identificaron por tiempo de retención y co-inyección con testigos conocidos.

---

## RESUMEN

### Introducción

El parásito *Trypanosoma cruzi* es el causante de la enfermedad de Chagas que afecta a 18 millones de personas en América Latina (OMS, 1997). Constituye un problema socio-económico importante debido a la falta de opciones terapéuticas y las reacciones colaterales que ocasionan las drogas disponibles. El parásito presenta tres estadios principales de diferenciación: el epimastigote que se encuentra en el insecto vector y que puede ser crecido en cultivo axénico; el amastigote o forma intracelular que vive en el citoplasma de la célula infectada y el trypomastigote que es el estadio terminal de diferenciación en el insecto vector (forma metacíclica) o en el torrente sanguíneo del mamífero hospedador. Todos los estadios del parásito expresan en su membrana celular glicoproteínas ancladas por medio de un glicoinositolfosfolípido (GPI), como así también glicoinositolfosfolípidos libres (GIPLs). Este tipo de anclaje le confiere al parásito una protección densa y homogénea que es esencial para su supervivencia e infectividad.

En esta tesis se estudiaron dos tipos de biomoléculas, que cumplen funciones biológicas fundamentales para el parásito, las cuales se describen en la Parte A y Parte B. La ausencia en mamíferos de sistemas enzimáticos que intervienen en la biosíntesis de estas estructuras, las indica como blancos potenciales para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos.

### Parte A.

#### **Caracterización de mucinas, aceptoras potenciales en la reacción de trans-sialidación.**

*Trypanosoma cruzi* es incapaz de sintetizar ácido siálico *de novo*, por el contrario, generó la inusual capacidad de adquirirlo de sialoglicoconjugados del hospedador. La enzima responsable de esta transferencia es única dentro de la familia de las sialidasas ya que no sólo hidroliza ácido siálico sino que además lo transfiere a galactosas piranósicas terminales de glicoproteínas de membrana del parásito conocidas como mucinas. Estas glicoproteínas están unidas a la superficie celular a través de un GPI, presentan cadenas *O*-glicosídicas que son las aceptoras de ácido siálico en la reacción catalizada por trans-sialidasa y están unidas a la estructura proteica a través de  $\alpha$ -GlcNAc en lugar de  $\alpha$ -GalNAc como sucede en mucinas de mamífero.

Los oligosacáridos de las cepas estudiadas antes de comenzar el trabajo de tesis (G y Y) se diferenciaban por la presencia (cepa G) de galactosa furanósica. Dicho azúcar constituye un determinante antigénico importante ya que en dicha configuración está ausente de glicoproteínas de mamífero. En nuestro laboratorio se habían sintetizado por primera vez las unidades  $\beta$ -Gal $\beta$ 1-4GlcNAc y  $\beta$ -Gal $\beta$ 1-4( $\beta$ Gal $\beta$ 1-6)GlcNAc, componentes de mucinas de la cepa G. Con estos antecedentes, se propuso estudiar las cadenas *O*-glicosídicas de mucinas de la cepa CL con el fin de determinar si la infectividad del parásito puede estar en relación con la estructura de los oligosacáridos. Para esto se puso a punto la separación de todos los posibles disacáridos alditoles de  $\beta$ -Gal $\beta$ (1-X)GlcNAc y  $\beta$ -Gal $\beta$ (1-X)GlcNAc (X = 6, 4, 3) por cromatografía de intercambio aniónico con detección por pulso amperométrico (HPAEC-PAD) y por cromatografía en capa delgada, con el fin de lograr una rápida caracterización de las cadenas con la menor cantidad de muestra. Mediante este método se determinó que las mucinas del clon CL14 contenían N-acetilglucosamina y  $\beta$ -Gal $\beta$ 1-4GlcNAc. Además, se estudió la glicosilación de una mucina recombinante obtenida por transfección en epimastigotes de un gen “tipo mucina” con repeticiones en “tandem” en la región central (MUC-R), y se encontró  $\beta$ -Gal $\beta$ 1-4GlcNAc y  $\beta$ -Gal $\beta$ 1-4( $\beta$ Gal $\beta$ 1-6)GlcNAc tanto en las mucinas endógenas como en la recombinante. No se encontró galactofurano en esta cepa, lo cual estuvo de acuerdo con su clasificación en el grupo 2 según su infectividad.

## **Parte B.**

### **Biosíntesis de inositolfosfoceramida y glicolípidos durante la diferenciación del estadio trypomastigote al amastigote**

Los inositolfosfolípidos de las anclas de GPI de *Trypanosoma cruzi* poseen como residuo lipídico, un glicerolípido o una ceramida. La presencia de ceramida en anclas de GPI se da también en *Saccharomyces cerevisiae* y en *Leishmania*. Por el contrario sólo acilglicerofosfolípidos fueron identificados en anclas de glicoproteínas de *Trypanosoma brucei* mientras que sólo diacil o alquilacilglicerolípidos son parte del ancla de glicoproteínas de mamífero, no se ha encontrado ceramida en las mismas.

Las glicoproteínas que contienen ceramida en su ancla glicolípida (por ejemplo: el antígeno mayoritario de formas amastigotes “Ssp4”, la trans-sialidasa y las mucinas del estadio trypomastigote metacíclico) han sido relacionadas con el proceso de



infección, por *T. cruzi*. Por otra parte cuando células epimastigotes se colectan en fase exponencial, el glicolípido mayoritario LPPG posee un glicerolípido y cuando son colectadas en fase estacionaria, posee una ceramida.

La ruta biosintética de introducción de ceramida en las anclas de glicoproteínas de *Trypanosoma cruzi* no está totalmente delucidada. En las anclas de glicoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae* la ceramida es introducida por una reacción de remodelamiento que reemplaza el glicerolípido por una ceramida sintetizada *de novo*. En trabajos recientes de nuestro laboratorio se demostró que un mecanismo de remodelamiento también tiene lugar en formas epimastigotes de *T. cruzi*. Se había descrito con anterioridad la composición de inositolfosfolípidos (IPLs) en epimastigotes y en formas trypomastigotes y se encontró que en ambos estadios, inositolfosfoceramida constituye el IPL mayoritario. Sin embargo, se demostró que no era sustrato para los primeros pasos de biosíntesis de GPI. Por otra parte se había determinado también un aumento de ceramida endógena durante la diferenciación del estadio trypomastigote al amastigote.

