



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Glicómica de parásitos. Estudio de la vía biosintética de
esfingolípidos en *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium
falciparum*.**

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

Tamara Alejandra Piñero

Director de Tesis: Dra. Alicia S. Couto

Consejero de Estudios: Dra. Silvia M. Moreno

**Lugar de trabajo: CIHIDECAR, Departamento de Química Orgánica, FCEN,
UBA**

Buenos Aires, 2015

A mi madre, Elsa, por la vida y enseñarme que los sueños son posibles.

A Augus y Maxy, por existir y no dejarme bajar la vista del horizonte.

A Carlos, por caminar a mi lado y creer en mí.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
OBJETIVOS	4
INTRODUCCIÓN	
PROTOZOARIOS PARÁSITOS	5
Trypanosomátidos- <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Leishmania</i>	5
Generalidades morfológicas	8
<i>Trypanosoma cruzi</i> y enfermedad de Chagas	10
Transmisión	13
Fases de la enfermedad- tratamiento y prevención	16
<i>Leishmania</i> y leishmaniasis	18
Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. Transmisión. Manifestaciones de la enfermedad	19
Apicomplexa- <i>Plasmodium falciparum</i>	21
<i>Plasmodium</i>	22
Ciclo de vida de <i>Plasmodium falciparum</i>	23
Estadíos intraeritrocíticos	24
Malaria o paludismo	25
Síntomas	29
Diagnóstico y tratamiento	30
ESFINGOLÍPIDOS	
Generalidades	32
Biosíntesis y metabolismo	35
Síntesis anabólica o <i>de novo</i>	36
Vía de reciclado, salvataje y degradación de SIs	40
Reóstato de esfingolípidos	42
Esfingolipidómica	43
Esfingolípidos en hemoparásitos	45

GLICOSILTRANSFERASAS

Glicosiltransferasas. Del glicogenoma al glicoma	54
Mecanismos catalíticos	57
Estructuras moleculares	59
Glicoesfingolípidos	60

MUERTE CELULAR PROGRAMADA (PCD) **64**

Apoptosis-autofagia-necrosis	65
Vías intrínseca y extrínseca	66
Etapas de la muerte celular programada (PCD)	68
Esfingolípidos y muerte celular programada	71
PCD en tripanosomátidos	75

RESULTADOS

GLUCOSILCERAMIDA SINTASA (GCS) **78**

Actividad enzimática, optimización de la reacción de actividad.	
Actividad en las diferentes especies.	79
Purificación de la GCS de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	81
Producción de un anticuerpo anti GCS en ratón	88
Acoplamiento de las inmunoglobulinas G purificadas a Sepharosa	
4b activada	89
Acople del anticuerpo anti- GCS a una matriz de Sepharosa.	
Columna de inmunoafinidad	89
Inmunopurificación en columna	90
Inmunoprecipitación de la GCS con el anticuerpo anti-GCS	92
Inmunodetección por western blott con el anticuerpo anti-GCS	
en otros parásitos	93
Actividad enzimática de la GCS en <i>Plasmodium falciparum</i>	
y <i>Leishmania amazonensis</i>	94
Curva de tiempo de la reacción enzimática específica en	
<i>P. falciparum</i>	95
Acción de la saponina	95
Proteómica. Identificación de secuencias putativas.	

Análisis por espectrometría de masa UV-MALDI TOF-TOF bandas purificadas por cromatografía en columna de afinidad a colorantes Green dye-agarosa	101
INHIBICIÓN DE LA VÍA DE ESFINGOLÍPIDOS EN HEMOPARÁSITOS	113
Efecto de inhibidores sobre el metabolismo de los esfingolípidos	113
Esfingolípidos, <i>T. cruzi</i> y tamoxifeno	114
Cromatografía de alta resolución en fase reversa	116
Análisis por espectrometría de masa	118
Ensayo de inhibición con tamoxifeno cultivos de <i>Plasmodium falciparum</i>	122
Cromatografía en capa	122
Cromatografía de alta resolución en fase reversa	124
Espectrometría de masa	128
Esfingolípidos en <i>L. amazonensis</i> , acción de inhibidores	132
En resumen.	138
Determinación de muerte celular por citometría de flujo	140
 NUEVA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLICOLÍPIDOS UTILIZANDO INGENIERÍA METABÓLICA	 146
Química click	146
Marcación de glicolípidos de formas intraeritrocíticas de <i>P. falciparum</i>	151
SDS-PAGE y cromatografía en capa delgada	152
Análisis por espectrometría de masas	154
 MATERIALES Y MÉTODOS	 165
Cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i>	165
Purificación de los diferentes estadios intraeritrocíticos. Gradiente Percoll.	166

INDICE

Sincronización de cultivos con sorbitol	166
Purificación por columna magnética de formas esquizontes	166
Preparación de los complejos NBD-dihidroceraida, NBD-ceraida con seroalbúmina bovina	167
Ensayo de actividad de la GCS en presencia de saponina	167
Incorporaciones metabólicas en los estadios intraeritrocíticos de <i>Plasmodium falciparum</i>	167
Ensayo de inhibición con citrato de tamoxifeno cultivos de <i>Plasmodium falciparum</i>	167
Cultivo de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> , cepas Tulahuen 2 y Cl Brener	168
Ensayos con inhibidores en cultivos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	168
Extracción y purificación de los lípidos	169
Cromatografía de intercambio aniónico	169
Cromatografía en capa delgada	170
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	170
Purificación de la glucosilceramida sintasa de <i>Plasmodium falciparum</i>	171
Purificación de la glucosilceramida sintasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	171
Obtención de una fracción enriquecida en membranas.	171
Precipitación con sulfato de amonio	172
Ultracentrifugación	172
Cromatografía de afinidad a colorantes	173
Ensayo de actividad de la glucosilceramida sintasa (GCS)	173
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	174
Tinción con nitrato de plata	174
Proteómica. Preparación de las muestras para espectrometría de masa UV-MALDI TOF-TOF	174
Tinción con Coomassie coloidal	175
Digestión en gel de proteínas con tripsina	175
Sembrado de las muestras y análisis de las muestras	176
Lipidómica. Preparación de las muestras para espectrometría de masa UV-MALDI TOF-TOF	177

INDICE

Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y reacción con anticuerpos (Western blot)	178
Cuantificación de proteínas	178
Método de Lowry	178
Método de Bradford	178
Producción de anticuerpos anti-GCS	179
Acoplamiento de las inmunoglobulinas G purificadas a Sepharosa 4b activada con bromocianógeno.	179
Inmunopurificación en columna	180
Inmunoprecipitación	180
Esfingolípidos en <i>L. amazonensis</i> , acción de inhibidores.	181
Test de apoptosis/necrosis- citometría de flujo	181
Incorporación de β -N-azido tetra-o-acetil-D-glucosamina	182
CONCLUSIONES	184
PUBLICACIONES	188
BIBLIOGRAFIA	189
ABREVIATURAS	203

Glicómica de parásitos. Estudio de la vía biosintética de esfingolípidos en *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*.

Este trabajo presenta un estudio de la vía biosintética de esfingolípidos en dos protozoarios hemoparásitos: *Trypanosoma cruzi* (formas epimastigote) y *Plasmodium falciparum* (estadios intraeritrocíticos) utilizando espectrometría de masa UV-MALDI-TOF.

En una primera etapa se realizó la purificación de la glucosilceramida sintasa, enzima responsable de la transferencia de glucosa desde UDP-glucosa a ceramida, a partir de formas epimastigote de *T. cruzi* utilizando diferentes pasos cromatográficos. Se demostró que la proteína purificada presentó actividad enzimática específica. A partir de ella fue posible obtener un suero policlonal en ratones con el cual se inmunoprecipitó la enzima activa. Por otra parte, se acopló el anticuerpo a Sepharosa de forma de realizar la inmunopurificación de la enzima en forma más eficiente. Este mismo anticuerpo fue utilizado para la detección de la GCS en otros parásitos. Dado que esta enzima no presenta una secuencia conservada en diferentes sistemas, se realizó un análisis proteómico con la enzima purificada y los resultados fueron comparados en bancos de datos.

En una segunda etapa, teniendo en cuenta resultados previos del laboratorio que indicaban que el Tamoxifeno (TAM) inhibe el desarrollo de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, se estudió el efecto del TAM sobre el metabolismo de los esfingolípidos no solo en *T. cruzi*, sino también en *P. falciparum* y *L. amazonensis*. Para ello se realizaron incorporaciones metabólicas de ceramidas fluorescentes en cultivos en presencia y ausencia de TAM y se analizaron los esfingolípidos obtenidos por ccd, hplc y espectrometría de masa UV-MALDI-TOF.

En la tercera etapa, haciendo uso de la ingeniería metabólica se desarrolló una nueva metodología para la determinación de glicolípidos. Se realizó la incorporación de N-AzGlcNH₂ en los estadios intraeritrocíticos de *P. falciparum*. Luego de la extracción de los glicolípidos la utilización de las reacciones denominadas "Click" permitió la unión de un grupo fluorescente que sería utilizado para la detección durante el fraccionamiento así como para el análisis por espectrometría de masa utilizando el grupo fluorescente como fotosensibilizador, disminuyendo el tiempo de análisis e incrementando la sensibilidad con una mínima preparación de la muestra. Este nuevo método resulta de utilidad para cuantificar cambios dinámicos en el patrón de glicosilación y realizar la determinación estructural directa en diferentes sistemas.

Palabras claves: EM MALDI-TOF, *T. cruzi*, *P. falciparum*, esfingolípidos, Tamoxifeno

ABSTRACT

Parasite glycomics. Study of the biosynthesis of sphingolipids in *Trypanosoma cruzi* and *Plasmodium falciparum*.

In this work, we present a study of the biosynthetic route of sphingolipids in two hemoparasitic protozoa: *Trypanosoma cruzi* (epimastigote forms) and *Plasmodium falciparum* (intraerythrocytic stages), using UV-MALDI-TOF mass spectrometry.

Firstly, the purification from epimastigote forms of *T. cruzi* of the glucosylceramide synthase (GCS), enzyme responsible of transferring glucose from UDP-glucose to ceramide, by different chromatographic steps was performed. The purified protein resulted active and with this protein fraction, a mice polyclonal antibody was obtained. This antibody was able to immunoprecipitate the active enzyme. Furthermore, the antibody was coupled to Sepharose in order to perform the immunopurification of the enzyme more efficiently. The same antibody was used to detect GCS in other parasites. As this enzyme does not present a conserved sequence through different systems, a proteomic approach was performed and the results were compared with data banks.

In a second step, taking into account previous results obtained in our lab indicating that Tamoxifen (TAM) inhibits *T. cruzi* growth the effect of TAM on the sphingolipid metabolism was studied. This study was extended to *P. falciparum* and *L. amazonensis*. For this purpose, fluorescent ceramides were metabolically incorporated in cultures containing or not TAM. The labelled sphingolipids were extracted and were analysed by TLC, HPLC and UV-MALDI-TOF mass spectrometry.

In the third step, using the metabolic engineering technique, a new method for glycolipid analysis was developed. We performed

the metabolic incorporation of N-AzGlcNH₂ in the intraerythrocytic stages of *P. falciparum*. After extraction, the use of "click chemistry" allowed to link a fluorescent reporter group that resulted useful for the glycolipid detection during fractionation and also for the mass spectrometry analysis as photosensitizer, diminishing the analysis time while increasing sensitivity with a minimum sample preparation. This new methodology is useful to quantify dynamic changes of the glycolipid pattern as well as to perform direct structural determination in different systems.

Keywords: MALDI-TOF m.s., *T. cruzi*, *P. falciparum*, sphingolipids, Tamoxifen

Páginas 5 a 145 eliminadas a pedido del autor.

NUEVA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLICOLÍPIDOS UTILIZANDO INGENIERÍA METABÓLICA.

QUÍMICA CLICK

La glicómica busca entender cómo un determinado grupo de hidratos de carbono se relaciona con un evento biológico en particular. Los hidratos de carbono participan en la mayoría de los procesos biológicos, desde la señalización intracelular hasta el desarrollo de un órgano o el crecimiento tumoral. Entender cómo la totalidad de los azúcares gobierna estos procesos es un punto central de la glicobiología.

El glicoma puede ser descrito en varios niveles jerárquicos de creciente complejidad:

- Un primer nivel en el que se determina la simple estructura de un azúcar separado de la proteína o el lípido al que se haya unida, independientemente de su localización en la célula, órgano u organismo.
- En segundo lugar, conocer la forma en que los hidratos de carbono se asocian a las diferentes proteínas y lípidos, fundamental al momento de determinar su función.
- Un tercer nivel de complejidad, en el que se determina cuáles de estos hidratos de carbono o glicoconjugados se expresan en las diferentes células y tejidos.
- El último peldaño de esta jerarquía involucra la visualización de cómo los glicoconjugados están organizados y se relacionan entre sí tanto a nivel intracelular, de la membrana o de la matriz extracelular.

Dentro de este marco, las reacciones químicas bioortogonales están allanando el camino para las nuevas innovaciones en biología y la

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

glicobiología no es un área ajena a estos avances. Dichas reacciones poseen extrema selectividad y biocompatibilidad, tal que los reactivos que forman parte de ellas pueden formar uniones covalentes dentro de sistemas biológicos funcionalizados e inclusive en organismos vivos (Jewetta y Bertozzi, 2010).

El término química bioortogonal refiere a cualquier reacción química que puede ocurrir dentro de los sistemas vivos sin interferir con los procesos bioquímicos nativos. El término fue acuñado por Carolyn R. Bertozzi en 2003.

