

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos.

**Estudio de la síntesis de poliaminas por la vía de arginina decarboxilasa en
Trypanosoma cruzi.**

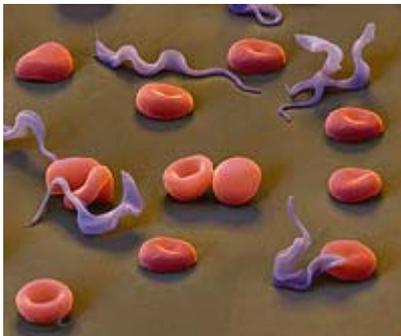
Transporte de poliaminas en *Crithidia fasciculata*.

Tesis realizada para optar por el título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Autor: María Pía Serra

Director y consejero de estudios: Dr. Israel David Algranati

Lugar de trabajo: Laboratorio de parásitos tripanosomátidos,
Instituto Leloir



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales 2007

Metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos.

**Estudio de la síntesis de poliaminas vía de arginina decarboxilasa en
Trypanosoma cruzi.**

Transporte de poliaminas en *Crithidia fasciculata*.

Metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos.

Estudio de la síntesis de poliaminas por la vía de arginina decarboxilasa en *Trypanosoma cruzi*.

Transporte de poliaminas en *Crithidia fasciculata*.

Resumen

Síntesis de poliaminas en *T. cruzi*. *Trypanosoma cruzi* es el agente causante de la enfermedad de Chagas. En la actualidad no existen vacunas y las drogas disponibles solo son efectivas durante la etapa aguda y producen serios efectos colaterales.

Las poliaminas son esenciales para la supervivencia, proliferación y diferenciación celular en todos los organismos, incluyendo *T. cruzi*. El metabolismo de poliaminas es un buen blanco para el diseño de drogas, ya que es muy diferente en parásitos y mamíferos.

T. cruzi no puede sintetizar poliaminas a partir de ornitina por la vía de Ornitina decarboxilasa; sin embargo existen opiniones contrapuestas sobre la ruta alternativa de arginina decarboxilasa. (ADC) en el parásito. El objetivo de este trabajo es investigar si *T. cruzi* es capaz de sintetizar poliaminas a partir de arginina. Epimastigotes de *T. cruzi* cultivados en medio libre de poliaminas dejan de proliferar luego de 15 días por agotamiento de los niveles endógenos de poliaminas. Ensayos *in vivo* con L-[U -¹⁴C] arginina muestran que *T. cruzi* no sintetiza poliaminas a partir de arginina. Epimastigotes transgénicos que expresan ADC de avena solo sintetizan agmatina y tampoco se multiplican en medio sin poliaminas, demostrando la ausencia de la actividad enzimática de agmatinasa. En el genoma de *T. cruzi* no se encontraron secuencias con identidad significativa con las ADC conocidas.

Trasporte de poliaminas en *C. fasciculata*. Al inhibir la síntesis de poliaminas en *Crithidia fasciculata* aumenta el transporte de putrescina y se induce la expresión de un gen de función desconocida que podría estar involucrado en la regulación del transporte de poliaminas en parásitos tripanosomátidos.

Palabras Clave: Arginina decarboxilasa, agmatina, biosíntesis de poliaminas, transporte de poliaminas, pRIBOTEX.

Polyamine metabolism in trypanosomatid parasites.

Estudies on polyamines biosynthesis via the arginine decarboxylase pathway in *Tripanosoma cruzi*.

Polyamine transport in *Crithidia fasciculata*.

Abstract

Polyamines synthetisis in *T. cruzi*. *Trypanosoma cruzi* is the protozoan parasite causing Chagas disease. Until now there are no vaccines against this disease and the drugs currently used for the treatment of patients have severe collateral effects and are only useful during the acute phase.

Polyamines are basic substances essential for the survival, proliferation and differentiation of all organisms, including *T. cruzi*. Polyamine metabolism shows remarkable differences between parasites and mammals, suggesting that these pathways could be useful targets for anti-parasitic drugs. It has been demonstrated that *T. cruzi* is not able to synthetize putrescine from ornitine via ornitine decarboxylase activity. However, the presence of the alternative arginine decarboxylase pathway in parasites is still controversial. The main goal of the present work is to investigate whether *T. cruzi* synthetize polyamines from arginine.

When *T. cruzi* epimastigotes were cultivated for 15 days in a free-polyamine medium, parasite growth was arrested due to depletion of polyamine intracellular pools. In vivo labeling of parasites with L-[U-¹⁴C] arginine showed that *T. cruzi* does not synthetize agmatine from arginine. Transgenic *T. cruzi* cell lines expressing heterologous oat ADC were able to synthetize agmatine, but weren't able neither produce putrescine nor proliferate in polyamine-free medium. These facts suggest the absence of agmatinase activity. Analysis of the *T. cruzi* genome database showed no sequences with partial identity to previously reported ADC genes.

Polyamine transport in *C. fasciculata*. The inhibition of polyamine synthesis in *C. fasciculata* increases putrescine transport. We have also detected an increased expression of a gene with unknown function, which might involved in regulation of the polyamine transport in trypanosomatids.

Keywords: Arginine decarboxylase, agmatine, polyamine biosynthesis, polyamine transport, pRIBOTEX

Índice

Introducción

I. 1 *T. cruzi*

Clasificación taxonómica 1

I. 2 Morfología y biología celular de *T. cruzi* 3

Ciclo de vida 5

Características morfológicas y fisiológicas de los tripanosomátidos 6

Particularidades genéticas, transcripción y procesamiento del RNA 9

I. 3 Enfermedad de Chagas – distribución y aspectos epidemiológicos 13

Distribución geográfica de los vectores 14

Formas de transmisión y síntomas de la enfermedad 15

Estrategias de prevención y control y tratamiento de la enfermedad 16

I. 4 Poliaminas 18

Funciones de las poliaminas 20

Metabolismo de poliaminas 25

Regulación del metabolismo de poliaminas 27

Características y regulación de la ODC 29

Arginina descarboxilasa (ADC) 31

Síntesis de poliaminas en Tripanosomátidos 34

Síntesis de poliaminas en *T. cruzi* 37

Ausencia de la síntesis de putrescina por la vía de ADC en *T. cruzi* 38

Transporte de poliaminas 39

Transporte de poliaminas en tripanosomátidos 40

Objetivos 41

Resultados 42

Evidencias bioquímicas y fisiológicas de la ausencia de síntesis de poliaminas vía arginina descarboxilasa en epimastigotes de *T. cruzi*. 42

Determinación de las causas de la ausencia de actividad enzimática de ADC 45

Actividad de ADC en parásitos salvajes y transformados	48
Caracterización de los productos enzimáticos de la actividad ADC, en parásitos transformados.	51
Búsqueda del gen de ADC en el genoma de <i>T. cruzi</i>	51
Expresión del gen heterólogo en <i>T. cruzi</i>	54
Integración del plásmido recombinante al genoma del parásito.	57
Procesamiento de la ADC de avena expresada en <i>T.cruzi</i>	65
Estado oligomérico de la ADC	69
Búsqueda de genes involucrados en el transporte de poliaminas en parásitos tripanosomátidos	71
Puesta a punto de la técnica de Differential Display para <i>Crithidia fasciculata</i>	74
Resultados de los ensayos de Differential Display	76
Validación de resultados por <i>Northern blot</i>	77
Análisis de secuencia del transcripto “B25”	79
Análisis de la secuencia de “ORF1”	80
<u>Discusión</u>	82
Auxotrofia de poliaminas en <i>T. cruzi</i>	82
Integración del plásmido recombinante	85
Procesamiento de ADC	86
Influencia del tag de histidinas en las propiedades de ADC	87
Transporte de poliaminas	88
<u>Materiales y métodos</u>	91
<u>Bibliografía</u>	101

Introducción

I. 1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un parásito unicelular flagelado causante de la enfermedad de Chagas. Este parásito fue descrito por primera vez por el Dr. Carlos Chagas en 1909 quién también describió la enfermedad y su transmisión por los insectos vectores de la subfamilia Triatominae.

Clasificación taxonómica de *T. cruzi*:

T. cruzi pertenece al phylum Sarcomastigophora, subphylum Mastigosphora del Orden Kinetoplastidia que incluye organismos flagelados con kinetoplasto (estructura de ADN que se encuentra en el mitocondrion de estos organismos).

T. cruzi se encuentra en la sección Stercorarias junto con otros tripanosomátidos, en los cuales la forma infectiva se desarrolla en el tracto digestivo del insecto vector y luego infecta al mamífero durante la succión de la sangre por el vector hematófago, por contaminación con las heces infestadas.

T. cruzi se encuentra dentro del subgénero Schizotrypanum que incluye trypanosomátidos capaces de proliferar en el estadio intracelular de la célula hospedadora del vertebrado. El nombre taxonómico es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (WHO/TDR 2005).

En la **Figura i 1** se muestra la clasificación taxonómica.

I. 2 Morfología y biología celular de *T. cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* se desarrolla en dos tipos de hospedadores:

Hospedador vertebrado:

T. cruzi es capaz de infectar más de 150 especies de mamíferos incluyendo el hombre, animales domésticos y animales silvestres como roedores y otros pertenecientes a los órdenes Marsupialia, Chiroptera y Primata (Brenner, 1979).

Hospedador invertebrado hematófago (vector):

El hospedador invertebrado actúa como vector de la enfermedad, siendo el medio de transmisión del parásito entre los hospedadores vertebrados.

Existen más de 80 especies de insectos vectores pertenecientes a la subfamilia *Triatominae*.

En Argentina, el vector más importante es el *Triatoma infestans*, conocido como “Vinchuca” (Mazza, 1943).

A lo largo del ciclo de vida, el parásito presenta varios estadios diferentes, cada uno con una morfología característica (**Fig. i 2**).

Epimastigote:

Estadio proliferativo, no infectivo de forma alargada de unos 20 a 40 μm de largo con el kinetoplasto localizado anterior al núcleo.

El epimastigote es un estadio extracelular que se desarrolla en el intestino del hospedador invertebrado. También se lo encontró en células de vertebrado como un estadio intermedio en la transformación de amastigote en tripomastigote al final del ciclo celular y en la diferenciación de tripomastigote a amastigote en el inicio del ciclo celular (Wanderley De Souza 2002 b).

Este estadio puede cultivarse *in vitro* en un medio libre de células.

Tripomastigote:

Estadio infeccioso, no proliferativo de unos 25 µm de largo y 2 µm de ancho, posee un flagelo largo adherido lateralmente a algunas zonas de la membrana plasmática. El kinetoplasto está localizado posterior al núcleo. Este estadio presenta dos variantes:

tripomastigote sanguíneo: se encuentra circulando en la sangre del hospedador vertebrado, infecta macrófagos por fagocitosis y también otros tipos celulares como cardiomiocitos y adipocitos.

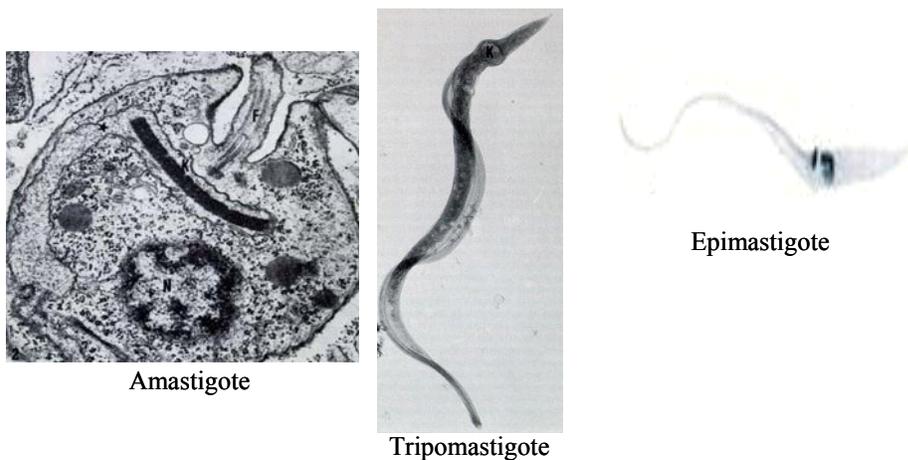
tripomastigote metacíclico: se desarrollan en el tubo digestivo del insecto y son eliminados con las heces. Este estadio infecta al hospedador vertebrado a través de la herida de la picadura del insecto o por las mucosas.

Esta forma también se encuentra en la fase estacionaria de cultivos *in vitro* libres de células.

Amastigote:

Forma redondeada presente en el medio intracelular del hospedador vertebrado, posee un flagelo muy corto que solo se visualiza con microscopía electrónica (Wanderley De Souza 2002 a). Es capaz de proliferar e infectar células de vertebrado (Wanderley De Souza 2002 b).

Fig. i 2 Morfología de los estadios de *T. cruzi*



Adaptado de Wanderley De Souza(2002), b.

Ciclo de vida

Fase en el hospedador invertebrado: cuando un insecto hematófago de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, se alimenta de un mamífero infectado con *T. cruzi*, ingiere los tripomastigotes presentes en la sangre. En el estómago del insecto los tripomastigotes se diferencian a una forma redondeada de flagelo libre (forma intermedia) que a su vez se puede transformar en epimastigote y seguir multiplicándose por fisión binaria en el intestino o transformarse en una forma más alargada que se dirige hacia la parte posterior y se transforma en tripomastigote metacíclico.

El tripomastigote metacíclico es un estadio no proliferativo, infectivo de células de mamífero, que es eliminado con las heces del insecto en el momento en que éste se alimenta.

Fase de infección celular en el hospedador vertebrado: El tripomastigote metacíclico infecta las células del mamífero por endocitosis quedando en una vacuola llamada vacuola parasitófora en la que los tripomastigotes se diferencian en amastigotes y se multiplican por fisión binaria. Luego el lisosoma de la célula hospedadora se fusiona con la vacuola parasitófora y la acidificación del medio activa unas enzimas liberadas por el parásito que van degradando la membrana de la vacuola; de esta manera los amastigotes son liberados al citoplasma de la célula hospedadora, donde se transforman en tripomastigotes (forma infectiva, no proliferativa).

Al final del ciclo celular el intenso movimiento de los tripomastigotes rompe la membrana plasmática de la célula hospedadora y los parásitos son liberados al espacio extracelular para iniciar un nuevo ciclo celular o dirigirse al torrente sanguíneo (Wanderley De Souza 2002 a,b).

Ver **Fig. i 3**.

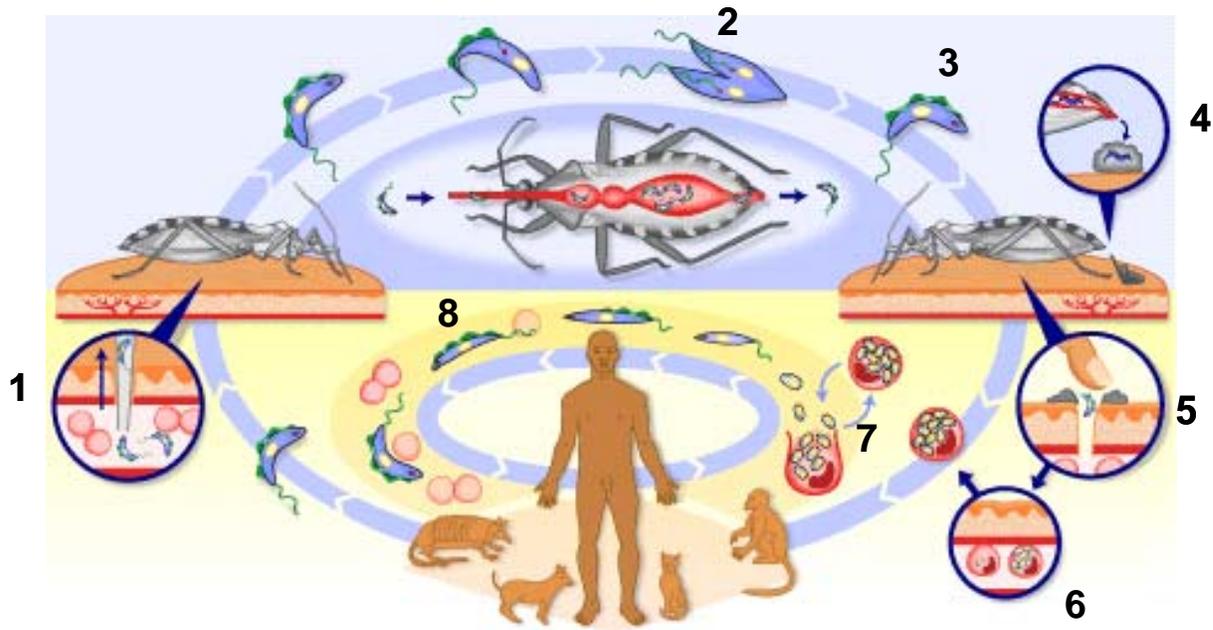
Fig. i 3: Ciclo de vida de *T. cruzi*.

Fig. i 3 1: Tripomastigotes sanguíneos ingeridos por el insecto vector. 2 epimastigotes en el intestino del vector. 3: Tripomastigote metacíclico. 4: Tripomastigote metacíclico eliminado por las heces del insecto durante la picadura. 5: La persona, al rascarse la picadura, favorece la entrada del parásito a través de la piel. 6: Células de mamífero infectadas. 7: ciclo de infección celular. 8: Tripomastigote.

Adaptado de who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm.

Características morfológicas y fisiológicas de los tripanosomátidos

Membrana plasmática:

Una característica de la familia Trypanosomatidae es la presencia de una red de microtúbulos llamados “microtúbulos subpeculiares” que se encuentran adheridos del lado interno de la membrana plasmática, por filamentos cortos de tubulina. Esta capa de microtúbulos confiere rigidez a la membrana, por eso los parásitos son difíciles de romper por medios mecánicos (Wanderley De Souza 2002 a).

Kinetoplasto/Mitocondrion:

Los organismos de la familia Trypanosomatidae poseen una sola mitocondria llamada mitocondrion que se extiende desde la base del flagelo a lo largo de la célula en forma de un sistema de túbulos.

El mitocondrion contiene una estructura de DNA, llamada kinetoplasto, que contiene entre 20 y 50 maxicírculos y entre 5000 y 10000 minicírculos (aproximadamente de 1400pb) asociados unos con otros y con moléculas lineales. Esta estructura define al orden Kinetoplastida (Wanderley De Souza 2002 b).

El DNA del kinetoplasto representa entre un 20 y 25% del DNA total en *T. cruzi*.

Los maxicírculos y minicírculos codifican los RNA guías para la edición de RNA mensajeros (ver edicion de RNA) (Wanderley De Souza 2002 a, b).

Los maxicírculos contienen alrededor de 16 a 17 Kb codificantes y una región no codificante muy variable entre diferentes especies y cepas (Pavel N 2006).

Estudios filogenéticos indican que el mitocondrion proviene de un endosimbionte, relacionado con las α - proteobacterias, que habría colonizado a un antecesor común de los Kinetoplastida (Véronique Hannaert 2003).

Glicosoma/peroxisoma:

Los peroxisomas, en células eucariotas, están definidos por la presencia de enzimas como catalasa y oxidasas que catalizan la descomposición de H_2O_2 en H_2O y O_2 ; en trypanosomátidos, estas enzimas, se encuentran solo en los organismos monogenéticos como *Crithidia* y *Leptomonas*. En cambio en parásitos digenéticos como *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania* se encuentran unas organelas análogas a los peroxisomas, pero sin actividad de catalasa, que contienen enzimas glicolíticas involucradas en la conversión de glucosa 3- fosfoglicerato, por lo que se los denominan glicosomas.

En el glicosoma también ocurren procesos de fijación de CO_2 , reciclaje de purinas y síntesis *de novo* de pirimidinas que, en otros eucariotas, ocurren en el citoplasma.

Peroxisomas y glicosomas poseen proteínas en común en su membrana; además las proteínas de ambas organelas contienen las mismas señales de importación. Esto sugiere que los glicosomas tienen un origen común con los peroxisomas (Wanderley De Souza 2002 a, b).

El ácido calcisoma:

Es una vacuola que contiene polímeros de ortofosfato con uniones fosfoanhidro de alta energía y altas concentraciones de Ca, Mg, Na, Zn y Fe.

Se los denomina acidocalcisomas por la presencia de una alta concentración de calcio y un pH interno ácido; esta organela contiene una ATPasa con actividad antiporte Ca^+/H^+ y H^+-ATPasa en la membrana.

Los estudios realizados hasta el momento sugieren que esta organela funciona, principalmente, como reservorio de calcio y energía (Wanderley De Souza 2002 a).

Bolsillo flagelar y reservosoma:

El bolsillo flagelar es una invaginación de la membrana plasmática de la cual sale el flagelo. Esta región de la membrana es diferente en términos de distribución y contenido de algunas proteínas y enzimas.

Los estadios de epimastigote y amastigote de los organismos pertenecientes al subgénero *Schyzotrypanum*, al cual pertenecen *T. cruzi* y *T. dionisi*, poseen un bolsillo flagelar diferente llamado “citostoma”, que forma un embudo y puede extenderse hasta la región nuclear.

El bolsillo flagelar es una estructura especializada en endocitosis y exocitosis; luego de la endocitosis el material queda contenido en unas vacuolas endocíticas que se van fusionando unas con otras formando una estructura tubular llamada reservosoma. En la matriz de esta estructura se encuentran proteínas e inclusiones lipídicas, en las que se acumulan proteínas endocitadas como transferrina, albúmina, peroxidasa y lipoproteínas como la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Narcisa L 2002).

El parásito consume los metabolitos de esta organela para mantener su metabolismo cuando es incubado en medio pobre y durante la transformación de epimastigote a tripomastigote infectivo (Wanderley De Souza 2002 a).

División celular:

La división celular de los estadíos de epimastigote y amastigote, se produce por fisión binaria. Durante este proceso el núcleo se alarga pero mantiene su estructura y membranas intactas dividiéndose por constricción sin condensación de los cromosomas.

Particularidades genéticas, transcripción y procesamiento del RNA

Trans-splicing

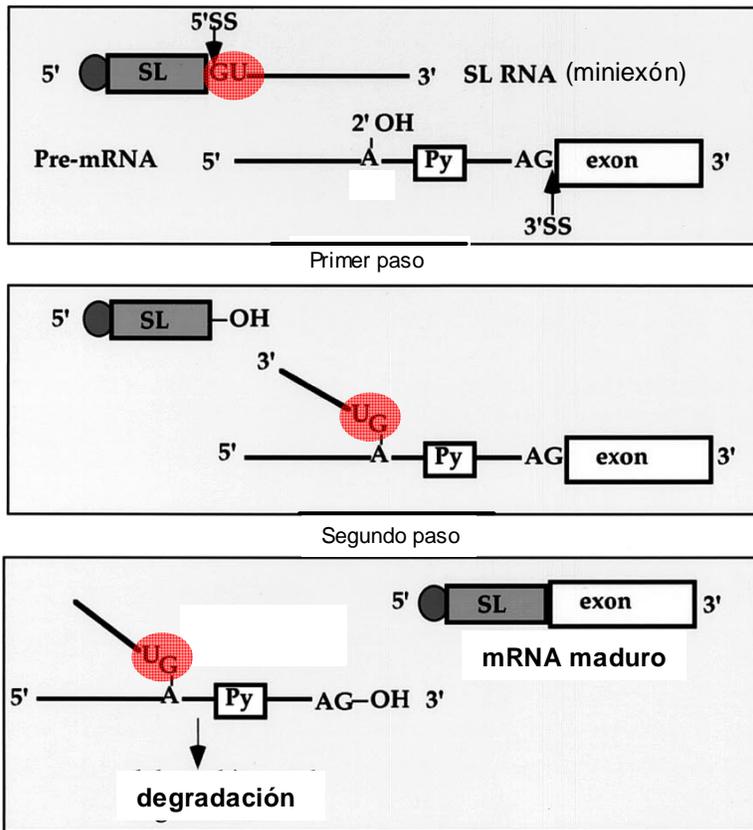
En los organismos de la familia Kinetoplastida, los genes se encuentran dispuestos en arreglos policistrónicos en tandem, separados por regiones intergénicas no codificantes. Estos genes son transcritos todos juntos en una unidad policistrónica desde un promotor en el extremo 5' del policistrón. En simultáneo con la transcripción cada mensajero es separado por el proceso de trans-splicing de modo que cada mRNA maduro es monocistrónico.

El trans-splicing consiste en la adición de un “miniexón” al extremo 5' de cada RNA mensajero. Se lo llama trans-splicing porque el miniexón se encuentra codificado en una región distante de los genes codificantes y es transcrito en forma independiente. Este proceso se encuentra acoplado a la poliadenilación del mensajero que se encuentra en dirección 5' en el policistrón (**Fig. i 4**). En *T. cruzi*, el miniexón consta de 39 nucleótidos (Webb 2005).

En Kinetoplastida los genes no contienen intrones y el trans-splicing se da en todos los pre-mRNA; solo se encontró un mensajero que es procesado por cis-splicing (Mayer 2005).

Luego de la maduración, los mensajeros, que antes formaban un policistrón, pueden encontrarse en diferentes cantidades y expresarse de manera diferencial. La regulación de la expresión génica es principalmente postranscripcional por estabilización del mRNA (Webb 2005).

El proceso de trans-splicing no es exclusivo de tripanosomátidos; este proceso también se da en Diplomemida, Euglenida, Nematodos, Trematodos, Tubelarians, Hydra, *Ciona intestinalis*, *Drosophila* e incluso en mamíferos (Mayer 2005).

Fig. i 4 Mecanismo de trans-splicing

Mecanismo de trans-splicing: El sitio de splicing 5' (GU) del RNA del miniexón reacciona con la adenina indicada en el pre-mRNA; la "horquilla" formada se escinde del exón y el miniexón se une al primer exón del RNA mensajero.

SL: splice leader (miniexón). **SS**: sitio de "splicing". **Py**: tracto polipirimidinas. En el extremo 5' del miniexón se muestra el Cap.

Edición de RNA mensajeros

Los mRNA transcritos en el kinetoplasto, codificados en los maxicírculos son editados mediante la delección y adición de uridinas por medio de los RNA guías.

Los RNA guías están codificados en los minicírculos o, en cis, en el extremo 3' de algunos mRNAs (Avila 1995).

La edición de mensajeros es vital en los trypanosomátidos (Stuart 2005).

Regulación de la expresión génica:

No se han encontrado hasta el momento secuencias promotoras que regulen la expresión a nivel transcripcional de RNA mensajeros; en cambio se han visto mecanismos postranscripcionales como splicing alternativo y estabilización de RNAm mediada por factores que reconocen motivos de secuencias.

Se postula que en *T. cruzi* la regulación de la transcripción en los diferentes estadios podría estar mediada por condensación y descondensación de la cromatina. En los estadios no proliferativos de tripomastigote disminuye mucho la tasa de transcripción y síntesis de proteínas; esto se correlaciona con cambios morfológicos en el núcleo en el cual se ve una distribución mucho más amplia de heterocromatina que la encontrada en los estadios de epimastigote y amastigote (Elias 2001).

Otro mecanismo importante en tripanosomátidos es la regulación del inicio de la traducción. Se han descrito múltiples proteínas homologas a eIF4E en *Leishmania* y *Trypanosoma* capaces de unirse al Cap y controlar el inicio de la traducción (Jeffrey Shaw 2006).

Características compartidas con organismos fotosintéticos

Se ha visto que organismos pertenecientes a los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* contienen varias proteínas que son más parecidas a las homologas en cloroplastos, citoplasma de plantas o algas, que a las proteínas correspondientes de otros eucariotas inferiores.

Algunas proteínas encontradas en *Trypanosomas* son exclusivas de plantas.

Se postula que el antecesor común de Euglenida y Kinetoplastida habría adquirido un alga endosimbionte. Euglenida habría conservado el cloroplasto mientras que Kinetoplastida habría perdido el endosimbionte conservando solo un considerable número de genes.

Estudios filogenéticos indican que las enzimas presentes en el glicosoma involucradas en la glicólisis y en el camino de las pentosas fosfato, provienen del endosimbionte fotosintético (Véronique Hannaert 2003).

Linajes y cepas de *T. cruzi*

La población de *T. cruzi* abarca gran diversidad de hospedadores e induce una enfermedad muy variable en cuanto a características biológicas y signos clínicos.

T. cruzi es una especie heterogénea muy variable a nivel genético donde se encuentran diferencias en el número y tamaño de los cromosomas.

Estudios realizados utilizando las secuencias del rRNA de la subunidad mayor y otros estudios complementarios con isoenzimas, promotores de rRNA, secuencias de miniexón y marcadores microsatélite, divide la población de *T. cruzi* en dos grandes grupos o linajes conocidos como 1 y 2, que abarcan todas las cepas conocidas.

El linaje 1 predomina en el ciclo doméstico y produce mayor parasitemia en humanos y el linaje 2 predomina en el ciclo selvático.

La gran variedad de *T. cruzi* está relacionada con la variedad de los hospedadores y la distribución y aislamiento de cada uno de estos, de modo que la estructura de la población se compone de linajes clonales que evolucionaron independientemente (Briones 1999).

Entre las diferentes cepas se ven varias diferencias a nivel del genoma como diferente patrón de bandeo en electroforesis de cromosomas enteros y cambios en la localización de grupos multicopias como el miniexón (Wagner 1990).