La enzima fosfatidilinositolfosfolipasa C (TcPI-PLC) había sido clonada recientemente y aumentaba su expresión durante la diferenciación al asociarse a la membrana plasmática. Por otra parte, durante la diferenciación los antígenos de la membrana varían; el antígeno Ssp4 es el característico de las formas amastigotes, está unido a la membrana a través de una IPC y se libera al medio por acción de una PI-PLC.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos era interesante determinar las variaciones que tienen lugar en los IPLs durante la diferenciación de las formas trypomastigotes a las formas amastigotes replicativas. Durante este trabajo de tesis se determinó que la enzima recombinante fosfatidilinositolfosfolipasa C hidroliza IPC, liberando ceramida. Este lípido podría actuar como segundo mensajero durante la diferenciación del estadio trypomastigote al amastigote. También se estudió la acción en *Trypanosoma cruzi* de Aureobasidina A, inhibidor en la biosíntesis de inositolfosfoceramida en *S. cerevisiae*, con el fin de validar esta ruta metabólica como blanco potencial para el desarrollo de nuevas drogas. El antibiótico inhibió la síntesis de IPC y de GIPLs y también la diferenciación. Por otra parte se determinó la asociación de las fosfolipasas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C, IPC-hidrolasa y acil transferasa con membranas de formas infectivas, amastigotes y trypomastigotes. Estas enzimas actúan en reacciones de remodelamiento sobre lípidos que son anclas de glicoproteínas maduras y de GIPLs.

Como se habían detectado por inmunofluorescencia estructuras tipo GIPL con galactofuranosa en organelas ácidas, se estudiaron también en esta tesis los fosfolípidos y GIPLs en los acidocalcisomas.

La composición determinada por espectrometría de masa con ionización por electrospray (ESI/MS) fue similar a la de la fracción microsomal, si bien no se detectó IPC. En todos los fosfolípidos se encontró ácido linoleico en la posición sn-2. Los GIPLs de acidocalcisomas a diferencia de los de membrana no reaccionan con un anticuerpo contra Galf. Los acidocalcisomas son organelas acídicas y reservorios del calcio intracelular y es la única organela conservada desde procariotes a eucariotes.

**Este trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:**

Salto, Maria Laura; Bertello Laura E.; Vieira, Mauricio; Docampo, Roberto; Moreno, Silvia N.J. & Lederkremer, Rosa M. (2003). "Formation and remodeling of inositolphosphoceramide during differentiation of *Trypanosoma cruzi* from trypomastigote to amastigote." *Eukaryotic Cell* 2(4): 756-68.

Salto Maria Laura; Furuya Tetsuya, Moreno Silvia N., Docampo Roberto & De Lederkremer Rosa M. (2002). "The phosphatidylinositolphospholipase C from *Trypanosoma cruzi* is active on inositolphosphoceramide." *Molecular and Biochemical Parasitology* 119(1), 131-3.

Salto, Maria Laura, Gallo-Rodriguez, Carola; Lima, Carlos & de Lederkremer, Rosa M. (2000). "Separation of Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ XGlcNAc and Gal $p\beta$ 1 $\rightarrow$ XGlcNAc (X = 3, 4 and 6) as the Alditols by High-pH Anion-Exchange Chromatography (HPAEC-PAD) and TLC. Characterization of Mucins from *Trypanosoma cruzi*. *Analytical Biochemistry* 279, 79-84.

Pollevick, Guido D.; Di Noia, Javier M.; Salto, Maria Laura; Lima, Carlos; Leguizamon, M. Susana; de Lederkremer, Rosa M. & Frasch, Alberto (2000). "*Trypanosoma cruzi* Surface Mucins with Exposed Variant Epitopes." *Journal Biological Chemistry*, 275(36):27671-80.

**Publicaciones relacionadas con esta tesis que no fueron incluidas en este trabajo:**

Okura, M.; Fang Jianmin; Salto, Maria Laura; Docampo, Roberto & Moreno, Silvia N. J. (2005). "A lipid-modified phosphoinositide-specific phospholipase C (TcPI-PLC) is involved in differentiation of trypomastigotes to amastigotes of *Trypanosoma cruzi*." *J Biol Chem* 280, 16235-43

Salto, Maria Laura; Bertello, Laura E. & de Lederkremer Rosa M. (1997) "Chemo-enzymatic synthesis of 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-palmitoyl-*sn*-glycerol." *Biotechnology Letters* 19, 853-855.

Bertello, Laura E.; Salto, Maria Laura & de Lederkremer, Rosa M. (1997). "Lipase-Catalyzed Monoesterification of 1-*O*-Hexadecylglycerol in Organic Solvents." *Lipids* 32, 907-911.

---

## REFERENCIAS

- Acosta, A., et al. (1994). "Sialic acid acceptors of different stages of *Trypanosoma cruzi* are mucin-like glycoproteins linked to the parasite membrane by GPI anchors." Braz J Med Biol Res **27**(2): 439-42.
- Adroher, F. J., et al. (1988). "Influence of saccharides and sodium chloride on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*." Cell Differ **22**(2): 165-70.
- Agrellos, O. A., et al. (2003). "A novel sialylated and galactofuranose-containing O-linked glycan, Neu5Acalpha2-->3Galpbeta1-->6(Galfbeta1-->4)GlcNAc, is expressed on the sialoglycoprotein of *Trypanosoma cruzi* Dm28c." Mol Biochem Parasitol **126**(1): 93-6.
- Agusti, R., et al. (1998). "Structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchor of the trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote forms." Mol Biochem Parasitol **97**(1-2): 123-31.
- Almeida, I. C., et al. (2000). "Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents." Embo J **19**(7): 1476-85.
- Almeida, I. C., et al. (1994). "Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*." Biochem J **304 ( Pt 3)**: 793-802.
- Almeida, I. C., et al. (1991). "Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies." J Immunol **146**(7): 2394-400.
- Alves, M. J., et al. (1986). "Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **21**(1): 75-82.
- Alves, M. J. and W. Colli (1975). "Glycoproteins from *trypanosoma cruzi*: partial purification by gel chromatography." FEBS Lett **52**(2): 188-90.
- Andrade, S. G., et al. (1985). "Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*." Ann Trop Med Parasitol **79**(4): 397-407.
- Andrews, N. W., et al. (1987). "Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*." Exp Parasitol **64**(3): 474-84.
- Andrews, N. W., et al. (1984). "Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity." Eur J Biochem **140**(3): 599-604.
- Andrews, N. W., et al. (1988). "Developmentally regulated, phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*." J Exp Med **167**(2): 300-14.
- Angata, T. and A. Varki (2002). "Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective." Chem Rev **102**(2): 439-69.
- Araujo-Jorge, T. C. and W. De Souza (1988). "Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. Involvement of surface galactose and N-acetyl-D-galactosamine residues on the recognition process." Acta Trop **45**(2): 127-36.
- Araujo-Jorge, T. C., et al. (1989). "*Trypanosoma cruzi*: the effect of variations in experimental conditions on the levels of macrophage infection in vitro." Parasitol Res **75**(4): 257-63.