Para ser considerada bioortogonal, una reacción debe cumplir una serie de requisitos:

- Selectividad: La reacción debe ser selectiva entre los grupos para evitar reacciones laterales con compuestos biológicos.
- Inercia biológica: los reactivos y los productos de la reacción de unión resultante no deben poseer reactividad capaz de alterar la funcionalidad química nativa del organismo en estudio.
- Inercia química: El enlace covalente debe ser fuerte e inerte a las reacciones biológicas.
- Cinética: La reacción debe ser rápida en la escala de tiempo de los procesos celulares para evitar la competencia en las reacciones que pueden solapar las señales de especies menos abundantes. Reacciones rápidas también ofrecen una respuesta rápida.
- Biocompatibilidad de reacción: Las reacciones no deben presentar toxicidad y deben funcionar en condiciones biológicas de pH, medio acuosos, y temperatura.
- El reportero químico debe ser capaz de ser incorporado en las biomoléculas a través de alguna forma de ingeniería de proteínas o metabólica.

La química bioortogonal se basa en dos pasos. En primer lugar, un sustrato celular, por ej., metabolitos, inhibidores de enzimas, etc., se modifica con un grupo funcional bioortogonal y se introduce en la célula. El producto final de la reacción no debe alterar la estructura del sustrato para evitar afectar dramáticamente su bioactividad. En segundo lugar, una

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

sonda que contiene el grupo funcional complementario es introducida para marcar el sustrato.

Desde su introducción, el concepto de la reacción bioortogonal ha permitido el estudio de biomoléculas tales como hidratos de carbono, proteínas, y lípidos en tiempo real en sistemas vivos sin provocar toxicidad celular. En el último tiempo se han desarrollado varias estrategias de ligación química que cumplen los requisitos de bioortogonalidad, incluyendo la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen, en particular la variante paso a paso catalizada por Cu(I) conocida simplemente como "la reacción en un click", cicloadiciones tales como la reacción de Diels-Alder, ejemplos de sustitución nucleofílica en compuestos conteniendo grupos epoxy y aziridina y reacciones de adición a dobles enlaces carbono-carbono como la dihidroxilación, entre otras.

La **química click** es una filosofía química introducida por K. Barry Sharpless en 2001 (Kolb y col, 2001; Evans 2007; Díaz y col, 2008) y describe una operatoria química a medida para generar sustancias en forma rápida y fiable al unir pequeñas unidades entre sí. Se inspira en el hecho de que la naturaleza también genera sustancias al unir pequeñas unidades modulares. La química click no es una reacción específica, sino que es un concepto que imita la naturaleza o sea es bioortogonal.

Las reacciones en la química click deberían reunir las siguientes características:

- ser modulares
- ser de amplio alcance
- dar un rendimiento químico muy alto
- generar solo subproductos inofensivos
- ser estereoespecíficas
- ser fisiológicamente estables
- mostrar una gran fuerza termodinámica
- poseer una elevada economía de átomos.
- para su aplicación en sistemas vivos debe ser

bioortogonal.

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

La mayoría de las reacciones click son irreversibles e incluyen procesos de enlace entre un átomo de carbono y un heteroátomo. Un ejemplo de esto sería la incorporación de grupos azida a través de la reacción Staudinger-Bertozzi dentro de biomoléculas produciendo potenciales blancos para una marcación azido específica. La reacción también se denomina ligación de Staudinger porque las dos moléculas se ligan al final de la reacción, mientras que en la reacción de Staudinger clásica, los dos productos no se unen covalentemente después de la hidrólisis. (Saxon y col., 2000; Kiicky col., 2002; Sletten y Bertozzi, 2009). Esta reacción es bioortogonal dado que las azidas y fosfinas no se hallan presentes en las moléculas biológicas naturales. Otro rasgo de alta relevancia es la biocompatibilidad de la reacción, dado que se lleva a cabo en solución acuosa bajo condiciones suaves a temperaturas y rangos de pH moderados. Cabe destacar que la reacción tiene una elevada eficiencia, habitualmente se logran rendimientos de $\geq 90\%$.

En el presente trabajo utilizamos la reacción "click" de cicloadición de azidas y alquinos de Huisgen, con el cobre como catalizador que da como resultado la formación del 1,4-regioisómero. El kit fue diseñado para detectar la síntesis de nuevas proteínas o subclases de glicoproteínas modificadas con un grupo azida (Fig. 1) a través de la incorporación metabólica de diferentes azúcares modificados con azidas dentro de la estructura glicoproteica. Luego se analiza el perfil proteico mediante SDS-PAGE e incluso mediante Western blots. El método de detección también es compatible con el análisis mediante espectrometría de masa UV MALDI, permitiendo diferenciar subclases de glicoproteínas, fosfoproteínas y proteínas totales. Las muestras fueron marcadas con Tetrametilrodamina (TAMRA).

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

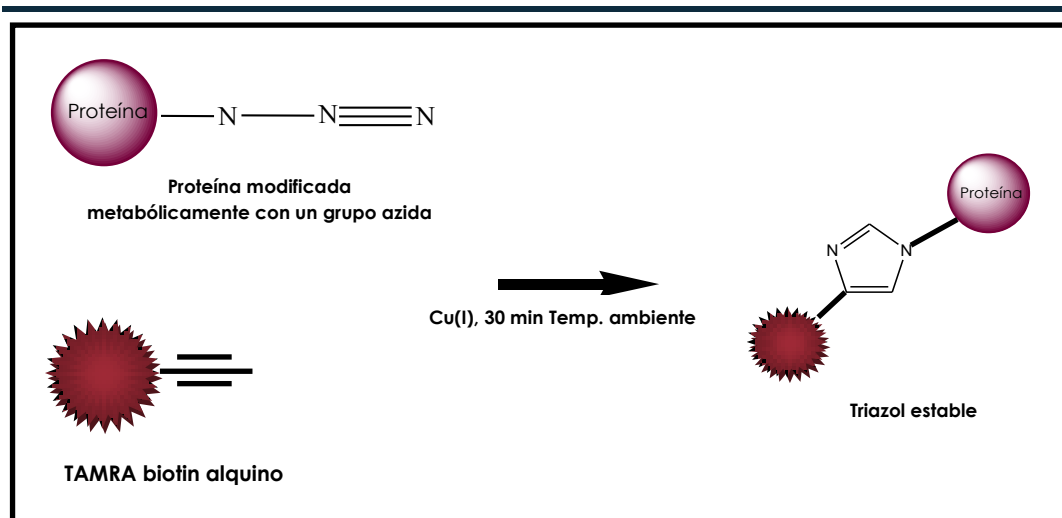


Fig. 1: Reacción azida/alquino click, cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen, variante paso a paso catalizada por Cu (I). En nuestro trabajo consistió en la incorporación metabólica de diferentes azúcares modificados con azidas dentro de la estructura glicoproteica marcadas con Tetrametilrodamina (TAMRA). Luego de la incorporación metabólica el azido-azúcar puede ser químicamente modificado por la reacción de ligación de Staudinger uniendo una sonda al grupo azido.

MARCACIÓN DE GLICOLÍPIDOS DE FORMAS INTRAERITROCÍTICAS DE *P. FALCIPARUM*

Tanto la glicobiología como el metabolismo lipídico de *P. falciparum* han sido foco de un creciente interés en los últimos años dadas su potencialidad como herramienta quimioterapéutica (Mitamura, T. y Palacpac, N.M.Q., 2003).

En el presente trabajo se realizaron incorporaciones metabólicas con azido azúcares con el fin de determinar diferencias en los patrones de glicosilación en los distintos estadios intraeritrocíticos de *P. falciparum*. Con la intención de obtener información más profunda sobre las estructuras de los glicoconjugados en *Plasmodium* utilizamos azido-azúcares útiles para el estudio de glicoproteínas y glicolípidos que con anterioridad eran inaccesibles.

El metabolismo lipídico ha sido también uno de los aspectos más estudiados en los últimos tiempos de la biología del parásito por sus posibles aplicaciones con propósitos terapéuticos. (2). Fueron identificados dos candidatos como precursores putativos de ancla de GPI

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

(glicosilfosfatidilinositol) para proteínas de membrana, con las estructuras etanolamina fosfato-6(Man a I-2)Man a I-2Man-a I-6Man-a I-4GlcN-PI (Pfa) y etanolamina fosfato-6Man a I-2Man a I-6Man-a I-4-GlcN-PI (Pfb) (3-4). Solamente Pfa ha sido descrito como ancla de las proteínas MSP-1 y MSP-2 (5).

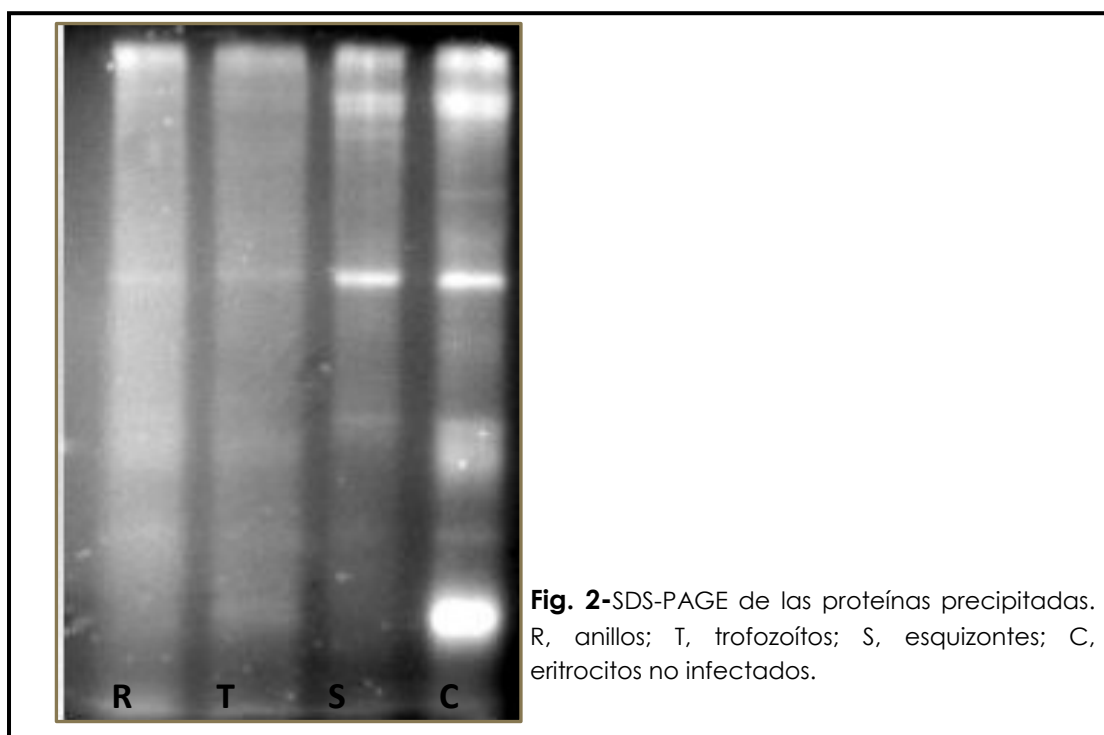
El precursor Pfb es sintetizado y transferido a alguna proteína no caracterizada aún, especialmente del estadio de trofozoíto (3, 6). Resultó interesante que el core de glicanos aislado determinado en muestras de nueve aislados de *P. falciparum* correspondientes a diferentes regiones geográficas muestran una estructura universal (7). Un análisis del sustituyente acilo en C-2 del inositol de los GPIs de *P. falciparum* mostraron la presencia de ácido palmítico (~90%) y ácido mirístico (~10%). La molécula de diacilglicerol contiene predominantemente C18:0 y C18:1, proporciones menores de C14:0, C16:0, C18:2, C20:0, C22:0 y ácidos no determinados, con C18:1 y C18:2 en la posición sn-2 (8).

Por otro lado, ha sido demostrada la síntesis de esfingomielina por el parásito (9-10), aunque su vía metabólica no está suficientemente entendida. A pesar de la evidencia de que *Plasmodium* tiene limitada habilidad para sintetizar. Estadios intaeritrocíticos de *P. falciparum* fueron metabólicamente incorporados con N-azido-tetra-O-acetilglucosamina. Se realizaron las incorporaciones en diferentes condiciones, y los mejores resultados fueron obtenidos utilizando 0.26 mg/ml de cultivo durante 24hs. Luego de la purificación por gradiente de Percoll, cada estadio fue lisado, centrifugado y los lípidos fueron extraídos con cloroformo: metanol: agua. La fase orgánica (OP I) fue separada de las proteínas precipitadas por centrifugación y cada fracción fue marcada con TAMRA (Tetrametilrodamina). El precipitado proteico marcado proveniente de cada estadio fue nuevamente extraído con cloroformo: metanol: agua y la fase orgánica separada y secada (OP II). En todos los casos eritrocitos no infectados fueron tratados en paralelo y usados como control.

La fracción proteica fue re-solubilizada en buffer de muestra y desnaturalizada para ser analizada por SDS-PAGE (Fig.2). El análisis evidenció que si bien en los tres estadios intraeritrocíticos del parásito se

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

observaban bandas o zonas fluorescentes, los eritrocitos no infectados mostraban un perfil de marcación coincidente y de mayor intensidad. Por otra parte, a pesar de cambios en las condiciones de marcación no se logró un resultado satisfactorio. Por lo tanto, se procedió al análisis de los extractos lipídicos obtenidos.



Con este propósito, las fases orgánicas (OPI y OPII) fueron analizadas por CCD usando como solvente de desarrollo cloroformo: metanol: agua (40:10:1) (Fig. 3 A y B respectivamente).