I. 3 Enfermedad de Chagas – distribución y aspectos epidemiológicos

La enfermedad de Chagas es una zoonosis provocada por el protozoo *Tripanosoma cruzi* que posee un ciclo de vida complejo que involucra un hospedador de la familia de los triatomíneos (conocido como Vinchuca) y un hospedador vertebrado.

La enfermedad fue descrita por primera vez por el Dr Carlos Chagas en 1909, quién describió el ciclo del parásito, el vector que transmite la enfermedad e identificó a pequeños mamíferos como reservorios domiciliarios.

La enfermedad de Chagas se encuentra distribuida desde Great Lakes Norte América (latitud 42° Norte) hasta la Patagonia Argentina (latitud 46° Sur) según la distribución de las diferentes especies de Triatomíneos que transmiten la enfermedad (Ramsey JM 2003) (**Fig. i 5**).

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que hay entre 16 y 18 millones de infectados y 120 millones de personas en riesgo de contagio que representan un 25% de la población de América latina (who.int Report of the Scientific Working on Chagas Disease Buenos Aires 2005).

La enfermedad afecta principalmente a personas con pocos recursos que viven en zonas rurales en viviendas precarias donde el insecto vector y el parásito encuentran el nicho ideal para desarrollarse.

Los habitantes de las zonas endémicas tienen muy poco acceso a los sistemas de salud y en muchos de estos países hay poca disponibilidad de las drogas utilizadas para el tratamiento de la enfermedad (WHO.int TDR 2005 Seventeenth Programme Report.).

Fig. I 5 Distribución geográfica de vectores

Distribución geográfica de vectores del Chagas En rojo se muestra la distribución de las especies epidemiológicamente más importantes: *T. dimidiata*, *R. prolixus*, *T. infestans*, *T. sordida*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* (Carrillo C. 2006 “Poliaminas en *T. cruzi*”, inédito).

Formas de transmisión:

La principal forma de transmisión es vectorial a través de la picadura por Triatomínios infectados. Trasmisión congénita madre – hijo a través de la placenta; esto se da en el 10 % de las embarazadas infectadas.

Transfusiones con sangre infectada.

Transplantes de órganos

Ingestión de comida contaminada con heces de triatomínios infectados, carne contaminada mal cocida, o de triatomínios contaminados enteros (Coura JR 2002).

Accidentes de laboratorio por manipulación de vinchucas, animales infectados y cultivos *de T. cruzi*.

Por manejo de animales domésticos y peridomésticos infectados. Se han encontrado parásitos en la saliva de perros con alta parasitemia.

Síntomas y desarrollo de la enfermedad:

La enfermedad de Chagas se desarrolla en dos fases: Fase aguda: esta fase dura entre 6 y 8 semanas; generalmente es asintomática pero puede presentar fiebre, diarrea y hepatoesplenomegalia. En muchos casos se observa un nódulo inflamatorio llamado “chagoma” compuesto por parásitos, histocitos y granulocitos periféricos. Fase crónica: en la mayoría de los casos no presenta signos detectables, pero luego de varios años, entre el 20 % y 35% de los infectados presenta daños irreversibles en el sistema nervioso autónomo del corazón, en el esófago, el colon y sistema nervioso periférico (Laranja 1956; Moncayo 2006).

Costos socio – económicos:

El Chagas representa la primer causa de lesiones cardíacas en jóvenes y adultos económicamente productivos en 18 países endémicos de Latinoamérica (Moncayo 2003).

En Brasil se ha estimado un costo anual de 750 millones en implantes y cirugías (Sucam 1987).

Se ha calculado que por cada dolar invertido en prevención, se ahorran 17 dólares de gastos en atención médica a los enfermos de Chagas (Moncayo 2003).

Estrategias de prevención y control de la enfermedad:

1. Interrupción de la transmisión vectorial eliminando la población de insectos vectores domiciliarios y peridomiciliarios mediante la aplicación periódica de insecticidas.
2. Mejoras de las viviendas y zonas peridomésticas.
3. Control de los dadores de sangre de países endémicos.
4. Detección temprana y tratamiento en la transmisión congénita.
5. Diagnóstico y tratamiento a niños con la enfermedad en la fase aguda (WHO.int Report of the Scientific Working on Chagas Disease Buenos Aires 2005).

Con el Programa de control múltiple en países del cono sur, la transmisión del Chagas por vectores y transfusiones de sangre fue interrumpida en Uruguay (1997), Chile (1999) y 8 áreas endémicas de Brasil (2000). La incidencia de nuevas infecciones en el continente bajó más del 70% (Moncayo 2003).

Aunque la transmisión vectorial este interrumpida, es importante un constante monitoreo de las zonas endémicas ya que la población salvaje de Triatomíneos se encuentra en los alrededores y pueden aparecer nuevas poblaciones domésticas originadas a partir de estas (Ramsey 2003).

La aparición de parásitos resistentes a las drogas, la resistencia a insecticidas de los insectos vectores, el calentamiento global, el crecimiento de la población en países endémicos y los viajes hacia esos países, contribuyen al crecimiento de la incidencia de las enfermedades parasitarias tropicales (Reguera 2005).

Tratamientos y drogas antiparasitarias

Los fármacos utilizados en la actualidad son el benznidazole (2-nitroimidazol) (1971) (González y Cazzulo 1989, WHO 1991, CTD 1998, WHO 1991) y el nifurtimox (5-nitrofurano) (1965) (Docampo y Moreno 1986); éste último ya no está disponible en el mercado.

El tratamiento tripanocida con estas drogas, es efectivo solo si se lo aplica en la fase aguda de la enfermedad; en la fase crónica se realizan tratamientos para aliviar los síntomas.

Estos fármacos son poco eficaces y producen muchos efectos colaterales (Schofield and Maudlin 2001); por eso es importante el desarrollo de nuevas drogas antiparasitarias que sean efectivas en un alto porcentaje de enfermos de Chagas en una ventana de tiempo más amplia desde la infección, y más específicas, de modo que sean letales para el parásito sin producir daños colaterales en los pacientes.

Para diseñar drogas antiparasitarias específicas es necesario buscar rutas metabólicas y puntos claves en la fisiología del parásito que sean exclusivas de este o muy diferentes a los del hospedador mamífero.

Las poliaminas son moléculas muy importantes para la supervivencia y proliferación de los parásitos. El tratamiento con DFMO (inhibidor de la síntesis de poliaminas por la vía de la ornitina decarboxilasa) bloquea la proliferación de *T. brucei* en ratas infectadas, produciendo la cura de la enfermedad (Bacchi 1980).

El DFMO disminuye la concentración endógena de poliaminas e inhibe la proliferación de varios protozoarios como *Giardia lamblia*, *Plasmodium falciparum*, *T. congolense*, *T. b. gambiense*, *T. b. rodhesiense*, pero no es efectiva contra *T. cruzi*. Esta droga es efectiva en el tratamiento de humanos infectados con *T. b. rodhesiense*, causante de la enfermedad del sueño (Sjoerdsma and Scheter 1984).

El metabolismo de poliaminas es un buen blanco para el desarrollo de drogas antiparasitarias ya que es muy diferente en parásitos y mamíferos (ver más adelante).

I. 4 Poliaminas

La primera poliamina descubierta fue la espermina aislada de semen humano en 1678 por Leeuwenhoek.

En 1917 Mary Christine Rosenheim mostró que esta poliamina también se hallaba en otros tejidos.

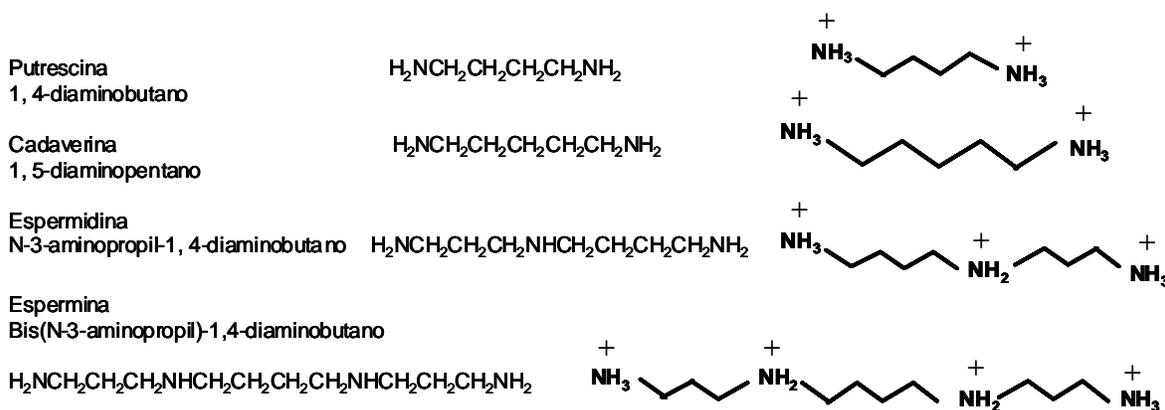
En 1924, Otto Rosenheim y colaboradores purificaron la espermina y describieron su estructura molecular. Al observar que formaba precipitados cristalinos insolubles concluyó que era la misma sustancia observada por Leeuwenhoek en el semen humano en 1678 (Cohen S. 1998, p.6 a 7).

Estructura y características generales

Las poliaminas son moléculas carbonadas alifáticas, esenciales y presentes en todos los seres vivos, salvo raras excepciones como en los órdenes Methanobacteriales y Halobacteriales pertenecientes a Archea (Hamana 1992). Contienen de 2 a 6 grupos amino. A pH fisiológico se encuentran como policationes por lo cual tienen la capacidad de interaccionar con moléculas cargadas negativamente como cadenas de ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos. Por su estructura y carga las poliaminas se unen a otras moléculas a través de uniones iónicas, uniones de puente hidrógeno y uniones hidrofóbicas.

Por su naturaleza policationica, las poliaminas presentan varias características compartidas con cationes inorgánicos como Ca^{+2} y Mg^{+2} . Sin embargo es importante mencionar que existen diferencias fundamentales, debido a que en las poliaminas las cargas se encuentran distribuidas a lo largo de una cadena carbonada flexible, lo cual permite interacciones específicas y funciones diferentes de las de los cationes inorgánicos (Schuber F. 1989).

Las poliaminas más comunes son: putrescina (1,4 diaminobutano), cadaverina (1,5 diamino pentano), espermidina (N-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) y espermina (bis(N-3-aminopropil)- 1,4- diaminobutano) (Cohen S 1998, p.16 y 17) (**Figura I. 6**).

Fig i 6 Estructura de las poliaminas más comunes.

Aunque casi todos los organismos contienen poliaminas, el tipo, la concentración y proporción de cada una de ellas es muy variable entre los diferentes organismos y tipos celulares (Cohen S. 1998 cap. 22).

Además de las poliaminas más comunes mencionadas, existen poliaminas más complejas. Para los efectos de esta tesis solo describiré algunos ejemplos:

En especies bacterianas termófilas extremas o moderadas, que crecen a temperaturas óptimas de entre 62 a 85°C predomina la pentamina N⁴-bis-(aminopropil) noespermidina.

Otras bacterias termófilas extremas cultivadas a 80°C, contienen noespermidina, también llamada termina, noespermina, caldopentamina y termopentaminas además de espermidina y espermina. Cuando estas bacterias crecen a temperaturas más bajas, el contenido de pentaminas y hexaminas disminuye; esto sugiere que las poliaminas más largas y complejas serían una adaptación a las altas temperaturas.

Bacterias termófilas extremas y reductoras de sulfatos como Thermodisulfobacteriales contienen la pentamina N⁴-bis (aminopropil) espermidina.

Noespermidina, homoespermidina, homocaldopentamina, aminopropilhomoespermidina y termopentamina también fueron encontradas en otras especies de eubacterias y archeobacterias.

Varios estudios indican que estas poliaminas son importantes para la estabilidad de los ácidos nucleicos y proteínas a altas temperaturas (Ryuichi Hosoya 2004, Oshima 1979, Oshima 1982).

Funciones de las poliaminas

Distribución intracelular

Experimentos realizados con linfocitos bovinos, hepatocitos de rata y en *E. coli* muestran que la putrescina se encuentra mayoritariamente en forma libre (40 %) aunque también se encontró gran parte unida a RNA (48 %) y en menor proporción a otras moléculas como DNA (9 %), fosfolípidos (1,4 %) y ATP (2,6 %); en cambio espermidina y espermina se encuentran mayoritariamente unidas a macromoléculas.

Dependiendo del tipo celular, las poliaminas se encuentran distribuidas en diferentes porcentajes, asociadas a moléculas y macromoléculas de la siguiente forma:

Espermidina: RNA entre un 57 y 78 %; DNA 4,3 y 13 %; fosfolípidos 3 y 0,7 %; ATP 12 – 0,7%.

Espermina: unida a RNA entre un 65 y 85 %; DNA 18 y 6 %; fosfolípidos 2,5 y 4,5; ATP 12 y 2,3 %.

Las poliaminas también interactúan con gran número de proteínas como kinasas, canales iónicos, etc., pero esto representa un muy bajo porcentaje (ver en detalle más adelante).

En esta distribución se ven reflejadas las diferentes funciones que cumplen las poliaminas dentro de la célula y la abundancia relativa de cada una según el tipo celular (Igarashi 2000).

Proliferación y diferenciación celular

Las poliaminas son muy importantes para la proliferación y diferenciación celular.

Estudios realizados en bacterias muestran que las poliaminas inducen la expresión de un grupo de genes, aumentando la eficiencia de traducción. La mayoría de los genes son inducidos indirectamente por las poliaminas por un aumento en la eficiencia de traducción de algunos factores de transcripción como por ejemplo Fis que juega un rol muy importante en la transcripción de rRNA, algunos tRNAs y otros genes involucrados en el crecimiento celular.

Las poliaminas inducen un cambio conformacional en estructuras inestables de RNA doble cadena presentes en mRNAs, aumentando la traducción a nivel de la iniciación (Yoshida 2004).

Trabajos recientes muestran que para mantener el fenotipo neoplásico son necesarios altos niveles de poliaminas y que en células de mieloma se encuentra aumentada la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC) que cataliza la biosíntesis de putrescina a partir de ornitina (Nikolaus Sélle 2005).

Se cree que uno de los mecanismos del efecto de las poliaminas sobre la proliferación celular ocurre a través de la estimulación en la síntesis de proteínas por activación postraduccional del factor de iniciación de la traducción eIF5A. Esta activación sucede por transferencia de parte de la molécula de espermidina (el grupo aminobutilo) a una lisina específica del factor eIF5A, formando el aminoácido modificado hipusina. Esta reacción está catalizada por la deoxihipusina sintetasa y la deoxihipusina hidroxilasa (Nishimura 2005, Myung 1981).

Las poliaminas son necesarias para la diferenciación celular en varios tejidos de mamíferos como mucosa intestinal, sistema hematopoyético, glándula mamaria, fibroblastos y adipocitos.

El tratamiento con difluormetilornitina (DFMO, inhibidor irreversible de la ODC) en ratones, detiene el desarrollo embrionario en E6.

Durante la etapa de gastrulación hay un incremento de poliaminas necesario para el crecimiento y diferenciación embrionaria (Heby 1987).

Condensado de la cromatina

Espermina y espermidina se encuentran unidas al DNA condensado, neutralizando las cargas negativas y disminuyendo la energía de transición de este estado.

Las poliaminas inducen y estabilizan la conformación z con giro hacia la izquierda y las conformaciones de triple hebra del DNA. Aunque las uniones entre DNA y poliaminas son electrostáticas, la estructura de las poliaminas juega un rol muy importante en la condensación (Veena 2001; Igarashi 2000).

Estudios realizados *in vitro* muestran que la interacción de las poliaminas altera la estructura del DNA y lo protege de daños oxidativos por especies reactivas de oxígeno, interacción con metales de transición y radicales libres (Pedreño 2005; Spothem-Maurizot 1995; Hyo 1998; Cohen S. 1998).

Síntesis de DNA

Estudios en cultivo de tejidos animales muestran que la inhibición de síntesis de poliaminas por el tratamiento con DFMO, disminuye la velocidad de síntesis de DNA. Cuando se cultivan células en presencia de un inhibidor de la síntesis de poliaminas, disminuye la incorporación de [³H] timidina. Esto indica que las poliaminas son necesarias para la síntesis de DNA (Fillingame 1975; Seyfried y Morris 1979).

Regulación de la expresión de genes

Las poliaminas se encuentran involucradas en la regulación de la expresión. Ante la estimulación de mitógenos como factores de crecimiento, la putrescina estimula la actividad de tirosina kinasa y la expresión de c-fos y c-jun.

Los experimentos que alteran la concentración de poliaminas intracelulares muestran que éstas afectan varias reacciones de fosforilación y expresión de varios factores de transcripción (Nikolaus Sélle 2005).

Síntesis de proteínas

En células animales y bacterias las poliaminas se encuentran principalmente asociadas a RNA.

Las poliaminas inducen el ensamblado de la subunidad 30S del ribosoma (Yoshida 2004), asegurando la eficiencia en el inicio de la traducción y la fidelidad en la lectura del RNA mensajero (Echandi y Algranati 1975; García - Patrone 1975; Goldemberg y Algranati 1981).

Las poliaminas también están involucradas en la síntesis de varias proteínas, necesarias para la viabilidad y crecimiento celular, a nivel de la traducción (Nishimura 2005).

Las poliaminas interactúan con el RNA ribosomal, RNA mensajeros y RNAs de transferencia favoreciendo cambios en la estructura de estas macromoléculas.

A los propósitos de esta tesis citaré solo algunos ejemplos:

- la molécula de ^{phe}tRNA posee 2 moléculas de espermina que estabilizan su estructura secundaria.
- las poliaminas estimulan la formación de ^{Ile}-tRNA.
- aumentan el ensamblado de la subunidad 30S del ribosoma.
- regulan la traducción de ciertas proteínas por un corrimiento en el marco de lectura, como en el caso de la antizima (ver mas adelante en regulación de la síntesis de poliaminas).

La función de las poliaminas en la síntesis de proteínas es específica ya que actúan de manera diferente y más eficiente que los cationes de carga puntual como Mg^{+2} (Igarashi 2000).

Transducción de señales y regulación de actividad enzimática

Espermidina activa tirosina kinasas y también estimula la fosforilación de ERKs (Nikolaus Sélle 2005).

Las poliaminas, especialmente la espermina, forman complejos con $ATP-Mg^{+2}$ afectando la actividad de las kinasas. Por ejemplo la Kinasa A es estimulada por la espermina (Igarashi 2000). En cambio se vio que las poliaminas inhiben la proteína kinasas dependientes de Ca^{+2} /calmodulina y Ca^{+2} /fosfolípidos (Morgan 1990).

Poliaminas y apoptosis

Las poliaminas intracelulares tienen efectos opuestos en la apoptosis según el tipo celular: en células de cáncer de pulmón, cáncer de útero y células epiteliales de mama se vio que la disminución de poliaminas por tratamiento con DFMO produce apoptosis; en líneas celulares de linfocitos B y T los bajos niveles de poliaminas inducen apoptosis por la vía mitocondrial. En cambio, estudios realizados con células IEC-6 demostraron que el tratamiento con DFMO retrasa la apoptosis inducida por $TNF-\alpha$ o cicloheximida (Nikolaus Sélle 2005).

Regulación de canales iónicos

Las poliaminas, especialmente la espermina, causan bloqueo y modulación de varios tipos de canales iónicos. La espermidina extracelular causa varios efectos en receptores de glutamato NMDA, aumentando las corrientes iónicas y el bloqueo dependiente de voltaje (Igarashi 2000).

Estabilidad de membranas

Se ha visto que concentraciones fisiológicas de poliaminas estabilizan protoplastos, membranas mitocondriales y microorganismos, protegiéndolos del shock osmótico.

Experimentos realizados *in vitro* muestran que las poliaminas inmovilizan los lípidos de membrana, sugiriendo una interacción que podría formar puentes entre proteínas y fosfolípidos o entre moléculas de lípidos.

Las poliaminas aumentan la actividad de enzimas que participan en la síntesis de glicerolípidos y fosfolípidos como la sn-glicerol-3-fosfatoaciltransferasa y 1,2-diacil sn-glicerol aciltransferasa; esto sugiere que las poliaminas son necesarias para la producción de membranas durante el crecimiento celular.

Las poliaminas, además favorecen la fusión de membranas en presencia de un aumento en la concentración de Ca^{+2} , disminuyendo la repulsión electrostática entre los fosfolípidos y aumentando la contribución de las fuerzas de atracción tipo Van der Waals (Schuber F. 1989).

Las poliaminas se unen al citoesqueleto que se encuentra por debajo de la membrana plasmática de los eritrocitos confiriéndoles una mayor resistencia mecánica (Ballas 1983).

Equilibrio redox en tripanosomátidos / Tripanotiona

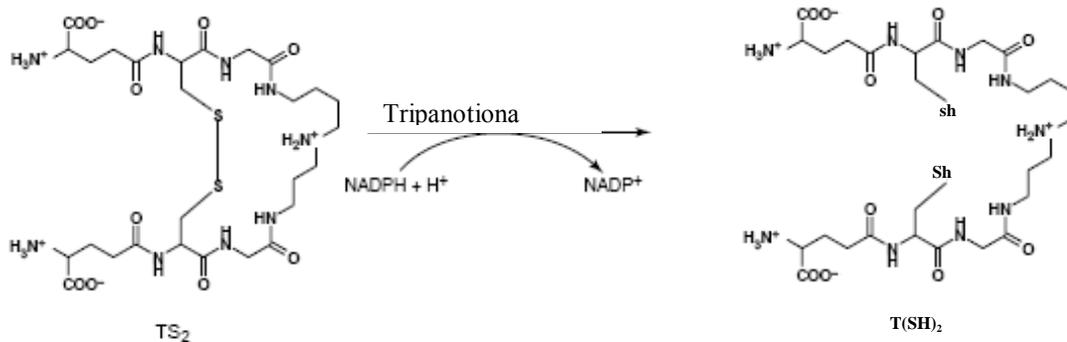
En tripanosomátidos el sistema glutación/glutación reductasa, ampliamente distribuido en los organismos, está reemplazado por un sistema metabólico exclusivo que utiliza la bis-glutationilespermidina, conocida como Tripanotiona, que conforma el 70% del glutación intracelular total (**Fig i 7**).

En *C. fasciculata* la tripanotiona es sintetizada en dos pasos por la glutationilespermidina sintetasa y la tripanotiona sintetasa; en cambio en *T. cruzi* la tripanotiona es sintetizada por una única enzima que cataliza las dos reacciones secuencialmente.

La tripanotiona es reducida por una flavo proteína dependiente de NADPH, la Tripanotiona reductasa (Müller 2003).

El sistema NADPH-tripanotiona peroxidasa, conformado por tripanotiona reductasa, tripanotiona, triparedoxina y triparedoxina peroxidasa, protege a la célula de las especies reactivas de oxígeno como peróxidos y radicales libres manteniendo el equilibrio redox de la célula (Tetaud E. 2001; Ariyanayagam 2001; Fairlamb 1992).

Fig i 7 Estructura de la tripanotiona



Metabolismo de poliaminas

En células eucariotas, las poliaminas putrescina, espermidina y espermina se sintetizan principalmente a partir de L-arginina (vía L-ornitina) y L-metionina en varios pasos enzimáticos (**Fig i. 8**).

Putrescina, la primer poliamina, se forma por descarboxilación de ornitina mediante la acción de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC). A partir de putrescina se sintetiza la espermidina por adición de un grupo aminopropilo, en una reacción catalizada por espermidina sintetasa; luego por agregado de otro grupo aminopropilo a la espermidina, se sintetiza la espermina por la espermina sintetasa.

Ambas enzimas espermidina y espermina sintetetas, utilizan S-adenosilmetionina descarboxilada como dadora del grupo amino propilo (Wallace 2003).

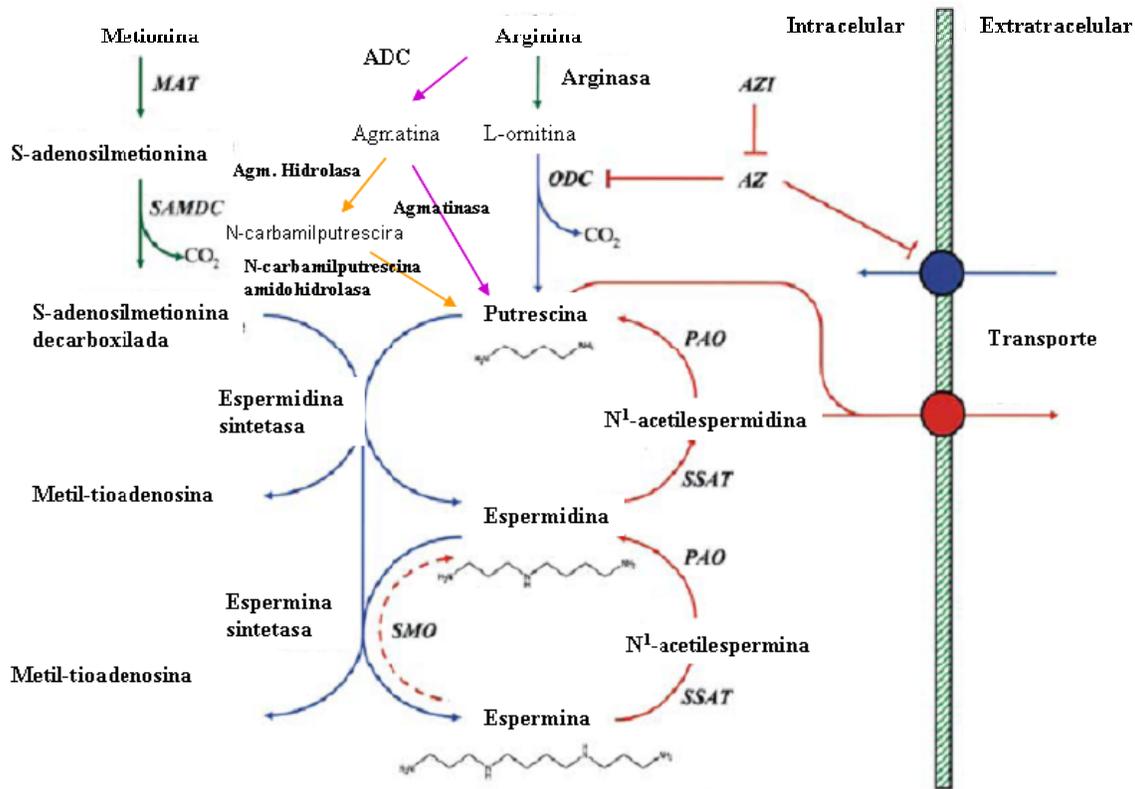
En bacterias y plantas superiores existe otra ruta alternativa, vía arginina, para la síntesis de putrescina. En el primer paso la arginina se descarboxila por la acción de la arginina descarboxilasa (ADC) dando agmatina. En plantas se hidroliza la agmatina por la agmatina imino

hidrolasa para dar N-carbamilputrescina, que luego es convertida a putrescina por la enzima N-carbamilputrescina amidohidrolasa (Cohen 1998, cap. 20).

En bacterias la síntesis de putrescina a partir de agmatina, se produce en un solo paso: la agmatina es directamente hidrolizada por la agmatina ureohidrolasa (agmatinasa) produciendo putrescina y urea como metabolito secundario (Cohen 1998, cap. 20).

Las reacciones de síntesis de poliaminas descritas son irreversibles pero existen vías de retroconversión de poliaminas por reacciones de acetilación y oxidación.

Fig. i 8 Metabolismo de poliaminas



Abreviaturas: MAT: metil adenosil transferasa, SAMDC: S-adenosilmetionina descarboxilasa, ADC: arginina descarboxilasa, ODC: ornitina descarboxilasa, AZ: antizima, AZI: inhibidor de la antizima, PAO: poliamina oxidada, SSAT: espermidina/espermina acetiltransferasa, SMO: espermina oxidada. Adaptado de Wallace 2003.

En células de mamíferos, el compuesto S-adenosilmetionina (AdoMet) se sintetiza a partir de L-metionina y ATP por la acción de la S-adenosilmetionina sintetasa. En cambio, en los parásitos *L. donovani*, *T. brucei* y *T. cruzi* es transportado desde el medio extracelular, ya que carecen de la S-adenosilmetionina sintetasa (Heby 2003).

La S-adenosilmetionina es el principal dador de grupos metilo en numerosos procesos de transmetilación de ácidos nucleicos, lípidos y proteínas cambiando su función y actividad. La S-adenosilmetionina descarboxilada participa en la síntesis de espermidina y espermina como dador de grupos aminopropilos (Reguera 2007).

Las concentraciones intracelulares de poliaminas están finamente reguladas (ver más adelante); una de las vías de regulación es la excreción de acetyl-derivados formados como intermediarios en la vía de retroconversión de poliaminas.

N¹-acetyl-espermidina y N¹-acetyl-espermina se sintetizan por la espermidina/espermina N¹-acetyltransferasa (SSAT). Luego estos acetyl derivados se oxidan por la poliamina oxidasa para formar espermidina y putrescina.

La SSAT de mamíferos, es una enzima muy regulada y con una actividad basal baja.

Existe una ruta alternativa para la retroconversión de espermina en espermidina en un único paso a través de la espermina oxidasa (SMO) (Wallace 2003).