- Babal, P. and L. C. Russell (1999). "Sialic acid-specific lectin-mediated adhesion of *Trichomonas foetus* and *Trichomonas mobilensis*." J Parasitol **85**(1): 33-40.
- Beeler, T., et al. (1998). "The *Saccharomyces cerevisiae* TSC10/YBR265w gene encoding 3-ketosphinganine reductase is identified in a screen for temperature-sensitive suppressors of the Ca<sup>2+</sup>-sensitive csg2Delta mutant." J Biol Chem **273**(46): 30688-94.
- Beeler, T., et al. (1994). "A novel protein, CSG2p, is required for Ca<sup>2+</sup> regulation in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **269**(10): 7279-84.
- Beeler, T. J., et al. (1997). "SUR1 (CSG1/BCL21), a gene necessary for growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of high Ca<sup>2+</sup> concentrations at 37 degrees C, is required for mannosylation of inositolphosphorylceramide." Mol Gen Genet **255**(6): 570-9.
- Belen Carrillo, M., et al. (2000). "Heterologous expression of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in *Leishmania major* enhances virulence." Infect Immun **68**(5): 2728-34.
- Bertelli, M. S., et al. (1977). "Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: effect of temperature on the intracellular differentiation in tissue culture." J Parasitol **63**(3): 434-7.
- Bertello, L. E., et al. (2000). "Evidence for phospholipases from *Trypanosoma cruzi* active on phosphatidylinositol and inositolphosphoceramide." Biochem J **345 Pt 1**: 77-84.
- Bertello, L. E., et al. (2004). "Inositolphosphoceramide is not a substrate for the first steps in the biosynthesis of glycoinositolphospholipids in *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **133**(1): 71-80.
- Bertello, L. E., et al. (1996). "Developmentally regulated expression of ceramide in *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **79**(2): 143-51.
- Bertello, L. E., et al. (1995). "Structural analysis of inositol phospholipids from *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms." Biochem J **310 ( Pt 1)**: 255-61.
- Bonaldo, M. C., et al. (1988). "Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation." J Cell Biol **106**(4): 1349-58.
- Brandwagt, B. F., et al. (2000). "A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. lycopersici toxins and fumonisin B1." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4961-6.
- Bredt, W., et al. (1982). "Adherence of mycoplasmas: phenomena and possible role in the pathogenesis of disease." Infection **10**(3): 199-202.
- Brener, Z. (1973). "Biology of *Trypanosoma cruzi*." Annu Rev Microbiol **27**: 347-82.
- Briones, M. R., et al. (1995). "*Trypanosoma cruzi* trans-sialidase gene lacking C-terminal repeats and expressed in epimastigote forms." Mol Biochem Parasitol **70**(1-2): 9-17.
- Briones, M. R., et al. (1999). "The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity." Mol Biochem Parasitol **104**(2): 219-32.
- Buede, R., et al. (1991). "Cloning and characterization of LCB1, a *Saccharomyces* gene required for biosynthesis of the long-chain base component of sphingolipids." J Bacteriol **173**(14): 4325-32.
- Burleigh, B. A. and N. W. Andrews (1995). "The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells." Annu Rev Microbiol **49**: 175-200.
- Caceres, O. and J. F. Fernandes (1976). "Glucose metabolism, growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*." Rev Bras Biol **36**(2): 397-410.

- Camargo, E. P. (1964). "Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **12**: 93-100.
- Carlson, D. M. (1968). "Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins." J Biol Chem **243**(3): 616-26.
- Carneiro, M., et al. (1991). "Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes." Mem Inst Oswaldo Cruz **86**(4): 387-93.
- Castellani, O., et al. (1967). "Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture." J Protozool **14**(3): 447-51.
- Castro, C. D., et al. (1995). "In situ <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance for observation of polyphosphate and catabolite responses of chemostat-cultivated *Saccharomyces cerevisiae* after alkalization." Appl Environ Microbiol **61**(12): 4448-53.
- Catisti, R., et al. (2000). "Calcium mobilization by arachidonic acid in trypanosomatids." Mol Biochem Parasitol **105**(2): 261-71.
- Conzelmann, A., et al. (1992). "Two different types of lipid moieties are present in glycosphosphoinositol-anchored membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae*." Embo J **11**(2): 457-66.
- Couto, A. S., et al. (2004). "Glycosphingolipids in *Plasmodium falciparum*. Presence of an active glucosylceramide synthase." Eur J Biochem **271**(11): 2204-14.
- Couto, A. S., et al. (1990). "The N-linked carbohydrate chain of the 85-kilodalton glycoprotein from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes contains sialyl, fucosyl and galactosyl (alpha 1-3)galactose units." Mol Biochem Parasitol **39**(1): 101-7.
- Coux, O., et al. (1996). "Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes." Annu Rev Biochem **65**: 801-47.
- Cremona, M. L., et al. (1999). "Enzymically inactive members of the trans-sialidase family from *Trypanosoma cruzi* display beta-galactose binding activity." Glycobiology **9**(6): 581-7.
- Cremona, M. L., et al. (1995). "A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases." Gene **160**(1): 123-8.
- Crocker, P. R., et al. (1998). "Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins." Glycobiology **8**(2): v.
- Cross, G. A. (1996). "Antigenic variation in trypanosomes: secrets surface slowly." Bioessays **18**(4): 283-91.
- de Araujo Jorge, T. C. and W. de Souza (1984). "Effect of carbohydrates, periodate and enzymes in the process of endocytosis of *Trypanosoma cruzi* by macrophages." Acta Trop **41**(1): 17-28.
- de Araujo-Jorge, T. C. (1989). "The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction." Mem Inst Oswaldo Cruz **84**(4): 441-62.
- De Arruda, M. V., et al. (1989). "Terminal beta-D-galactofuranosyl epitopes recognized by antibodies that inhibit *Trypanosoma cruzi* internalization into mammalian cells." Eur J Biochem **182**(2): 413-21.
- de Souza, W. (1984). "Cell biology of *Trypanosoma cruzi*." Int Rev Cytol **86**: 197-283.
- de Titto, E. H. and F. G. Araujo (1987). "Mechanism of cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: importance of sialidase activity." Acta Trop **44**(3): 273-82.
- Dekker, J., et al. (2002). "The MUC family: an obituary." Trends Biochem Sci **27**(3): 126-31.
- Denny, P. W., et al. (2004). "Sphingolipid-free *Leishmania* are defective in membrane trafficking, differentiation and infectivity." Mol Microbiol **52**(2): 313-27.