Es de destacar que aunque los extractos provenientes de eritrocitos no infectados mostraron lípidos marcados, el análisis de los extractos correspondientes a los diferentes estadios indicó claras diferencias. El análisis de la OPI (Fig. 3A) mostró que las bandas denominadas 1 y 2 aparecen aumentadas en el estadio anillo y van disminuyendo con la diferenciación a esquizontes.

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

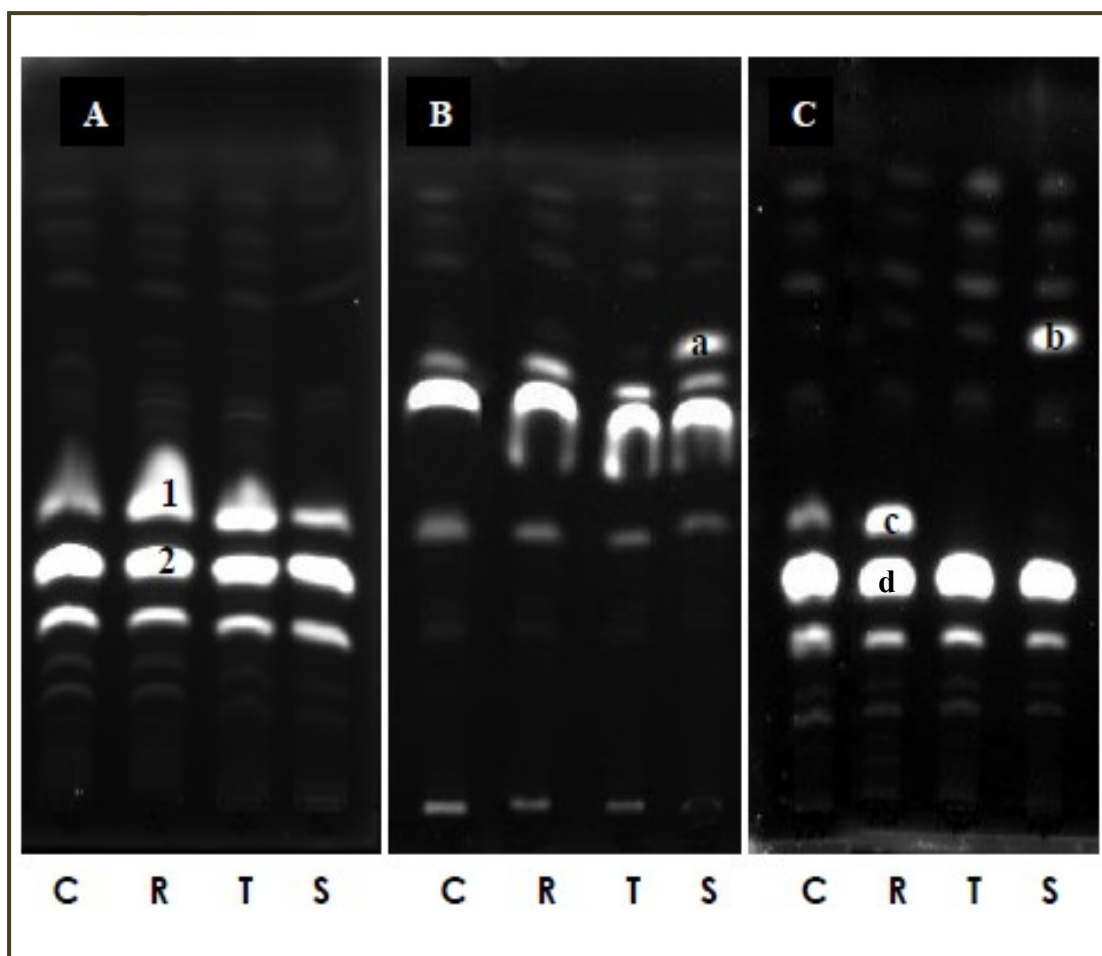


Fig3-CCD de las fases orgánicas.(A) OP I y (B) OP II utilizando cloroformo: metanol: agua (40:10:1) como solvente de desarrollo; (C)OP II utilizando cloroformo: metanol: agua (40:10:0.3) como solvente de desarrollo. R, anillos; T, trofozoitos; S, esquizontes; C, eritrocitos no infectados. Los números y las letras en minúscula indican los productos que fueron analizados por espectrometría de masas.

Los compuestos fluorescentes denominados **1** y **2**, fueron levantados de la placa y extraídos con cloroformo: metanol: agua, secados y analizados por espectrometría de masa. En un trabajo anterior (Landoni y col., 2008) fue determinado que el análisis de esfingolípidos provenientes de incorporaciones metabólicas con análogos fluorescentes, NBD-ceramida y NBD-dihidroceraida puede ser analizado por espectrometría de masa UV-MALDI-TOF sin agregado de matriz, ya que el mismo grupo fluorescente es capaz de absorber la energía a las longitudes de onda del láser utilizado y actuar desorbiendo/ionizando los compuestos. Por lo tanto se intentó probar si la sonda utilizada en este caso (TAMRA) poseía esta propiedad. En la

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

figura 4 se observan los espectros obtenidos de los componentes 1 y 2 del estadió anillo.

El espectro correspondiente al componente **1** de la Fig 3 A, obtenido en modo positivo, mostró una señal a m/z 1817.7 (calc. m/z 1816.8) correspondiente al $[M+H]^+$ de una estructura de glicosilfosfatidilinositol conteniendo un grupo diacilglicerol formado por C18:1 y C12:0 y dos unidades de hexosa unidas a la molécula de hexosamina-Inositol marcada con TAMRA (esquema 1). Un ácido graso C14:0 adicional genera un pico de m/z 2026.3 (calc. m/z 2027.0). Esta última señal está de acuerdo con el hecho que el ácido mirístico es el ácido graso preferencial que sustituye el anillo inositol de los GPIs en *Plasmodium* (Debierre-Grockiego y Schwarz, 2010). Las señales a m/z 1200.5 y 1216.3 (calc. 1199.4 y 1215.4) corresponden a la pérdida del grupo fosfatidil del m/z 1817.7. Adicionalmente, mientras el pico con m/z 1506.5 (calc. 1505.6) corresponde a la pérdida del grupo diacilglicerol del ión m/z 2026.3, la señal de m/z 1476.7 (calc. 1475.9) puede ser atribuida a la pérdida de dos unidades de hexosa del m/z 1817.9. Adicionalmente, la señal a m/z 939.7 (calc 939.3) corresponde a la pérdida del grupo diacilglicerol del ión m/z 1476.5.

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

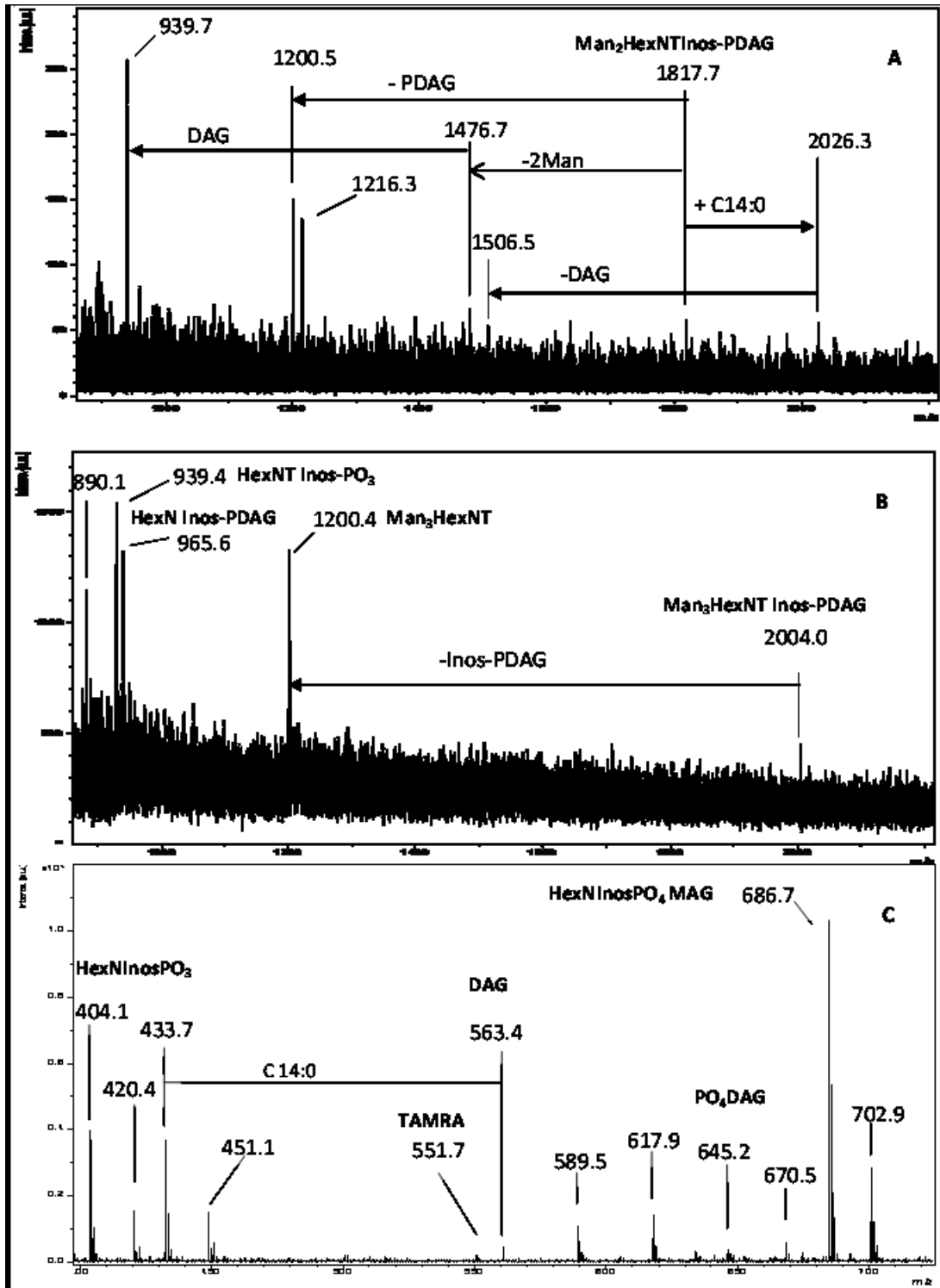
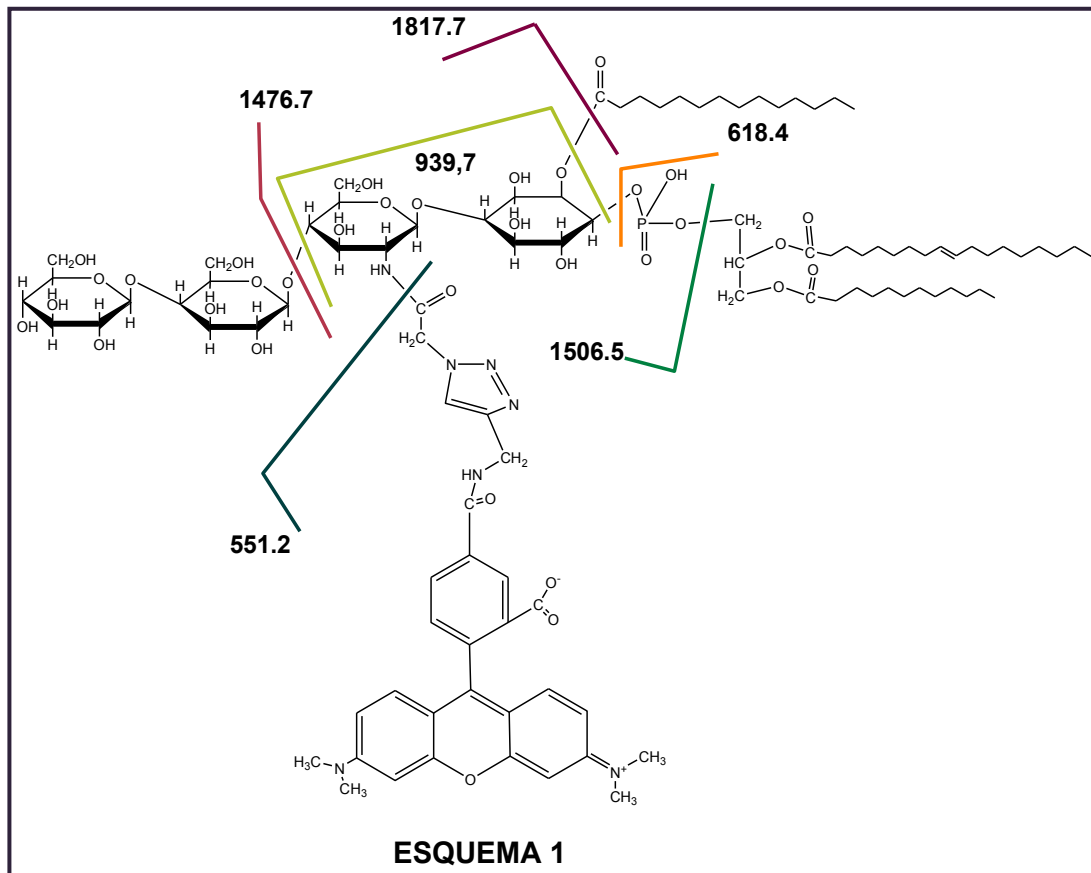


Fig 4- Análisis por espectrometría de masa realizado sin agregado de matriz externa. A) banda 1, B) y C) banda 2 de fig. 3A; B corresponde al rango expandido m/z 850-2200. HexNT: hexosamina marcada con TAMRA; DAG: fosfatidil diacilglicerol; MAG monoacilglicerol.