Regulación del metabolismo de poliaminas

La concentración intracelular de poliaminas esta muy regulada. Ante un estímulo para el crecimiento o proliferación celular, aumenta el transporte y la biosíntesis de poliaminas; cuando éstas alcanzan concentraciones óptimas, se induce la degradación, la excreción y se inhibe su síntesis y transporte (Igarashi 2000).

La concentración de poliaminas varía a lo largo del ciclo celular. Hacia el final de la fase G1 hay un pico en la expresión de ODC seguido de un aumento de poliaminas; durante la fase S la expresión de ODC disminuye y la concentración de poliaminas presenta un leve descenso; en la

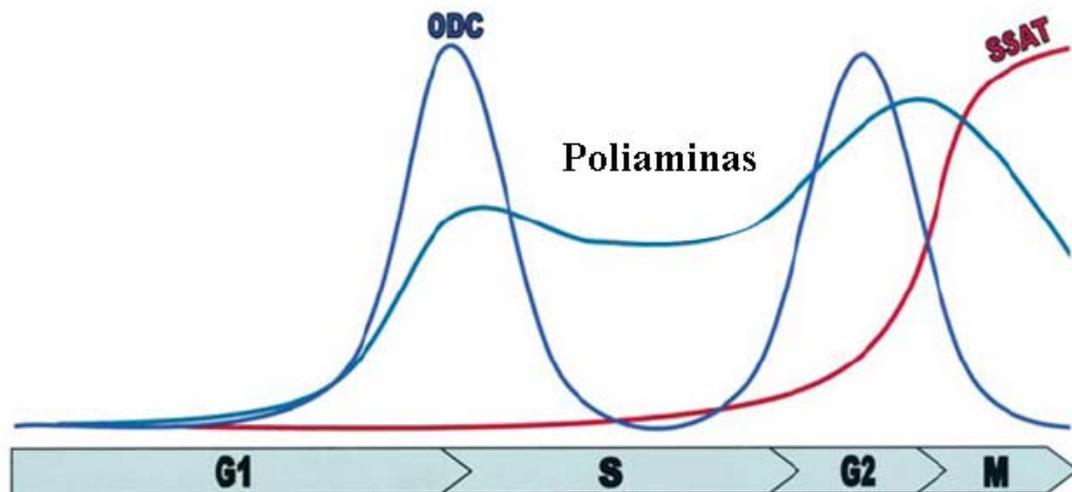
fase G2 la actividad de ODC vuelve a aumentar y también se ve un significativo aumento en los niveles de poliaminas que luego disminuyen durante la mitosis (**Fig. i 9**).

Las enzimas ornitina descarboxilasa (ODC), espermina / espermidina acetil-transferasa (SSAT) y poliamina oxidasa (PAO) son las más reguladas en el metabolismo de poliaminas.

En muchos tipos de cáncer, la regulación de la ODC se encuentra alterada, resultando en un aumento de la actividad y en los niveles intracelulares de poliaminas. Hay prueba de que la sobreexpresión de ODC es parte del proceso de iniciación en carcinogenesis.

Muchas veces se ha intentado el diseño de drogas antiproliferativas a partir de inhibidores de la síntesis de poliaminas, pero por el complejo mecanismo de regulación, aparecen cambios compensatorios en el metabolismo, manteniendo la homeostasis (Wallace 2003).

Fig i 9 Metabolismo de Poliaminas durante el ciclo celular



Las flechas indican las diferentes fases del ciclo celular. **ODC**: ornitina descarboxilasa. **SSAT**: espermidina/espermina acetil transferasa. Adaptado de Wallace 2003.

Características y regulación de la ODC

La ornitina descarboxilasa es una enzima dependiente de piridoxal fosfato (PLP) que cataliza la síntesis de putrescina por descarboxilación de ornitina; éste es un paso limitante y uno de los más regulados en la síntesis de poliaminas.

Está formada por un homodímero con dos sitios activos formados en la interfase de las dos cadenas polipeptídicas que constituyen los monómeros.

El sitio activo de la ODC de mamíferos y de parásitos es idéntico (Jackson 2003).

La ODC es una enzima altamente regulada que responde a una gran cantidad de estímulos de crecimiento. En mamíferos tiene una vida media muy corta (10 min a 1 hora). En el extremo carboxi-terminal posee dos secuencias PEST (ricas en prolina, glutamato, serina y treonina) que son esenciales para la degradación de la enzima; sin éstas secuencias, la estabilidad de la proteína es mucho mayor.

La ODC también está regulada a nivel de transcripción, estabilidad y eficiencia de traducción del RNA mensajero (Wallace 2003).

En células de mamífero, el mRNA de la ODC posee largas regiones 5' y 3' UTR no codificantes, (aprox. 300 nt) involucradas en la regulación de la traducción. El extremo 5' rico en GC forma estructuras secundarias que inhiben la traducción (Lövkvist Wallström 2001).

El promotor del gen de la ODC contiene múltiples secuencias que responden a hormonas, factores de crecimiento y promotores de tumores (Pegg 2006).

La ODC es regulada negativamente por las poliaminas a nivel traduccional y post-traduccional. En mamíferos y otros eucariotas superiores, un exceso en los niveles de poliaminas induce la traducción de una proteína llamada antizima (AZ) que se une al monómero de la ODC disociando el homodímero e inhibiendo su actividad enzimática. La unión de la antizima provoca una exposición de la señal de degradación carboxi-terminal, aumentando la degradación de la enzima por el proteosoma 26S (Hoyt 2003) (**Fig. i 10**).

El RNA mensajero de la antizima se traduce constitutivamente dando una proteína inactiva de 35 aminoácidos. Espermidina y espermina inducen un corrimiento de lectura de un nucleótido en el

codón stop del primer marco de lectura (ORF 1), encontrando un segundo ATG; por consiguiente, sigue la traducción sintetizando una proteína que fusiona los ORF 1 y ORF 2 formando la AZ activa (Rom 1994).

La acción de la AZ esta regulada por una proteína llamada Inhibidor de la antizima (AZI). Este inhibidor se une con alta afinidad a la AZ, liberando a la ODC. En mamíferos, además de AZI, se encontró otra proteína con actividad de AZI llamada ODCp (por “paróloga a ODC”) ya que posee una secuencia con 48% de identidad y 69% de similitud con la ODC; este inhibidor se expresa en sistema nervioso central y testículos (Lopez-Contreras 2006).

La degradación de la AZ requiere ubiquitinación y este proceso se inhibe por altos niveles de poliaminas que de esta forma estabilizan la AZ, que a su vez acelera la degradación de la ODC y por lo tanto disminuye los niveles de poliaminas. Las poliaminas también inducen un aumento en la transcripción del mRNA de la AZ (Pegg 2006).

Este sistema de regulación por antizima no se encuentra en protozoarios (Reguera 2005; Nasizadeh 2003).

Fig. i 10 Regulación postraducciona de ODC.

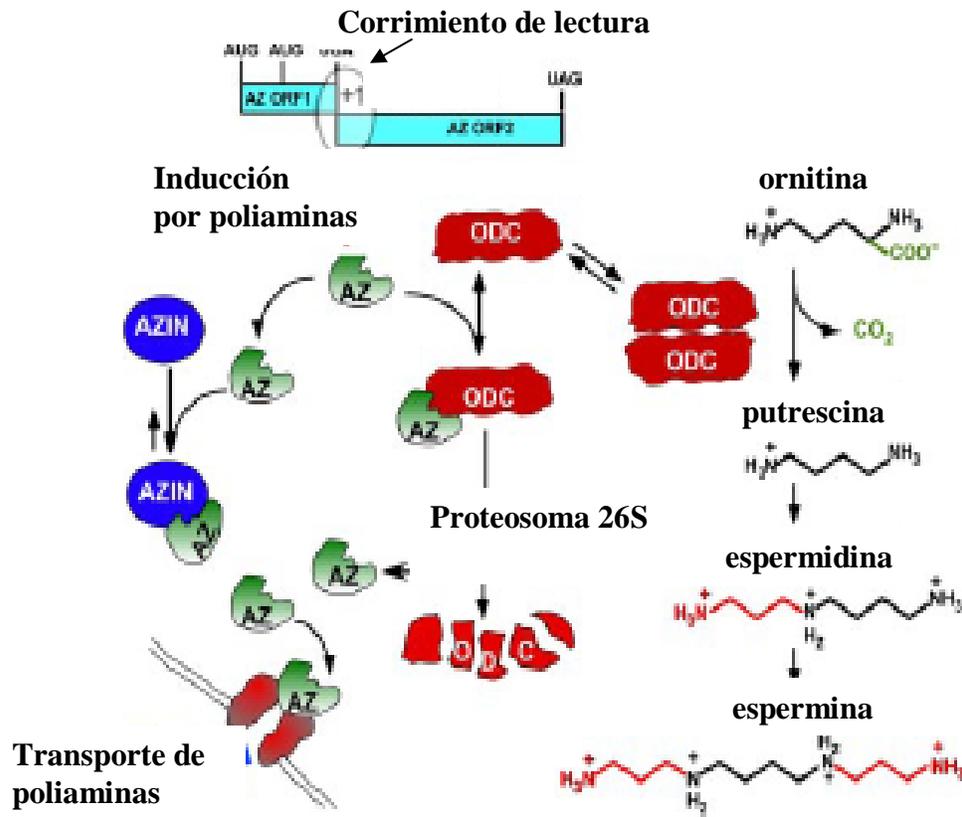


Fig. i 10 Regulación postraduccional de ODC.

El aumento en los niveles intracelulares de poliaminas induce el corrimiento del marco de lectura de AZ; ésta se une a la ODC, inhibe la actividad enzimática y aumenta su degradación por el proteosoma 26S; AZ también inhibe el transporte de poliaminas. Ante un estímulo de crecimiento celular se induce AZIN (inhibidor de la antizima), que se une a la AZ liberando la ODC. Adaptado de Pegg 2006.

Arginina descarboxilasa (ADC)

Esta enzima cataliza la descarboxilación de L-arginina produciendo agmatina.

La actividad de ADC ha sido descrita para plantas superiores, bacterias, *C. elegans* y mamíferos (Zhu 2004).

En plantas la síntesis de poliaminas vía ADC juega un rol importante durante el desarrollo y en respuesta a estrés osmótico, iónico, ácido, escasez de nutrientes y de luz UV (Bell 1990; Young 1983; Watson and Malberg 1996). La síntesis de poliaminas vía ODC participa en el crecimiento y supervivencia de las plantas.

En plantas y en *E. coli* la ADC se sintetiza como un polipéptido precursor que luego es clivado; este procesamiento es indispensable para la actividad de la enzima. En avena la ADC sería procesada por una proteasa específica (Malberg 1994), en cambio en *Arabidopsis* el procesamiento sería a través de proteasas inespecíficas (Hanfrey 2001).

El estudio con mutantes de ADC de *Arabidopsis* sugiere que la ADC estaría formada por un homodímero invertido con el sitio activo formado por el extremo N- terminal de un monómero y el extremo C- terminal del otro monómero, de modo que cada dímero tendría dos sitios activos idénticos del mismo modo que en ODC (Hanfrey 2001) (**Fig. i 11**).

En mamíferos la agmatina se sintetiza, se almacena y se libera en el cerebro y en leucocitos sugiriendo que esta amina tiene una función fisiológica como neurotransmisor, regulador de la proliferación celular e inflamación (Zhu 2004).

Fig i 11 Esquema de la estructura de ADC



Las barras esquematizan los monómeros y los óvalos amarillos los sitios activos.

Regulación de la concentración intracelular de poliaminas por eliminación de acetyl derivados

Las poliaminas son excretadas en forma de N¹-acetilpoliaminas.

En la vía de retroconversión de poliaminas estos acetyl-derivados pueden ser excretados u oxidados por la poliamina oxidasa para el reciclado de poliaminas.

Si la célula se encuentra en división, los acetyl-derivados son oxidados dando espermidina y putrescina (**Fig i 6**). Si el crecimiento y división celular están inhibidos, estos derivados son

excretados al medio extracelular produciendo una disminución neta en la concentración intracelular de poliaminas (Wallace 2003).

SSAT

La enzima espermidina/espermina-acetil transferasa de mamíferos comparte muchas características con la ODC: tiene una vida media de 20 a 40 minutos y es regulada a varios niveles.

Varios estudios realizados con análogos de poliaminas muestran una superinducción de varios miles de veces en la actividad de esta enzima por aumento en la transcripción, estabilización del RNA mensajero y de la proteína, y un aumento de la traducción.

Los niveles bajos en espermidina y espermina inducen un “splicing” alternativo con la inclusión de un exón de 110 pb entre los exones 3 y 4; este exón contiene una señal de terminación que conduce a la degradación por decaimiento del mRNA sin sentido (NMD). En condiciones normales o con elevados niveles de poliaminas este “splicing” alternativo se encuentra inhibido (Hyvönen 2006).

AdoMetDC

Esta enzima es fundamental para los parásitos; se ha visto que inhibidores contra esta enzima tienen un gran efecto antiparasitario.

La actividad enzimática de AdoMetDC de parásitos es alta en la fase exponencial de crecimiento y disminuye en la fase estacionaria.

En *C. fasciculata*, *T. brucei* y *T. cruzi* esta enzima es fuertemente activada por putrescina.

En mamíferos y *C. fasciculata*, AdoMetDC tiene una vida media corta; en cambio en *T. brucei* y *L. donovani* es una enzima estable (Nasizadeh 2003).

PAO

La poliamina oxidasa es una enzima dependiente de flavín – adenín dinucleótido (FAD) (Holttta 1977) que está localizada en peroxisomas en gran número de organismos (bacterias, levaduras, hongos, plantas, parásitos, mamíferos, etc.) (Morgan 1998).

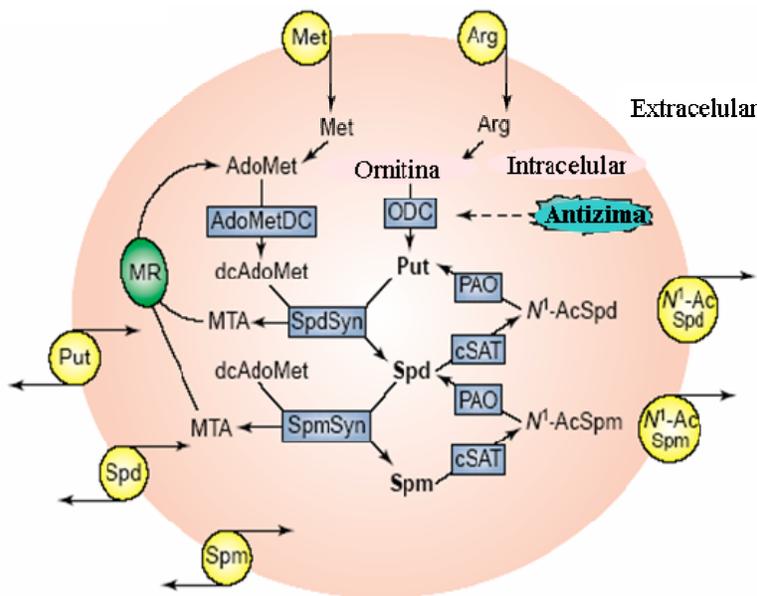
En varios tejidos de vertebrados se encuentra una alta actividad de PAO, formando parte del sistema de interconversión de poliaminas, importante para mantener las concentraciones intracelulares de éstas en células no proliferativas (Seiler 1995).

La actividad de PAO es importante para el reciclado y detoxificación del exceso de poliaminas (Seiler 1987; Morgan 1987; Poulin 1995; Seiler 1996).

Cuando el crecimiento celular se encuentra inhibido, aumenta la actividad de PAO (Seiler 2004).

La regulación del metabolismo de poliaminas en mamíferos se da en muchos de los pasos de la biosíntesis y retroconversión, permitiéndole a la célula adaptarse a los cambios intracelulares y extracelulares de poliaminas (**fig i 12**).

Fig i 12 Metabolismo de Poliaminas en células de mamífero



Abreviaturas: **Met:** metionina, **Arg:** arginina, **Put:** putrescina, **Spd:** espermidina, **Spm:** espermina, **AdoMet:** adenosilmetionina, **AdoMetDC:** adenosil metionina decarboxilasa, **dcAdoMet:** adenosilmetionina decarboxilada, **SpdSyn:** espermidina sintetasa, **SpmSyn:** espermina sintetasa, **MTA:** metiltioadenosina, **MR:** reciclado de metionina, **PAO:** poliamina oxidasa, **cSAT:** Spd/Spm acetil transferasa citosolica, **N¹-AcSpd:** N¹- acetil espermidina, **N¹-AcSpm:** N¹-Acespermina. Adaptado de Muller 2001.

Síntesis de poliaminas en Tripanosomátidos

El metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos es más sencillo, ya que no poseen múltiples caminos para la obtención de estas moléculas, como ocurre en células de mamífero; ésto los hace más sensibles al ataque con drogas contra este metabolismo (Müller 2001).

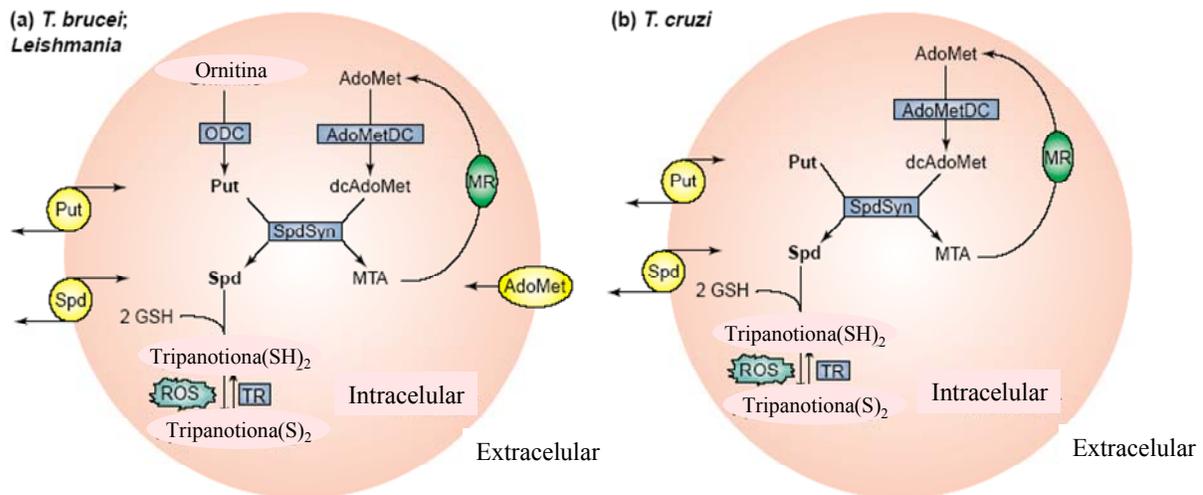
En *Leishmania*, *T. brucei* y *Crithidia fasciculata* se ha descrito la síntesis *de novo* de poliaminas por la vía de ornitina y adenosilmetionina, sin embargo *T. cruzi* carece de ODC y el parásito necesita del transporte de poliaminas del medio para sobrevivir.

En *T. brucei* se ha encontrado un transportador de AdoMet (Müller 2001).

T. brucei, *Crithidia fasciculata* y *T. cruzi* carecen de sistemas de retroconversión de poliaminas y tampoco contienen espermina.

Un paso muy importante y exclusivo de los trypanosomátidos es la síntesis de tripanotona a partir de una molécula de espermidina y dos de glutatión. Este compuesto mantiene el equilibrio redox en estos parásitos (**Fig i 13**).

Fig i 13 Metabolismo de poliaminas en Tripanosomátidos



Abreviaturas: **Put:** putrescina, **Spd:** espermidina, **AdoMet:** adenosilmetionina, **AdoMetDC:** adenosil metionina decarboxilasa, **dcAdoMet:** adenosilmetionina decarboxilada, **SpdSyn:** espermidina sintetasa, **MTA:** metiltioadenosina, **MR:** reciclado de metionina, **ROS:** especies reactivas de oxígeno, **TR:** tripanotiona reductasa. Adaptado de Müller 2001.

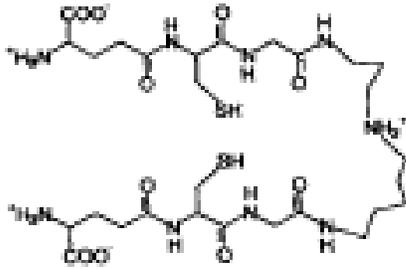
T. brucei es especialmente sensible al inhibidor irreversible de la ODC, debido a que esta enzima es estable y además, el transporte de poliaminas desde el exterior es ineficiente.

El tratamiento con DFMO para la tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño) es efectivo tanto en la etapa aguda como en la crónica (Müller 2001).

En *T. cruzi* se encontró otra diamina que no está presente en otros tripanosomátidos, la cadaverina.

La cadaverina es convertida en aminopropilcadaverina por la espermidina sintetasa y luego se conjuga a dos moléculas de glutatión formando N¹, N⁹ – bis(glutatiónil) aminopropilcadaverina, también llamada Homotripanotiona (Hunter 1994) (**Fig i 14**).

Fig i 14 Homotripanotiona



La homotripanotona sería reducida por la tripanotona reductasa.

Experimentos realizados con cultivos de epimastigotes en presencia de [^3H] lisina muestran que *T. cruzi* es incapaz de sintetizar cadaverina; el parásito la obtiene por transporte desde el medio extracelular (Hunter 1994).

Regulación de ODC en parásitos tripanosomátidos

En tripanosomátidos, la regulación es diferente a la descrita en mamíferos. En *Crithidia fasciculata* las poliaminas no inducen la degradación de la ODC (como sucede en mamíferos) (Ceriani 1992).

La ODC de mamíferos contiene dos regiones ricas en prolina (P), glutámico (E), serina (S) y treonina (T) denominadas “secuencias PEST” que le confieren una vida media corta y favorecen la degradación de la enzima a niveles altos de poliaminas intracelulares.

La ODC de parásitos digenéticos como *T. brucei* y varias especies de *Leishmania* es muy estable, la enzima de estos parásitos no contiene la región PEST en el extremo C-terminal (encontrada en la enzima de mamíferos) (Persson 2003, Nasizadeh 2003). Sin embargo *C. fasciculata* contiene una ODC de vida media corta (30 min.) a pesar de que ésta no contiene la región PEST en el extremo C-terminal.

La ODC de *C. fasciculata*, posee dos regiones que cumplen con todos los requerimientos de las secuencias PEST, una en el extremo N-terminal y otra cerca del extremo C-terminal (Persson 2003).

La antizima se ha encontrado en eucariotas desde levaduras hasta mamíferos, pero no se ha podido detectar en ninguno de los tripanosomátidos (Nasizadeh 2003; Reguera 2005).

Síntesis de poliaminas en *T.cruzi*

Resultados de nuestro laboratorio y otros autores han demostrado que *T. cruzi* es incapaz de sintetizar poliaminas *de novo* a partir de los precursores ornitina, arginina y lisina; en cambio se encontró que este parásito puede sintetizar espermidina a partir de putrescina. Esto significa que el transporte de poliaminas, sobre todo el de putrescina, juega un rol fundamental en los niveles intracelulares de poliaminas de modo tal que *T. cruzi* cultivado en medio definido (sin poliaminas) deja de proliferar y luego muere (Algranati 1990 p.141 – 146; Hunter 1994).

Existen numerosas evidencias de que no hay actividad de ODC ni ADC, en ninguno de los estadios, en varias cepas y/o clones de *T.cruzi* (Hunter 1994; Fairlamb 1997; C Carrillo 1999; Bacchi 2001).

Todas estas evidencias indican que la ausencia de síntesis de poliaminas no se debe a condiciones de cultivo o a cambios en el parásito en los distintos estadios durante el ciclo de vida. Experimentos realizados en nuestro laboratorio muestran que la ausencia de actividad de ODC se debe a la ausencia del gen codificante (Carrillo 1999).

La ausencia de ODC se encuentra bien documentada y aceptada; sin embargo aún existen algunas discusiones acerca de la síntesis de putrescina por la vía de ADC en *T.cruzi*.

Ausencia de la síntesis de putrescina por la vía de ADC en *T. cruzi*

En contraposición a las evidencias mencionadas anteriormente que indican la auxotrofia para poliaminas en *T. cruzi*, varios trabajos afirman que el parásito sintetiza poliaminas a partir de arginina por la vía de la arginina decarboxilasa.

El grupo de trabajo de Kierszenbaum muestra que el tratamiento con inhibidores de arginina decarboxilasa disminuye la infectividad de *T. cruzi* y la proliferación dentro de la célula hospedadora y atribuyen este efecto a que el parásito sintetiza poliaminas a través de ADC (Kierszenbaum F 1987). En otro trabajo sugieren que *T. cruzi* tendría actividad de ADC (Majunder S 1992).

Otros autores publicaron que tanto la proliferación como el contenido intracelular de poliaminas disminuían por el agregado difluormetilarginina (DFMA, inhibidor irreversible de la ADC) al medio de cultivo libre de poliaminas. Este efecto se revertía con el agregado de precursores de la síntesis de putrescina vía ADC como arginina, agmatina, o con putrescina; pero los resultados eran confusos y no tenían un tratamiento estadístico apropiado (Schwarcz 1993). Estos autores también determinaron propiedades bioquímicas de la enzima y la inhibición de la actividad por el tratamiento *in vivo* con poliaminas en el medio de cultivo (Hernández S 1999).

Un trabajo de Piacenza et al. muestra que L-Arginina tiene un efecto antiapoptótico que es inhibido por DFMA, con lo cual atribuyen parte del efecto a que *T. cruzi* sintetiza poliaminas vía ADC (Piacenza 2001).

Ensayos de actividad de ADC en extractos de epimastigotes de *T. cruzi*, realizados en nuestro laboratorio, dieron valores del orden de **20 pmoles/mg prot./h**; estos valores son despreciables comparados a los obtenidos para el mismo ensayo realizado con *E. coli* con valores de **400 nmoles/mg prot./h**. (Carrillo 2003) Es interesante señalar que la mínima actividad de ADC detectada en *T. cruzi* parece deberse a una decarboxilación oxidativa, no enzimática.

Debido a estos resultados contrapuestos, la existencia de ADC en *T. cruzi* está en discusión. Por este motivo decidimos realizar estudios fisiológicos, bioquímicos y genéticos que resuelvan esta controversia.

Transporte de poliaminas

En bacterias existen dos transportadores de poliaminas del tipo ABC (ATP Binding Cassette), uno específico para putrescina y otro que transporta putrescina y espermidina, con mayor afinidad por espermidina. Estos transportadores están formados por 4 subunidades: una proteína que se une al sustrato en el espacio periplásmico, dos proteínas transmembrana que forman el poro y una ATPasa del lado interno de la membrana plasmática que provee la energía para el transporte.

En algunas especies de bacterias existe un tercer transportador, Pot E que transporta putrescina hacia adentro y también hacia afuera de la célula por antiporte con ornitina que es transportada hacia adentro (Igarashi 1999, Reguera 2005).

En levaduras se conocen cuatro transportadores: TPO1 se localiza en la membrana plásmática y está involucrado en el transporte de espermidina hacia el exterior de la célula (Albertsen 2003) y TPO2 a TPO4 se encuentran en membrana de vacuolas para compartimentalizar espermidina y espermina, ya que estas poliaminas libres en el citosol son tóxicas para levaduras. TPO2 y TPO3 son específicos para espermina. Estos transportadores pertenecen a la familia de transportadores de resistencia múltiple a drogas (Tomitori 2001, Reguera 2005).

En células de mamífero hay un transportador específico para putrescina y otro capaz de transportar espermidina y espermina.

El transporte está muy regulado; uno de los mecanismos involucra la misma antizima que regula la ODC. En presencia de un exceso de poliaminas la antizima inhibe el transporte de poliaminas e induce la excreción de acetyl derivados (Sakata 2000).

Agmatina compete por el transportador de espermidina, teniendo un efecto antiproliferativo por disminución en la concentración intracelular de poliaminas en células de mamífero (Satriano 2001).

Transporte de poliaminas en tripanosomátidos

En *Leishmania* se han descrito bioquímicamente dos transportadores diferentes, uno específico para putrescina y otro para espermidina (Reguera 2005).

Recientemente se ha caracterizado un transportador en *L. major*, con alta afinidad para putrescina y espermidina LmPOT1 perteneciente a la superfamilia APC, localizado principalmente en la membrana plasmática (Hasne 2005).

Estudios bioquímicos indican que *T. cruzi* posee un sistema de transporte para putrescina y cadaverina 10 a 50 veces más eficiente que los transportadores presentes en los otros tripanosomátidos (González 1993).

Otros trabajos sugieren que habría al menos dos transportadores de poliaminas en *T. cruzi*, uno específico para diaminas y otro para espermidina (Le Quesne 1996).

Recientemente se clonó y caracterizó un transportador de alta afinidad para espermidina en *T. cruzi* (TcPAT₁₂), perteneciente a la familia de transportadores de aminoácidos; este transportador presenta un 55,3% de identidad con el transportador POT1 de *L. major*. Expresado en ovocitos de *Xenopus* se vio que también transporta putrescina y L-arginina pero con una eficiencia de 6,7 y 5,4 veces menor que para espermidina, respectivamente (Carrillo 2006).