- Di Noia, J. M., et al. (2002). "A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage." J Exp Med **195**(4): 401-13.
- Di Noia, J. M., et al. (1998). "The *Trypanosoma cruzi* mucin family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions." J Biol Chem **273**(18): 10843-50.
- Dickson, R. C. (1998). "Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison to mammals." Annu Rev Biochem **67**: 27-48.
- Dickson, R. C. and R. L. Lester (1999). "Yeast sphingolipids." Biochim Biophys Acta **1426**(2): 347-57.
- Dickson, R. C., et al. (1997). "Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*." J Biol Chem **272**(48): 30196-200.
- Dickson, R. C., et al. (1997). "Synthesis of mannose-(inositol-P)<sub>2</sub>-ceramide, the major sphingolipid in *Saccharomyces cerevisiae*, requires the IPT1 (YDR072c) gene." J Biol Chem **272**(47): 29620-5.
- Docampo, R., et al. (2005). "Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man." Nat Rev Microbiol **3**(3): 251-61.
- Docampo, R. and S. N. Moreno (2001). "The acidocalcisome." Mol Biochem Parasitol **114**(2): 151-9.
- Docampo, R. and O. P. Pignataro (1991). "The inositol phosphate/diacylglycerol signalling pathway in *Trypanosoma cruzi*." Biochem J **275** ( Pt 2): 407-11.
- Docampo, R., et al. (1995). "Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*." Biochem J **310** ( Pt 3): 1005-12.
- Doering, T. L., et al. (1989). "Biosynthesis of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. Origin of the non-acetylated glucosamine." J Biol Chem **264**(19): 11168-73.
- El Bawab, S., et al. (2000). "Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase." J Biol Chem **275**(28): 21508-13.
- Englund, P. T. (1993). "The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors." Annu Rev Biochem **62**: 121-38.
- Fairbanks, G., et al. (1971). "Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane." Biochemistry **10**(13): 2606-17.
- Fan, J. Q., et al. (1994). "Comparison of acid hydrolytic conditions for Asn-linked oligosaccharides." Anal Biochem **219**(2): 375-8.
- Ferguson, M. A. (1999). "The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research." J Cell Sci **112** ( Pt 17): 2799-809.
- Ferguson, M. A. (2000). "Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis validated as a drug target for African sleeping sickness." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 10673-5.
- Fernandes, O., et al. (1998). "Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences." Am J Trop Med Hyg **58**(6): 807-11.
- Ferrero-Garcia, M. A., et al. (1993). "The action of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase on glycolipids and glycoproteins." Eur J Biochem **213**(2): 765-71.
- Figueiredo, J. M., et al. (2004). "Characterization of the inositol phosphorylceramide synthase activity from *Trypanosoma cruzi*." Biochem J.
- Funato, K., et al. (2002). "Biosynthesis and trafficking of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Biochemistry **41**(51): 15105-14.

- Furuya, T., et al. (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): 6428-38.
- Gable, K., et al. (2000). "Tsc3p is an 80-amino acid protein associated with serine palmitoyltransferase and required for optimal enzyme activity." J Biol Chem **275**(11): 7597-603.
- Gallo-Rodriguez, C., et al. (1999). "Synthesis of beta-D-Galf-(1-3)-D-GlcNAc by the trichloroacetamide method and of beta-D-Galf-(1-6)-D-GlcNAc by SnCl<sub>4</sub>-promoted glycosylation." Org Lett **1**(2): 245-7.
- Gallo-Rodriguez, C., et al. (1997). "One-pot synthesis of beta-D-Galf(1-->4)[beta-D-Galp(1-->6)]-D-GlcNAc, a 'core' trisaccharide linked O-glycosidically in glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*." Carbohydr Res **305**(2): 163-70.
- Gallo-Rodriguez, C., et al. (1996). "First Synthesis of beta-D-Galf(1-4)GlcNAc, a Structural Unit Attached O-Glycosidically in Glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*." J Org Chem **61**(5): 1886-1889.
- Garcia, E. S. and P. Azambuja (1991). "Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector." Parasitol Today **7**(9): 240-4.
- Garg, N., et al. (1997). "Glycosylphosphatidylinositols are required for the development of *Trypanosoma cruzi* amastigotes." Infect Immun **65**(10): 4055-60.
- Garrido, M. N., et al. (2000). "Changes in *Trypanosoma cruzi* phospholipid turnover induced by parasite contact with cell membranes." Parasitol Res **86**(2): 96-100.
- Gerold, P., et al. (1996). "Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*." Mol Biochem Parasitol **75**(2): 131-43.
- Ghosh, S., et al. (2002). "Leishmania donovani suppresses activated protein 1 and NF-kappaB activation in host macrophages via ceramide generation: involvement of extracellular signal-regulated kinase." Infect Immun **70**(12): 6828-38.
- Gonzalez, J., et al. (1996). "Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite." J Exp Med **184**(5): 1909-18.
- Guillas, I., et al. (2001). "C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p." Embo J **20**(11): 2655-65.
- Gum, J. R., Jr. (1992). "Mucin genes and the proteins they encode: structure, diversity, and regulation." Am J Respir Cell Mol Biol **7**(6): 557-64.
- Guther, M. L. and M. A. Ferguson (1995). "The role of inositol acylation and inositol deacylation in GPI biosynthesis in *Trypanosoma brucei*." Embo J **14**(13): 3080-93.
- Haak, D., et al. (1997). "Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p." J Biol Chem **272**(47): 29704-10.
- Hakomori, S. (1981). "Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis." Annu Rev Biochem **50**: 733-64.
- Haltiwanger, R. S., et al. (1992). "Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins is ubiquitous and dynamic." Biochem Soc Trans **20**(2): 264-9.
- Hanada, K., et al. (1997). "A mammalian homolog of the yeast LCB1 encodes a component of serine palmitoyltransferase, the enzyme catalyzing the first step in sphingolipid synthesis." J Biol Chem **272**(51): 32108-14.
- Hannun, Y. A. (1994). "The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide." J Biol Chem **269**(5): 3125-8.
- Hannun, Y. A. (1996). "Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress." Science **274**(5294): 1855-9.