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

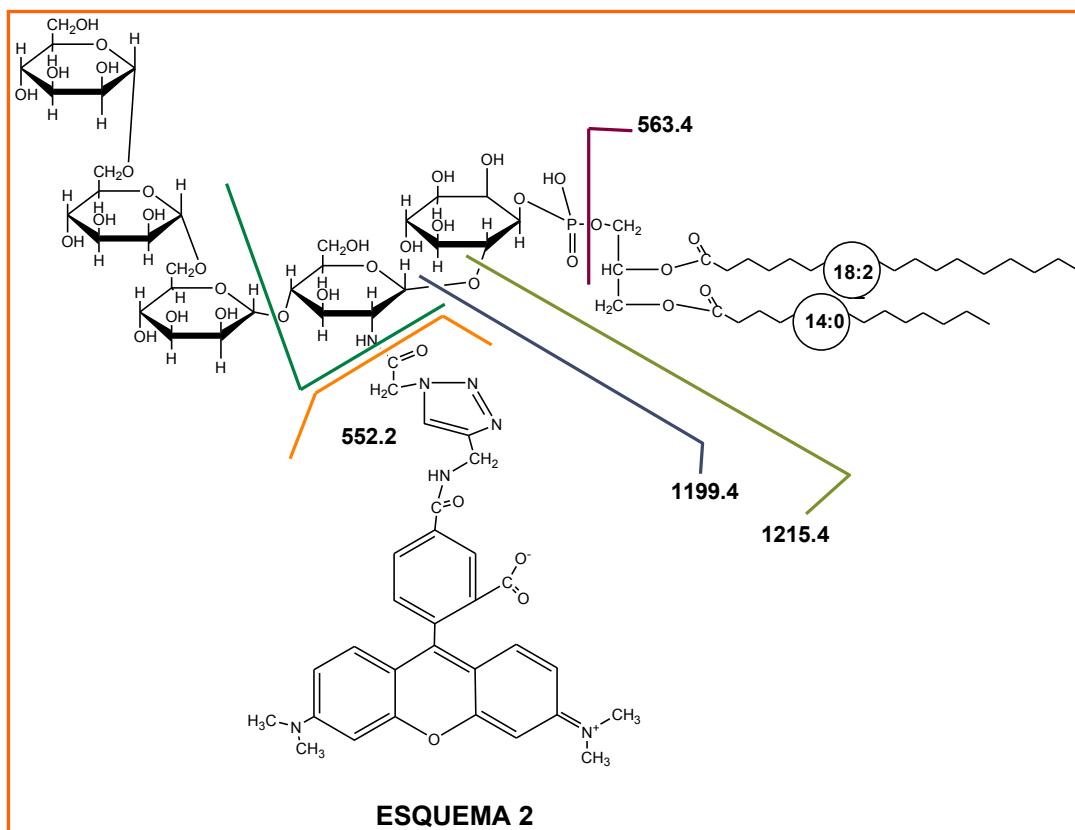


Esquema 1. Estructura del componente 1 de la Fig 3 A, correspondiente a una molécula de glicosilfosfatidilinositol conteniendo un grupo diacilglicerol formado por C18:1 y C12:0 y dos unidades de hexosa unidas a la molécula de hexosamina-Inositol marcada con TAMRA.

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

El espectro de la banda **2** se muestra en la Fig4 B y C. En este caso la señal a m/z 2004.0 (calc. m/z 2004.9) puede ser atribuida a una estructura de glicosilfosfatidilinositol conteniendo un grupo diacilglicerol formado por ácidos grasos C 14:0 y C18:2 y una estructura glicosídica conteniendo tres unidades de hexosas y la unidad de HexNH₂-Inositol marcada con TAMRA (Fig.4B). La ruptura principal entre la glucosamina y el inositol producen una señal a m/z 1200.5 (cal. m/z 1199.4). La pérdida de dos unidades de hexosa de esta última da lugar al ión m/z 890,1 (calc. m/z 889.3). Adicionalmente, como en el espectro anterior, la señal a m/z 939,7 (calc. m/z 939,4) corresponde a la unidad de HexNH₂-Inositol con el grupo fosfato. Por otra parte la pérdida de las tres unidades de hexosa y de la porción fosfatidildiácilglicerol da lugar a la señal m/z 890.1 (calc m/z 889.3) mientras que la pérdida de las tres unidades de hexosa y el TAMRA da lugar a la señal m/z 965.6 (calc. m/z 966.5). En la zona de masas menores (Fig 3C) la pérdida del grupo TAMRA y el ac. graso C18:2 da lugar a la señal a m/z 686.7, m/z 702.9 y m/z 670.5 (calc. m/z 686.3, 702.3 y 670.3 respectivamente,) Además la unidad de fosfatidildiácilglicerol da lugar al ión m/z 645.2 (calc. m/z 644.4), el fosfatidilmonoácilglicerol conteniendo el C18:2 da lugar a la señal a m/z 433.7 (calc. m/z 433.2) mientras que la porción de diácilglicerol da lugar al ion m/z 563.4(calc. m/z 564.4). Señales menores a m/z 617.9 y m/z 589.5 (de m/z 646.4) corresponden a micro heterogeneidades en la composición de los ácidos grasos (Esquema 2).

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*



Esquema 2. Se muestra la estructura determinada a partir del espectro de la Fig 4 B y C, atribuida a una molécula de glicosilfosfatidilinositol conteniendo un grupo diacilglicerol formado por ácidos grasos C 14:0 y C 18:2 y una estructura glicosídica conteniendo tres unidades de hexosas y la unidad de HexNH₂-Inositol marcada con TAMRA

Cuando el extracto OPII fue analizado por ccd (Fig. 3B) el estadio esquizonte presentó un componente que migraba mucho que no estaba presente en los otros estadios ni en el control. Las mismas diferencias pero con una mejor resolución fueron detectadas cuando las muestras se analizaron en un solvente menos polar (Fig. 3C). Las bandas denominadas **a** de la Fig. 3B, **b** y **c** de la Fig 3C fueron extraídas y analizadas por espectrometría de masa sin agregado de matriz externa. Como era de esperar, los espectros de masa en modo positivo de la bandas **a** y **b** resultaron idénticos y fueron atribuidos a una estructura de glicoesfingolípido (Fig. 5).

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

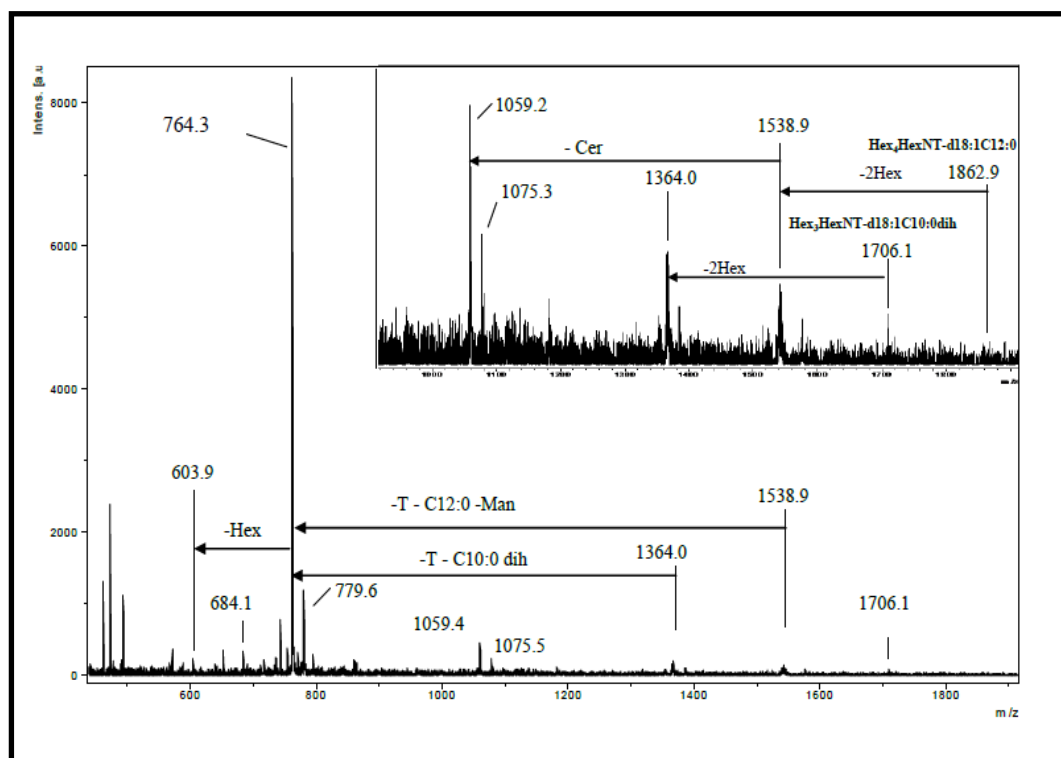
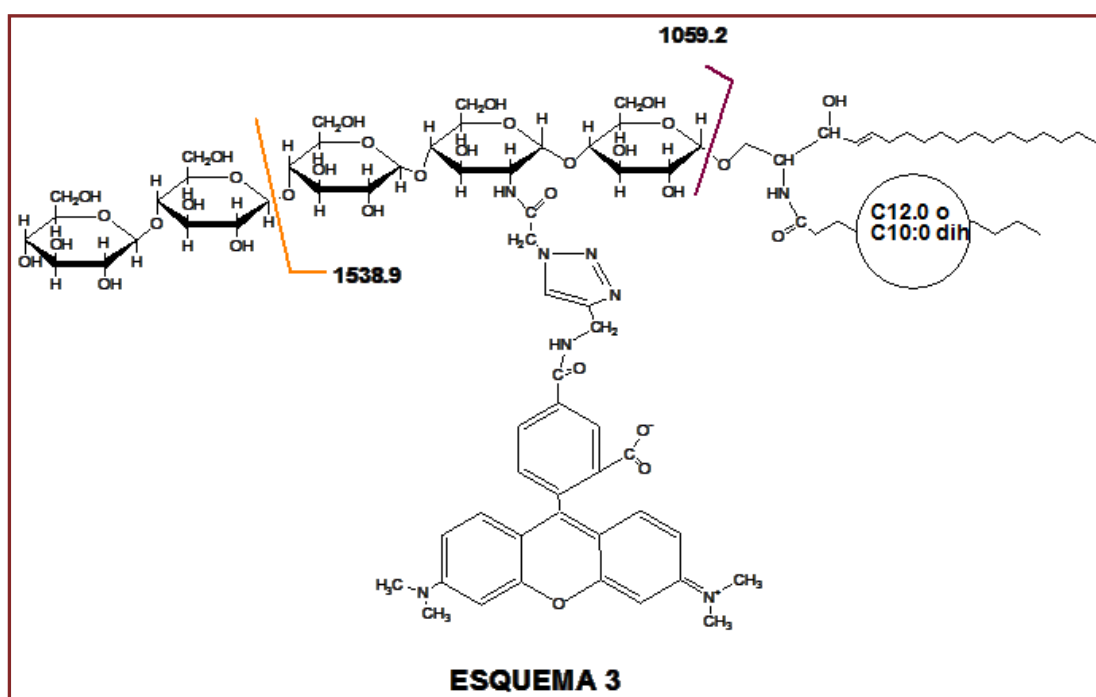


Fig.5. Espectro de masa de la banda (a) de la figura 3 C. En la parte superior se observa el rango expandido de m/z : 950–1900 Da

La señal de m/z 1706.1 (calc m/z 1705.8) puede ser atribuida al ión $[M+Na]^+$ correspondiente a una ceramida compuesta por una base esfingosínica d18:1 acilada con un ácido graso C 10:0 dihidroxilado y glicosilada con tres unidades de hexosa y una hexosamina marcada con TAMRA (esquema 3). La señal a m/z 1364.0 (calc. m/z 1364.7) correspondería a la pérdida de dos hexosas de esta última. De forma similar, la señal de m/z 1862.9 (calc. m/z 1863.9) corresponde a una base d18:1 acilada con un ácido graso C12:0 y glicosilada con cuatro unidades de hexosa y una glucosamina marcada con TAMRA. De la misma forma, la señal a m/z 1538.9 (calc. m/z 1538.8) se atribuiría a la pérdida de dos unidades de hexosas de la última. La pérdida adicional de la ceramida del ion m/z 1538.9 generaría los picos m/z 1059.2 y 1075.3 (calc m/z 1058.4 and 1074.4, ΔO). En la zona de masa menores, el pico mayoritario a m/z 764.3 (calc. m/z 765.4) corresponde atribuido a la pérdida del grupo TAMRA concomitante a la pérdida del ác. graso del ion m/z 1364.0 como $[M+H]^+$ así como a la

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

pérdida del grupo TAMRA, el ác. graso y una unidad de hexosa del ion m/z 1538.9. Una segunda pérdida de hexosa da lugar al ion m/z 603.9 (calc. m/z 604.4). Además la señal a m/z 684.1 (calc. m/z 685.2) corresponde a tres hexosas y la unidad de hexosamina. Estas estructuras están de acuerdo con las estructuras de glicoesfingolípidos previamente descritas en *P. falciparum* (Couto y colaboradores (2004)) en donde se detectaron mono, di, tri y tetrahexosilceramidas conteniendo ac. grasos C10:0, C12:0 y C14:0 mono, di y tri hidroxilados.



Esquema 3. Estructura correspondiente a la banda (a) de la figura 3 C determinada por e.m., atribuida a una ceramida compuesta por una base esfingosínica d18:1 acilada con un ácido graso C 10:0 dihidroxilado o C12:0 y glicosilada con tres unidades de hexosa y una hexosamina marcada con TAMRA

Por otra parte, cuando las bandas **c** y **d** fueron analizadas, mostraron el mismo patrón de estructuras descrita para las bandas **1** y **2** de la Fig. 3, indicando que las estructuras GPI no fueron completamente extraídas en la OPI.