Objetivos del trabajo

Estudiar el metabolismo de poliaminas en *T. cruzi*, buscando los puntos diferenciales con células de mamífero que puedan ser un blanco para el desarrollo de drogas antiparasitarias.

Objetivos particulares:

Estudiar en profundidad la vía de síntesis de poliaminas vía ADC en *T. cruzi* a nivel fisiológico y genético para definir si esta presente en el parásito.

Investigar si existen reguladores de la expresión del gen o de la actividad enzimática de la proteína en el estadio epimastigote.

Estudiar como afecta la expresión de una ADC heteróloga en el metabolismo de poliaminas en epimastigotes, para ello se transformaron epimastigotes de *T. cruzi* con el cDNA de ADC de avena y se estudió si el parásito transgénico es capaz de crecer en un medio libre de poliaminas y sintetizar putrescina a partir de arginina.

También se buscarán secuencias en el genoma del parásito que tengan identidad significativa con secuencias de genes de ADC de otras especies.

Buscar genes involucrados en el sistema de transporte de poliaminas en parásitos tripanosomátidos.

Resultados

Evidencias bioquímicas y fisiológicas de la ausencia de síntesis de poliaminas vía arginina descarboxilasa en epimastigotes de *T. cruzi*.

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que cultivos de *T. cruzi* en SDM₇₉ (medio semidefinido con solo trazas de poliaminas) dejan de crecer luego de varios pasajes. El crecimiento del cultivo puede reanudarse por el agregado de putrescina pero no con el agregado de sus precursores síntesis ornitina o arginina (Carrillo 2003) (**Fig R1**).

Para estudiar si arginina se metaboliza en el parásito, se agregó este aminoácido radioactivo a cultivos de *T. cruzi* y luego se estudiaron los metabolitos marcados sintetizados en el parásito, por electroforesis en papel (trabajo realizado con la colaboración de la Doctora Nélida González) (**Fig. R2**). Los resultados muestran que no hay conversión de arginina en agmatina, ornitina o putrescina *in vivo*.

El análisis de los productos obtenidos en un ensayo de actividad enzimática de ADC *in vitro*, realizado con extractos crudos de parásitos, mostró los mismos resultados.

Esta técnica puede detectar hasta 10 pmoles de producto radioactivo, suficiente sensibilidad como para detectar actividad de ADC aunque esta sea extremadamente baja.

Como control positivo se realizó el mismo experimento con extractos de *E. coli* en las mismas condiciones; este ensayo muestra claramente la formación de agmatina y putrescina (**Fig. R2 B**) (Carrillo 2003).

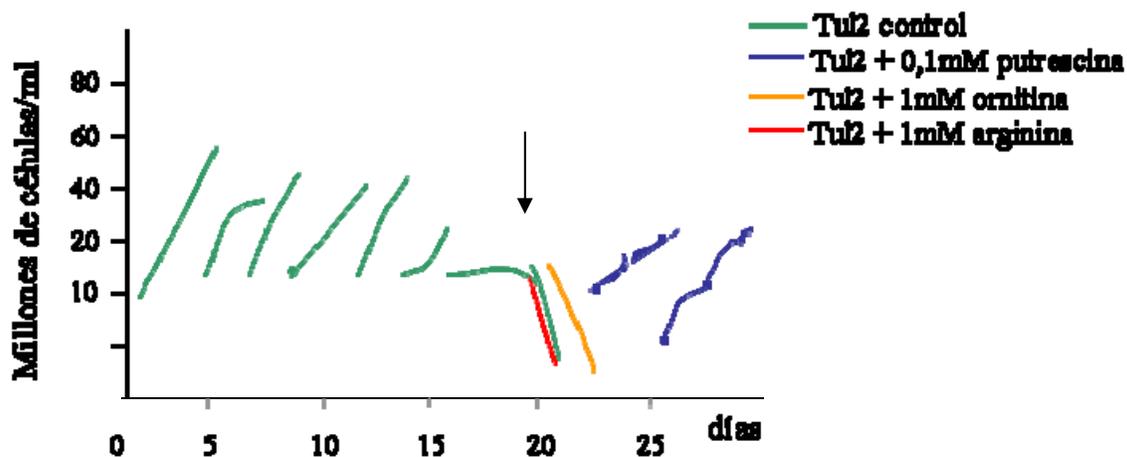
Fig.R 1 Curvas de crecimiento de *T. cruzi* (cepa Tul₂)

Fig. R 1: Los parásitos fueron cultivados en medio semidefinido sin poliaminas, a partir de los 20 días se cultivaron en el mismo medio (control) o en presencia de putrescina, ornitina o arginina. El crecimiento se siguió por conteo de parásitos. Cada curva representa la proliferación de los parásitos luego de una dilución del cultivo en el mismo medio.

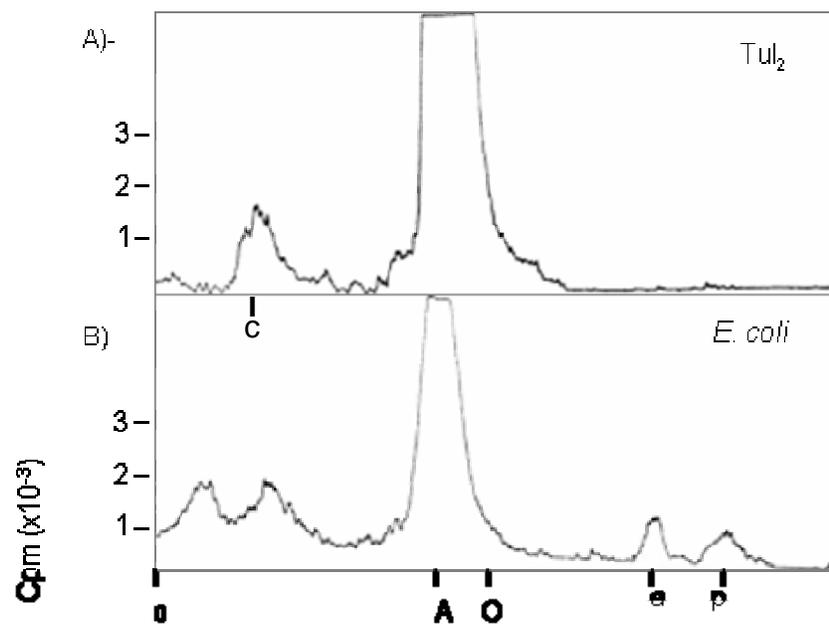
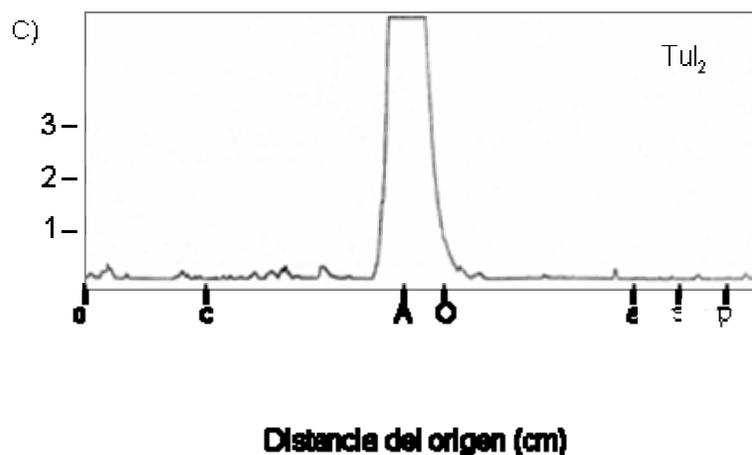
Fig. R2 Productos metabólicos a partir de arginina.I)- *in vitro*II)- *in vivo*

Fig. R 2: I)- *in vitro*: Electroforésis en papel de los productos formados en el ensayo de decarboxilación de L [U -¹⁴C]arginina A)- Mezcla de reacción enzimática con extracto de *T. cruzi*, cepa Tul₂.

B)- Mezcla de reacción enzimática con extracto de *E. coli* (control positivo de la síntesis de poliaminas).

II)- *in vivo*: C)- Electroforésis en papel de los productos sintetizados, *in vivo*, por epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Tul₂) cultivados en presencia de L [U -¹⁴C]arginina.

0: punto de siembra de la muestra; **c:** citrulina; **A:** arginina; **O:** ornitina; **a:** agmatina; **s:** espermidina y **p:** putrescina.

Resultados similares se obtuvieron para todas las cepas de *T. cruzi* ensayadas (Tul₂, Morel, Cl y RA).

Estos resultados demuestran que epimastigotes de *T. cruzi* no sintetizan putrescina a partir de arginina por la vía de la arginina descarboxilasa. Esto junto con las evidencias de la ausencia de ODC en el parásito, concuerdan con resultados previos de nuestro laboratorio y otros autores sobre la auxotrofia para poliaminas en *T. cruzi* (Carrillo 1999; Ariyanayagam 1997; Carrillo 2003; Algranati 1989; Hunter 1994; Le Quesne and Fairlamb 1996; Bachi 2001).

Para determinar si existen sistemas de regulación de la expresión o de la actividad enzimática que impidan detectar la síntesis de putrescina vía ADC, según el estadio del parásito o las condiciones de cultivo, decidimos investigar a fondo todas las causas posibles de la ausencia de actividad de ADC.

Determinación de las causas de la ausencia de actividad enzimática de ADC

La ausencia de actividad de ADC podría deberse a varias causas:

- Inhibidores intracelulares de la actividad enzimática
- Regulación negativa de la expresión de ADC a nivel transcripcional o traduccional
- Ausencia del gen codificante en el genoma del parásito.

La ausencia de actividad de ADC no puede deberse a un deficiente transporte de arginina ya que está demostrado que *T. cruzi* transporta arginina eficientemente. (Algranati 1990, Pereira 1999)

Para determinar las causas de la ausencia de ADC transformamos epimastigotes de *T. cruzi* con el plásmido recombinante pRIBOTEX- ADC (“**pADC₈**”) el cual lleva el cDNA de ADC de avena clonado en el sitio para EcoR1 del vector pRIBOTEX como se describe en Materiales y Métodos (**Fig R 3**)

Los parásitos fueron transformados por electroporación y seleccionados con G418 (derivado de la geneticina) 500µg/ml a partir de las 48 horas luego de la transformación.

Los parásitos transgénicos fueron cultivados en medio rico, con alto contenido de poliaminas, salvo para algunos experimentos donde se aclara específicamente el medio de cultivo utilizado.

Fig. R 3 Vector pRIBOTEX - ADC.

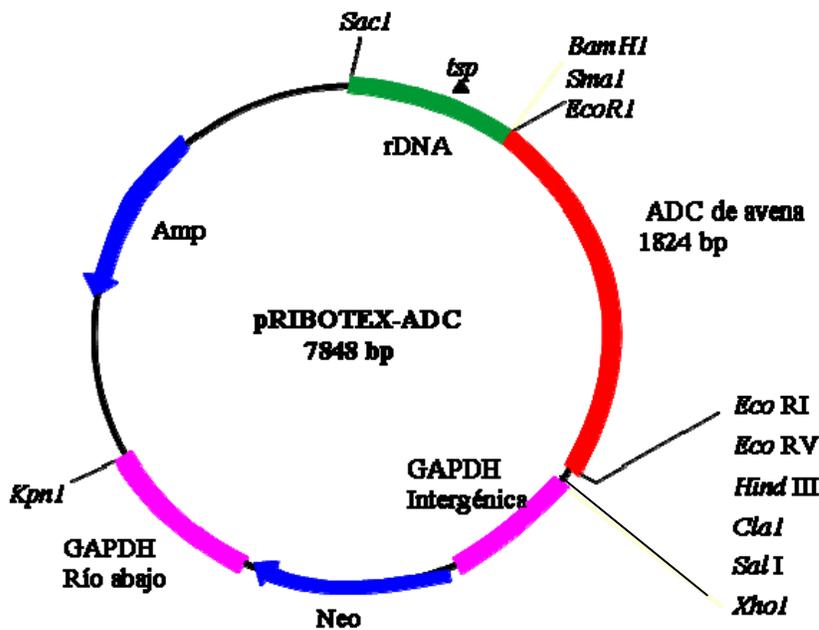


Fig. R 3: rDNA: secuencia promotora de genes de RNA ribosomales donde comienza la transcripción (**tsp**, transcription start point), **GAPDH intergénica** y **GAPDH Río abajo**: regiones intergénicas de los genes GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) para un correcto “trans-splicing”, **Neo**: secuencia de resistencia a neomicina para selección en células eucariotas, **Amp.**: gen de resistencia a ampicilina para la selección en bacterias (Martínez-Calvillo 1997).

Se realizó un ensayo de *Southern blot* con muestras de DNA de parásitos transfectados con pADC₈ (“**Tul-ADC**”) y parásitos de las cepas salvajes RA y Tul2 como control negativo.

Los resultados muestran una correcta transformación de los parásitos.

Los parásitos salvajes no dieron ninguna señal de hibridización con la sonda radioactiva específica para ADC (**Figura R 4**).

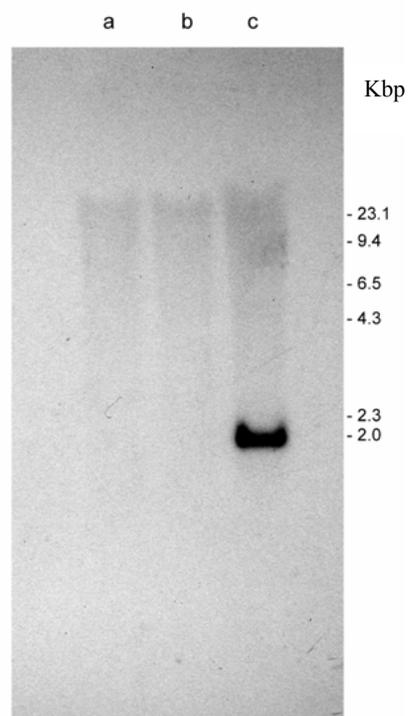
Fig. R 4 Southern blot

Fig. R 4: Muestras de DNA total de Tul₂ (a), RA (b), y Tul2-ADC (c) fueron digeridas con EcoR1. Luego de la separación por electroforesis en gel de agarosa y transferencia a membrana, se hibridizó con sonda específica para ADC marcada radioactivamente con ³²PdCTP (ver Materiales y Métodos)

Luego de las 48 horas de la transformación se estudió la actividad enzimática de ADC en los parásitos. Los parásitos transformados “Tul-ADC” y “RA- ADC” mostraron altos niveles de actividad enzimática (**Tabla R 1**).

Tabla R 1

Actividad de ADC en parásitos salvajes y transformados.

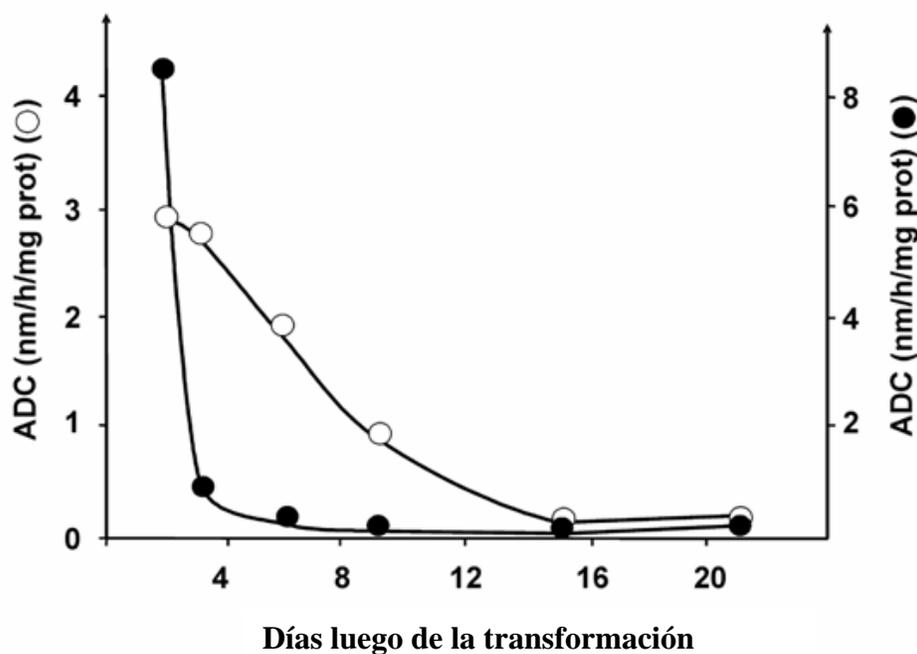
Cepa de <i>T. cruzi</i>	Vector	Actividad de ADC (μmoles $\text{CO}_2/\text{hr/mg prot.}$)
	-	< 20
Tulehuen 2	pADC₂ (48 hr desde la transformación)	2900 \pm 500
	-	< 20
RA	pADC₃ (48 hr desde la transformación)	6300 \pm 1200

Actividad enzimática de ADC de epimastigotes de las cepas Tul 2 y RA salvajes o transformados con el plásmido pADC₃.

El preparado de los extractos y los ensayos enzimáticos se realizó como se describe en materiales y métodos.

Todos los valores representan un promedio de tres mediciones \pm desvío estandar.

En los parásitos transformados la actividad enzimática heteróloga se mantuvo por pocos días y luego fue disminuyendo hasta llegar a valores indetectables a las dos semanas en las dos cepas utilizadas (RA y Tul2) (**Fig R 5**).

Fig. R 5 Actividad ADC en parásitos transgénicos.**Fig. R 5:** Parásitos Tul 2 (○) y RA (●) transformados con ADC se cosecharon a diferentes tiempos luego de la transformación. La actividad de ADC se midió *in vitro* con extractos celulares totales.

La actividad de la ADC heteróloga de los parásitos transformados fue caracterizada por estequiometría, producto y especificidad de reacción.

Extractos celulares de Tul-ADC se incubaron con L-[U-¹⁴C] arginina durante 1h a 37 °C en las condiciones descriptas para la reacción de ADC (Hernández 1999), en ausencia o en presencia de DFMA (Difluormetilarginina, inhibidor irreversible de ADC). Una vez finalizada la reacción enzimática se caracterizaron los productos por su movilidad, respecto de estándares, en electroforesis en papel (trabajo en colaboración con la Doctora Nélica González) (**Fig.R 6 A**).

Los resultados muestran que a partir de arginina el único producto formado es la agmatina; éste producto se encuentra ausente en las muestras incubadas en presencia de DFMA, indicando especificidad de la reacción enzimática (**fig R 6 B**).

Los productos fueron calculados a partir de la radioactividad de cada mancha y la actividad específica de la L-[U-¹⁴C] arginina utilizada. La disminución del sustrato (25,2 nmol) es equivalente a la cantidad de CO₂ liberado (23,3 nmol) y agmatina formada (26,3 nmol) como era de esperar para una reacción directa de decarboxilación de arginina.

Estos resultados muestran que, a pesar de que el parásito transgénico tiene una alta actividad de ADC, tampoco es capaz de sintetizar putrescina a partir de arginina sugiriendo que *T. cruzi* carece de la enzima agmatinasa.

Para verificar que los parásitos no contienen inhibidores de la actividad enzimática de ADC se midió actividad mezclando extractos celulares de la cepa salvaje y de los parásitos “Tul-ADC” por partes iguales. Los resultados mostraron una disminución de la actividad con respecto a los extractos de Tul-ADC que corresponde solo al efecto por dilución (Resultado no mostrado).

Fig. R 6 Caracterización de los productos enzimáticos de la actividad ADC, en parásitos transformados.

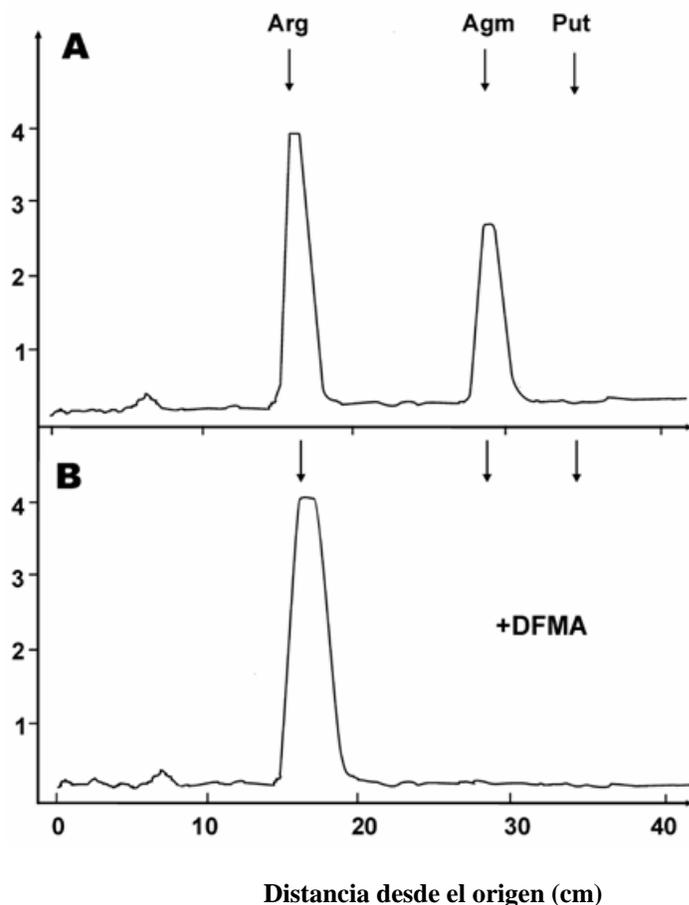


Fig.R 6: Extractos celulares de parásitos fueron incubados con L – [U – 14C] arginina en ausencia (A) o presencia de DFMA (B). Los productos de reacción fueron analizados por electroforesis en papel
Arg: arginina, **Agm:** agmatina, **Put:** putrescina.

Búsqueda del gen de ADC en el genoma de *T. cruzi*

Visto que en *T. cruzi* no hay factores que interfirieran con la expresión del gen heterólogo y tampoco inhibidores de la actividad enzimática de ADC, decidimos investigar si el genoma del parásito contiene secuencias que tengan alguna identidad con los genes de las enzimas descritas en otros organismos. Utilizando la información disponible del proyecto genoma de *T. cruzi* se utilizaron 41 secuencias consenso correspondientes a diferentes ADC y se compararon contra 1118787 secuencias disponibles en la base de datos (The Institute for genomic Research TIGR, www.tigr.org/; usando el programa tblastn). Se analizaron tanto las secuencias con un valor esperado alto ($E < 1$), como las secuencias que tuvieran alguna región conservada (por lo menos 5 aminoácidos). De un total de 29 secuencias analizadas ninguna mostró identidad significativa con ninguna de las ADC conocidas (Trabajo realizado con la colaboración del Dr. Claudio Pereira del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA, CONICET).

Para descartar que este resultado no se debiera a que esta secuencia no haya sido cubierta por las 14 secuenciaciones del genoma de *T. cruzi* de TIGR, se diseñaron primers degenerados correspondientes a regiones conservadas obtenidas a partir de alineamientos de las secuencias aminoacídicas de las ADC conocidas corrigiendo según el uso de codones de *T. cruzi*. Con esos primers se realizaron reacciones de PCR en condiciones no estrictas para la unión de los primers, utilizando DNA de tres cepas diferentes de *T. cruzi* salvaje (Tulahuen 2, CL Brener y RA). Luego de secuenciar los productos obtenidos no se encontró ningún fragmento que tuviera alguna región conservada con los genes de ADC conocidos (Carrillo 2003).

Para investigar si el parásito transgénico Tul-ADC era auxótrofo para poliaminas, realizamos curvas de crecimiento en medio de cultivo rico y en medio semidefinido libre de poliaminas.

La actividad de ADC en los parásitos transformados no confiere ninguna ventaja adaptativa.

Al pasar los parásitos transformados con ADC a medio de cultivo semidefinido sin poliaminas, estos dejan de crecer luego de varios pasajes. Esto indica que, los parásitos transgénicos, a pesar de tener alta actividad de ADC, no pueden sintetizar putrescina a partir de arginina, sugiriendo que no tendrían la enzima agmatinasa, necesaria para la síntesis de poliaminas por la vía de ADC. Estos resultados también demuestran que la agmatina no sustituye fisiológicamente a las poliaminas (**Fig R 7**).

Fig. R 7 Curvas de crecimiento de Tul-ADC en diferentes medios de cultivo.

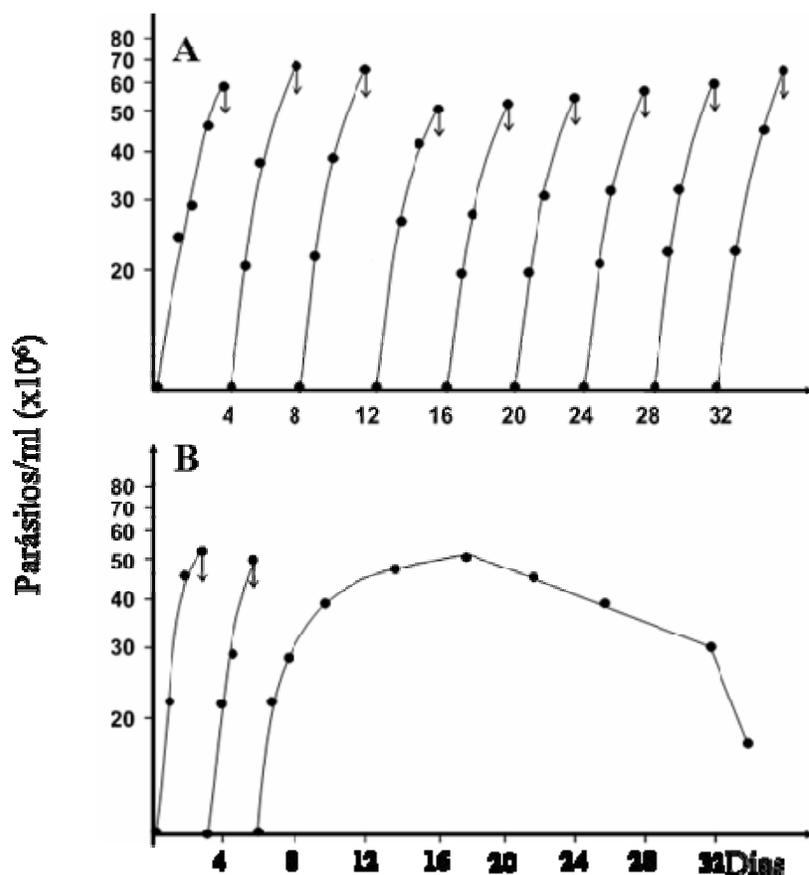


Fig. R 7: Parásitos transformados con ADC fueron cultivados en medio rico, luego se diluyeron 10 veces con medio rico (A) o medio semidefinido libre de poliaminas (SDM₇₉) (B) y se los cultivó durante varios pasajes.

Las flechas indican dilución del cultivo.

A diferencia de estas observaciones, experimentos realizados anteriormente en el laboratorio, con *Tul*₂ transformado con pRIBOTEX-ODC, muestran que éste parásito transgénico puede crecer en medio libre de poliaminas ya que esta enzima es suficiente para que el parásito sintetice putrescina a partir de ornitina (Carrillo 1999).

La curva de actividad de la figura R 5 muestra una expresión transitoria de ADC en los parásitos transformados. Este resultado sugiere una transformación transitoria de los parásitos; este hecho resulta llamativo teniendo en cuenta que el plásmido pRIBOTEX se caracteriza por ser un vector que se integra al genoma rápidamente generando una transformación estable (Lorenzi 2003, Carrillo Carolina_ resultados no publicados).

Debido a estos resultados decidimos estudiar la expresión del gen heterólogo durante períodos más prolongados luego de la transformación y la integración del plásmido recombinante pADC₈ al genoma del parásito.

Expresión del gen heterólogo en *T. cruzi*

Epimastigotes de *T. cruzi* se transfectaron con el plásmido pADC₈ y la población transformada se seleccionó a las 48 horas con el agregado de G418.

La expresión de ADC fue estudiada por ensayos de actividad enzimática utilizando parásitos cultivados en presencia o ausencia de G418 luego de las 48 horas iniciales de la transformación, tomando muestras de los cultivos a diferentes tiempos (**Fig. R 8**).

Los resultados muestran que existe un período de expresión transitoria que va disminuyendo hasta llegar a valores muy bajos a las cuatro semanas y luego comienza a aumentar alcanzando niveles de expresión muy altos.

Los parásitos transformados cultivados en ausencia de G418 expresan el gen heterólogo hasta aproximadamente 10 días y luego se pierde la actividad.