- Heise, N., et al. (1996). "Identification of complete precursors for the glycosylphosphatidylinositol protein anchors of *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem **271**(28): 16877-87.
- Hirose, S., et al. (1992). "Characterization of putative glycoinositol phospholipid anchor precursors in mammalian cells. Localization of phosphoethanolamine." J Biol Chem **267**(24): 16968-74.
- Horvath, A., et al. (1994). "Ceramide synthesis enhances transport of GPI-anchored proteins to the Golgi apparatus in yeast." Embo J **13**(16): 3687-95.
- Hoyer, L. L., et al. (1991). "Purification and properties of cloned *Salmonella typhimurium* LT2 sialidase with virus-typical kinetic preference for sialyl alpha 2---3 linkages." J Biochem (Tokyo) **110**(3): 462-7.
- Hsu, F. F. and J. Turk (2000). "Characterization of phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-4-phosphate, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate by electrospray ionization tandem mass spectrometry: a mechanistic study." J Am Soc Mass Spectrom **11**(11): 986-99.
- Hsu, F. F. and J. Turk (2002). "Characterization of ceramides by low energy collisional-activated dissociation tandem mass spectrometry with negative-ion electrospray ionization." J Am Soc Mass Spectrom **13**(5): 558-70.
- Ichikawa, S., et al. (1996). "Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4638-43.
- Ilgoutz, S. C., et al. (1999). "Evidence that free GPI glycolipids are essential for growth of *Leishmania mexicana*." Embo J **18**(10): 2746-55.
- Jenkins, G. M., et al. (1997). "Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **272**(51): 32566-72.
- Jiang, J. C., et al. (1998). "Homologs of the yeast longevity gene LAG1 in *Caenorhabditis elegans* and human." Genome Res **8**(12): 1259-72.
- Jones, C., et al. (2000). "NMR assignments for glucosylated and galactosylated *N*-acetylhexosaminotols: oligosaccharide alditols related to *O*-linked glycans from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*." Carbohydr Res **328**(3): 321-30.
- Jones, C., et al. (2004). "Heterogeneity in the biosynthesis of mucin *O*-glycans from *Trypanosoma cruzi* tulahuen strain with the expression of novel galactofuranosyl-containing oligosaccharides." Biochemistry **43**(37): 11889-97.
- Kearse, K. P. and G. W. Hart (1991). "Topology of *O*-linked *N*-acetylglucosamine in murine lymphocytes." Arch Biochem Biophys **290**(2): 543-8.
- Kelm, S. and R. Schauer (1997). "Sialic acids in molecular and cellular interactions." Int Rev Cytol **175**: 137-240.
- Kempka, G., et al. (1990). "A membrane-associated form of C-reactive protein is the galactose-specific particle receptor on rat liver macrophages." J Immunol **144**(3): 1004-9.
- Klein, A., et al. (2000). "Structural analysis of mucin-type *O*-linked oligosaccharides." Methods Mol Biol **125**: 191-209.
- Kodali, D. R., et al. (1990). "Acyl migration in 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol." Chem Phys Lipids **52**(3-4): 163-70.
- Koivusalo, M., et al. (2001). "Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response." J Lipid Res **42**(4): 663-72.
- Krin, E., et al. (2002). "The regulation of Enzyme IIA(Glc) expression controls adenylate cyclase activity in *Escherichia coli*." Microbiology **148**(Pt 5): 1553-9.

- Lasky, L. A. (1992). "Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation." Science **258**(5084): 964-9.
- Lasky, L. A. (1995). "Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response." Annu Rev Biochem **64**: 113-39.
- Leber, A., et al. (1997). "The yeast mic2 mutant is defective in the formation of mannosyl-diinositolphosphorylceramide." FEBS Lett **411**(2-3): 211-4.
- Ledeen, R. W. and R. K. Yu (1982). "Gangliosides: structure, isolation, and analysis." Methods Enzymol **83**: 139-91.
- Lederkremer, R. M. and L. E. Bertello (2001). "Glycoinositolphospholipids, free and as anchors of proteins, in *Trypanosoma cruzi*." Curr Pharm Des **7**(12): 1165-79.
- Lederkremer, R. M., et al. (1976). "A lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* (epimastigota). Isolation, purification and carbohydrate composition." Biochim Biophys Acta **444**(1): 85-96.
- Lederkremer, R. M. and W. Colli (1995). "Galactofuranose-containing glycoconjugates in trypanosomatids." Glycobiology **5**(6): 547-52.
- Lederkremer, R. M., et al. (1990). "Structural features of the lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* common with the glycoposphatidylinositol anchors." Eur J Biochem **192**(2): 337-45.
- Lederkremer, R. M., et al. (1991). "Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes." J Biol Chem **266**(35): 23670-5.
- Lederkremer, R. M., et al. (1993). "Hexadecylpalmitoylglycerol or ceramide is linked to similar glycoposphoinositol anchor-like structures in *Trypanosoma cruzi*." Eur J Biochem **218**(3): 929-36.
- Lederkremer R. M. & Confalonieri A. N. (1994) "Different pattern of glycoproteins with unusual O-linked oligosaccharides in two strains of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes." Ciência e Cultura **46**, 286-289, 1994.
- Leipelt, M., et al. (2001). "Glucosylceramide synthases, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosphingolipids in animals, plants, and fungi." J Biol Chem **276**(36): 33621-9.
- Leipelt, M., et al. (2000). "Characterization of UDP-glucose:ceramide glucosyltransferases from different organisms." Biochem Soc Trans **28**(6): 751-2.
- Lemercier, G., et al. (2002). "A vacuolar-type H<sup>+</sup>-pyrophosphatase governs maintenance of functional acidocalcisomes and growth of the insect and mammalian forms of *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **277**(40): 37369-76.
- Levine, N. D., et al. (1980). "A newly revised classification of the protozoa." J Protozool **27**(1): 37-58.
- Lu, H. G., et al. (1998). "Ca<sup>2+</sup> content and expression of an acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*." Mol Cell Biol **18**(4): 2309-23.
- Luo, S., et al. (2004). "*Trypanosoma brucei* plasma membrane-type Ca(2<sup>+</sup>)-ATPase 1 (TbPMC1) and 2 (TbPMC2) genes encode functional Ca(2<sup>+</sup>)-ATPases localized to the acidocalcisomes and plasma membrane, and essential for Ca(2<sup>+</sup>) homeostasis and growth." J Biol Chem **279**(14): 14427-39.
- Luo, S., et al. (2002). "*Trypanosoma cruzi* H<sup>+</sup>-ATPase 1 (TcHA1) and 2 (TcHA2) genes complement yeast mutants defective in H<sup>+</sup> pumps and encode plasma membrane P-type H<sup>+</sup>-ATPases with different enzymatic properties." J Biol Chem **277**(46): 44497-506.