Los GPIs constituyen la modificación con carbohidratos más abundante presente en *Plasmodium*, tanto en forma libre como unidos a antígenos de superficie, y están involucrados en la patogenicidad del parásito (Delorenzi y col., 2009). Las estructuras de GPI descritas hasta la

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

fecha contienen una estructura básica caracterizada por la presencia de glucosamina sin N-acetilar (rasgo característico) unida en la posición 1 a inositol y en la posición 4 a una cadena comúnmente de tres residuos de manosa. Frecuentemente, la tercera unidad de manosa se encuentra unida al extremo C- terminal de una proteína mediante una etanolamina fosfato (EtNP). Además, un fosfolípido es unido al OH-1 del inositol. Estas estructuras son producidas en una ruta biosintética a través de la acción coordinada de multicomponentes.

Basados en el conocimiento de las estructuras de los GPI del parásito, Delorenzi y col, propusieron 9 pasos, iniciado por la transferencia de NAcGlc al fosfatidilinositol. El hecho que se hayan determinado estructuras GPI luego de la incorporación metabólica de N-azido acetilglucosamina muestra que el parásito tolera análogos del sustrato natural. El segundo paso correspondería a la desacetilación de la unidad de NAcGlc, sin embargo nuestros datos indican que la N-azidoglucosamina permanece inalterada y es posteriormente manosilada. Este resultado indicaría dos posibilidades: o este paso puede ser dispensable, aunque sea en baja proporción, o el grupo azido mimetiza lo suficientemente bien al azúcar natural de forma que el paso de manosilación puede llevarse a cabo. En este sentido, aunque por búsqueda en base de datos y secuencia de mRNA y expresión en *P. falciparum* se han descrito 8 genes (PIG-A, PIG B, PIG-M, PIGO, GPI1, GPI8 y GAA-1) solo existe evidencia preliminar del gen PIG-L que codifica la N-acetilglucosaminilfosfatidilinositol de N-acetilasa responsable del paso de desacetilación (Delorenzi y col. 2002)

La fig. 6 esquematiza la ruta biosintética de los GPI postulada para *Plasmodium* con modificaciones en cuanto a la nomenclatura de los genes y las enzimas, además se detallan los links correspondientes a la base de datos DeRisiLab Malaria Transcriptome Database.

INGENIERÍA METABÓLICA EN *P. FALCIPARUM*

sensible, resultó ser útil como matriz interna para el análisis por espectrometría de masa. El hecho de que no sea necesario agregar una matriz externa indica que se lleva a cabo un proceso de desorción/volatilización/ionización por laser (UV-LDI). Sin embargo aunque LDI es un método de ionización fuerte, se obtienen espectros muy limpios. Hasta el momento este constituyó el primer ejemplo de análisis de glicolípidos por medio de incorporación metabólica de azido-azúcares.

Esta aplicación es particularmente atractiva porque disminuye el tiempo de análisis e incrementa la sensibilidad con una mínima preparación de la muestra. Los resultados muestran que esta estrategia puede convertirse en una herramienta útil tanto para estudios biosintéticos como para la elucidación de glicolípidos en *P. falciparum*, constituyendo un nuevo método para cuantificar cambios dinámicos en el patrón de glicosilación y facilitando el análisis directo por espectrometría de masas.

Páginas 164 a 186 eliminadas a pedido del autor.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- **Acosta DM, Soprano LL, Ferrero MR, Esteva MI, Riarte A, Couto AS, Duschak VG.** Parasite Immunol. 34(11):499-510. doi: 10.1111/j.1365-3024.2012.01378.x.
- **Acosta-Serrano, A, S. Schenkman, N. Yoshida, A. Mehler, J. M. Richardson, and M. A. J. Ferguson.** J. Biol. Chem. 270:27244–27253. 1995.
- **Alexander J., Russell, D. G.** Adv Parasitol. 31:175-254. 1992.
- **Alicia S. Couto, Carolina Caffaro, M. Laura Uhrig, Emilia Kimura, Valnice J. Peres, Emilio F. Merino, Alejandro M. Katzin, Masae Nishioka, Hiroshi Nonami and Rosa Erra-Balsells.** Eur. J. Biochem. 271, 2204–2214 (2004) FEBS 2004 doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04150. 2004.
- **Almeida, I. C., Camargo M. M., Procopio D. O., Silva L. S., Mehler A., Travassos L. R., Gazzinelli R. T. and Ferguson M. A.** EMBO J. 19:1476–1485. 2000.
- **Alvar J., Vélez I. D., Bern C., Herrero M., Desjeux P., Cano J., Jannin J., den Boer M., . the WHO Leishmaniasis Control Team.** Published: May 31, 2012 DOI: 10.1371/journal.pone.0035671.
- **Alvarez VE1, Kosec G, Sant Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B.** Autophagy. 2008 Apr;4(3):361-3. Epub 2008 Jan 17.
- **Alvarez VE, Kosec G, Sant'Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B.** J Biol Chem.;283(6):3454-64. Epub 2007 Nov 26. 2008.
- **Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A, Ouaissi A.** Cell Death Differ. ; 2(4):285-300. Oct, 1995.
- **Ansorge I, Jeckel D, Wieland F and Lingelbach K.** Biochem J 308: 335-341. 1995.
- **Ansorge I, Jeckel D, Wieland F, Lingelbach K.** Biochemical Journal 308:335–41. 1995.
- **Araújo A., Jansen A., Reinhard K., Ferreira L.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 104 Suppl 1:9-16. Jul, 2009.
- **Araujo-Jorge TC, De Souza W.** Acta Trop 41: 17-28. 1984.
- **Atkinson, C.T., Aikawa, M.** Blood Cells. 16: 351-68. 1990.
- **Azzouz N, Rauscher B, Gerold P, Cesbron-Delauw MF, Dubremetz JF, Schwarz RT.** International Journal for Parasitology; 32:677–84. 2002.
- **Azzouz, N., Rauscher, B., Gerold, P., Cesbron-Delauw, M.F., Dubremetz, J.F., Schwarz, R.T.** Int J Parasitol. 32: 677-84. 2002.
- **Balasubramanian K, Mirnikjoo B, Schroit AJ.** J Biol Chem;282:18357–18364. 2007.
- **Bannister L, Mitchell G.** Trends Parasitol. 19(5):209-13. Review. May, 2003.
- **Bannister LH, Hopkins JM, Fowler RE, Krishna S, Mitchell GH.** Parasitol Today. 16(10):427-33. Review. Oct, 2000.
- **Bannister, L.H., Mitchell, G.H.** J Protozool. 33: 271-5. 1986.
- **Banuls A.L., Hide M., Prugnolle F.** Adv Parasitol 64: 1–109. 2007.
- **Barnhart, B.C. Alappat, E.C. Peter, M.E.** Semin. Immunol. 15 185–193. 2003.

- **Barreto-Bergter E, Vermelho AB, Hartmann R, Pohlentz G, Klein RA, Egge H.** *Molecular and Biochemical Parasitology*; 51:263–270. 1992.
- **Bartke N. and Hannun, Y. A.** *Journal of Lipid Research*, vol. 50, supplement, pp. S91–S96, 2009.
- **Basu, S., Kaufman, B., Roseman, S.** *J Biol Chem.* 243: 5802-4. 1968.
- **Bates, P.A., Roger, M.E.** *Curr Mol Med* 4: 601–609. 2004.
- **Becker I, Wang-Eckhardt L, Yaghooftam A, Gieselmann V, Eckhardt M.** *Histochem. Cell. Biol.* 129:233–241. 2008.
- **Bejaoui, K. Wu, C. Scheffler, M.D. Haan, G. Ashby, P. Wu, L. de Jong, P., Brown Jr., R.H.** *Nat. Genet.* 27 261–262. 2001.
- **Berhe S, Schofield L, Schwarz RT, Gerold P.** *Mol Biochem Parasitol*; 103:273-278. 1999.
- **Bern C.** *J Travel Med.* 15(5):385; author reply 386. doi: 10.1111/j.1708-8305.2008.00247_1.x. Sep-Oct, 2008.
- **Bertello L., Goncalvez M.F., Colli W., de Lederkremer R.M.** *Biochemical Journal* 310:255–261. 1995.
- **Bertello L., Goncalvez M.F., Colli W., Lederkremer R.M.** *Biochemical Journal* 310:255–261. 1995.
- **Bertello L.E., Andrews N.W., Lederkremer R.M.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, 143–151. 1996.
- **Bertozzi CR and Sasisekharan R.** *Glycomics. Essentials of glycobiology* second edition. 48, 679-689. 2003.
- **Besteiro Besteiro S, Williams RA, Morrison LS, Coombs GH, Mottram JC.** *J Biol Chem.* 281(16):11384-96. Epub 2006 Feb 23. Apr 21, 2006.
- **Bielawska, A., y col.** *J. Biol. Chem.* 271, 12646. 1996.
- **Bleicher, R. J., and M. C. Cabot.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1585 : 172 – 178 . 2002.
- **Bleicher, R. J., and M. C. Cabot.** *Biochim. Biophys. Acta*, págs. 1585: 172-178. 2002.
- **Bontempi E., Franke de Cazzulo B.M., Ruiz A.M., Cazzulo J.J.** *Comp Biochem Physiol* 77B: 599-604. 1984.
- **Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z, Kolesnick R.** *Cell.* 82:405–414. 1995.
- **BoseDasgupta S, Das BB, Sengupta S, Ganguly A, Roy A, Dey S, et al.** *Cell Death Differ*; 15:1629-40. 2008.
- **Breckenridge, D.G., Germain, M. Mathai, J.P. Nguyen, M. Shore, G.C.** *Oncogene* 22 8608–8618. 2003.
- **Brener Z.** *Annu Rev Microbiol.*27:347-82. 1973.
- **Breton C, Heissigerová H, Jeanneau C, Moravcová J, Imberty A, Rigden, O.L. Franco and D.J.** *Biochem Soc Symp.* (69):23-32. 2002.
- **Bromley, P. E., Li, Y. O. Murphy S. M, Sumner, C. M. and Lynch, D. V.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 417, no. 2, pp. 219–226, 2003.
- **Burleigh B.A., Woolsey A.M.** *Cell Microbiol.* 2002 Nov; 4(11):701-11.
- **Bursch, W., Hochegger, K., Torok, L., Marian, B., Ellinger, A., and Hermann,**
- **Butcher, G.A.** *Bull World Health Organ.* 57: 17-26. 1979.
- **Camargo, M. M., Andrade, A. C. Almeida I. C., Travassos L. R., and Gazzinelli R. T.** *J. Immunol.* 159:6131– 6139. 1997.

- **Campbell, J., Davies, G., Bulone, V., and Henrissat, B.** *Biochem. J.* 329, 929–939. 1998.
- **Carter H. E., W. J. Haines, W. E. Ledyard, and W. P. Norris.** *J. Biol. Chem.* 169 77–82. 1947.
- **CDC,** <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/>.
- **Chakraborti S.** *Cell Signal*;15:637–665. 2003.
- **Chalfant CE, Kishikawa K, Mumby MC, Kamibayashi C, Bielawska A, Hannun YA.** *J Biol Chem*; 274:20313–20317. 1999.
- **Charnock SJ, Davies GJ.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 55(Pt 3):677-8. 1999.
- **Chiu CP, Lairson LL, Gilbert M, Wakarchuk WW, Withers SG, Strynadka NC.** *Biochemistry.*46:7196–7204. 2007
- **Coppolino MG, Dierckman R, Loijens J, Collins RF, Pouladi M, Jongstra-Bilen J, Schreiber AD, Trimble WS, Anderson R, Grinstein S.** *J Biol Chem*;277:43849–43857. 2002.
- **Coura J.R., Dias J.C.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jul;104 Suppl 1:31-40. *Chagas, C. Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 159–218, 1909.
- **Coutinho PM, Henrissat B.** In **HJ Gilbert, G Davies, B Henrissat, B Svensson, eds.** *The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom,* pp 3–12. 1999a.
- **Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J. and Henrissat, B. (2003).** *J. Mol. Biol.* 328: 307–317.
- **Couto AS, Zingales B, de Lederkremer RM, Colli W.** *Experientia.*;41(6):736-8. 1985.
- **Couto, A. S.; Caffaro, C.; Uhrig, M. L.; Kimura, E.; Peres, V. J.; Merino, E. F.; Katzin, A. M.; Nishioka, M.; Nonami H. and Erra-Balsells, R.** *FEBS, Eur. J. Biochem,* págs. 271, 2204–2214. 2004.
- **Couto, A.S., Caffaro, C., Uhrig, M.L., Kimura, E., Peres, V.J., Merino, E.F., Katzin, A.M., Nishioka, M., Nonami, H., Erra-Balsells, R.** *Eur J Biochem.*; 271: 2204-14.14. 2004.
- **Cunningham A.C.** *Exp Mol Pathol.* Apr; 72(2):132-41. 2002.
- **Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek OA, Coso O, Gutkind S, Spiegel S,** *Nature* 381: 800-803. 1996.
- **Da Silveira J.F., and Colli W.** *Biochimica et Biophysica Acta* 644:341–350. 1981.
- **Daido, S., Kanzawa, T, Yamamoto, A. Takeuchi, H. Kondo, Y. Kondo, S.** *Cancer Res.* 64 (2004) 4286–4293.
- **Das R, Roy A, Dutta N, Majumder HK.** *Apoptosis*; 13:867-82. 2008.
- **Dawkins, J.L., Hulme, D.J. Brahmhatt, S.B., Auer-Grumbach, M. Nicholson, G.A.** *Nat. Genet.* 27 309–312. 2001.
- **deVries, E. G.E., Gietema, J. A. and de Jong, S.** *Clin Cancer Res* 2006;12(8) April 15, 2006 <http://www.aacrjournals.org/>.
- **de Carvalho T.M., de Souza W.** *Cell Struct Funct.* (4):383-92. Aug 14, 1989.
- **de Lederkremer RM, Zingales B, Confalonieri AN, Couto AS, Martin NF, Colli W.** *Biochem Int.*; 10(1):79-88. 1985.
- **de Souza W.** *Parasitol Res* 88:1013–1025. 2002.
- **de Souza W., de Carvalho T.M., Barrias E.S.** *Int J Cell Biol.* 2010; 2010. pii: 295394. doi: 10.1155/2010/295394. Epub Jul 29, 2010.