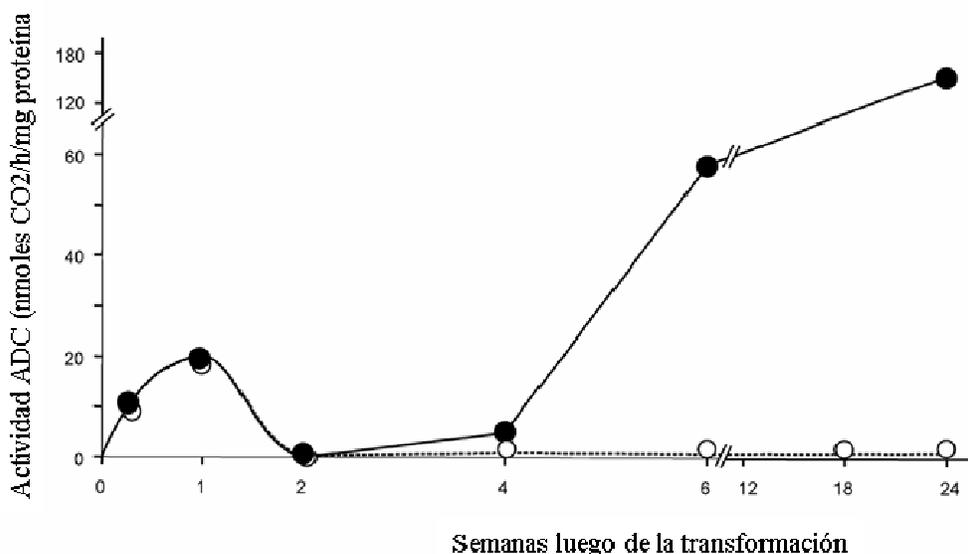
Fig. R 8 Actividad de ADC en parásitos transgénicos

Fig. R 8: La actividad enzimática fue medida *in vitro*, a partir de extractos celulares obtenidos de parásitos cosechados a diferentes tiempos luego de la transformación. Los parásitos se cultivaron en ausencia (○) o presencia (●) de geneticina.

Para estudiar la expresión del gen heterólogo se realizó un ensayo de Northern blot tomando muestras de los parásitos transformados a diferentes tiempos luego de la electroporación (**Fig. R 9**).

Se cosecharon los parásitos a las 48 horas, y 1, 2, 4 y 24 semanas luego de la electroporación. Muestras de RNA total se analizaron por hibridización con una sonda específica para ADC de avena obtenida por PCR utilizando los primers ADC1 y ADC2. Como control de carga del gel se hibridizó con una sonda ribosomal como se describe en Materiales y Métodos.

Los resultados del ensayo de *Northern blot* muestran que la expresión aumenta moderadamente hasta una semana y luego disminuye llegando a niveles indetectables a las cuatro semanas; luego la expresión vuelve a incrementarse notablemente mostrando altos niveles de expresión a las 24 semanas.

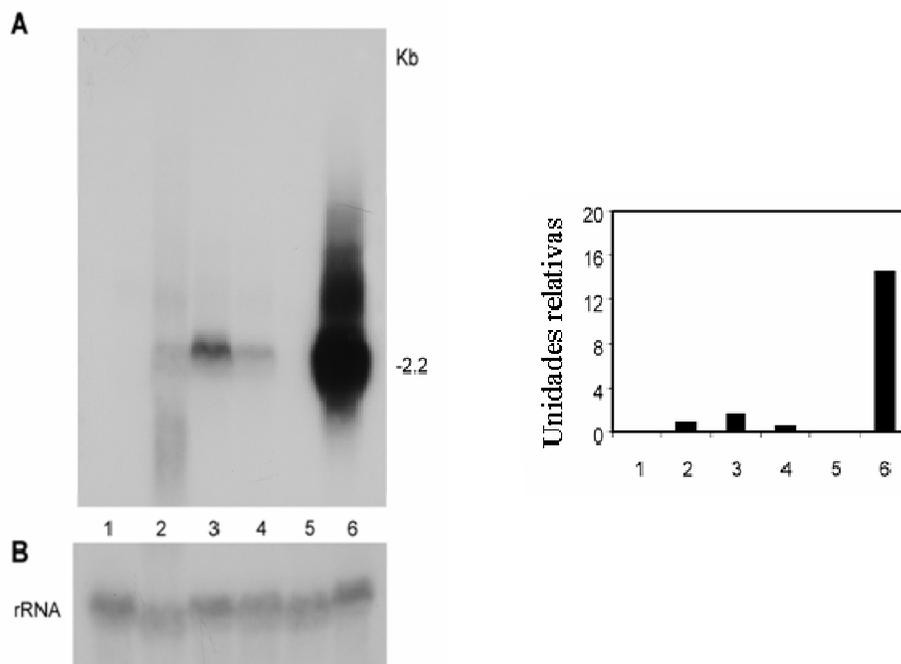
Fig. R 9 Estudio de los niveles de expresión del gen heterólogo de ADC.

Fig. R 9: **A y B** Northern blot Análisis de los niveles de mRNA de ADC en muestras de RNA total extraídas de parásitos cosechados a diferentes tiempos luego de la transformación. **A** sonda específica para ADC, **B** Sonda ribosomal. Calle1) Tul2 wt., 2) RNA de parásitos cosechados a las 48 hs. de la transformación, 3) a 1 semana, 4) 2 semanas, 5) 4 semanas, 6) 24 semanas.

C Representación de los niveles de mRNA de ADC relativos a la señal de la sonda ribosomal de cada calle.

Estos resultados, junto con la curva de actividad enzimática (fig R 8), muestran una expresión transitoria del gen heterólogo que disminuye hasta valores indetectables al cabo de 4 semanas de la transformación. Luego la expresión y la actividad enzimática se recuperan alcanzando niveles superiores a los registrados durante las dos primeras semanas.

Está descrito que parásitos transfectados con el vector pRIBOTEX adquieren una transformación estable por recombinación del plásmido con el genoma del parásito en el locus ribosomal (Lorenzi 2003).

Los cambios en los niveles de expresión podrían explicarse por una baja eficiencia de integración del plásmido recombinante al genoma del parásito. La expresión vista durante las 2 primeras semanas podría deberse a la expresión del gen heterólogo, a partir del plásmido recombinante, mantenido en la población de los parásitos en forma libre como episoma. Durante el período de selección de los parásitos transformados, por acción del antibiótico, el plásmido recombinante se integra al genoma en unos pocos parásitos, mientras que el plásmido no integrado se va degradando. Los parásitos con el plásmido integrado al genoma, sobreviven a la selección por el antibiótico.

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que los parásitos no transformados tardan alrededor de un mes en ser eliminados por el antibiótico, durante ese período se tiene una mezcla variable parásitos transformados y salvajes.

Integración del plásmido recombinante al genoma del parásito.

Para investigar si la actividad observada hasta las 2 semanas se debía a una transformación transitoria en la que el plásmido permanece en forma libre sin integrarse al genoma del parásito, se analizó la integración del plásmido recombinante a diferentes tiempos luego de la electroporación mediante PFGE (electroforesis de campo pulsante).

Los ensayos se realizaron con cromosomas preparados a partir de parásitos cultivados en presencia o ausencia de geneticina por más de 4 semanas (**Fig. R 10**).

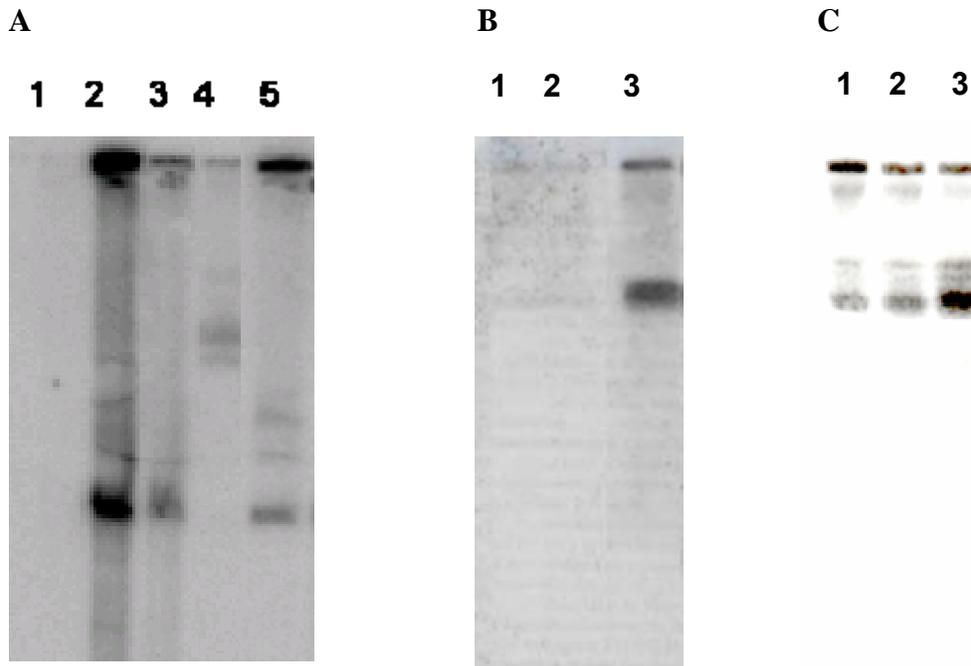
Fig R 10 Análisis de los cromosomas de Tul-ADC por PFGE

Fig. R 10: Cromosomas de parásitos salvajes o transformados con pADC₈, fueron separados por PFGE. Luego de la transferencia del DNA a membrana se hibridizó con la sonda ADC 1-2 o sonda ribosomal.

A (1) Cromosomas de parásitos salvajes, (2) Tul – ADC cosechados a las 48 hs. luego de la transformación, (3) a los 7 días, (4) a los 3 meses (calles 1 a 4 corresponden a parásitos cultivados en presencia de G418) (5) cromosomas de Tul₂ salvaje + pADC8 (agregado durante la preparación de los cromosomas), como control de corrida del plásmido en forma episomal.

B (1) Cromosomas de parásitos wt., (2) Tul-ADC cultivados en ausencia de G418 y cosechados 5 semanas después de la transformación, (3) TulADC cultivados presencia de G418 y cosechados 5 semanas después de la transformación. **C** Idem B, hibridizado con sonda ribosomal.

Para confirmar que las variaciones en los niveles de RNA y actividad enzimática observados a diferentes tiempos post-trasformación, iban en paralelo con la integración del plásmido recombinante al genoma del parásito e investigar si ésta se daba en el locus ribosomal, se analizó la integración por ensayos de PCR con diferentes pares de primers que permiten diferenciar entre el plásmido en forma episomal o integrado al genoma del parásito.

Se utilizaron dos pares de primers diferentes: T7 (específico para la región promotora del pRIBOTEX) y ADC2 (específico para ADC); T7 y RIB (específico para el locus ribosomal en el genoma del parásito) (**Fig R 11 A, B y C**).

Los ensayos de PCR se realizaron con DNA total obtenido de parásitos cosechados a diferentes tiempos luego de la transformación utilizando los dos pares de primers en todos los casos. Los productos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1 %.

Si el plásmido se encuentra en forma episomal en copia individual o formando un complejo multimérico, se obtendrá un producto de 2030 pb con los primers T7 y ADC2.

En cambio si el plásmido se encuentra integrado al genoma como copia única en el locus ribosomal solo se obtendrá un producto de 890 pb con el par de primers T7 y RIB.

Por estudios anteriores con el plásmido pRIBOTEX se sabe que puede integrarse al genoma en varias copias en tandem (Martinez – Carvillo1997). Si éste fuera el caso se obtendrían los dos productos de 2030 y 890 pb (ver esquema en **Fig R 11 C**).

Los resultados muestran que durante las primeras 2 semanas el plásmido permanece libre en forma episomal ya que solo se obtiene el fragmento de 2030pb, luego el plásmido (no integrado) es degradado llegando a niveles apenas detectables al cabo de 2 semanas. A partir de las 4 semanas se obtienen los dos fragmentos de 2030 y 890 indicando una integración de 2 o más copias en tandem en el genoma del parásito.

No podemos descartar que también haya quedado una pequeña proporción de plásmido libre, aún en la población transformada de manera estable (**Fig R 11 D**).

Fig. R 11 Análisis de integración del plásmido recombinante al genoma de *T. cruzi*.

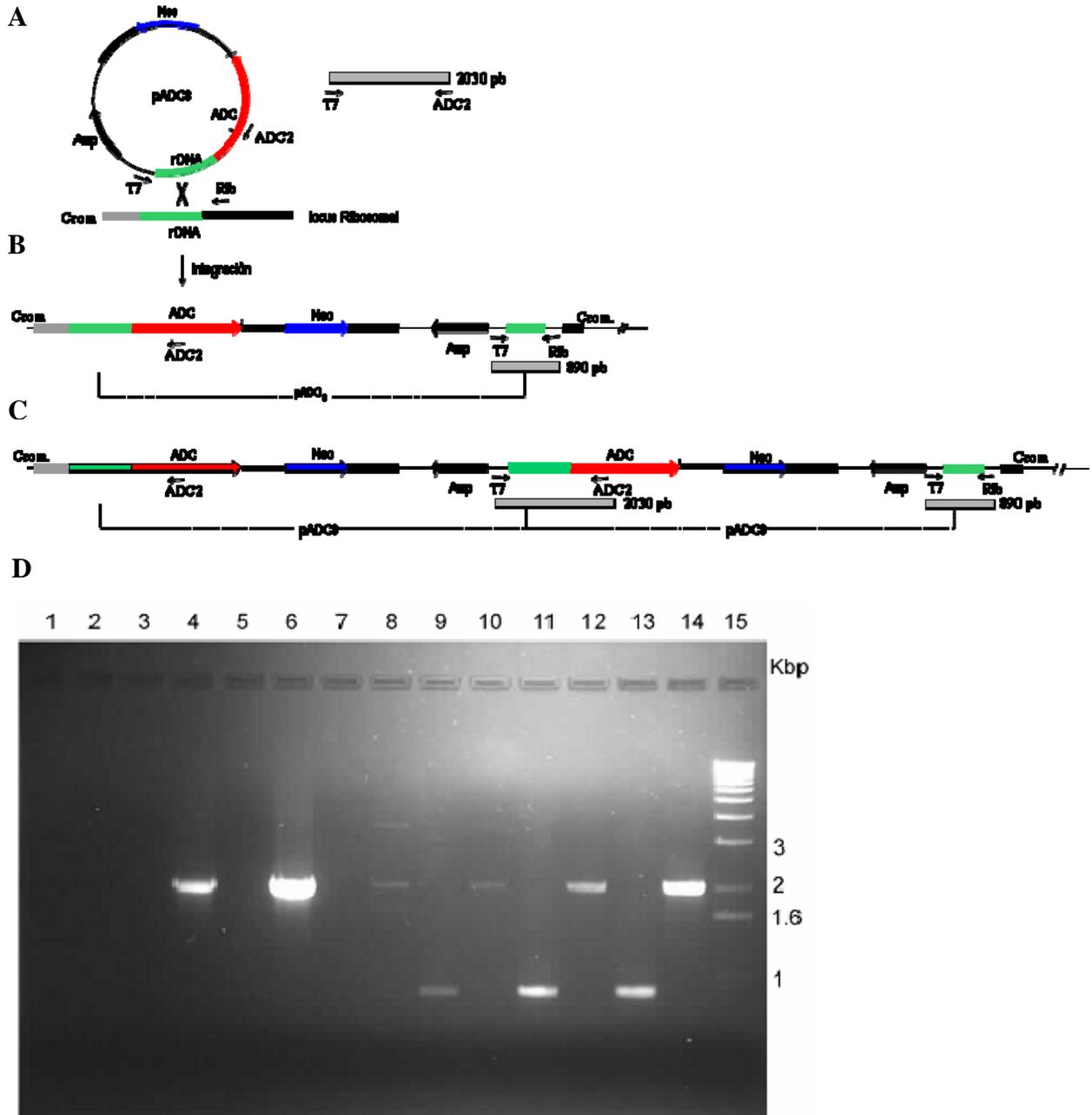


Fig. R 11: Esquemas de integración y productos de amplificación esperados por PCR: **A** plásmido libre, **B** integrado al genoma del parásito en una copia, **C** integrado al genoma del parásito, en dos o más copias en tandem.

D: Análisis de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa. Los productos fueron visualizados por tinción con Bromuro de Etidio.

calles 1 y 2 ensayo realizado con DNA de Tul₂ wt como templado; calles 3 y 4 corresponden al ensayo realizado con el plásmido recombinante pADC8; calles 5 y 6; 7 y 8; 9 y 10; 11 y 12; 13 y 14 corresponden a ensayos realizados con DNA de parásitos cosechados a 48 horas y 2, 4, 6 y 24 semanas después de la transformación, respectivamente. Calles 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13 productos obtenidos con los primers T7 y RIB. Calles 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 productos obtenidos con los primers T7 y ADC2. Calle 15 estandar de peso molecular.

Para confirmar que el plásmido recombinante se encuentra integrado en más de una copia en tandem en el genoma del parásito se realizaron dos ensayos de Southern blot digiriendo DNA total de Tul₂ ADC con diferentes enzimas de restricción (**Fig. R 12 y 13**). Luego de la separación por electroforesis y transferencia de las muestras a membrana de nylon, se hibridizó con la sonda “ADC 1-2” (descrita en materiales y métodos).

Los parásitos transfectados se cosecharon a los 6 meses de la electroporación, momento en que la población ya se encuentra transformada de manera estable y los parásitos de cepa salvaje ya fueron eliminados por el antibiótico de selección.

En la **tabla R 2**, **figura R 12 A, B, C** y **figura R 13 C** se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción para pRIBOTEX y ADC. En todos los casos las enzimas tienen un único sitio de corte en pRIBOTEX y en la secuencia de ADC.

Tabla R 2

Sitios de corte de las enzimas de restricción para el pRIBOTEX y el cDNA de ADC.

	pRIBOTEX	ADC
Nhe I	3809 pb	821 pb
Sst I/ SacI	657	1683
SalI	1514	1460
SstII/ SacII	1190	--
BstBI	3758	--

Fig. R 12 Análisis del genoma de Tul-ADC por Southern blot

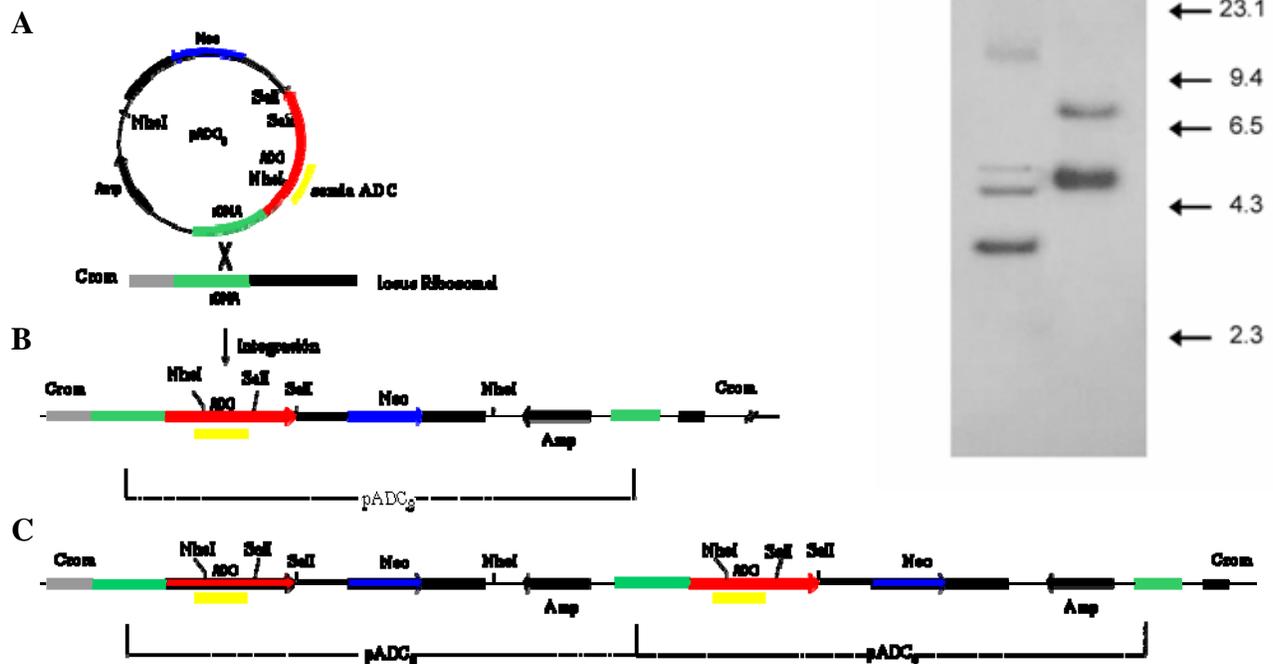


Fig. R 12: A, B y C: esquemas de las formas libres e integradas del plásmido recombinante al genoma del parásito y sitios de corte para las enzimas de restricción.

D: Ensayo de Southern blot a partir de DNA total, obtenido de parásitos cosechados luego de los 6 meses de la trasfección, digerido por las enzimas NheI (calle 1) y Sall (calle 2).

Luego de la transferencia la membrana fue hibridizada con la sonda ADC 1-2.

Si el plásmido pADC-8 no está integrado al genoma se espera dos bandas al digerir las muestras con Nhe 1 y una banda de 7,6 Kb con Sal 1. Si el plásmido se encuentra integrado en copia única, se espera obtener dos bandas al digerir con Nhe 1 y una banda al digerir con Sal 1. Si el plásmido se encuentra integrado al genoma en dos o más copias en tandem, se espera obtener tres bandas con Nhe 1 y dos bandas con Sall.

Los resultados obtenidos indican que el plásmido se encuentra integrado al genoma del parásito en dos o más copias en tandem (**Fig. R 12D**).

En el siguiente ensayo de Southern blot se utilizó DNA total digerido con las enzimas SstII o BstBI, cada una con un único sitio de corte en el extremo 5' o 3' de pADC8 respectivamente (**Fig. R 13**).

Luego de la hibridización con la sonda de ADC, en ambos casos se ve un fragmento de 7,9 Kb; esto refuerza la idea de una integración de 2 o más copias en tandem cabeza-cola, sin rearrreglos ni deleciones, del pADC₈ al genoma del parásito. El fragmento de 23 Kb obtenido con BstBI se debe al fragmento liberado cuando la enzima corta en el genoma del parásito hacia el 5' del pADC₈.

La ausencia de un fragmento mayor de 8 kb en la muestra digerida con SstII podría deberse a que el sitio de corte en el genoma en sentido 3', luego del plásmido, se encuentra muy próximo a éste de manera que da un producto cercano a 8 kb que no puede distinguirse por falta de resolución en la electroforesis.

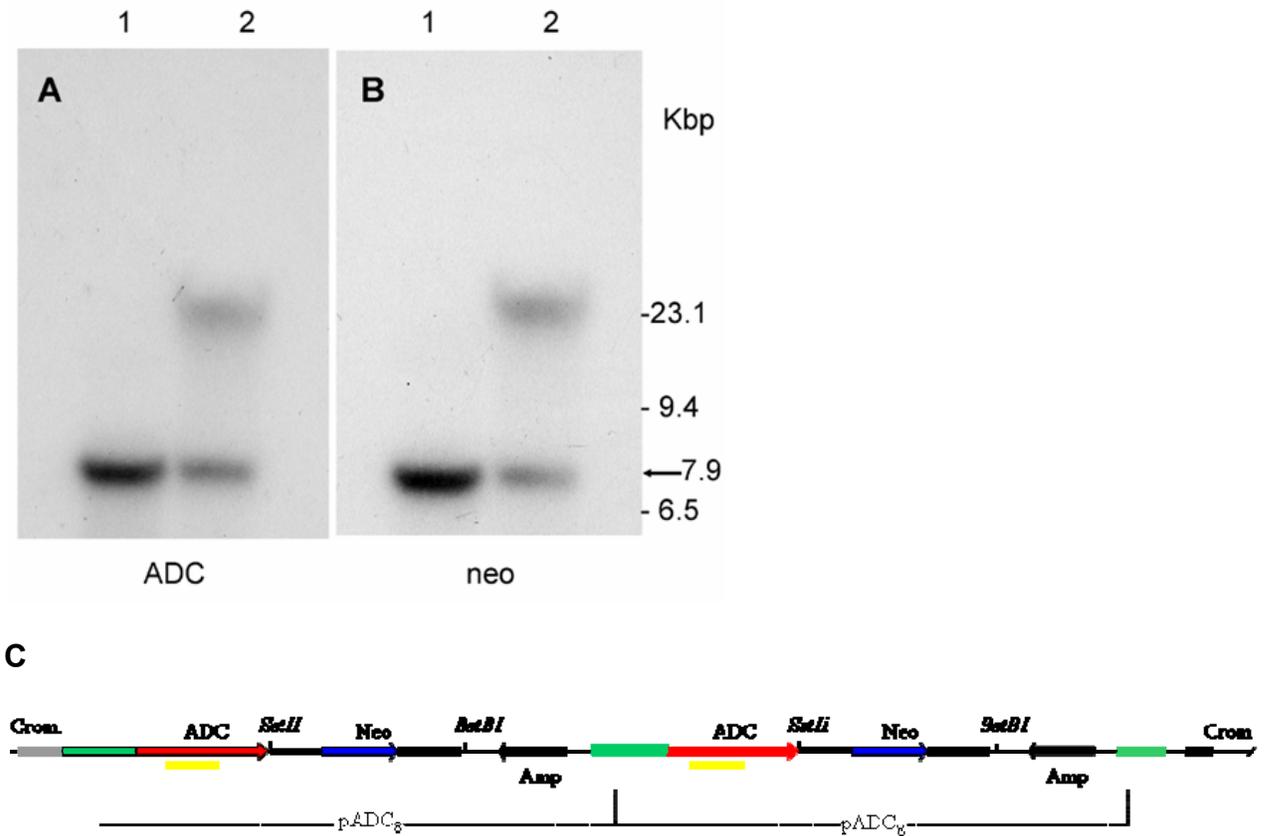
Fig. R 13 Análisis de integración del pADC₈ por enzimas de restricción con sitio único de corte

Fig. R 13: EL DNA total de parásitos transformados de manera estable fue digerido con las enzimas SstI (calle1) o BstBI (calle 2). Luego de la electroforesis y transferencia a membrana, se hibridizó con la sonda específica para ADC (A) o la sonda específica para el gen de neomicina (B)
 (C) Esquema de los sitios de corte de las enzimas de restricción SstI y BstBI.

Procesamiento de la ADC de avena expresada en *T.cruzi*

Está demostrado que la ADC de plantas necesita ser procesada proteolíticamente para tener actividad enzimática. En avena, el polipéptido inicial de 66 kDa es procesado por una proteasa específica, originando un fragmento de 42 kDa y otro de 24kDa que quedan unidos formando parte de un monómero. Se postula que la forma activa de la enzima sería un homodímero en el cual el extremo N-terminal de un monómero se une al extremo C- terminal del otro monómero formando dos sitios activos (Malberg 1994, Hanfrey 2001).

Para estudiar si la ADC de avena es procesada en los parásitos transgénicos y debido a que no disponemos de un anticuerpo anti ADC de avena, se clonó en el plásmido pRIBOTEX el cDNA de ADC de avena seguido por una secuencia que codifica para 6 histidinas en el extremo C-terminal (“ADC-his”). Esta construcción se utilizó para transformar epimastigotes de *T.cruzi*.

La expresión de ADC-his no afectó la proliferación de los parásitos en cultivo (Resultado no mostrado).

Se realizó un ensayo de Western blot con extractos crudos de parásitos cosechados luego de más de 6 semanas de transformación, utilizando anticuerpos contra la secuencia de 6 histidinas.

En el ensayo de Western blot se detectó una banda de 66 kDa, correspondiente a la proteína sin procesar y otra de 24KDa correspondiente al fragmento C- terminal de la proteína ya procesada (**Fig R 14 A**).

La proteína ADC-his se purificó por HPLC utilizando una columna de níquel. La fracción eluída con alta concentración de imidazol tenía actividad enzimática. Esta fracción se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida. Luego de la tinción con nitrato de plata se visualizaron 3 bandas, una de 66 kDa (ADC sin procesar) y dos bandas de 42 kDa y 24 kDa que corresponden a los fragmentos resultantes del procesamiento.

La secuencia de 6 histidinas se encuentra solo en el extremo C-terminal de la secuencia de ADC, sin embargo en la purificación se obtuvieron los dos fragmentos (de 42 y 24 kDa), este resultado indica que, luego del procesamiento, los péptidos quedan unidos formando parte de la enzima activa (**Fig R 14 B**).

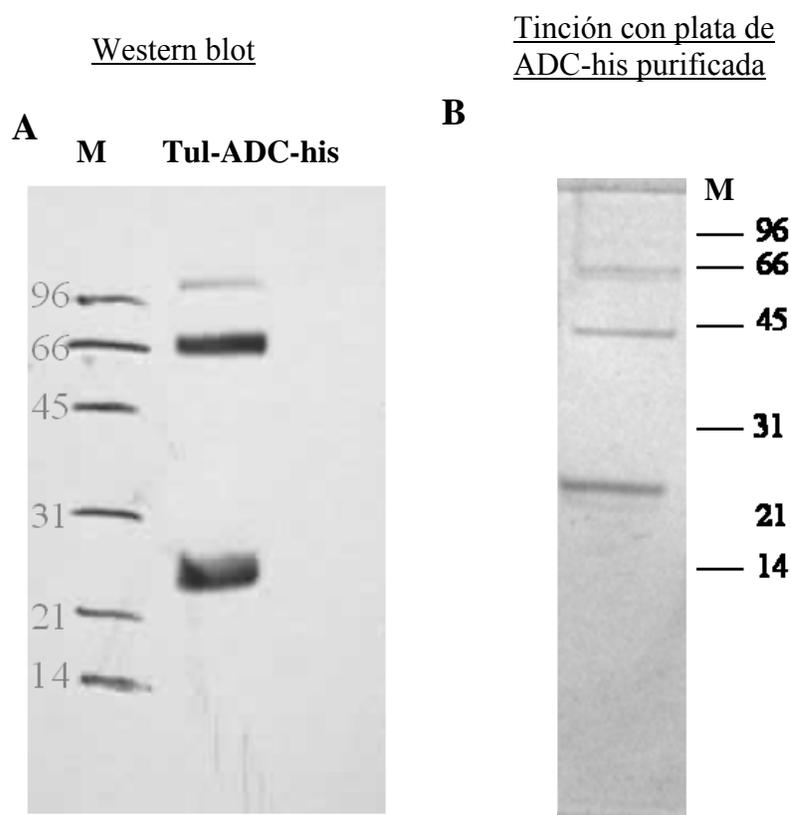
Fig. R 14 Procesamiento de la proteína ADC en epimastigotes de *T.cruzi*

Fig. R 14 A: Un extracto total de parásitos transformados “Tul-ADC-his” se analizó por SDS-PAGE. Luego de la transferencia a membrana se reveló con anticuerpo anti his-tag. **B:** ADC-his purificada por columna de níquel se analizó por SDS-PAGE revelando por tinción con nitrato de plata. **M:** marcador de peso molecular.