- Luo, S., et al. (2001). "A plasma membrane-type Ca(2+)-ATPase co-localizes with a vacuolar H(+)-pyrophosphatase to acidocalcisomes of *Toxoplasma gondii*." Embo J **20**(1-2): 55-64.
- Luquetti, A. O., et al. (1986). "*Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil." Trans R Soc Trop Med Hyg **80**(3): 462-70.
- Lyman, D. F., et al. (1999). "Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease." Am J Trop Med Hyg **60**(3): 377-86.
- Macrae, J. I., et al. (2005). "Structural characterization of NETNES, a novel glycoconjugate in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes." J Biol Chem **280**(13): 12201-11.
- Mandala, S. M., et al. (1998). "Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: a key regulator of sphingolipid metabolism and stress response." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 150-5.
- Mandon, E. C., et al. (1992). "Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine *N*-acyltransferase in mouse liver." J Biol Chem **267**(16): 11144-8.
- Mao, C., et al. (2000). "Cloning of an alkaline ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*. An enzyme with reverse (CoA-independent) ceramide synthase activity." J Biol Chem **275**(10): 6876-84.
- Mao, C., et al. (2000). "Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* alkaline ceramidase with specificity for dihydroceramide." J Biol Chem **275**(40): 31369-78.
- Mao, C., et al. (2001). "Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide." J Biol Chem **276**(28): 26577-88.
- Marchesini, N., et al. (1998). "Diacylglycerol pyrophosphate: a novel metabolite in the *Trypanosoma cruzi* phosphatidic acid metabolism." FEBS Lett **436**(3): 377-81.
- Martinez-Calvillo, S., et al. (1997). "pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants." Gene **199**(1-2): 71-6.
- Masterson, W. J., et al. (1989). "A novel pathway for glycan assembly: biosynthesis of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein." Cell **56**(5): 793-800.
- Masterson, W. J., et al. (1990). "Fatty acid remodeling: a novel reaction sequence in the biosynthesis of trypanosome glycosyl phosphatidylinositol membrane anchors." Cell **62**(1): 73-80.
- Matsukita, S., et al. (2003). "Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma." Histopathology **42**(1): 26-36.
- McConville, M. J. and M. A. Ferguson (1993). "The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes." Biochem J **294** ( Pt 2): 305-24.
- Meirelles, M. N., et al. (1992). "Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro." Mol Biochem Parasitol **52**(2): 175-84.
- Menon, A. K., et al. (1990). "Cell-free synthesis of glycosyl-phosphatidylinositol precursors for the glycolipid membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. Structural characterization of putative biosynthetic intermediates." J Biol Chem **265**(16): 9033-42.

- Merrill, A. H., Jr. and D. D. Jones (1990). "An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism." Biochim Biophys Acta **1044**(1): 1-12.
- Mikusova, K., et al. (2000). "Biosynthesis of the galactan component of the mycobacterial cell wall." J Biol Chem **275**(43): 33890-7.
- Milne, K. G., et al. (1994). "Partial purification and characterization of the *N*-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol de-*N*-acetylase of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in African trypanosomes." J Biol Chem **269**(23): 16403-8.
- Miranda, K., et al. (2000). "The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*." Parasitol Res **86**(5): 373-84.
- Mirmira, S. R. and I. Tinoco, Jr. (1996). "NMR structure of a bacteriophage T4 RNA hairpin involved in translational repression." Biochemistry **35**(24): 7664-74.
- Mitchell, A. G. and C. E. Martin (1997). "Fah1p, a *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b5 fusion protein, and its *Arabidopsis thaliana* homolog that lacks the cytochrome b5 domain both function in the alpha-hydroxylation of sphingolipid-associated very long chain fatty acids." J Biol Chem **272**(45): 28281-8.
- Mitsutake, S., et al. (2001). "Purification, characterization, molecular cloning, and subcellular distribution of neutral ceramidase of rat kidney." J Biol Chem **276**(28): 26249-59.
- Mollick, J. A., et al. (2003). "MUC1-like tandem repeat proteins are broadly immunogenic in cancer patients." Cancer Immun **3**: 3.
- Montalvetti, A., et al. (2004). "A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem **279**(37): 38673-82.
- Moody-Haupt, S., et al. (2000). "The major surface antigens of *Entamoeba histolytica* trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans." J Mol Biol **297**(2): 409-20.
- Moreno, S. N., et al. (1994). "Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion." J Exp Med **180**(4): 1535-40.
- Moreno, S. N., et al. (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): 251-61.
- Morita, Y. S., et al. (2000). "Glycosyl phosphatidylinositol myristoylation in African trypanosomes. New intermediates in the pathway for fatty acid remodeling." J Biol Chem **275**(19): 14147-54.
- Mortara, R. A., et al. (2001). "Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) cleavage of GPI-anchored surface molecules of *Trypanosoma cruzi* triggers in vitro morphological reorganization of trypomastigotes." J Eukaryot Microbiol **48**(1): 27-37.
- Nagamune, K., et al. (2000). "Critical roles of glycosylphosphatidylinositol for *Trypanosoma brucei*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(19): 10336-41.
- Nagiec, M. M., et al. (1994). "The LCB2 gene of *Saccharomyces* and the related LCB1 gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(17): 7899-902.
- Nagiec, M. M., et al. (1996). "Sphingolipid synthesis: identification and characterization of mammalian cDNAs encoding the Lcb2 subunit of serine palmitoyltransferase." Gene **177**(1-2): 237-41.
- Nagiec, M. M., et al. (1997). "Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a

- mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the AUR1 gene." J Biol Chem **272**(15): 9809-17.
- Nakamura, N., et al. (1997). "Expression cloning of PIG-L, a candidate *N*-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol deacetylase." J Biol Chem **272**(25): 15834-40.
- Nishimura, H., et al. (1988). "Attachment of influenza C virus to human erythrocytes." J Gen Virol **69** ( Pt 10): 2545-53.
- Nomura, T., et al. (1998). "Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-Gal: glucosylceramide beta-1,4-galactosyltransferase from rat brain." J Biol Chem **273**(22): 13570-7.
- Oh, C. S., et al. (1997). "ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation." J Biol Chem **272**(28): 17376-84.
- Okura, M., et al. (2005). "A lipid-modified phosphoinositide-specific phospholipase C (TcPI-PLC) is involved in differentiation of trypomastigotes to amastigotes of *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem.
- Orlowski, M. (1990). "The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system." Biochemistry **29**(45): 10289-97.
- Parodi, A. J., et al. (1992). "Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*." Embo J **11**(5): 1705-10.
- Pereira, M. E., et al. (1981). "Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*." Science **211**(4482): 597-600.
- Pereira, M. E., et al. (1980). "Lectin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi*. Developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cells." J Exp Med **152**(5): 1375-92.
- Pereira-Chiocola, V. L., et al. (2000). "Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies." J Cell Sci **113** ( Pt 7): 1299-307.
- Perez-Vilar, J. and R. L. Hill (1999). "The structure and assembly of secreted mucins." J Biol Chem **274**(45): 31751-4.
- Pinto, W. J., et al. (1992). "Characterization of enzymatic synthesis of sphingolipid long-chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*: mutant strains exhibiting long-chain-base auxotrophy are deficient in serine palmitoyltransferase activity." J Bacteriol **174**(8): 2575-81.
- Piras, M. M., et al. (1987). "The effect of fetuin and other sialoglycoproteins on the in vitro penetration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes into fibroblastic cells." Mol Biochem Parasitol **22**(2-3): 135-43.
- Pollevick, G. D., et al. (2000). "*Trypanosoma cruzi* surface mucins with exposed variant epitopes." J Biol Chem **275**(36): 27671-80.
- Porchet, N. and J. P. Aubert (2004). "[MUC genes: mucin or not mucin? That is the question]." Med Sci (Paris) **20**(5): 569-74.
- Previato, J. O., et al. (1985). "Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route." Mol Biochem Parasitol **16**(1): 85-96.
- Previato, J. O., et al. (1994). "O-glycosidically linked *N*-acetylglucosamine-bound oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*." Biochem J **301** ( Pt 1): 151-9.
- Previato, J. O., et al. (1995). "Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from

- epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain." J Biol Chem **270**(13): 7241-50.
- Previato, J. O., et al. (1998). "Biosynthesis of O-N-acetylglucosamine-linked glycans in *Trypanosoma cruzi*. Characterization of the novel uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase-catalyzing formation of N-acetylglucosamine alpha1-->O-threonine." J Biol Chem **273**(24): 14982-8.
- Puoti, A. and A. Conzelmann (1993). "Characterization of abnormal free glycosylphosphatidylinositols accumulating in mutant lymphoma cells of classes B, E, F, and H." J Biol Chem **268**(10): 7215-24.
- Quinones, W., et al. (2004). "The glycosome membrane of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: protein and lipid composition." Exp Parasitol **106**(3-4): 135-49.
- Racagni, G., et al. (1992). "Phospholipids in *Trypanosoma cruzi*: phosphoinositide composition and turnover." Lipids **27**(4): 275-8.
- Ralton, J. E., et al. (2003). "Evidence that intracellular beta1-2 mannan is a virulence factor in *Leishmania* parasites." J Biol Chem **278**(42): 40757-63.
- Ramirez, M. I., et al. (1993). "Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion." Infect Immun **61**(9): 3636-41.
- Reggiori, F., et al. (1997). "Lipid remodeling leads to the introduction and exchange of defined ceramides on GPI proteins in the ER and Golgi of *Saccharomyces cerevisiae*." Embo J **16**(12): 3506-18.
- Reggiori, F. and A. Conzelmann (1998). "Biosynthesis of inositol phosphoceramides and remodeling of glycosylphosphatidylinositol anchors in *Saccharomyces cerevisiae* are mediated by different enzymes." J Biol Chem **273**(46): 30550-9.
- Revollo, S., et al. (1998). "*Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties." Exp Parasitol **89**(1): 30-9.
- Rodrigues, C. O., et al. (2001). "The sterol composition of *Trypanosoma cruzi* changes after growth in different culture media and results in different sensitivity to digitonin-permeabilization." J Eukaryot Microbiol **48**(5): 588-94.
- Rohloff, P., et al. (2004). "Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem **279**(50): 52270-81.
- Rohloff, P., et al. (2003). "Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium." Mol Biochem Parasitol **126**(2): 219-30.
- Ruiz, F. A., et al. (2001). "Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem **276**(28): 26114-21.
- Ruiz Rde, C., et al. (1993). "The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion." Parasite Immunol **15**(2): 121-5.
- Saba, J. D., et al. (1997). "The BST1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase." J Biol Chem **272**(42): 26087-90.
- Salto, M. L., et al. (2000). "Separation of Galbeta1-->XGlcNAc and Galbeta1-->XGlcNAc (X = 3, 4, and 6) as the alditols by high-pH anion-exchange chromatography and thin-layer chromatography: characterization of mucins from *Trypanosoma cruzi*." Anal Biochem **279**(1): 79-84.
- Scharfman, A., et al. (1995). "Interactions between human respiratory mucins and pathogens." Biochem Soc Trans **23**(4): 836-9.

- Schauer, R., et al. (1983). "The occurrence of *N*-acetyl- and *N*-glycolylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **364**(8): 1053-7.
- Schenkman, S., et al. (1993). "Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **59**(2): 293-303.
- Schenkman, S., et al. (1991). "A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells." Cell **65**(7): 1117-25.
- Schenkman, S., et al. (1992). "Trypanosoma cruzi trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes." J Exp Med **175**(2): 567-75.
- Schettino, P. M., et al. (1995). "Regulatory effect of the level of free Ca<sup>2+</sup> of the host cell on the capacity of *Trypanosoma cruzi* to invade and multiply intracellularly." J Parasitol **81**(4): 597-602.
- Schmatz, D. M. and P. K. Murray (1982). "Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in irradiated muscle cells: improved synchronization and enhanced trypomastigote production." Parasitology **85** (Pt 1): 115-25.
- Schorling, S., et al. (2001). "Lag1p and Lac1p are essential for the Acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **12**(11): 3417-27.
- Schulte, S. and W. Stoffel (1993). "Ceramide UDPgalactosyltransferase from myelinating rat brain: purification, cloning, and expression." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(21): 10265-9.
- Scott, D. A., et al. (1998). "Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem **273**(34): 22151-8.
- Scott, D. A. and R. Docampo (2000). "Characterization of isolated acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem **275**(31): 24215-21.
- Scott, D. A., et al. (1997). "In situ compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem **272**(44): 28020-9.
- Segura, E. L., et al. (1980). "Variation in the infectivity of *Trypanosoma cruzi*." Medicina **40**(1): 256-7.
- Serrano, A. A., et al. (1995). "The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms." J Biol Chem **270**(45): 27244-53.
- Sharma, D. K., et al. (1999). "Differences between the trypanosomal and human GlcNAc-PI de-*N*-acetylases of glycosylphosphatidylinositol membrane anchor biosynthesis." Glycobiology **9**(4): 415-22.
- Singh, B. N., et al. (1994). "Identification of the lipid moiety and further characterization of the novel lipophosphoglycan-like glycoconjugates of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*." Arch Biochem Biophys **309**(2): 273-80.
- Sipos, G., et al. (1997). "Alternative lipid remodelling pathways for glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*." Embo J **16**(12): 3494-505.
- Skrzypek, M., et al. (1997). "Suppressor gene analysis reveals an essential role for sphingolipids in transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." J Bacteriol **179**(5): 1513-20.
- Smith, T. K., et al. (1999). "Selective inhibitors of the glycosylphosphatidylinositol biosynthetic pathway of *Trypanosoma brucei*." Embo J **18**(21): 5922-30.