- **de Souza W., Sant'Anna C., Cunha-e-Silva N.L.** J Protozool 24: 591-595. Prog Histochem Cytochem. 44(2):67-124. doi: 10.1016/j.proghi.2009.01.001. Epub Apr 5, 2009.
- **de Souza, W.;** Attias, M.; Rodrigues, J.C.. Int. J. Biochem. Cell Biol. 41, 2069–2080. 2009.
- **DEANE L.M.** Rev Bras Malariol Doencas Trop.; 16:27-48. Jan-Mar, 1964.
- **Debierre-Grockiego F and Schwarz RT.** Glycobiology. 20: 801–811. 2010.
- **Delorenzi M, Sexton A, Shams-Eldin H, Schwarz RT, Speed T and Schofield L.** Infect Immun 70: 4510–4522. 2002.
- **Denny PW, Goulding D, Ferguson MA, Smith DF.** Mol Microbiol 52:313–327. 2004.
- **Denny PW, Shams-Eldin H, Price HP, Smith DF, Schwarz RT.** J Biol Chem 281:28200–28209. 2006.
- **Denny, P. W., Shams-Eldin, H. Price, H. P. Smith, D. F. and Schwarz, R. T.** Journal of Biological Chemistry, vol. 281, no. 38, pp. 28200–28209, 2006.
- **Díaz D., Finn M. G., Sharpless K. B., Fokin V. V., Hawker C. J.** An. Quím. 2008, 104(3), 173–180). 2007.
- **Divecha N., Irvine R.F.** Cell;80:269–278. 1995.
- **Docampo R., de Souza W., Miranda K., Rohloff P., Moreno S.N.** Nat Rev Microbiol 3:251–26. 2005.
- **Dollet, M.; Sturm, N.R.; Campbell, D.A.** Infect. Genet. Evol. 12, 299–308. 2012.
- **Dunn, WA Jr.** J Cell Biol. 1990 Jun;110(6):1935-45.1990b.
- **Dunn, WA Jr.** J Cell Biol. 1990 Jun;110(6):1923-33.1990a.
- **Durrant, LG., Noble, P., Spendlove I.** Clin Exp Immunol 167:206-215. 2012.
- **Elliott K, Ge K, Du W, Prendergast GC.** Oncogene.;19(41):4669-84. 2000.
- **Elmendorf HG, Haldar K.** Journal of Cell Biology 124:449–62. 1994.
- **Elmendorf, H.G., Haldar, K.** J Cell Biol. 124: 449-62. 1994.
- **Evans R. A.** Australian Journal of Chemistry 60 (6): pp.384–395. doi:10.1071/CH06457. 2007.
- **Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM.** J Immunol;148:2207–2216. 1992.
- **Fankhauser, C., S. W. Homans, J. E. Thomas-Oates, M. J. McConville, C. Desponds, A. Conzelmann, and M. A. J. Ferguson.** J. Biol. Chem. 268:26365–26374. 1993.
- **Feng, Y.A. Hannun, J.** Biol. Chem. 273 (1998) 26870–26874].
- **Ferguson, M. A.** J. Cell Sci. 112:2799–2809. 1999.
- **Ferguson, M. A., S. W. Homans, R. A. Dwek, and T. W. Rademacher.** Science 239:723–728. 1988.
- **Fernandes, M. C. Cortez, M. Flannery, A. R. Tam, C. Mortara, R. A. and Andrews, N. W.** Journal of Experimental Medicine, vol. 208, no. 5, pp. 909–921, 2011.
- **Fernandez Rodriguez, J.C., Lima Prado Godinho, J., De Souza W.** Chapter 1, Proteins and proteomics of Leishmania and Trypanosoma, Subcellular Biochemistry 74, DOI 10.1007/978-94-007-7305-9_1. Springer Science+Business Media Dordrecht, 2014.
- **Ferri, K.F. Kroemer, G.** Nat. Cell Biol. 3 E255–E263. 2001.

- **Figarella K, Rawer M, Uzcategui NL, Kubata BK, Lauber K, Madeo F, et al.** Cell Death Differ; 12:335-46. 2005.
- **Figueiredo, J. M., Dias, W. B., Mendonca-Previato, L., Previato, J. O., and Heise, N.** Biochem. J. 387, 519–529, 2005.
- **Foghsgaard, L. Wissing, D. Mauch, D. Lademann, U. Bastholm, L. Jaattela, M. M.** Oncogene 23 2746–2756. 2004.
- **Fredman, P. Hedberg, K. Brezicka, T.** BioDrugs 17 155–167. 2003.
- **Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, DosReis GA, Lopes MF.** Nature. 2000 Jan 13;403(6766):199-203. Erratum in: Nature;404(6780):904. Apr 20; 2000.
- **Furuya, T.; Kessler, P.; Jardim, A.; Schnauffer, A.; Crudder, C.; Parsons, M.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 14177–14182. 2002.
- **Futerman A.H. and Hannun Y.A.** EMBO. 2004.
- **Futerman AH, Pagano RE.** Biochem J.. 280 (Pt 2):295-302. Dec 1, 1991.
- **Gallego, M.A. Joseph, B. Hemstrom, T.H. Tamiji, S. Mortier, L. Kroemer, G. Formstecher, P. Zhivotovsky, B. Marchetti, P.** Oncogene 23 6282–6291; 2004.
- **Gannavaram S, Vedvyas C, Debrabant A.** J Cell Sci; 121:99-109. 2008.
- **García EA, Ziliani M, Agüero F, Bernabó G, Sánchez DO, Tekiel V.** PLoS Negl Trop Dis. 2010 Oct 5;4(10). pii: e841. doi: 10.1371/journal.pntd.0000841. 2010.
- **Georgopapadakou NH.** Expert Opinion on Investigational Drugs;9:1787–96. 2000.
- **Gerold P and Schwarz RT.** Mol Biochem Parasitol; 112:29-37. 2001.
- **Gerold P, Dieckmann-Schuppert A, Schwarz RT.** J Biol Chem; 269:2597-2606. 1994.
- **Gerold P, Jung N, Azzouz N, Freiberg N, Kobe S and Schwarz RT.** Biochem J. 344:731-738. 1999.
- **Gerold P, Schofield L, Blackman MJ, Holder AA, Schwarz RT.** Mol Biochem Parasitol; 75:131-143. 1996.
- **Gerold P, Schwarz RT.** Molecular and Biochemical Parasitology; 112:29–37. 2001.
- **Gerold, P., Schwarz, R.T.** Biosynthesis of glycosphingolipids de-novo by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 112: 29-37. 2001.
- **Gowda DC, Gupta P, Davidson EA.** J Biol Chem; 272:6428 -39. 1997.
- **Gualdrón-Lopez, M.; Brennand, A.; Hannaert, V.; Quinones, W.; Caceres, A.J.; Bringaud, F.; Concepcion, J.L.; Michels, P.A.** Int. J. Parasitol. 42, 1–20. 2012.
- **Gulbins E, Dreschers S, Bock J.** Exp Physiol; 88:85-90; 2003.
- **Gull K.** Annu Rev Microbiol. 1999;53:629-55. Review.
- **H. Birbes, S. El Bawab, Y.A. Hannun, L.M. Obeid,** FASEB J. 15 2669–2679. 2001.
- **Haanstra, J.R.; van Tuijl, A.; Kessler, P.; Reijnders, W.; Michels, P.A.; Westerhoff, H.V.; Parsons, M.; Bakker, B.M.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 17718–17723. 2008.
- **Hahn, H.P. Pang, M. He J., Hernandez, J.D. Yang, R.Y. Li, L.Y. Wang, X. Liu, F.T. Baum L.G.,** Cell Death Differ. 11 1277–1286. 2004.
- **Hakomori, S.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 10231–10233. 2002.

- **Hakomori, S., Kanfer J.N., Hakomori S.** (Eds.), *Sphingolipid Biochemistry*, Plenum Press, New York, pp. 1–165. 1983.
- **Haldar K, Uyetake L, Ghori N, Elmendorf HG, Li WL.** *Mol Biochem Parasitol* 49: 143-156. 1991.
- **Haldar K, Uyetake L, Ghori N, Elmendorf HG, Li WL.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 49:143–56. 1991.
- **Haldar K., Sophien Kamoun, N. Luisa Hiller*, Souvik Bhattacharje* and Christiaan van Ooij** .922, DEC, 2006, VOLUME 4 www.nature.com/reviews/micro.
- **Hanada K.** *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 58:131–48. 2005.
- **Hanada, K.** *Biochimica et Biophysica Acta*, vol.1632, no. 1–3, pp. 16–30, 2003.
- **Hannun, Y.A.** *Science*. 274,1855. 1996.
- **Hannun Y. A. and Obeid, L. M.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, no. 2, pp. 139–150, 2008.
- **Hannun, Y. A. Loomis, C. R. Merrill, A. H. and Bell, R. M.** *Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, no. 27, pp. 12604–12609, 1986.
- **Haynesa, C.A., Allegoodc, J. C. , Park, H., Sullards, C. M. C.** *Journal of Chromatography B*, 877 2696–2708. 2009.
- **Heinrich M, Wickel M, Winoto-Morbach S, Schneider-Brachert W, Weber T, Brunner J, Saffig P, Peters C, Krönke M, Schütze S.** *D. Adv Exp Med Biol*;477:305–315. 2000.
- **Heise, N., M. L. Cardoso de Almeida, and M. A. J. Ferguson.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 70:71–84. 1995.
- **Hengartner MO.** *Nature*; 407:770-6. 2000.
- **Hengartner, MO.** *Nature*. 407(6805):770-6. Review. Oct 12; 2000.
- **Herwaldt B.L.** *Clin Microbiol Rev.* 14(4):659-88. Oct 2001.
- **Heung LJ, Luberto C, Del Poeta M.** *Infection and Immunity*; 74:28–39.2006.
- **Hoare, C.A.** *Meditinskaiia parazitologija i parazitarnye bolezni*, 40, 307–309. 1971.
- **Holthuis, J. C. M. Tafesse, F. G. and Ternes, P.** *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 40, pp. 29421–29425, 2006.
- **Homans, S. E., Ferguson M. A. J., Dwek R. A., Rademacher T. W., Anand R., and Williams A. F.** *Nature* 333:269–272. 1988.
- **Hsiao LL, Howard RJ, Aikawa M, Taraschi TF.** *Biochem J.*; 274 (Pt 1):121–32. 1991.
- **Huitema, K. Van Den Dikkenberg, J. Brouwers, J. F. H. M. and Holthuis J. C. M.,** *EMBO Journal*, vol. 23, no. 1, pp. 33–44, 2004.
- **Hung, W.C. Chang, H.C. Chuang, L.Y.** *Biochem. J.* 338 (Pt 1) 161. 1999.
- **Ichikawa, S., Ozawa, K., Hirabayashi, Y.** *Biochem Biophys Res Commun.* 253: 707-11.17.1998.
- **Ichikawa, S., Sakiyama, H., Suzuki, G., Hidari, K.I., Hirabayashi, Y** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 4638-43. 1996.
- **Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A.** *J Cell Biol.*157(3):455-68. Epub 2002 Apr 29. 2002.
- **Isogai C, Murate K, Tamiya-Koizumi K, Yoshida S, Ito T, Nagai H, Kinoshita T, Kagami Y, Hotta T, Hamaguchi M, Saito H,** *Exp Hematol* 26: 1118-1125. 1998.