Al medir actividad enzimática en los parásitos transformados con ADC-his, se encontró que la actividad específica era alrededor de 20 veces mayor que la encontrada en los parásitos transformados con ADC sin el péptido de histidinas. Para investigar las causas de este aumento de actividad se analizaron los parámetros cinéticos de la enzima ADC-his utilizando la enzima purificada y se los comparó con los parámetros de la enzima sin modificar. Se estudio la K_m para arginina y la actividad específica. También se estudió la vida media de la enzima cultivando los parásitos Tul-ADC y Tul-ADC-his en presencia de cicloheximida por diferentes tiempos y midiendo la actividad enzimática.

La Km no varían significativamente. En cambio se ve un gran aumento de la vida media de ADC-his *in vivo*. Esto explica el aumento de actividad específica en los parásitos transformados con ADC-his (**Tabla R 3**).

Tabla R 3 Propiedades de la enzima y parámetros cinéticos

	ADC en avena	ADC en <i>T. cruzi</i>	ADC-his
Actividad específica en parásitos		100-200 nmol/h/mg prot.	2000-4000 nmol/h/mg prot.
Km	0,28 ± 0,14	0,97 ± 0,24	0,7 ± 0,44
Vida media		2,5 h	> 12 h

Tabla R 3: Las enzimas ADC fueron purificadas de los distintos organismos: avena, parásitos transgénicos Tul-ADC y Tul-ADC-his. Los valores cinéticos se obtuvieron de un promedio de 3 experimentos independientes.

Análisis estadístico: Km Anova , diferencias no significativas, $P > 0,05$.

Aunque no se dilucidó el mecanismo por el cual la secuencia de histidinas aumenta la vida media de ADC podríamos proponer que no se debe a un cambio conformacional importante ya que no afecta la actividad enzimática ni el procesamiento de la proteína. Sería interesante investigar si el agregado del tag de histidinas también afecta la vida media de otras proteínas expresadas en *T. cruzi*.

El agregado del tag de histidinas es un método muy utilizado para purificación y análisis de proteínas; en la mayoría de los casos este agregado no afecta la función de las proteínas. Sin embargo se han reportado efectos de cambios de conformación y actividad biológica en algunas proteínas que llevan esta modificación. Se ha visto que el agregado de 6 histidinas en el extremo

N-terminal del IFN- α 2 disminuye su actividad antiviral y antiproliferativa por un cambio conformacional local (Schmeisser 2006).

También existen evidencias que muestran que el tag de histidinas puede la expresión de la proteína (Svensson 2006).

Por estos motivos decidimos investigar si el fragmento que codifica para las 6 histidinas no estaba afectando, además, los niveles de RNA mensajero de la enzima ADC-his en los parásitos transformados.

Se realizó un ensayo de RT - PCR semicuantitativa para los cultivos Tul-ADC y Tul-ADC-his.

Se extrajo RNA total de ambos cultivos y sobre éstos se realizó una retrotranscripción con un primer oligo dT. El cDNA obtenido se utilizó como templado para una reacción de PCR específica para ADC como se describe en Materiales y Métodos.

Se realizaron 6 reacciones de PCR para cada muestra utilizando diluciones seriadas de 1/3 del cDNA obtenido.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Los resultados muestran que no hay diferencia significativa en los niveles de RNA mensajero entre las muestras correspondientes a parásitos Tul-ADC y Tul-ADC-his (**Fig. R 15**).

Estos resultados indican que el aumento de actividad de ADC en los parásitos transformados con ADC-his, se debe solo al aumento de la vida media de la proteína.

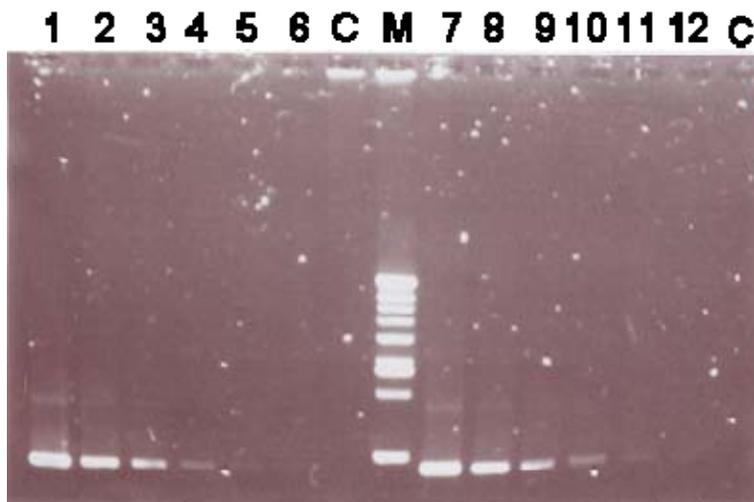
Fig. R 15 RT-PCR semicuantitativa

Fig R 15: Calles 1 a 6 corresponden a los ensayos de PCR utilizando diluciones seriadas 1/3 del cDNA de Tul-ADC, 7 a 12 idem con cDNA de Tul-ADChis. C: control negativo (PCR sin templado). M: estandar de tamaño.

Estado oligomérico de la ADC en parásitos transgénicos

Como se explica en la introducción, hay evidencias indirectas que indican que la enzima ADC, en algunas especies de plantas como arabis y avena, estaría formada por un homodímero invertido análogo a lo descrito para ODC. Con estos antecedentes decidimos realizar un ensayo de “crosslinking” de proteínas, utilizando la ADC-his purificada para analizar la dimerización de la proteína.

La proteína ADC-his, purificada por columna de níquel, se incubó en presencia de 0,5 mM y 1mM de Bis (sulfosuccinimidil) suberato (BS³) durante 15 minutos a temperatura ambiente, como se indica en Materiales y Métodos.

El producto de reacción obtenido, fue precipitado con 10% de TCA, resuspendido en cracking buffer 1X y analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata.

Los resultados muestran la formación de un homodímero que aumenta con la concentración del reactivo BS³ (**Fig R 16**).

En la figura no se ven los fragmentos de 24 y 42 kDa que se muestran en la figura 14 B, esto significa que prácticamente toda la proteína estaría en forma de dímero.

La proteína sin tratar con BS3 no muestra formación de dímero.

Fig. R 16 Estudio de dimerización de ADC-his

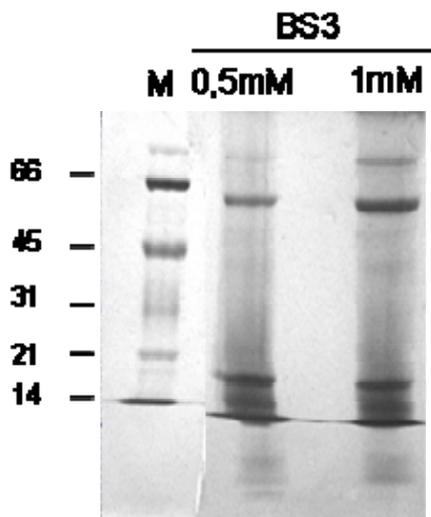


Fig R16: Electroforesis en gel de acrilamida 12% de los productos del ensayo de "crosslinking". El gel fue teñido con nitrato de plata. Calles: 1 Estándar de tamaño molecular, 2 ADChis + BS3 0,5mM, 3 ADChis + BS3 1mM

Los resultados obtenidos muestran que *T. cruzi* no sintetiza poliaminas *de novo* y que necesita transportarlas desde el exterior para sobrevivir. El sistema de transporte de poliaminas podría ser un buen blanco para el diseño de drogas antiparasitarias ya que sin él *T. cruzi* no sobrevive, por eso es importante estudiar el sistema de transporte de poliaminas en parásitos tripanosomátidos.

Búsqueda de genes involucrados en el transporte de poliaminas en parásitos tripanosomátidos

Al comienzo de esta tesis no se conocían los transportadores de poliaminas de *Leishmania* y *T. cruzi*; sólo se conocían los transportadores de bacterias y levaduras (ver introducción).

Para buscar los genes involucrados en el sistema de transporte de poliaminas, se tomó como modelo de estudio al parásito *Crithia fasciculata*. Este parásito posee una ODC de vida media corta, característica que lo hace resistente al DFMO, (difluormetilornitina, inhibidor irreversible de la ODC). Cuando se cultiva *C. fasciculata* en presencia de DFMO disminuyen los niveles de poliaminas intracelulares y se induce el transporte de estas sustancias desde el medio de cultivo.

Experimentos anteriores realizados en el laboratorio muestran que la inducción del transporte de poliaminas, luego del tratamiento con DFMO, se debe a un aumento en la velocidad máxima de la actividad (lo que significa un aumento de transportadores activos). La K_m para putrescina no varía (tesis doctoral Carolina Ceriani, 1997 UBA). Por lo tanto en esas condiciones, se espera que haya una expresión diferencial de los genes involucrados en el transporte.

Tomando en cuenta estas características, se aplicó la técnica de *Differential Display* utilizando cultivos control y cultivos tratados con DFMO por diferentes períodos de tiempo.

Como primer paso se realizaron ensayos de transporte de poliaminas en parásitos tratados con DFMO por diferentes tiempos para determinar las condiciones en las cuales la inducción fuera máxima.

Los primeros ensayos realizados con 16 y 20 horas de tratamiento no mostraron diferencias significativas en el transporte de putrescina.

Cultivos de *C.fasciculata* se trataron con DFMO 5mM por 48 horas, variando el medio de cultivo: SDM₇₉ (medio definido, carente de poliaminas) o BHT (medio rico); luego se midió el transporte de putrescina (**fig. R17**).

Los resultados muestran que la inducción del transporte es mayor en SDM₇₉. Con estos resultados, entonces, se procedió a realizar tratamientos de 24, 48, 72 horas y 10 días en SDM₇₉. Los resultados muestran que el transporte llega a un máximo de inducción, luego de un tratamiento por 48 horas en SDM₇₉ (**fig R 18**).

Fig. R 17 Transporte de putrescina en *C. fasciculata* en diferentes condiciones de cultivo

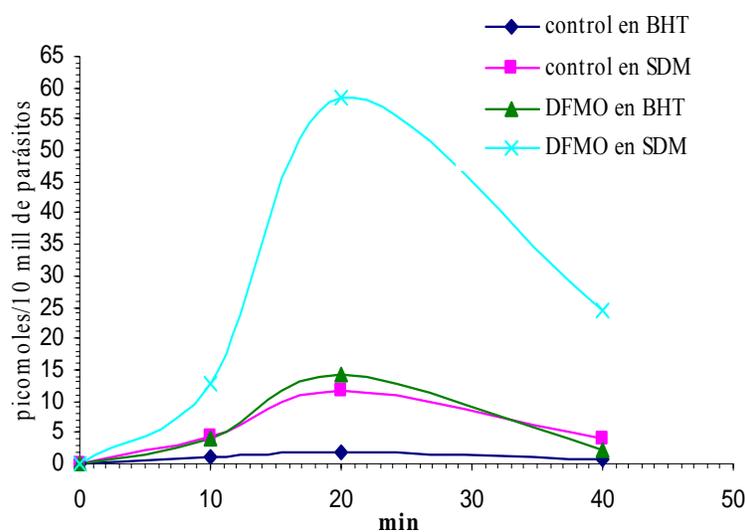


Fig. R 17: Ensayo de transporte de putrescina de *C. fasciculata* cultivada en medio semidefinido, libre de poliaminas “SDM₇₉”, o en medio rico “BHT”; sin tratar (control) o tratados con DFMO 5 mM por 48 horas.

Fig. R 18 Inducción del transporte de putrescina por tratamiento con DFMO por diferentes período de tiempo.

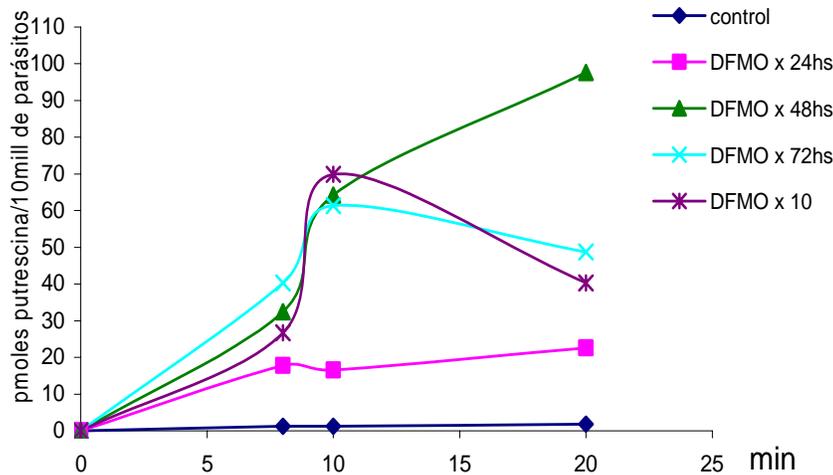
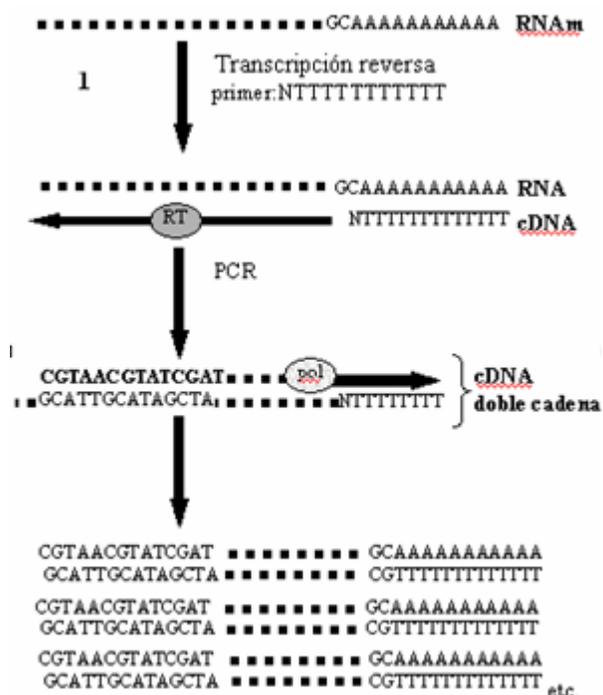


Fig. R 18: Cultivos de *C. fasciculata* mantenidos en SDM₇₉ se trataron con DFMO 5mM por diferentes períodos de tiempo como se indica en la figura.

Los cultivos en SDM₇₉, tratados con DFMO por 24 y 48 horas se utilizaron para los ensayos que se describirán a continuación, exceptuando aclaraciones.

Se extrajo RNA total de los cultivos control, y tratados con DFMO por 24 o 48 horas cultivados en SDM₇₉ y se realizaron 3 reacciones de retrotranscripción con tres oligo dT diferentes como *primers*: NTTTTTTTTTTTTT, donde N puede ser A, C o G.

Los cDNA obtenidos fueron amplificados por PCR en presencia de dATP ³⁵S, utilizando el oligo dT correspondiente a cada uno como *primer* para la región 3' y un *primer* para la región 5' de 10 a 13 nucleótidos de una secuencia al azar (ver materiales y métodos). Con cada cDNA se realizaron 4 amplificaciones de PCR variando el *primer* para la región 5'. Así se realizaron en total 12 ensayos de PCR para cada muestra, con diferentes combinaciones de *primers* (**Fig R 19**).

Fig R 19 Esquema del ensayo de *Differential Display* (ver explicación en el texto)

Es importante hacer mención de la puesta a punto de la técnica ya que para cada organismo puede ser diferente.

Puesta a punto de la técnica de *Differential Display* para *Crithidia fasciculata*

En los primeros ensayos se probaron varias condiciones diferentes para las reacciones de retrotranscripción y PCR.

Se ensayaron 2 y 4 µg de RNA como templado para la transcripción reversa y también diferentes cantidades de primers, nucleótidos, MgCl₂, cantidades de cDNA y número de ciclos para la PCR. En la **figura R 20** se muestran algunos de los ensayos.

A partir de estos resultados se eligieron las condiciones óptimas para la reacción de PCR: 1,5 mM de $MgCl_2$; 4 μ M de nucleótidos; 0,4 μ M de primer 5' y primer 3'; 0,5 μ l del cDNA en lugar de 2 μ l y amplificación por PCR de 30 ciclos en lugar de 40 (Yong – Jig Cho 2002; Peng Liang 1994).

Se eligieron las condiciones que dieran mayor eficiencia de amplificación (mayor número de bandas) y que a su vez permitieran detectar las diferencias en la expresión de unas pocas bandas entre las diferentes muestras.

Fig. R 20 Puesta a punto de los ensayos de *Differential Display*

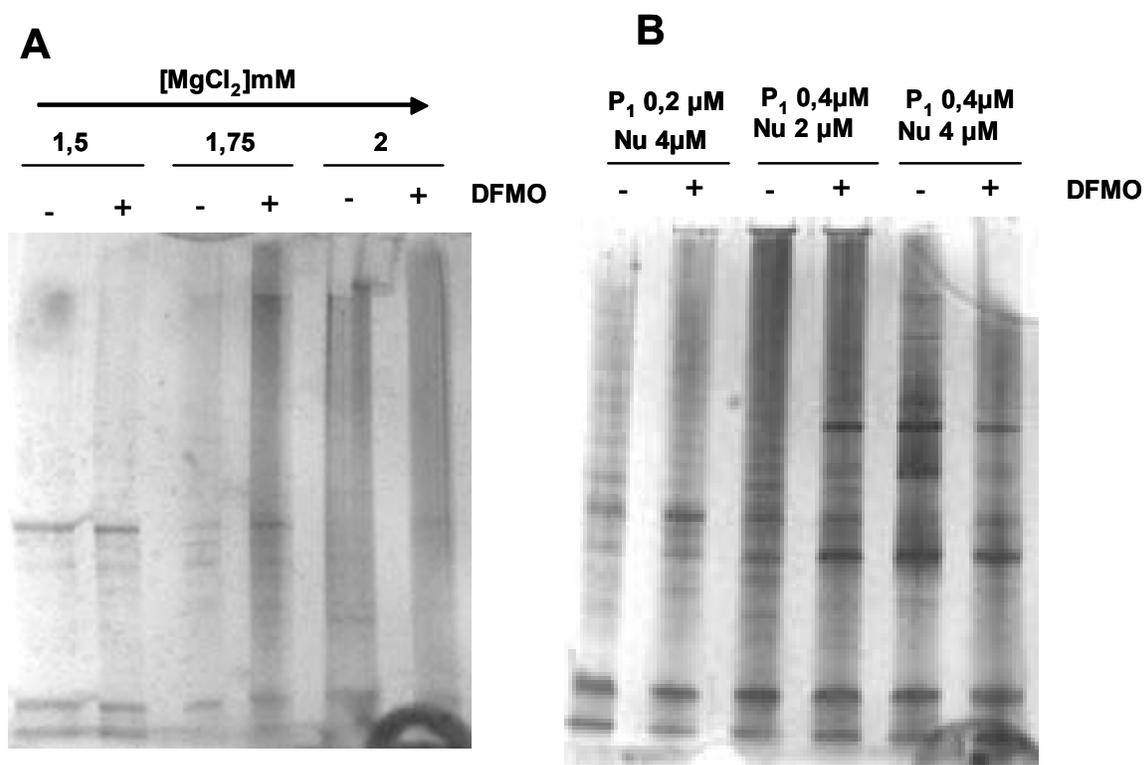


Fig. R 20: En cada ensayo se utilizó RNA extraído de parásitos cultivados en SDM₇₉ en ausencia o presencia de DFMO 5mM por 48 horas.

A: RT-PCR realizadas con diferentes concentraciones de $MgCl_2$. **B:** RT-PCR realizadas con diferentes concentraciones de nucleótidos trifosfato y “primer random”. Para el resto de los parámetros se utilizaron las condiciones estandar como figura en Materiales y Métodos.

Los productos de PCR fueron cuantificados y analizados por electroforesis en geles de secuencia, exponiéndolos a una placa radiográfica.

Analizando los patrones de bandas y niveles de expresión entre las muestras, se encontraron 28 bandas expresadas diferencialmente entre todos los ensayos de *Differential Display* (**Fig R 21**).

Las bandas con un mayor nivel de expresión en las muestras tratadas con DFMO, se recortaron y se clonaron para su secuenciación y utilización como sondas en ensayos de Northern blot.

Fig R 21 Ensayo de *Differential Display*

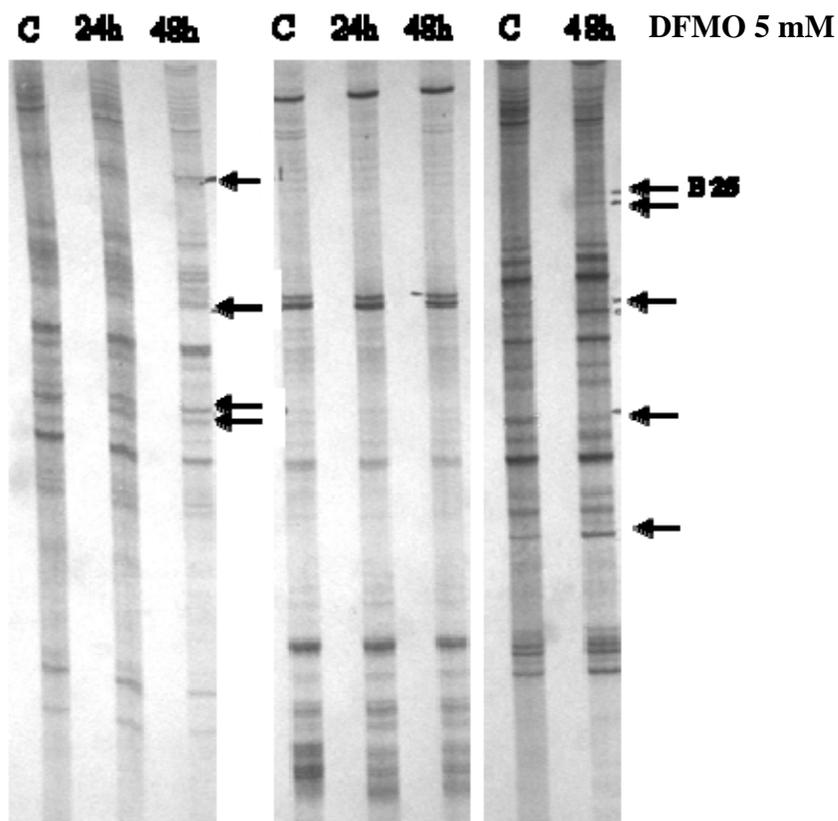


Fig. R 21: Análisis de los productos, de tres ensayos de *Differential Display* (con tres pares de *primers* diferentes), por electroforesis en gel de secuencia. En todos los casos se utilizó RNA total de parásitos sin tratar (control) y parásitos tratados con DFMO 5mM por 24 o 48 horas. Las bandas enumeradas corresponden a fragmentos de RNA mensajeros expresados diferencialmente, algunas de estas bandas aumentan con el tratamiento con DFMO y otras disminuyen.

Los experimentos de *Differential Display* pueden dar falsos positivos, es decir que por artefactos de la técnica, en una muestra puede aparecer una banda con mayor intensidad aunque el mensajero no se encuentre diferencialmente expresado en la muestra original. Esto puede deberse, por ejemplo, a diferencias en la eficiencia de amplificación por efectos de la secuencia durante las reacciones de PCR. Por esta razón es indispensable validar los resultados obtenidos realizando ensayos de *Northern blot*.

Validación de resultados por *Northern blot*.

Se realizaron ensayos de Northern blot con RNA total de las muestras control y tratadas con DFMO, utilizando las bandas diferenciales como sondas para corroborar la expresión diferencial de cada una de éstas.

Se ensayaron nueve bandas diferenciales, de las cuales dos dieron falso positivo (mismo nivel de expresión entre las muestras), seis dieron resultados dudosos o sin señal alguna de hibridización y una confirmó su carácter diferencial aumentando la intensidad de señal en los RNA correspondientes a los cultivos tratados con DFMO. (**Fig. R 22**)

Fig. R 22 Expresión deferencial del transcripto “B25”

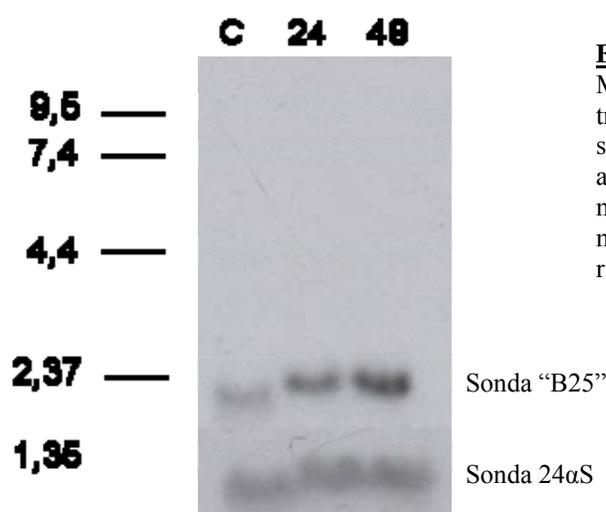


Fig. R 22: Ensayo de *Norther blot*
Muestras de RNA total de parásitos control y tratados por 24 o 48 horas con DFMO 5mM se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1% ; luego de la transferencia a membrana de Nylon se hibridizó con B25 marcada con (α - 32 P) dCTP y con una sonda ribosomal 24 α S

La banda diferencial ("B25") fue clonada en el plásmido pGEM-T easy y secuenciada; al compararla con diferentes bases de datos de secuencias no se encontró similitud con ninguna secuencia caracterizada. Ante estos resultados y sabiendo que sólo se tenía un fragmento del mensajero, se decidió realizar reacciones de PCR para obtener el mensajero completo; para esto se diseñó un primer específico de la región 3' y otro para la región del miniexón de *C. fasciculata* (secuencia 5' común a todos los mensajeros agregada por el proceso de "transplicing").

Las reacciones de PCR se realizaron con cDNA de parásitos tratados con DFMO por 48 horas como templado.

El producto obtenido de 1400pb fue nuevamente probado en ensayos de Northern blot y dio el resultado esperado coincidiendo con los resultados anteriores del fragmento B25 inicial (**Fig. R 23**).

Fig. R 23 Expresión del transcrito completo de "B25"

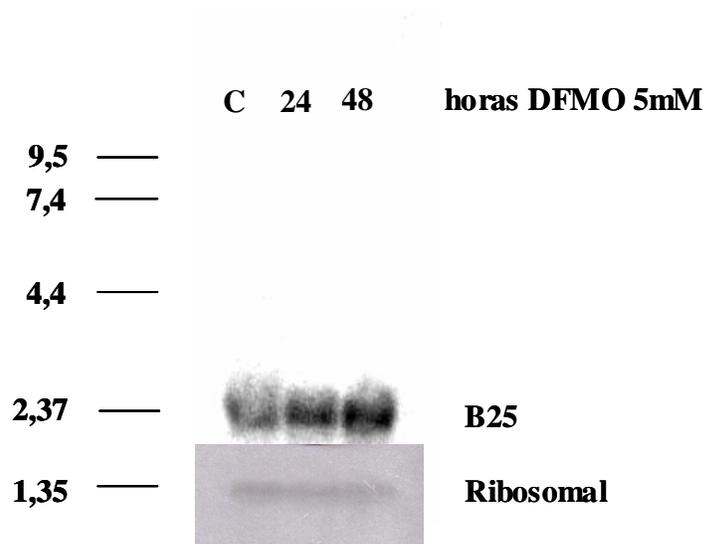


Fig. R 23: Northern blot: Idem Fig. 22, utilizando el fragmento ampliado de B25 como sonda.

Análisis de secuencia del transcripto “B25”

El fragmento ampliado fue secuenciado y analizado, encontrando varios marcos de lectura abiertos para proteínas; de estos marcos teóricos se eligió el primero ("ORF I") de 264 pares de bases como el más probable por longitud, coincidencia con el uso de codones de *C. fasciculata* y otras características de la secuencia que indican una distribución no azarosa de los codones y aminoácidos resultantes. Al comparar la secuencia de aminoácidos contra varias bases de datos se encontró que tiene similitud con dos regiones de una pequeña proteína de membrana de *Leishmania major* (número de acceso: Q9XZY0) de función desconocida. (SIB BLAST, Expasy; Altschul 1997) (**Fig. R 24**).