- Souto, R. P., et al. (1996). "DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **83**(2): 141-52.
- Sperling, P., et al. (2000). "Further characterization of Delta(8)-sphingolipid desaturases from higher plants." Biochem Soc Trans **28**(6): 638-41.
- Sperling, P., et al. (2001). "Functional characterization of sphingolipid C4-hydroxylase genes from *Arabidopsis thaliana*." FEBS Lett **494**(1-2): 90-4.
- Striepen, B., et al. (1999). "Glucosylation of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors: identification of uridine diphosphate-glucose as the direct donor for side chain modification in *Toxoplasma gondii* using carbohydrate analogues." Biochemistry **38**(5): 1478-87.
- Striepen, B., et al. (1997). "Molecular structure of the "low molecular weight antigen" of *Toxoplasma gondii*: a glucose alpha 1-4 N-acetylgalactosamine makes free glycosyl-phosphatidylinositols highly immunogenic." J Mol Biol **266**(4): 797-813.
- Sutterlin, C., et al. (1997). "Specific requirements for the ER to Golgi transport of GPI-anchored proteins in yeast." J Cell Sci **110 ( Pt 21)**: 2703-14.
- Takesako, K., et al. (1993). "Biological properties of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic." J Antibiot (Tokyo) **46**(9): 1414-20.
- Takizawa, M., et al. (1999). "cDNA cloning and expression of human lactosylceramide synthase." Biochim Biophys Acta **1438**(2): 301-4.
- Tamada, S., et al. (2002). "Expression of MUC1 and MUC2 mucins in extrahepatic bile duct carcinomas: its relationship with tumor progression and prognosis." Pathol Int **52**(11): 713-23.
- Tamura, K., et al. (2001). "Characterization of an *Arabidopsis* cDNA encoding a subunit of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid biosynthesis." Plant Cell Physiol **42**(11): 1274-81.
- Ternes, P., et al. (2002). "Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family." J Biol Chem **277**(28): 25512-8.
- Todeschini, A. R., et al. (2001). "Structure of O-glycosidically linked oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* CL-Brener strain: evidence for the presence of O-linked sialyl-oligosaccharides." Glycobiology **11**(1): 47-55.
- Todeschini, A. R., et al. (2002). "trans-Sialidase from *Trypanosoma cruzi* binds host T-lymphocytes in a lectin manner." J Biol Chem **277**(48): 45962-8.
- Tomlinson, S., et al. (1995). "The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH." Parasitology **110 ( Pt 5)**: 547-54.
- Travassos, L. R. and I. C. Almeida (1993). "Carbohydrate immunity in American trypanosomiasis." Springer Semin Immunopathol **15**(2-3): 183-204.
- Tyler, K. M. and D. M. Engman (2000). "Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation." Cell Motil Cytoskeleton **46**(4): 269-78.
- Uhrig, M. L., et al. (1997). "*Trypanosoma cruzi*: nitrogenous-base-containing phosphatides in trypomastigote forms--isolation and chemical analysis." Exp Parasitol **87**(1): 8-19.
- Uhrig, M. L., et al. (1996). "Characterization of inositolphospholipids in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms." Biochim Biophys Acta **1300**(3): 233-9.
- van Blitterswijk, W. J., et al. (2001). "Sphingolipids related to apoptosis from the point of view of membrane structure and topology." Biochem Soc Trans **29**(Pt 6): 819-24.
- Van den Steen, P., et al. (1998). "Concepts and principles of O-linked glycosylation." Crit Rev Biochem Mol Biol **33**(3): 151-208.



- Van Klinken, B. J., et al. (1995). "Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion." Am J Physiol **269**(5 Pt 1): G613-27.
- Vandekerckhove, F., et al. (1992). "Substrate specificity of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase." Glycobiology **2**(6): 541-8.
- Vanderheyden, N., et al. (1996). "The role of a H(+)-ATPase in the regulation of cytoplasmic pH in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes." Biochem J **318** ( Pt 1): 103-9.
- Varki, A. (1997). "Sialic acids as ligands in recognition phenomena." Faseb J **11**(4): 248-55.
- Varki, A. (1998). "Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus." Trends Cell Biol **8**(1): 34-40.
- Vercesi, A. E. and R. Docampo (1996). "Sodium-proton exchange stimulates Ca<sup>2+</sup> release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*." Biochem J **315** ( Pt 1): 265-70.
- Vercesi, A. E., et al. (1994). "Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*." Biochem J **304** ( Pt 1): 227-33.
- Vercesi, A. E., et al. (2000). "Presence of a Na(+)/H(+) exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs." FEBS Lett **473**(2): 203-6.
- Villalta, F., et al. (2001). "A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection." FEBS Lett **505**(3): 383-8.
- Wainszelbaum, M., et al. (2001). "Lysosomal phospholipase A1 in *Trypanosoma cruzi*: an enzyme with a possible role in the pathogenesis of Chagas' disease." Biochem J **355**(Pt 3): 765-70.
- Wang, R. Q. and D. C. Fang (2003). "Alterations of MUC1 and MUC3 expression in gastric carcinoma: relevance to patient clinicopathological features." J Clin Pathol **56**(5): 378-84.
- Warnecke, D. and E. Heinz (2003). "Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi." Cell Mol Life Sci **60**(5): 919-41.
- Watanabe, R., et al. (2002). "Sphingolipids are required for the stable membrane association of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in yeast." J Biol Chem **277**(51): 49538-44.
- Weiss, B. and W. Stoffel (1997). "Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase--cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis." Eur J Biochem **249**(1): 239-47.
- Wu, W. I., et al. (1995). "Regulation of lipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by fumonisin B1." J Biol Chem **270**(22): 13171-8.
- Yoshida, N. (1983). "Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*." Infect Immun **40**(2): 836-9.
- Yoshida, N., et al. (1997). "Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction." Mol Biochem Parasitol **84**(1): 57-67.
- Zanolari, B., et al. (2000). "Sphingoid base synthesis requirement for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*." Embo J **19**(12): 2824-33.
- Zhang, K., et al. (2003). "Sphingolipids are essential for differentiation but not growth in *Leishmania*." Embo J **22**(22): 6016-26.
- Zhao, C., et al. (1994). "Suppressors of the Ca(2+)-sensitive yeast mutant (csg2) identify genes involved in sphingolipid biosynthesis. Cloning and characterization of SCS1, a gene required for serine palmitoyltransferase activity." J Biol Chem **269**(34): 21480-8.

- Zilberstein, D., et al. (1991). "Growth at acidic pH induces an amastigote stage-specific protein in *Leishmania promastigotes*." Mol Biochem Parasitol **45**(1): 175-8.
- Zingales, B., et al. (1982). "Endogenous and surface labeling of glycoconjugates from the three differentiation stages of *Trypanosoma cruzi*." FEBS Lett **142**(2): 238-42.
- Zingales, B., et al. (1999). "Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences." Mem Inst Oswaldo Cruz **94 Suppl 1**: 159-64.