- **Ivens AC, Peacock CS, Worthey E.A., et al.** *Science* 309:436–442. 2005.
- **J. Liang, S.H. Shao, Z.X. Xu, B. Hennessy, Z. Ding, M. Larrea, S. Kondo, D.J. Dumont, Nat Cell Biol.**9(2):218-24. Epub 2007 Jan 21. 2007.
- **J.U. Gutterman, C.L. Walker, J.M. Slingerland, G.B. Mills,** *Nat. Cell Biol.* 9 218–224. 2007.
- **Jaattela, M.** *Oncogene* 23 (2004) 2746–2756.
- **Jaikaria, N.S., Rozario, C., Ridley, R.G., Perkins, M.E.** *Mol Biochem Parasitol.*1993; 57: 269-79. Vickerman and Cox, 1967.
- **Jewetta J. C. and Bertozzi C. R.** *Chem Soc Rev.*; 39(4): 1272–1279. April, 2010.
- **Jimenez-Ruiz A, Alzate JF, Macleod ET, Luder CG, Fasel N, Hurd H.** *Parasit Vectors*; 3:104. 2010.
- **Kaneshiro ES, Jayasimhulu K, Lester RL.** *J Lipid Res.* 1986 Dec;27(12):1294-303.
- **Kang R, Saito H, Ihara Y, Miyoshi E, Koyama N, Sheng Y & Taniguchi N.** *J Biol Chem* 271:26706-26712. 1996.
- **Khan SM1, Waters AP.** *Trends Parasitol.* 20(12):575-80. Dec, 2004.
- **Kimura EA, Couto AS, Peres VJ, Casal OL and. Katzin AM.** *J Biol Chem* 271:14452-14461. 1996.
- **Kinoshita, T., and Inoue N.** *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:632–638. 2000.
- **Kinoshita, T., K. Ohishi, and Takeda J.** *J. Biochem. (Tokyo)* 122:251–257. 1997.
- **Klionsky DJ, Emr SD.** *Science.*; 290(5497):1717-21. Dec.1, 2000.
- **Kobayashi, T., Honke, K., Miyazaki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ishizuka, I., Makita, A.** *J Biol Chem.* 1994; 269: 9817-21.
- **Kollien, A. H., and Schaub, G. A.** *Parasitol. Today* 16, 381–387. 2000.
- **Kolb H. C., Finn M. G. and Sharpless K. B.** *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. Angewandte Chemie International Edition* 40 (11): pp. 2004–2021. 2001.
- **Kolter T. and Sandhoff, K,** *Angewandte Chemie*, vol. 38, no. 11, pp. 1532–1568, 1999.
- **Kolter, T., Proia, R. L., and Sandhoff, K.** *J. Biol. Chem.* 277, 25859–25862. 2002.
- **Koyama N, Miyoshi E, Ihara Y, Kang R, Nishikawa A, Taniguchi N.** *Eur J Biochem* 238:853-861. 1996.
- **Landoni M, Duschak VG, Erra-Balsells R and Couto AS.** *J Am Soc Mass Spectrom*; 19:923–926. 2008.
- **Landoni M, Duschak VG, Peres VJ, Nonami H, Erra-Balsells R, Katzin AM; Couto AS.** *Mol Biochem Parasitol* 154: 22-29. 2007.
- **Lauer S, VanWye J, Harrison T, McManus H, Samuel BU, Hiller NL, Mohandas N, Haldar K.** *EMBO J.*;19(14):3556-64. 2000.
- **Lauer SA1, Ghorri N, Haldar K.** *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 92(20):9181-5. 1995 Sep 26.
- **Laughlin ST, Agard NJ, Baskin JM, Carrico IS, Chang PV, Ganguli AS, Hangauer MJ, Lo A, Prescher JA, Bertozzi CR.** *Methods Enzymol* 415: 230-50. 2006.
- **Leist M, Jäättelä M.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(8):589-98. Review. 2001.
- **Levine B, Yuan J.** *J Clin Invest.* 2005 Oct;115(10):2679-88. Review. Erratum in: *J Clin Invest.*; 116(12):3293. Dec, 2006.

- **Levine, N. D., Corliss J.O., Cox F.E., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R. 3rd, Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J., Wallace F.G.** J. Protozool. 27:37-58. 1980.
- **Liu, Y. Y., T. Y. Han, A. E. Giuliano, and M. C. Cabot.** FASEB J. 15 : 719 – 730. 2001.
- **Liu, Y. Y., Han T. Y., Giuliano A. E., and Cabot M. C.** . FASEB J., págs. 15 : 719- 730. 2001.
- **Liu, Y. Y., Han T. Y., Yu J. Y., Bitterman A., Le A., Giuliano A. E. and Cabot M. C.** J. Lipid Res., págs. 45: 933-940. 2004.
- **Lucci, A., W. I. Cho, T. Y. Han, A. E. Giuliano, D. L. Morton, and M. C. Cabot.** Anticancer Res. 18 : 475 – 480 . 1998.
- **Lucci, A., Cho W. I, Han T. Y., Giuliano A. E., Morton D. L. and Cabot M.C.** Anticancer Res., págs. 18:475-480. 1998.
- **Luder CG, Campos-Salinas J, Gonzalez-Rey E, van Zandbergen G.** Parasit Vectors; 3:116. 2010.
- **Lukes J., Guilbride D.L., Votýpka J., Zíková A., Benne R., Englund P.T.** Eukaryotic Cell 1: 495–502. 2002.
- **Maceyka M, Payne SG, Milstein S, Spiegel S.** Biochim Biophys Acta, 2002; 1585: 193-205.
- **Maceyka M., Payne S.G, Milstein S., Spiegel S.** Biochim Biophys Acta, págs. 1585: 193-205. 2002.
- **Maguire PA, Prudhomme J, Sherman IW.** Parasitology. 102 Pt 2:179-86. 1991.
- **Majerus P.W., Connolly T.M., Deckmyn H., Ross T.S., Bross T.E., Ishii H., Bansal V.S., Wilson D.B.** Science. 234(4783):1519-26. 1986.
- **Marasas, W.F. Riley, R.T. Hendricks, K.A. Stevens, V.L. Sadler, T.W. Gelineau-van Waes, J. Missmer, S.A. Cabrera, J. Torres, O. Gelderblom, W.C. Allegood, J. Martinez, C. Maddox, J. Miller, J.D. Starr, L. Sullards, M.C. Roman, A.V.. Voss, K.A Wang, E., Merrill Jr., A.H.** J. Nutr. 134 711–716. 2004.
- **Marechal E, Azzouz N, Santos de Macedo C, Block MA, Feagin JE, Schwarz RT, Joyard J.** Eukaryotic Cell; 1:653-656. 2002.
- **Marks D.L., Dominguez M, Wu K, Pagano RE.** J Biol Chem. 2001 Jul 13;276(28):26492-8. Epub May 3, 2001.
- **Marks, D. L., Wu, K., Paul, P., Kamisaka, Y., Watanabe, R., and Pagano, R. E.** J. Biol. Chem. 274, 451–456. 1999.
- **Marks, David L. Wu K, Paul P, Kamisaka Y, Watanabe R, Pagano RE.** The Journal of Biological Chemistry, Vol. 274. 1999.
- **McConville, M. J., S. W. Homans, J. E. Thomas-Oates, A. Dell, and A. Bacic.** J. Biol. Chem. 265: 7385–7394. 1990.
- **Megan L., Mickum, Nina S. Prasanphanich, Jamie Heimborg-Molinaro, Kristoffer E. Leon and Richard D. Cummings.** Department of Biochemistry, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA) de REVIEW ARTICLE Front. Genet., | doi: 10.3389/fgene.2014.00262 05 Aug, 2014.
- **Mendez TL, De Chatterjee A, Duarte TT, Gazos-Lopes F, Robles-Martinez L, Roy D, Sun J, Maldonado RA, Roychowdhury S, Almeida IC,**

- Das S. *J Biol Chem.* 7;288(23):16747-60. doi: 10.1074/jbc.M112.438416. Epub 2013 Apr 14. 2013.
- **Menna-Barreto RF, Goncalves RL, Costa EM, Silva RS, Pinto AV, Oliveira MF, de Castro SL.** *Free Radic Biol Med.*; 47(5):644-53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.004. Epub 2009 Jun 6. Sep 1, 2009.
 - **Merrill A. H. and Sandhoff, K.** *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, D. E. Vance and J. E. Vance, Eds., pp. 373–407, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2002.
 - **Merrill A. H. and Sandhoff, K.** D. E. Vance and J. E. Vance, Eds., pp. 373–407, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2002.
 - **Merryl, A.H.** *J.Biol Chem*, págs. 277: 25843-25846. 2002.
 - **Metzler, D. E.** *Biochemistry; The Chemical Reactions of Living Cells*, vol. 1-2, Elsevier, 2nd edition, 2003.
 - **Metzler, D. E.** *The Chemical Reactions of Living Cells*, vol. 1-2, Elsevier, 2nd edition, Biochemistry Research International. 2003.
 - **Michels, P.A.; Bringaud, F.; Herman, M.; Hannaert, V.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1763, 1463–1477. 2006.
 - **Miller, L.H., Good, M.F., Milon, G.** *Science.* 264: 1878-83. 1994.
 - **Mina JG, Mosely JA, Ali HZ, Shams-Eldin H, Schwarz RT, Steel PG, et al.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 42:1553–61. 2010.
 - **Mina JG, Pan SY, Wansadhipathi NK, Bruce CR, Shams-Eldin H, Schwarz RT, et al.** *Molecular and Biochemical Parasitology;* 168:16–23. 2009.
 - **Mitamura, T. & Palacpac, N.M.Q.** *Microbes Infect.* 5, 545–552. 2003.
 - **Miyashita, T., Reed, J.C.** *Cell* 80 293–299; 1995.
 - **Mizutani, Y., Mitsutake S, Tsuji K, Kihara A, Igarashi Y.** *Biochimie.* 91:784–790. 2009.
 - **Mohney, R. P., Knez J. J., Ravi L., Sevlever D., Rosenberry T. L., Hirose S., and Medof M. E.** *J. Biol. Chem.* 269:6536–6542. 1994.
 - **Molyneux D., Ashford R.** Taylor and Francis, London. 1983.
 - **Morad S.A.F, Madigan, J. P., Levin, J. C., Abdelmageed, N., Karimi, R, Rosenberg, D.W., Sriram M.K., Shanmugavelandy, S., Cabot, M. C.** *Biochem Pharmacol.* 2013 April 15; 85(8): 1057–1065. doi:10.1016/j.bcp.2013.01.015.
 - **Moreira, D.; Lopez-Garcia, P.; Vickerman, K.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1861–1875. 2004.
 - **Müller, S., Kappes, B.** *Trends Parasitol.* 23: 112-21. 2007.
 - **Mullen D, Hannun Y.A., Obeid L.M.,** *Biochem J.* 441(3):789-802. doi: 10.1042/BJ20111626. 2012.
 - **Mullen TD, Jenkins RW, Clarke CJ, Bielawski J, Hannun YA, Obeid LM.** *J. Biol. Chem.* 286:15929–15942. 2011.
 - **Murphy, S.C., Fernandez-Pol, S., Chung, P.H., Prasanna Murthy, S.N., Milne, S.B., Salomao, M., Brown, H.A., Lomasney, J.W., Mohandas, N., Haldar, K.** *Blood*, 110: 2132-9. 2007.
 - **Murray, P. J., Spithill T. W., and Handman E.** *J. Immunol.* 143:4221–4226. 1989.
 - **Murray, P. J., Spithill T. W., and Handman E.** *J. Immunol.* 143:4221–4226. 1989.

- **Myler, P.J.** Adv Exp Med Biol 625: 133–140. 2008.
- **Nagao, E., Kaneko, O., Dvorak, J.A.** J Struct Biol. 130: 34-44. 2000.
- **Naik RS, Branch OH, Woods AS, Vijaykumar M, Perkins DJ, Nahlen BL, Lal AA, Cotter RJ, Costello CE, Ockenhouse CF, et al.** J Exp Med 192:1563–1576. 2000.
- **Nakano, K. and Vousden, K.H.** Mol. Cell 7 683–694. 2001.
- **Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C, Pérez JM.** Trends Parasitol; 20:375–380. 2004.
- **Nicotera, P. Melino, G.** Oncogene 23 2757–2765. 2004.
- **Nogueira, N, Bianco, C, Cohn, Z.** J Exp Med 142: pp. 224-229. 1975.
- **Novgorodov, S.A., Wu BX, Gudz TI, Bielawski J, Ovchinnikova TV, Hannun YA, Obeid L.M. et al.** J. Biol. Chem. 286:25352–25362. 2011.
- **Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jäättelä M.** Proc Natl Acad Sci U S A. 97(14):7871-6. 2000.
- **Oda, E. Ohki, R. Murasawa, H. Nemoto, J. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi, T., Tanaka, N.** Science 288 1053–1058; 2000.
- Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment
- **Ogretmen B. & Hannun Y.A.** Nature Reviews Cancer 4, 604-616 (August 2004).
- **Ohanian J. and Ohanian, V.** Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 58, no. 14, pp. 2053–2068, 2001.
- **Olivera A, Spiegel S,** Nature 365: 557-560. 1993.
- **Osawa, Y. Banno, Y. Nagaki, M. Brenner, D.A., Naiki T., Nozawa, Y. Nakashima, S. Moriwaki, H. J.** Immunol. 167(1):173-8. 2001.
- **P. Zhang, B. Liu, G.M. Jenkins, Y.A. Hannun, L.M. Obeid,** J. Biol. Chem. 272 , 9609–9612. 1997.
- **Parsons, M.** Molecular Microbiology 53 (3), 717–724 doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04203.x2004. 2004.
- **Pata, M. O. Hannun, Y. A. and C. K.-Y. Ng.** New Phytologist, vol. 185, no. 3, pp. 611–630, 2010.
- **Paulson J & Colley K.** J Biol Chem 264:17615-17618. 1989.
- **Paumen, M. B., Ishida, Y., Muramatsu, M., Yamamoto, M., and Honjo, T.** J. Biol. Chem. 272, 3324–3329. 1997.
- **Pereira KS, Schmidt FL, Barbosa RL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA.** Adv Food Nutr Res. 2010;59:63-85. doi: 10.1016/S1043-4526(10)59003-X. Review. Epub Jun 24, 2010.
- **Perez C. J., Lymbery A. J., and Andrew Thompson R.C.** Trends in Parasitology, Vol. 30, No. 4, 176-182. April 2014.
- **Pérez-López FR, Chedraui P.** Arch Gynecol Obstet. 2010 Dec;282(6):595-9. doi: 10.1007/s00404-010-1553-7. Review. Epub Jun 18, 2010.
- **Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F. C., Meijer, A. J., and Codogno, P.** J. Biol. Chem. 275, 992–998. 2000.
- **Petry, K., Nudelman, E., Eisen, H., Hakomori, S.** Mol Biochem Parasitol. 30: 113-21. 1988.
- **Podlipaev, S.A.** Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 95, 517–522. 2000.
- **Quiñones W., Urbina J.A., Dubourdieu M., Concepción J.L.** Experimental Parasitology 106:135–149. 2004.