Aplicando el sistema de búsqueda de dominios y secuencias conservadas con el programa InterProScan se encontró un péptido señal de retículo endoplasmático que sería cortado entre los aminoácidos 25 y 26 (subprograma SignalP), y una señal para anclaje a membrana por GPI con una señal de corte en el aminoácido 63 (KohGPI: Identification of GPI-anchor signals by a Kohonen Self Organizing Map).

El polipéptido comprendido desde el aminoácido 27 hasta el 63 correspondiente a ORF1 se encuentra, con diferentes grados de identidad, en muchas proteínas; inclusive algunas tienen numerosas repeticiones de este dominio. En todos los alineamientos se ve la conservación de las cisteínas, esto sugiere que la región desde el aminoácido 27 hasta el 63 y la posición de las cisteínas son importantes para la función biológica de esta proteína.

Fig. R 24 Análisis de la secuencia de “ORF1”

A

↓

mtafpaklavfvvalavlasfasaqcaiancvncalaspnqclvc
dsgyhltasgacrgtgsgaaslqstlvaaaaaacavlyvl 87aa

↑

B

Posible antígeno de superficie de *L. major*

Score = 43.5 bits (101), E = 0.003

Identidad = 16/37 (43%),

sustituciones conservativas + aminoácidos conservados = 22/37 (59%)

ORF1: 27 CAIANCVNCALASPNQCLVCDSGYHLTASGACRGTGS 63
 CA++NCV C+ +PN C C+ GY + G C GS

Proteína***L. major*:** 83 CAVSNCVTCSSTNPVNCTTCNPGYAVDRLGQCMVVG 119

Score = 34.3 bits (77), E = 1.8

Identidad = 15/32 (46%),

sustituciones conservativas + aminoácidos conservados = 18/32 (56%)

ORF1: 27 CAIANCVNCALASPNQCLVCDSGYHLTASGAC 58
 C +A+CV C +CL C SGY TAS C

Proteína***L. major*:** 120 CNVAHCVTCHANDNARCLSCASGYMPTASFKC 151

Fig. R 24: A: Secuencia de aminoácidos correspondiente a “ORF 1”. En rojo se muestran los motivos CXXC, en verde el péptido señal para retículo endoplasmático y en azul el fragmento de anclaje a GPI. Las flechas indican los sitios de corte para cada señal.

B: Alineamiento de ORF1 con una proteína de *Leishmania major* de función desconocida.

Se clonó el fragmento que codifica para ORF1 en un plásmido de expresión para bacterias que permitiese la purificación del péptido y luego producir anticuerpos para identificar y analizar la proteína endógena en *C. fasciculata* realizando ensayos de Western blot con cultivos control y cultivos tratados con DFMO, y analizar la ubicación subcelular de la proteína por inmunohistoquímica.

Estos ensayos quedan para un futuro desarrollo de la caracterización de la proteína expresada en condiciones de inducción del transporte de putrescina en *C. fasciculata*.

Discusión

Auxotrofía de poliaminas en *T. cruzi*

Existen numerosas evidencias que demuestran que *T. cruzi* no puede proliferar en un medio libre de poliaminas (Carrillo 1999; Ariyanayagam 1997; Carrillo 2003).

La ausencia de ornitina decarboxilasa (ODC) esta bien documentada y aceptada, sin embargo la presencia de actividad de arginina decarboxilasa (ADC) en el parásito presenta opiniones contrapuestas.

El grupo de trabajo de Kierszenbaum describió que el inhibidor irreversible de la ADC, difluormetilarginina (DFMA), reducía la capacidad infectiva de tripomastigotes de *T. cruzi* y la proliferación de los amastigotes dentro de macrófagos infectados. Además, en otro trabajo, mostró pequeñas cantidades de liberación de CO₂ y formación de agmatina y putrescina a partir de arginina. A partir de estos experimentos concluían que *T. cruzi* sintetiza poliaminas por la vía de ADC y que éste juega un rol muy importante en la infectividad (Kierszenbaum 1987; Majumder 1992).

Los valores de decarboxilación de arginina, presentados por estos autores, son producto de incubaciones de 7 horas, difieren en cuatro ordenes de magnitud al comparar con los valores obtenidos con extractos de *E. coli* y están dentro de los niveles que se obtienen con un ensayo blanco (mezcla de reacción sin extracto de parásitos) (Carrillo 2003).

Otros investigadores mostraron actividad de ADC en extractos de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa RA (alrededor de 100 pmol CO₂/hora/mg prot.) solo en la fase logarítmica temprana, entre las 4 y 23 horas desde la dilución del cultivo (Hernández y Schwarcz 1999).

Este mismo grupo mostró que *T. cruzi* cultivado en medio libre de poliaminas, incrementaba tanto su capacidad proliferativa como los niveles intracelulares de poliaminas por el agregado de arginina o agmatina al medio de cultivo, avalando la presencia de ADC en el parásito (Schwarcz 1993). Sin embargo, en los ensayos de actividad de ADC no muestran formación de agmatina o putrescina, el CO₂ liberado podría deberse a una decarboxilación oxidativa no enzimática de la arginina; además los valores de decarboxilación, son muy variables y no hay estadística clara de los resultados.

Es importante mencionar que la agmatina disponible comercialmente esta contaminada con putrescina (entre un 10 y 15 %) y el medio de cultivo utilizado por Hernández y Schwarcz no esta realmente libre de poliaminas ya que el suero que contiene no fue dializado y la metodología de cromatografía, para analizar contenido de poliaminas, no tiene buena definición ni buena sensibilidad (Le Quesne and Fairlamb 1996).

Existen varios trabajos que muestran que *T. cruzi* no prolifera en medio mínimo sin poliaminas y que es incapaz de sintetizar putrescina a partir de lisina, ornitina o arginina y que por lo tanto es auxótrofo para poliaminas (Algranati 1989; Hunter 1994; Le Quesne and Fairlamb 1996; Bachi 2001; Carrillo 2003).

Epimastigotes de *T. cruzi* transportan diaminas y poliaminas con alta eficiencia y afinidad. Esta actividad esta regulada en respuesta a las condiciones de crecimiento y concentración externa de poliaminas (Le Quesne and Fairlamb 1996; Algranati 1989; González 1992; González 1993; Carrillo 2006). Esto sugiere que el transporte juega un rol importante para mantener los niveles intracelulares de poliaminas.

A pesar de los resultados mencionados anteriormente hay trabajos que basan sus conclusiones en la existencia de la síntesis de poliaminas por la vía de ADC en *T. cruzi*.

En el 2001 el grupo de Radi encontró que arginina, agmatina, putrescina y espermidina tenían un efecto protector ante la inhibición de la proliferación de epimastigotes causada por la presencia de 10% de suero humano en el medio de cultivo y mencionaban, sin mostrar resultados, que obtenían poliaminas a partir de arginina en estas mismas condiciones. De estos resultados concluyeron que el efecto de la arginina se debía a la síntesis de poliaminas por la vía de ADC (Piacenza 2001). Para la discusión de los resultados se basaron en los trabajos de Kierszenbaum y Schwarcz.

Las poliaminas son moléculas vitales para todos los organismos incluyendo *T. cruzi*, su metabolismo en este parásito, difiere en muchos aspectos del metabolismo en células de mamíferos; por lo tanto podría ser un buen blanco para el diseño de drogas antiparasitarias. Un aspecto muy importante entonces, es determinar en forma definitiva, si existe o no en *T. cruzi*, la síntesis de poliaminas vía ADC.

Las curvas de crecimiento de cultivos de *T. cruzi* en medio mínimo con solo trazas de poliaminas, muestran que los parásitos pueden sobrevivir alrededor de dos semanas en este medio, pero luego de varios pasajes dejan de proliferar y luego mueren. El agregado de ornitina o arginina no restaura el crecimiento a pesar de que son transportados eficientemente (Algranati 1989; Pereira 1999); los parásitos logran reanudar el crecimiento solo con el agregado de putrescina.

Los ensayos de marcación, *in vivo* e *in vitro*, con L [U -¹⁴C] arginina, muestran que epimastigotes de *T. cruzi* no sintetizan poliaminas *de novo* a partir de este aminoácido (Carrillo 2003).

Resultados de otros autores que demuestran la auxotrofia para poliaminas en *T. cruzi*, refuerzan estas conclusiones (Hunter 1994; Ariyanayagam 1997; Carrillo 1999; Bacchi 2001). Todos estos resultados indican que *T. cruzi* necesita de las poliaminas del medio externo para sobrevivir.

La actividad de ADC en epimastigotes de *T. cruzi* mostrada en trabajos de otros autores es muy baja para contribuir significativamente a la concentración intracelular de poliaminas (Hernández y Schwarcz 1999; Schwarcz 1993; Kierszenbaum 1987; Majumder 1992; Piacenza 2001).

Los parásitos transgénicos que expresan la ADC de avena, “**Tul -ADC**”, poseen alta actividad de ADC y son capaces de producir agmatina, sin embargo no pueden sintetizar putrescina a partir de éste compuesto, por lo que no proliferan en medio mínimo libre de poliaminas. Estos resultados sugieren que no hay actividad de agmatinasa en *T. cruzi*. Los parásitos transgénicos siguen siendo auxótrofos para poliaminas y necesitan transportarlas desde el medio de cultivo para sobrevivir.

Las curvas de crecimiento en medio mínimo de los parásitos transformados indican que la agmatina no reemplaza fisiológicamente a las poliaminas. Esto significa que *T. cruzi* carece de toda la vía de síntesis de poliaminas, a partir de arginina (Carrillo 2004).

Los ensayos de PCR con *primers* degenerados, diseñados a partir de las secuencias de ADC presentes en la base de datos, con varias cepas de *T. cruzi* y, la búsqueda de secuencias en el genoma de *T. cruzi*, muestran que en el parásito no hay secuencias con identidad significativa

para las enzimas descritas en otros organismos. Estos resultados indican que la ausencia de actividad de ADC se debe a la ausencia del gen en el parásito (Carrillo 2004); sin embargo no podemos descartar la posibilidad de que *T. cruzi* posea un gen para ADC no relacionado con las secuencias conocidas en otros organismos.

Integración del plásmido recombinante

Los parásitos transformados con el plásmido recombinante pRIBOTEX-ADC expresaron el gen heterólogo en forma transitoria, presentando una actividad enzimática significativa entre las 48 horas y dos semanas luego de la transformación, pasado este período la actividad de ADC fue indetectable.

Manteniendo el cultivo en presencia del antibiótico de selección (G418), la actividad de la enzima comenzó a aumentar a partir de las cuatro semanas llegando a un nivel 10 veces mayor que el alcanzado durante la expresión transitoria.

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraban que la eliminación de los parásitos salvajes por G418, demora aproximadamente un mes; durante este período la población se compone de cantidades variables de parásitos transformados y salvajes.

El vector de expresión pRIBOTEX contiene una secuencia derivada del promotor de RNA ribosomal río arriba del sitio múltiple de clonado. Esta región promueve la transcripción del gen heterólogo y la integración del plásmido, por recombinación homóloga, al genoma del parásito (Lorenzi 2003).

Los ensayos de *Southern blot* realizados con parásitos transformados de manera estable mostraron que el plásmido se integra al genoma del parásito en el promotor ribosomal en dos o más copias en tandem. Esta forma de integración esta de acuerdo a lo descrito en otros trabajos en los que se utilizó pRIBOTEX u otros plásmidos derivados (Martinez-Carvillo 1997; Lorenzi 2003).

Los estudios de integración del plásmido recombinante, pRIBOTEX-ADC, por PFGE y PCR mostraron que la integración de éste al genoma se hace visible a partir de las 4 semanas luego de la transformación.

En el transcurso de las dos primeras semanas posteriores a la transformación el plásmido se mantiene en forma episomal sin integrarse al genoma (al menos en el nivel detectable de las

técnicas utilizadas). El plásmido libre es degradado por el parásito siendo prácticamente indetectable a las 3 y 4 semanas; durante ese período el plásmido recombinante se integraría en el genoma de una subpoblación de parásitos que sería seleccionada por el antibiótico. Una vez que el plásmido se integró al genoma, la transformación permanece estable.

Los niveles de mensajeros de ADC en el parásito transgénico siguen la misma curva descrita para la actividad enzimática de la ADC heteróloga.

Los cambios observados en los niveles de expresión de ADC en el cultivo de epimastigotes transgénicos, serían el resultado de un fenómeno de selección poblacional.

En trabajos anteriores realizados por otros autores con pRIBOTEX se observaba una integración del plásmido recombinante en el genoma de *T. cruzi* dentro de las 5 horas post-transfección (Lorenzi 2003; Carrillo Carolina _ resultados no publicados).

La diferencia en el tiempo de obtención de una población transformada de manera estable, entre aquellos ensayos y los presentados en esta tesis, no puede justificarse por diferencias en la metodología, el medio de cultivo o la cepa de parásitos ya que la transformación de epimastigotes con el mismo vector pero con diferente inserto (pRIBOTEX-ODC) y en las mismas condiciones experimentales dio resultados que coinciden con los trabajos anteriores sobre el pRIBOTEX (Carrillo, trabajo no publicado). Estas observaciones podrían sugerir que la secuencia misma de ADC clonada en el vector, influye en la integración al genoma del parásito o en el proceso de selección de los parásitos con el plásmido recombinante integrado al genoma.

Procesamiento de ADC

Está descrito que la ADC de avena se activa por proteólisis. El polipéptido inicial de 66 kDa es procesado por una proteasa específica originando un fragmento de 42 kDa y otro de 24kDa; que quedan unidos en la forma activa de la enzima (Malberg 1994). Sin embargo en otras especies como *arabidopsis*, se vio que puede ser procesada por proteasas no específicas (Hanfrey 2001).

Los ensayos de Western blot mostraron que la ADC de avena también es procesada cuando se la expresa en epimastigotes de *T. cruzi*, originando los mismos fragmentos descritos en avena. En éste caso la ADC heteróloga sería procesada por proteasas no específicas propias del parásito.

Aun no se conoce la estructura cristalográfica de ADC. Un trabajo realizado por Hanfrey sugiere que la enzima estaría formada por un homodímero (Hanfrey 2001).

El análisis de la proteína de fusión ADC-his (ADC con un tag de 6 histidinas en el extremo C-terminal) por electroforesis en geles de acrilamida muestra que, en los parásitos transgénicos, los fragmentos de 42 y 24 kDa quedarían unidos formando la enzima activa.

Además la incubación de ADC-his con un croslinqueador químico (BS3) muestra la formación de un homodímero.

Estos resultados indican que, al igual que lo descrito para *Arabidopsis* y otras especies, la enzima estaría formada por un homodímero en el cual el extremo N-terminal de un monómero se une al extremo C-terminal del otro monómero formando dos sitios activos (Hanfrey 2001; Chang 2000; Malberg 1994; Watson and Malberg 1996).

Influencia del tag de histidinas en las propiedades de ADC

El agregado de un fragmento de polihistidinas es un método muy útil y ampliamente utilizado para la purificación y caracterización de proteínas.

Existen numerosos trabajos que muestran proteínas de fusión con un péptido de 6 a 8 histidinas; muchas de estas proteínas son funcionalmente activas como las proteínas sin modificar. Sin embargo, algunas proteínas de fusión tienen menos actividad que las proteínas sin modificar debido a la formación de agregados insolubles como cuerpos de inclusión o cambios conformacionales cuando se las expresa en bacterias (Schmeisser 2006; Amor-Mahjoub 2006).

Svensson ha publicado que el agregado de un péptido de 6 histidinas al extremo N-terminal de la amelogenina produce un aumento en la traducción de la proteína de hasta un 200 % cuando se la expresa en *E. coli* y también un aumento en la densidad del cultivo respecto de un cultivo de bacterias que expresa la misma proteína pero sin el péptido de histidinas (Svensson 2006).

En algunos casos es necesario remover el tag de histidinas, por ejemplo para el estudio estructural, fisiológico o uso farmacológico. Sin embargo existen también algunas limitaciones asociadas a la remoción de éstos péptidos como: clivajes no específicos que

generan formas truncadas de la proteína, remoción parcial del péptido y contaminación de la muestra con proteasas (Amor- Mahjoub 2006).

En los parásitos transgénicos que expresan la proteína ADC-his (tag de histidinas en el extremo C-terminal), encontramos que el agregado de este tag de histidinas aumentó la vida media de la enzima en los parásitos.

Si bien no dilucidamos el mecanismo por el cual el tag de histidinas aumenta la vida media de ADC, esto no parece deberse a un cambio conformacional ya que los parámetros cinéticos de la actividad enzimática no se ven afectados significativamente. Sería interesante investigar si el agregado del tag de histidinas también afecta la vida media de otras proteínas al expresarlas en *T. cruzi*.

Estos resultados sirven como advertencia de que un péptido de histidinas puede alterar la conformación, la actividad biológica o cualquier otra propiedad de la proteína. Las características de cada proteína de fusión dependen de cada caso particular y deben corroborarse experimentalmente.

Transporte de poliaminas

En *E. coli* se han caracterizado 3 transportadores de poliaminas estructuralmente diferentes:

-ABC (ATP binding cassette): dos transportadores, cada uno compuesto por una proteína de unión a sustrato en el espacio periplásmico, dos proteínas que forman el canal a través de la membrana y una ATPasa asociada a membrana, del lado citoplasmático, que provee la energía para el transporte (Igarashi 1999).

-PotE: transportador compuesto por una sola subunidad con 12 pasos transmembrana que importa putrescina hacia dentro de la célula como uniportador y la exporta por un mecanismo de antiporte con ornitina (Kashiwagi 1997).

En eucariotas se conoce muy poco acerca de los transportadores de poliaminas. En *Saccharomyces cerevisiae* se caracterizaron cuatro transportadores de vacuola que transportan poliaminas hacia el interior de ésta disminuyendo las concentraciones citoplasmáticas, ya que este organismo es muy sensible a los niveles altos de poliaminas (Tomitori 2001; Reguera 2005).

El transporte de poliaminas, en *E. coli* a través de Pot E y en *Saccharomyces cerevisiae* a través de TPO1, está regulado por serin / treonin kinasas (Igarashi 1999; Tomitori 2001).

En parásitos se caracterizaron dos transportadores de poliaminas: en *Leishmania major* LmPOT1 que transporta putrescina y espermidina (Hasne 2005); y en *T. cruzi* TcPAT12 que transporta principalmente espermidina (Carrillo 2006). Estos transportadores pertenecen a la familia de transportadores de aminoácidos (APC) (Carrillo 2006).

TcPAT12 no sería el único transportador de poliaminas en *T. cruzi* ya que por estudios bioquímicos se sabe que existe un transportador con afinidad para putrescina y cadaverina (Le Quesne 1996; González 1992).

Es importante estudiar como se regulan estos transportadores en *T. cruzi*. Esto es un punto clave, ya que su única fuente de poliaminas es a través del transporte y su concentración intracelular debe ser controlada.

Nuestros estudios sobre el transporte de poliaminas en *Crithidia fasciculata* mostraron que al cultivar el parásito en presencia de DFMO (inhibidor específico de la ODC) se induce notablemente el transporte de putrescina hacia el interior de la célula.

Al tratar cultivos de *C. fasciculata* con DFMO por 24 y 48 horas se induce la expresión de un transcrito de 1400 pb (“B25”) que no posee ninguna similitud con los transportadores conocidos hasta el momento; nosotros especulamos que este gen podría estar involucrado en el sistema de regulación del transporte de poliaminas.

Analizando la secuencia de B25 se observa un marco abierto de lectura (“ORF1”) de 264 pb, que traducido daría una proteína de 87 aminoácidos.

La región central de ORF1 entre los aminoácidos 27 y 63 tiene una identidad de 43% y 46% con dos regiones de una proteína de *Leishmania major* de función desconocida (Q9XZY0).

Este fragmento del ORF 1 se encuentra, con diferentes grados de identidad, en muchas proteínas de otros organismos, en algunas de ellas este dominio se encuentra repetido muchas veces.

En los alineamientos, que resultan de comparar la secuencia de aminoácidos de ORF1 contra la base de datos de proteínas, se ve la conservación de las cisteínas. Estos resultados sugieren

que la región desde el aminoácido 27 hasta el 63 y la posición de las cisteínas son importantes para la función biológica de esta proteína.

Analizando la secuencia de aminoácidos con el programa SignalP se encontró un péptido señal de retículo endoplasmático que sería cortado entre los aminoácidos 25 y 26, y una señal para anclaje a membrana por GPI con una señal de corte en el aminoácido 63.

El análisis de la secuencia aminoacídica del ORF1 sugiere que este péptido tiene un paso transmembrana; también se observan dos motivos de secuencia CXXC (C cisteína y X cualquier aminoácido) encontrados en proteínas como tioredoxinas, disulfuro isomerasas, glutaredoxinas, proteínas de la familia Dsd (Disulfide bond-forming) (Banci 2006).

La proteína DsbB de *E. coli* tiene un motivo CVLC que es muy parecido al motivo CLVC encontrado en el ORF 1. Además DsbB es una proteína de membrana y eso coincide con la predicción para ORF1 (Raina and Missiakas 1997).

A pesar de la falta de homología entre las proteínas redox Dsb, todas ellas contienen un sitio activo similar al de las tioredoxinas. La resolución de la estructura tridimensional muestra que estas proteínas contienen un dominio que se superpone estructuralmente con la estructura de las tioredoxinas (Rain a and Missiakas 1997).

Todos los datos adquiridos por métodos de bioinformática y análisis de secuencias deben ser corroborados experimentalmente.

Queda para trabajos futuros la identificación de la proteína, producto de la traducción del transcripto B25, endógena de *C. fasciculata*, su ubicación subcelular y función.

En esta tesis se comprobó que *T. cruzi* no sintetiza poliaminas *de novo* a partir de arginina, ésto reafirma que el parásito es auxótrofo para poliaminas.

A partir de éstos resultados se abre una línea de investigación en el sistema de transporte de poliaminas y su regulación como blanco para el futuro diseño de drogas antiparasitarias.

Materiales y métodos

Cepas de parásitos

Se utilizaron parásitos *T. cruzi* de las cepas Tulahuen 2 (Tul 2) y RA (Cano 1995), y *C. fasciculata* cepa ATCC 11745.

Cultivo de parásitos

Los epimastigotes de *T. cruzi* se cultivaron en medio rico BHT (Cazzulo 1985) o en medio semidefinido SDM₇₉ (deficiente en poliaminas) (Brun 1979), utilizando métodos descriptos por Heby (1989); Pegg (1986); Algranati (1990).

Los parásitos transformados se seleccionaron con geneticina (G418) (500µg/ml concentración final) agregada luego de 48 horas de la electroporación.

Curvas de crecimiento:

Los parásitos cultivados como se indica en cada experimento, fueron seguidos por recuento en microscopio óptico, en cámara de Neubauer.

Preparación de extractos crudos y ensayo de ADC in vitro

Los parásitos se cosecharon en fase exponencial de crecimiento (20 – 30 x 10⁶ parásitos /ml) por centrifugación a 7000 rpm por 10 min.; se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en el buffer de reacción con PLP (piridoxal fosfato) a 1 x 10⁹ parásitos/ml. Los parásitos se lisaron por tres ciclos de congelado y descongelado y luego se sonicó 4 veces, durante 2 segundos, a potencia 5 para romper el DNA. El extracto se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min. a 4 °C y se trabajó con el sobrenadante.

Los ensayos de actividad de ADC se realizaron en un volumen total de 50 µl, por cuantificación del ¹⁴CO₂ liberado a partir de L-[U-¹⁴C] arginina (0,25 µCi, concentración final 1mM) adsorbido en papel Watman 3MM embebido en KOH 2M. La reacción se realizó a 37°C, durante una hora. La reacción se detuvo por agregado de un volumen de ácido perclórico 0,45 M.

Buffer de reacción para ADC: Buffer Hepes 100mM pH: 7,5; EDTA 0,5 mM; DTT 5mM; BSA 0,1 mg/ml.

La mezcla de reacción utilizada para medir actividad de ADC en los extractos de parásitos y *E. coli* fue la indicada en bibliografía (Hernández 1999; Kalio Mc Cann and Bey 1981; Wu and Morris 1973).

La actividad de las diferentes muestras se normalizó por medición del contenido de proteínas, según el método de Bradford (Bradford 1976), utilizando BSA para las curvas de calibración.

Análisis de los productos metabólicos a partir de L-[U-¹⁴C] arginina por electroforesis en papel

Ensayo *in vivo*: Se cosecharon los parásitos por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos, se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en este mismo buffer a 100 millones/ml de concentración final. Se incubaron con L-[U-¹⁴C] arginina (5 µCi/ml) durante 2 horas a 30 °C, se centrifugaron nuevamente, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 0,1 ml de ácido perclórico 0,2 M neutralizando con KOH, se eliminó el precipitado por centrifugación y el sobrenadante se analizó por electroforesis en papel.

Electroforesis en papel. Buffer de corrida: piridina 1 %, ácido acético 10 % (v/v) pH: 3,5.

Los compuestos radioactivos se detectaron por escaneado con un radiocromatograma. Los aminoácidos y poliaminas utilizados como estándares en la electroforesis se visualizaron por tinción con ninhidrina.

Construcción del plásmido recombinante para la expresión de ADC de avena en *T. cruzi* (pRIBOTEX-ADC)

El cDNA codificante para ADC de avena clonado en el plásmido pTZ19R se amplificó por PCR utilizando los primers 5'CGCATGGAATTCATGGCCAAGAACTACGGCGATG-3' (primer sentido) y 5'- CGCATGGAATTCCTAGGCCATTGGTGGGGGCTTG-3' (primer antisentido) correspondientes a los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante para ADC con el agregado de 12 nucleótidos para la digestión con EcoR1 en el extremo 5' de ambos primers.

El fragmento obtenido por PCR se digirió con EcoR1, se purificó por electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión 1,3% y se ligó al sitio EcoR1 del plásmido pRIBOTEX (Martinez – Calvillo 1997).

La construcción obtenida (pADC₈) se analizó por mapeo con enzimas de restricción y secuenciación.

Construcción del plásmido recombinante pRIBOTEX-ADCH: esta construcción se realizó siguiendo los mismos procedimientos que para pRIBOTEX-ADC (pADC₈) pero utilizando los siguientes primers para la amplificación del cDNA de avena. Primers:

5'-CGCATGGAATTCATGGCCAAGAACTACGGCGATG-3' (sentido) y

5'-CGCATGGAATTCCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGGCCATTGGGGGCTTG-3'

(antisentido, primer específico para el extremo 3' de ADC + secuencia codificante para 6 histidinas).

Transformación de *T. cruzi* con pADC₈

Los parásitos de las cepas salvajes Tul2 y Ra fueron transformados por electroporación.

300 millones de parásitos, resuspendidos en 200 µl de medio LIT, se transfectaron con aproximadamente 100 µg de plásmido en un volumen final de 350 µl a 335 volt y 1500 µF, R2, con el ECM 600 Generator, utilizando cubetas con 2 mm de distancia entre las placas conductoras.

Luego de la electroporación se diluyeron los parásitos en 10 ml de medio BHT con 10% suero fetal bovino y se cultivaron por 48 horas a 28 °C para permitir su recuperación. Luego los parásitos transformados se seleccionaron con G418 a 500 µg/ml de concentración final.

Purificación de DNA

El DNA de los parásitos se purificó por el método de TELT (Medina – Acosta and Cross 1993). Las muestras fueron cuantificadas por absorbancia a 260nm, y la pureza se determinó por los cocientes 260nm/280nm y 260nm/230nm.

Ensayos de hibridización por “Southern blot”

Muestras de DNA (10 a 15 µg) de los parásitos se digirieron con diferentes enzimas de restricción, según se indica en cada experimento y fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa 1% con Bromuro de Etidio para visualizar la digestión y la carga de las muestras.

Una vez finalizada la electroforesis, los fragmentos de DNA fueron transferidos a membrana de nylon (Hybond N⁺, Amersham) por capilaridad con NaOH 0,4 M.

Las membranas se hibridaron con sondas marcadas con (α - ^{32}P) dCTP, a 65 °C, en solución fosfato (Buffer fosfato 0,5 M (pH: 7,5); EDTA 1mM; SDS 7%; BSA 1%), durante toda la noche.

Los lavados se realizaron con solución de lavado (Buffer fosfato 40 mM (pH: 7,5); EDTA 1mM; SDS 1%) 2 veces durante 5 min. a temperatura ambiente y otras 2 veces a 65 °C durante 15 minutos.

Los resultados fueron visualizados por exposición de las membranas con placas radiográficas Kodak X- MAT LS o por el sistema de escaner de señales radioactivas por el “Sistema de imágenes STORM 840” (Molecular dynamics, Amersham)

Marcación de las sondas

Las sondas se marcaron por PCR con 5 μCi de (α - ^{32}P) dCTP (en un volumen total de 100 μl), utilizando el plásmido recombinante pADC₈ como templado para las sondas específicas para ADC y Neo.

Para la marcación de ADC se utilizaron los primers pADC1

(5'-CCGGAATTCCCGGTGAAGGTGAACCAGCACAAG-3') y pADC2

(5'-CCGGAATTCCAGCTTGGAAGAGAGATCGCGGGAT-3').

Sonda rRNA 24S α : la sonda se marcó por amplificación por PCR de un fragmento del gen con los primers **T7**: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' y

SP6: 5'- GATTTAGGTGACACTATAG – 3' utilizando como templado el gen inserto en un vector de clonado pUC generosamente proporcionado por el Dr. Daniel Sanchez (Universidad de San Martín).

Sonda Neo: **pNeo1** (5'-CCGGAATTCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAG-3') y **pNeo2** (5'-CCGGAATTCCGGCCATTTTCCACCATGATATTC-3') utilizando el pADC₈ como templado.

Electroforesis de campo pulsante PFGE (Pulse Field Gel Electroforesis).

Se cosecharon 1000 x 10⁶ parásitos, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 1 ml de agarosa de bajo punto de fusión 1%, colocando la mezcla en moldes plásticos. Los cubitos de agarosa se incubaron con una solución de lisis (proteínasa K 0,5 mg/ml; EDTA 0,5 M; N-lauroylsarcosina 1%) por 48 horas a 48 °C; se lavaron con buffer de conservación (Tris- base 50 mM, EDTA 10mM) y se guardaron a 4 °C hasta su utilización.

Los cromosomas se separaron por electroforesis en agarosa de grado cromosómico (BIORAD) 1% en TBE 0,5 X en una cuba de campo pulsante PFGE.

Programa de electroforesis: Bloque 1: 60 – 90 seg., 16 horas, 6 volt/cm.

Bloque 2: 200 – 500 seg., 20 horas, 3 volt/cm

Bloque 3: 500 – 1200 seg., 12 horas, 2,7 volt/cm

Una vez finalizada la electroforesis, se tiñó el gel con Bromuro de Etidio, se lavó y se irradió con UV (60 m Joules) para fraccionar los cromosomas y se transfirió a membrana de nylon por capilaridad con NaOH 0,4M – NaCl 1,5 M.

Purificación de RNA

El RNA total de los parásitos se purificó con TRIzol (LS reagent) de Invitrogen, según el protocolo indicado por los fabricantes. Se utilizó 1ml de TRIzol cada 500×10^6 de parásitos.

Se cuantificaron las muestras por absorbancia a 260 nm y se evaluó la pureza por absorbancia a 230 nm y por el cociente de 260/280.

Ensayo de Northern blot

Para los ensayos de Northern blot se utilizaron entre 20 y 30 μg de RNA total. El RNA se separó por electroforesis en gel de agarosa 1% con 2,2M de formaldehído en buffer Mops 1X y luego se transfirió a membrana de nylon por capilaridad en buffer SSC 10X (NaCl 1,5 M; citrato de Na 0,15 M; pH: 7)

La hibridización, los lavados y el revelado se realizaron del mismo modo que para *Southern blot*.

Verificación de la integración del plásmido por PCR

Las reacciones de PCR se realizaron con DNA total de parásitos transformados, cosechados a diferentes tiempos luego de la electroporación, utilizando los siguientes primers: primer del promotor T7 (Promega).

primer ADC2 específico para una región interna de ADC (ver marcación de sondas)

primer RIB complementario a una secuencia interna del gen de RNA ribosomal del parásito (Lorenzi 2003).

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1 % teñido con Bromuro de Etidio.

Búsqueda del gen de ADC en el genoma de *T. cruzi*:

285 secuencias aminoácidicas de ADC disponibles en el National Center of Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) fueron filtradas para quitar las secuencias repetidas, muy similares o incompletas. Se alinearon 41 secuencias seleccionadas de acuerdo a la identidad entre sus secuencias de aminoácidos, utilizando el programa CLUSTALW del Vector NTI-Suite 6.0 (InforMax, Inc.). Las secuencias consenso obtenidas se utilizaron para la búsqueda de secuencias en la base de datos del proyecto genoma de *T. cruzi* del “Institute for Genomic Research” (<http://tigr.org/>) utilizando el programa tblastn. Las secuencias obtenidas con $E < 1$ se ensamblaron utilizando el programa Vecto NTI-Suite assembler (InforMax) y se analizó el contenido de marcos abiertos de lectura parecidos a ADC.

Purificación de la enzima ADC de avena a partir de la planta y del parásito transgénico

Las semillas de avena se incubaron en cámara húmeda (cajas de Petri con algodón y papel mojados con agua) dentro de incubadora con ciclos de luz y oscuridad por 48 horas; las semillas germinadas se plantaron en tierra y se cultivaron durante dos semanas.

Se realizó un extracto de proteínas totales rompiendo las hojas en mortero con N_2 líquido hasta obtener un polvo fino, luego se agregó 1ml de buffer Tris HCl 100mM (pH: 7,4); PMSF 0,1 mM cada 500mg de tejido y se realizaron tres centrifugaciones diferenciales a 12000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se extrajo con $(NH_4)_2SO_4$ 50 % y se dializó toda la noche para eliminar el exceso de sales, luego se realizó una extracción con acetona 200% (v/v) y se dializó nuevamente de acuerdo a lo descrito por Smith (1983). El extracto enriquecido se purificó por HPLC en columna Mono Q eluyendo con un gradiente de NaCl 10mM a 1M.

Se ensayó la actividad de ADC de las fracciones obtenidas y la fracción con actividad enzimática se purificó por una columna de tamiz molecular Superdex 200.

Un extracto total de los epimastigotes transformados con ADC se enriqueció en el contenido de esta enzima por precipitación de proteínas calentando a 65 °C, 15 min, luego se separó el

precipitado por centrifugación a 13000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se purificó por HPLC en columna Mono Q con un gradiente de NaCl 10mM a 1M en 30 min.

Purificación de ADC-his por columna de Ni en HPLC

Se utilizó la columna HisTrap HP, 1ml de Amersham.

Para la purificación de ADC-His, se cosecharon 6000 millones de parásitos transformados con pADC-his; se preparó un extracto total de epimastigotes con el buffer de unión indicado para la columna y se procedió según el protocolo indicado por los fabricantes realizando la elución de las proteínas sin pegado específico con 10mM de imidazol. ADC-his fue purificada realizando un gradiente de imidazol de 10 a 250mM en 10 minutos.

Inmediatamente después de la purificación se eliminó el exceso de imidazol por diálisis ya que comprobamos que este compuesto inactiva la enzima.

Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida

Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida 12%, en condiciones desnaturizantes.

Tinción con plata

Se siguió el protocolo de tinción indicado en bibliografía (Hoefler 1994).

Western blot

Las muestras se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 12 %, en condiciones desnaturizantes. Finalizada la electroforesis, se transfirieron las muestras a membrana de nitrocelulosa (Hybond C, Amersham) durante 1 hora a 20 volts. Las membranas se revelaron con anticuerpo primario contra el péptido de 6 histidinas de conejo y luego con un anticuerpo contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa (PIERCE) y se reveló con Super Signal West Duro (PIERCE).

RT- PCR semicuantitativa

Muestras de RNA total de epimastigotes transformados con el plásmido recombinante pRIBOTEX-ADC (Tul-ADC) y otros con pRIBOTEX-ADC-His (Tul-ADC-His), se trataron con DNasa 1 (amplification grade Invitrogen). Las reacciones de retrotranscripción se realizaron según lo indicado para la enzima Superscript II (Invitrogen).

Para las reacciones de PCR se utilizaron 2 µl de las diluciones seriadas 1/3 de los cDNA. Se realizaron 30 ciclos de amplificación.

Croslinking de proteínas

La proteína ADC-his purificada se incubó con 0,5mM o 1mM de Bis(sulfosuccinimidil) suberato (BS³) PIERCE, Hepes 20mM, arginina 0,5mM durante 30 min. a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando Tris-HCl 0,1M pH: 7,5 y glicina 0,1M (concentración final) (Kahana 1993).

Ensayo de transporte de putrescina

20 millones de parásitos /ml se incubaron con una mezcla de reacción (putrescina 20 µM, 1 µCi de ³H- Putrescina, por ml del volumen total, en PBS); a diferentes tiempos se tomó una muestra y se diluyó en 3 volúmenes de putrescina 1mM a 4°C para detener la reacción.

Una vez terminada la reacción, se filtraron las muestras a través de filtros millipore y se cuantificó la putrescina radioactiva transportada en un contador de centelleo.

Differential Display:

Retrotranscripción y PCR

Para las reacciones de retrotranscripción se utilizó 2 µg de RNA total de cada muestra y se procedió según lo indicado para la enzima SuperscriptII (Invitrogen). Por cada muestra se realizó una reacción control sin transcriptasa reversa para verificar que no haya quedado DNA contaminante.

Primers: oligos dT que contiene 12 timinas seguidas de una base variable en sentido 3' es decir MTTTTTTTTTTTTT, donde M puede ser A;C o G. Concentración final: 0,4 µM.

PCR:

Para cada reacción de amplificación se utilizó 0,5µl del producto de RTPCR (cDNA).

Primers 5': se utilizaron diferentes oligonucleótidos de 10 y 13 pb de secuencia al azar (uno por cada reacción) en una concentración final de 0,4 µM.

Primers 3': se utilizaron los mismos primers que para la RTPCR 1µM.

Los nucleótidos se utilizaron en una concentración final de 4 µM.

Ciclos de PCR: 1min a 94 °C
2min. a 42 °C
30 seg. a 72 °C } 30 ciclos

Cuantificación de los productos de PCR

2 µl de los productos de cada reacción de PCR se precipitaron con ácido tricloro acético 10% + 50 µg/ml de RNA de transferencia, durante 30 min. en hielo; luego el precipitado se filtró a través de filtros de fibra de vidrio y se cuantificó el dATP ³⁵S en contador de centelleo.

Electroforesis en geles de secuencia

Los productos de PCR se analizaron en geles de poliacrilamida 6% con 40% de urea como desnaturalizante en buffer TBE 5X.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se colocó sobre un papel Watmman 3MM y se secó. El gel adherido al papel se expuso a placa radiográfica.

Recuperación de bandas diferenciales

Después de alinear la placa con el gel se cortaron las bandas de interés; luego el gel se expuso nuevamente con una placa radiográfica para verificar que el corte se realizó correctamente.

La banda recortada se colocó en un tubo con 100 µl de agua estéril, se incubó 10 min. a temperatura ambiente, luego se hirvió durante 15 min. y se centrifugó 2 min. a máxima velocidad. Se agrega al sobrenadante 0,1 mg/ml de glucógeno y se precipitó con acetato de sodio 0,3 M y 80% etanol. Una vez obtenido el precipitado se resuspendió en agua y se amplifica por PCR con los mismos primers (oligo dT y random) que se utilizaron para el ensayo correspondiente de “Differential Display” (Sanguinetti 1994).

Ampliación del fragmento “B 25”

Conociendo la secuencia, se amplió el fragmento hacia el extremo 5' con un primer específico para el miniexón de *Crithidia fasciculata* (GCTATATAAGTATCAGTTTCT) y un primer interno del extremo 3' del fragmento (CTTGCCGCATTCTTGTCACAT).

Expresión e inducción en bacterias

El fragmento amplificado se clonó en el plásmido de expresión Pet 28b+ para *E. coli* (cepa BL21, DE3).

La inducción se realizó con 1mM de IPTG, incubando a 28 °C 12 a 16 horas.

Bibliografía

Albertsen Markus, Bellahn Inga, Krämer Reinhard and Waffenschmidt Sabine (2003)
The Journal of Biological Chemistry 278 (15) 12820 - 12825.

Algranati ID, Sanchez C and González NS (1989) in The Biology and Chemistry of
Polyamines (Goldemberg S H and Algranati I D Eds.) pp. 137 – 146.

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W.,
Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein
database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402(1997).

Amor-Mahjoub Mouna, Suppini Jean-Philippe, Gomez- Vrielyunck Nathalie, Ladjimi
Moncef (2006) Journal of Chromatography B, 844, 328 – 334.

Ariyanayagam Mark R, Fairlamb Alan H (1997) Mol and Biochem. Parasitology 84, 111 –
121.

Ariyanayagam MR, Fairlamb AH (2001) Mol. Biochem. Parasitol. 115 (2) 189-98.

Avila Herbert A and Simpson Larry (1995) RNA 1, 939-847.

Bacchi CJ, Nathan HC, Huntner SH, McCann PP, Sjoerdsma A (1980) Science 210 (4467)
332 – 334.

Bacchi J. Cynus, Braunstein L. Vicki, Rattendi Donna, Yarlett Nigel, Wittner Murray and
Tanowitz B. Herbert (2001) J. Eukaryot. Microbiol. 201 S Workshops on opportunistic
protists.

Banci Lucia, Bertini Ivano, Ciofi-Baffoni Simone, Su Xu-Cheng, Miras Roger, Bal Nathalie,
Mintz Elisabeth, Catty Patrice, Shokes He comido Jacob and Scott A Robert. (2006) J. Mol.
Biol. 356, 638 – 650.

Ballas Samir K., Mohandas N, Marton L J, and Shohet S. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1942-1946 Cell Biology.

Bell Erin and Malberg L Russell (1990) Mol. Gen. Genet. 224, 431 - 436.

Brener Z (1979) “O parasito: relacoes hospedeiro – parasito in *T. cruzi*” e Doença de Chagas, Z y A.Z. Brener, ed. Rio de Janeiro, Brazil: Guanabara Koogan pp. 1 – 41.

Briones Marcelo R. S., Souto Ricardo P., Stolf Beatriz S., Zingales Bianca (1999) Molecular and Biochemical Parasitology 104, 219 – 232.

Brun R., Jenni L., Tanner M., Schonenberger M. and Schell K. F. (1979) Short communication. Acta Trop. 36, 387 – 90.

Cano M. I., Gruber A., Vazquez M., Cortes A., Levin M. j., Gonzalez a., Degrave w., Rondinelli e., Zingales B., Ramirez j. L. (1995) Mol. Biochem Parasitol 71, 273 – 278.

Carrillo C. (2007) “Polaminas en *Tripanosoma cruzi*, Pequeñas moléculas – grandes perspectivas.” En fase de registro.

Carrillo C, Cejas S, González N S, Algranati I D (1999) FEBS Letters 454 192 – 196.

Carrillo C, Cejas S, Huber A, González N and Algranati I D (2003) J. Eucariot. Microbiol., 50 (5) 312 – 316.

Carrillo Carolina, Canepa Gaspar E, Algranati Israel D, Pereira Claudio A (2006) Biochemical and Biophysical Research Communications 344, 936-940.

Cazzulo J. J., Franke de Cazzulo B. M., Engel J. C. and Cannata J. J. (1985)

Chang Suk Kwang, Lee Hi Sun, Hwang Bin Seong and Parkn yuong Ky (2000) *The Plant Journal* 24 (1) 45 – 56. *Mol. Biochem Parasitol* 16, 329 – 343.

Cohen S. (1998) *A guide to the polyamines*, Oxford, UK: Universitu Press, capítulo 22, pag 481-505.

Cohen S. (1998) *A guide to the polyamines*, Oxford, UK: Universitu Press, capítulo 5, pag 53 – 66.

Cohen S. S. (1998) *A guide to the polyamines*, Oxford, UK: Universitu Press, pag 16 y 17

Cohen S. S. (1998) *A guide to the polyamines*, Oxford, UK: Universitu Press, pag.6 a 7

Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brasil. *Trends in Parasitology* 2002; 18: 171 – 176.

CTD D. o C. T. D-W (1998). *Progres Report of Division of Control of Tropical Diseases – WHO.*

Docampo R. and Moreno S. N. J. (1986) *Federation Proceedings* 45, 2471 – 2476.

Echandi G. and Algranati I. D. (1975) *Biochem Biophys Res Commun* 62, 313 – 319.

Elias Carolina María Q. B., Marques Rafael – Porto, Freymüller Edna, Schenkman Sergio (2001) *Molecular and Biochemical Parasitology* 112, 79 – 90.

Fairlamb Alan H.(1992) *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 695-729.

Fillingame R H, Jorstad C M and Morris D R (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 4042 – 4045.

García – Petrone M, Gonzalez N. S. and Algranati I. D. (1975) *Biochem Biophys Acta* 395, 373 – 380.

Goldemberg S. H. and Algranati I. D. (1981) *Med. Biol.* 59, 360 – 367.

Gonzalez N S, Ceriani C and Algranati I D (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 120 – 128.

González N. S. and Cazzulo J. J. (1989) *Biochem. Pharmacol.* 38, 2873 – 2877.

Gonzalez N S, Ceriani C and Algranati I D (1993) *An. Asoc. Quím. Argent.* 81 (2-3) 117-125

Hamana K. and Matsuzaki S. (1992), *Crit. Rev. Microbiol.* 18, 261-283.

Hanfrey Colin, Sommer Susanne, Mayer J. Melinda, Burtin Daniel, Michael J. Anthony (2001) *The Plant Journal* 27 (6) 551 – 560.

Hasne Marie-Pierre, Ullman Buddy (2005) *The Journal of Biological Chemistry* 280 (15) 15188 – 15194.

Heby O. (1989) In *The Physiology of Polyamines*, U. Bachrach and Y. M. Heimer, eds. (Boca Raton, FL.: CRC Press, Inc.), pp. 83 – 94.

Heby O, Roberts S. C. and Ullman B. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (2) 415-419.

Heby Olle, Luk D. Gordon and Schindler Joel (1987) “Inhibition of polyamine metabolism. Biological Significance and Basis for New Therapies”. Peter P. McCann, Anthony E Pegg and Albert Sjoerdsma edition. Cap. 8, 165 – 183.

Hernández S, Schwarcz de Tarlovsky M (1999) *Cell. Mol. Biol.* 45 (4) 383 – 391

Holta E (1977) *Biochemistry* 16, 91 – 100.

Hoyt Martin A., Zhang Mingsheng and Coffino Philip (2003) *The Journal of Biological Chemistry* 278 (14) 12135-12143.

Hunter Karl J, Le Quesene Sarah A and Fairlamb Alan H. (1994) *Eur. J. Biochem.* 226, 1019-1027.

Hyo Chol Ha, Janes D. Yager, Patric A. Woster and Robert A Caseroj R. (1998) *Biochemical and Biophysical Res. Comm.* 244, 298-303.

Hyvönen Mervi T, Uimari Anne, Keinänen A.Tuomo, Heikkinen Sami, Pellinen Riikka, Wahlfors Tiina, Korhonen Arja, Närvänen Ale, Wahlfors Jarmo, Alhonen Leena and Jäne Juhani. (2006) *RNA* 12, 1569-1582.

Igarashi Kazuei and Kashiwagi Keiko (2000) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271, 559-564.

Igarashi Kazuei and Kashiwagi Keiko (1999) *Biochem J.* 344, 633 – 642.

Jackson K Laurie. Goldsmith J Elizabeth and Phillips A Margaret (2003) *The Journal of Biological Chemistry* 278 (24) 22037 – 22043.

Jeffrey Shaw, Sergio Schenkman and Mauricio Martins Rodrigues, *Kinetoplastid Biology and Disease* 2006, 5:4.

Kallio A., Mc Cann P. P. & Bey P. (1981) *Biochemistry* 20, 3163 – 3166.

Kashiwagi Keiko, Shibuya Sanae, Tomitori Hideyuki, Kuraishi Aiko and Igarashi Kazuei. (1997) *The Journal of Biological Chemistry* 272 (10) 6318 – 6323.

Kierszenbaum Felipe, Wirth J. Julia, McCann P. Peter and Sjoerdsma Albert (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4278 – 4282.

Laranja FS, Dias E, Nobrega G, Miranda A (1956) Circulation 14, 1035 – 1060.

Le Quesne Sarah A, Fairlamb Alan H (1996) Biochem J. 316, 481-486.

López-Contreras Andrés, López-García Carlos, Jiménez-Cervantes Celia, Cremades Asunción and Peñafiel Rafael (2006) The Journal of Biological Chemistry 281 (41) 30896-30906.

Lorenzi Hernán Alejandro, Vazquez Martín Pablo, Levin Mariano Jorge (2003) Gene 310, 91 – 99.

Lövkvist Wallström Eva, Takao Koichi, Wendt Anna, Vargiu Cristina, Yin Hong and Persson Lo (2001) Biochem. Journal 356, 627-634.

Majunder S, Wirth J, Bitonti A, McCann P, and Kierszenbaum F (1992) J. Parasitol. 78 (2) 371 – 374.

Malberg L. Russell and Cellino L. Michael (1994) The journal of Biological Chemistry 269 (4) 2703 – 2706.

Medina – Acosta Enrique and Cross George A. M. (1993) Molecular and Biochemical Parasitology, 59, 327 – 329.

Moncayo Alvaro (2003) Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the interruption of vectorial and Transfusional Transmission in the SouthernCone Countries. Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol. 98 (5): 577 – 591.

Martinez – Carvillo, Imelda López, Roberto Hernández (1997) Gen 199, 71-76.

- Mayer Mario Gustavo, Lucile Maria Floeter-Winter (2005) Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 100 (5) 501-513.
- Mazza S. (1943) Prensa médica Argentina 30, 1583 – 95.
- Moncayo A, Ortiz yanine MI (2006) Ann Trop Med Parasitol 100 (8) 663 677.
- Morgan D. M. (1987) Biochem J 242, 347 – 352.
- Morgan D. M. (1990) Biochem Soc Trans 18, 1080 – 1084.
- Morgan D. M. L. (1998) Polyamine Protocols, D. M. I. Morgan, ed. (Totowa, New Jersey: Humana Press).
- Müller Sylke, Coombs Graham H. and Walter D. Rolf (2001) TRENDS in Parasitology 17 (5) 242-249.
- Müller Sylke, Liebau Eva, Walter Rolf D, and Krauth-Siegel Luise R. (2003) TRENDS in Parasitology 19 (7) 320 – 328.
- Myung Hee Park, Herbert L. Cooper and J. E. Folk (1981) Proc. Natl. Sci. USA 78 (5) 2869-2873.
- Narcisa L (2002) FEMS Microbiology Letters 214, 7 – 12.
- Nasizadeh Sima, Jeppsson Annika and Persson Lo (2003) Cellular Physiology and Biochemistry 13, 321-328.
- Nasizadeh Sima, Persson Lo (2003) FEBS Letters 553, 131-134.
- Nikolaus Séller, Francis Raul (2005) J. Cell. Mol. 9 (3) 623-642)

Nishimura Kazuhiro, Murozumi Kaori, Shirahata Akira, Hee Park Myung, Kashiwagi Keiko and Igarashi Kazuel (2005) *Biochemical J.* 385 779-785.

Oshima Tairo (1979) *The Journal of Biological Chemistry*, 254, September 25, 8720-8722.

Oshima Tairo (1982) *The Journal of Biological Chemistry*, 257, September 10, 9913-9914.

Pavel N Flegontov and Alexander A Kolesnikov, *Kinetoplastid Biology and Disease* 2006, 5:5

Pedreño Eduardo, Andres J Lopez Contreras, Asunción Cremades and Rafael Pñafiel (2005) *Journal of inorganic Biochemistry* 99 2074-2080.

Peng Liang, Weimin Zhu, Xiaoying Zhang, Zhen Guo, Robert P. O Connell, Lidia Averboukh, Feilan Wang and Arthur B. Pardee. (1994) *Nucleic Acids Research* 22 (25) 5763 – 5764.

Pegg A. E. (1986) *Biochem J.* 234, 249 – 262.

Pegg Anthony E.(2006)*The Journal of Biological Chemistry* 281 (21), 14529-14532.

Pereira CA, AlonsoGD, Paveto MC, Flawiá MN, Torres HN (1999) *J Eukaryot Microbiol.* 46 (6) 566-70.

Persson L, Jeppsson A., Nasizadeh (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (2), 411-414.

Persson L., Jeppsson A. and Nasizadeh S. (2003) *Biochem. Soc. Trans.* 31, 411-414.

Piacenza L, Peludo G and Radi R (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, (13) 7301 – 7306.

Polulin R., Pelletier G, and Peg A. E. (1995) *Biochem J* 311, 723 – 727.

Raina S, Missiakas D (1997) *Annu. Rev. Microbiol.*, 51, 179 – 202.

Ramsey JM, PhD, Schofield, PhD (2003) *Salud pública de México*, 45 (2), 123 – 128.

Reguera M. Rosa, Redondo M. Carmen, Pérez-Portejo Yolanda, Balaña-Fouce Rafael (2007) *Mol. Biochem. Parasitol.* 152, 1-10.

Reguera Rosa María, Tekwani Babu L, Balaña-Fouce Rafael (2005) *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140, 151-164.

Rom Eran and Kahana Chaim (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3959-3963.

Ryuichi Hosoya, Koei Hamana, Maseru Niitsu and Takashi Itoh (2004) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50, 271-287.

Sakata Kaori, Kashiwagi Keiko and Igarashi Kazuei (2000) *Biochem. J.* 347, 297-303.

Sanguinetti Carlos J., Dias Neto Emmanuel and Simpson Andrew J. G. (1994) *BioTechniques* 17 (5), 914 – 921.

Satriano Joseph, Isome Masato, Casero Robert A, J R, Thomson Scott C and Blantz Roland C. (2001) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 281, 329 – 334.

Schmeisser Hana, Kontsek Peter, Esposito Dominic, Gillette William, Schreiber Gideon and Zoon Kathryn C. (2006) *Journal of Interferon & Cytokine Research* 26, 866 – 876.

Schofield CJ, Maudlin I (2001) *International Journal for Parasitology* 31, 615 – 620.

Schuber F. (1989) *Review. Biochem. J.* 260, 1-10.

Schwarcz de Tarlovsky M N, Hernandez S M, Bedoya A M, Lammel E M and Isola E L D (1993) *Biochem and Mol Biology Internatinal*, 30 (3) 547 – 558.

Seiler N, Hardy A and Moulinoux J. P.(1996) *Prog Drug Res* 46, 183 – 241.

Seiler N. (1987) *Can J Physiol Pharmacol* 65, 2024 – 2035.

Seiler N. (1995) *Prog Brain Res* 106, 333 – 344.

Seiler N. (2004) *Amino Acids* 26 (3) 217 – 233.

Smith Terence A (1983) *Methods in Enzymology*, 94, 176 – 180.

Seyfried C E and Morris D R (1979) *Cancer Res* 39, 4861 – 4867.

Spotheim-Maurigot M. Ruiz S, Sabattier R., Charlier M (1995) *Int. J. Radiat. Biol.* 68 (5) 571-577.

Stuart Kennet D. Schnauffer Achim, Lewis Ernst Nancy and Panigrahi Aswini K. (2005) *TRENDS in Biochemical Sciences* 30 (2) 97-105.

Sucam, Ministerio de Saúde (1987) *Alguns aspectos economicos e de custo – beneficio em doeVa de Chagas no Brasil, InfomaVoes Epidemiológicas, Sucam, V.54.*

Svensson Johan, Andersson, Reseland Janne E., Lyngstadaas Petter, Bülow Leif (2006) *Protein Expression & Purification* 48, 134 – 141.

Tetaud E, Giroud C., Precott AR, Parkin DW, Baltz D, Biteau N, Baltz T, Fairlamb AH (2001) *Mol. Biochem. Parasitol.* 116 (2) 171-83.

Tomitori Hideyuki, Kashiwagi Keiko, Asakawa Tomoko, Kakinuma Yoshimi, Michael Anthonu J, and Igarashi Kazuei (2001) *Biochem J.* 353, 681 – 688.

Veena Vijayanathan, Thesia Thomas, Akira Shirahata and T. J. Thomas 2001 *Biochemistry* 40, 13644-13651.

Véronique Hannaert (2003), *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2:11.

Wallace Heather M., Fraser Alison V. and Hughes Alun (2003) *Biochem J* 376, 1-14.

Wanderley De Souza (2002), a) " From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality." *Kinetoplastids Biology and Disease*. Review

Wanderley De Souza(2002), b) BioMedCentral (www.kinetoplastids.com/content/1/1/3) "Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*" , *Current Pharmaceutical Design* 8, 269 – 285.

Watson M. B. and Malberg R. L. (1996) *Plant Physiol* 111, 1077 – 1083.

Webb Helena, Burns Roisini, Kimblin Nicola, Ellis Louise and Carrington. (2005) *RNA* 11, 1108-1116.

WHO (1991) *Control of Chagas Disease*. (Geneva: World Health Organization).

who.int/topics/chagas OMS Report of the Scientific Working on Chagas Disease Buenos Aires, Argentina 17 – 20 April 2005.

who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm.

who.int/topics/chagas_disease TDR 2005 Seventeenth Programme Report. Progress 2003 – 2004.

Wilma Wagner and Magdalene SO, *Infection and Immunity* (1990) 3217 – 3224.

Wu W. H. and Morris D.R. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1687 – 1695.

Yoshida Madoka, Kashiwagi Keiko, Sigemasa Ai, Taniguchi Shiho, Yamamoto Kaneyoshi, Makinoshima Hideki, Ishihama Akira and Igarashi Kazuei (2004) *The Journal of Biological Chemistry* 279 (44) 46008-46013.

Yong – Jig Chi, Vincent R. Prezioso and Peng Liang (2002) *BioTechniques* 32, 762 – 766.

Young N. D. and Galston A. W. (1983) *Plant Physiol* 71, 767 – 771.

Zhu Meng – Yang, Iyo Abiye, Piletz John E, Regunatan Soundar (2004) *Biochimica et Biophysica Acta* 1670, 156 – 164.