- **R. S. J.** Cell Sci. 113, 1189–1198. 2000.
- **Raas-Rothschild, A. Pankova-Kholmyansky, I. Kacher Y., and Futerman, A. H.** Glycoconjugate Journal, vol. 21, no. 6, pp. 295–304, 2004.
- **Rabionet M, van der Spoel AC, Chuang CC, von Tumpling-Radosta B, Litjens M, Bouwmeester D, Hellbusch CC, Korner C, Wiegandt H, Gorgas K.** J. Biol. Chem. 283:13357–13369. 2008.
- **Rassi A. Jr1, Rassi A., Marin-Neto J.A.** Lancet. 17;375 (9723):1388-402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X. Apr, 2010.
- **Rhee SG.** Annu Rev Biochem; 70:281–312. 2001.
- **Rico E, Alzate JF, Arias AA, Moreno D, Clos J, Gago F, et al.** Mol Biochem Parasitol; 163:28-38. 2009.
- **Rini, J, Esko, J. and Varki, A.** *Essentials of Glycobiology. 2nd edition.* NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- **Roberts, W. L., S. Santikarn, V. N. Reinhold, and T. L. Rosenberry.** J. Biol. Chem. 263:18776–18784. 1988.
- **Rodrigues Coura, J. Albajar Viñas P.** *Chagas disease outlook S6-S7, 24-6-* www.nature.com/outlooks. 2010.
- **Rosenberg, A and Schengrund, C.** Rosenberg,A. and Schengrund.C. (eds), *Biological Roles of Sialic Acid* Plenum Press, New York and London, pp. 295-359. 1976.
- **Ross R.** Br Med J. Nov 28;2 (2239):1401. 1903
- **Rovina, P. Schanzer, A. Graf, C., Mechtcheriakova, D., Jaritz, M. and Bornancin, F.** Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1791, no. 10, pp. 1023–1030, 2009.
- **Saito H, Gu J, Nishikawa A, Ihara Y, Fujii J, Kohgo Y & Taniguchi N.** Eur J Biochem 233:18-26. 1995.
- **Salto M.L., Bertello L.E., Vieira M., Docampo R., Moreno S.N., Lederkremer R.M.** Eukaryot Cell 2:756–768. 2003.
- **Samanta S, Stiban J, Maugel TK, Colombini M.** Biochim. Biophys. Acta. 1808:1196–1201. 2011.
- **Sandhoff, K. Kolter, T. Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B Biol. Sci. 358 (2003) 847–861., R.W. Watts, Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B Biol. Sci. 358 (2003) 975–983.** 2003.
- **Sant'Anna C, Parussini F, Lourenço D, de Souza W, Cazzulo JJ, Cunha-e-Silva NL.** Histochem Cell Biol. 2008 Dec;130(6):1187-98. doi: 10.1007/s00418-008-0486-8. Epub 2008 Aug 12.Liu y col., 2005.
- **Santarius M, Lee CH, Anderson RA.** Biochem J;398:1–13. 2006.
- **Scarlatti, F. Bauvy, C. Ventruti, A. Sala, G. Cluzeaud, F. Vandewalle, A. Ghidoni, R. Codogno, P.** J. Biol. Chem. 279 18384–18391. Vol. 279, No. 18, Issue of April 30, pp. 18384–18391, 2004.
- **Scarlatti, F. Bauvy, C. Ventruti, A. Sala, G. Cluzeaud, F. Vandewalle, A. Ghidoni, R. Codogno, P.** J. Biol. Chem. 279 (2004) 18384–18391.
- **Schauer, R., Wember, M., Howard, R.J.** Hoppe Seylers Z Physiol Chem.; 365: 185-94. 1984.
- **Schmidt A, Schwarz RT, Gerold P** Exp Parasitol; 88:95-102. 1998.
- **Schmidt, A., R. T. Schwarz, and P. Gerold.** Exp. Parasitol. 88:95–102. 1998.

- **Schneider, P., Ferguson M. A. J., McConville M. J., Mehlert A., Homans S. W., and Bordier C.** *J. Biol. Chem.* 265:16955–16964. 1990.
- **Schulze H. and Sandhoff, K.** Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, vol. 3, no. 6, 2011.
- **Schwartz, G.K. Ward, D. Saltz, L. Casper, E.S. Spiess, T. Mullen, E. Woodworth J., Venuti, R. Zervos, P. Storniolo, A.M. Kelsen, D.P.** *Clin. Cancer Res.* 3 (1997) 537–543.
- **Sellers, W.R. Fisher, D.E.** *J. Clin. Invest.* 104 1655–1661.1999.
- **Shapiro TA, Englund PT.** *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 117, 43. 1995.
- **Sharma, D. K., Smith T. K., Weller C. T., Crossman A., Brimacombe J. S. and Ferguson M. A. J.** *Glycobiology* 9:415–422. 1999.
- **Shi Y.** *Mol Cell*; 9:459-70. 2002.
- **Shin J., Oh J, Kim Y, Jung J & Chung J.** *J Korean Med Sci* 26: 417-424. 2011.
- **Shlomai J.** *Curr. Mol. Med.* 4 (6): 623–47. 2004.
- **Simpson, A.G.; Stevens, J.R.; Lukes, J.** *Trends Parasitol.* 22, 168–174. 2006.
- **Siskind LJ, Colombini M.** *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1797:1239–1244. [PubMed: 20100454]; *J. Biol. Chem.* 275:38640–38644. 2000.
- **Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M.** *J. Biol. Chem.*; 277:26796–26803. 2002.
- **Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M.** *Mitochondrion.* 6:118–125. 67. 2006.
- **Siskind LJ, Mullen TD, Rosales KR, Clarke CJ, Hernandez-Corbacho MJ, Edinger AL, Obeid LM.** *J. Biol. Chem.* 285:11818–11826. 2010.
- **Smirlis D, Duszenko M, Jimenez-Ruiz AJ, Scoulica E, Bastien P, Fasel N, et al.** *Parasit Vectors*; 3:107. 2010.
- **Smith, E. R., and Merrill, A. H., Jr.** *J. Biol. Chem.* 270, 18749–18758. 1995.
- **Smith, T. K., Sharma D. K., Crossman A., Dix A., Brimacombe J. S., and Ferguson M. A. J.** *EMBO J.* 16:6667– 6675. 1997.
- **Sonda , S. , S. Stefanic , and A. B. Hehl .** *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 : 563 – 569. 2008.
- **Sonda S, Sala G, Ghidoni R, Hemphill A, Pieters J.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:1794–801. 2005.
- **Sperandio, S., de Belle, I. & Bredesen, D. E.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 14376–14381. 2000.
- **Spiegel, S., and Milstien, S.** *J. Biol. Chem.* 277, 25843–25846. 2002.
- **Sridevi P, Alexander H, Laviad EL, Pewzner-Jung Y, Hannink M, Futerman AH, Alexander S.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1793:1218–1227. 2009.
- **Stefanić S, Spycher C, Morf L, Fabriàs G, Casas J, Schraner E, Wild P, Hehl AB, Sonda S.** *Epub , J Lipid Research*, págs. 2527-45. Sep de 2010.
- **Stefanić S, Spycher C, Morf L, Fabriàs G, Casas J, Schraner E, Wild P, Hehl AB, Sonda S.** *J Lipid Res.* 51(9):2527-45. doi: 10.1194/jlr.M003392. Epub 2010 Mar 24. 2010.
- **Stoffel W., Bister K.** *Hoppe–Seylers Z. Physiol. Chem.* 354:169–181. 1973.
- **Stoka, V. Turk, B. Schendel, S.L., Kim, T.H. Cirman, T. Snipas, S.J. Ellerby, L.M. Bredesen, D. Freeze, H. Abrahamson, M. Bromme, D. Krajewski, S.**

- Reed, J.C. Yin, X.M. Turk, V. Salvesen, G.S. J. Biol. Chem. 276 3149–3157; 2001.
- Sugimoto, Y. Sakoh, and Yamada, K. Current Drug Targets, vol. 4, no. 4, pp. 311–322, 2004.
 - Suzuki, E. Handa, K. Toledo, M.S. Hakomori, S. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 14788–14793. 2004.
 - Tachado, S. D., Gerold P., Schwarz R., Novakovic S., McConville M., and Schofield L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4022–4027. 1997.
 - Taha T.A., Mullen T.D., Obeid L.M., Biochimica et Biophysica Acta 1758 (2006) 2027–2036. 2006.
 - Tamez, P.A., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Hiller, N.L., Llinás, M., Balu, B., Adams, J.H., Haldar, K. PLoS Pathog. 2008; 4: e1000118.
 - Tarbouriech, N., Charnock, S.J., and Davies, G.J. J. Mol. Biol., 314, 655–661. 2001.
 - Tarutani, M., Itami S., Okabe M., Ikawa M., Tezuka T., Yoshikawa K., Kinoshita T. and Takeda J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7400–7405. 1997.
 - Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Nat Rev Mol Cell Biol; 9:231–41. 2008.
 - Teixeira, M.M.; Borghesan, T.C.; Ferreira, R.C.; Santos, M.A.; Takata, C.S.; Campaner, M.; Nunes, V.L.; Milder, R.V.; de Souza, W.; Camargo, E.P. Protist, 162, 503–524. 2011.
 - Thudichum J.L.W. *A Treatise on the Chemical Constitution of Brain* Bailliere, Tindall, and Cox. London. 1884.
 - Thudichum, J.L.W. *The Popular Science Monthly* . 724–727. 1876.
 - Tilley L, Hanssen E. Transfus Clin Biol.;15(1-2):72-81. doi: 10.1016/j.traccli.2008.03.014. Epub 2008 May 23. 2008.
 - Tomavo, S., R. T. Schwarz, and J. F. Dubremetz. Mol. Cell. Biol. 9:4576–4580. 1989.
 - Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrico MC, Dramaix M, Truyens C, Carlier Y. Am J Trop Med Hyg. 70(2):201-9. Feb, 2004.
 - Trinchera M, Fabbri M, Ghidoni R. J Biol Chem.266(31):20907-12. Nov 5, 1991
 - Tuteja, R. *Malaria - an overview*. FEBS J. 274: 4670-9. 2007.
 - Uzcátegui, N. L., Denninger, V., Merkel, P., Schoenfeld, C., Figarella, K. Duzenko, M. Autophagy 3:6, 626-629; November/December 2007
 - Udenfriend, S., and Kodukula K. Annu. Rev. Biochem. 64:563–591 1995.
 - Uhrig M.L., Couto A.S., Colli W., Lederkremer R.M. Biochim Biophys Acta 1300:233–239. 1996.
 - Uhrig, M.L., Couto, A.S., de Lederkremer, R.M., Zingales, B., Colli, W. Carbohydr Res. 231: 329-34. 1992.
 - V.V. Parekh, M.T. Wilson, L. Van Kaer, Crit. Rev. Immunol. 25 183–213. 2005.
 - Van Meer G. and Lisman Q. Journal of Biological Chemistry, vol. 277, no. 29, pp. 25855–25858, 2002.
 - van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, Müller A, Hölscher C, Herrmann M, Sacks D, Solbach W, Laskay T. Proc Natl Acad Sci U S A;103:13837–13842. 2006.
 - Vance JE, Steenbergen R. Prog Lipid Res; 44:207–234. 2005.

- **Vassiliki Nikolettou, Maria Markaki, Konstantinos Palikaras, Nektarios Tavernarakis** *Biochimica et Biophysica Acta* 1833 3448–3459. 2013.
- **Verbert, A. and Cacan, R.** *J. Soc. Biol.*, 193, 101-110. 1999.
- **Vial, H. J., and Ancelin M. L.** *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection* (ed. I. W. Sherman), pp. 159-175. 1998.
- **Vickerman, K. and Cox, F. E. G.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61, 303-312. 1967.
- **Vickerman, K.** *Int. J. Parasitol.* 24, 1317–1331. 1994.
- **Vidugiriene J, and Menon AK.** *J Cell Biol.*;127(2):333-41. Oct, 1994.
- **Vidugiriene, J., and Menon A. K.** *J. Cell Biol.* 121:987–996. 1993.
- **Wanderley JL, Pinto da Silva LH, Deolindo P, Soong L, Borges VM, Prates DB, de Souza AP, Barral A, Balanco JM, do Nascimento MT, Saraiva EM, Barcinski MA.** *PLoS One*; 4:e5733. 2009.
- **Wang E., W. P. Norred, C. W. Bacon, R. T. Riley, and A. H. Merrill, Jr.** 1991. *J. Biol. Chem.* 266 14486–14490.
- **Wang G, Silva J, Krishnamurthy K, Tran E, Condie BG, Bieberich E.** *J Biol Chem*; 280:26415–26424. 2005.
- **Ward, G.E., Miller, L.H., Dvorak, J.A.** *J Cell Sci.* 106: 237-48. 1993.
- **Washington, DC: ASM Press. Stevens, V. L.** *Biochem. J.* 310:361–370. 1995.
- **Welburn SC, Barcinski MA, Williams GT.** *Parasitol Today.* 13(1):22-6. Jan; 1997.
- **Welburn SC, Maudlin I, Ellis DS.** *Med Vet Entomol*; 3:77-82. 1989.
- **Welburn SC, Maudlin I.** *Med Vet Entomol*; 11:286-9. 1997.
- **Wellems TE, Hayton K, Faihurst RM.** *J Clin Invest*; 119:2496-505. 2009.
- **Welti R, Mui E, Sparks A, Wernimont S, Isaac G, Kirisits M, Roth M, Roberts CW, Botté C, Maréchal E, McLeod R.** *Biochemistry.* 2007 Dec 4; 46(48):13882-90. Epub 2007.
- **WHO,** 2010.
- **WHO.** http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media/integrated_media_2010_leishmaniasis/en/.
- **Wolf, B.B. Green D.R.,** *J. Biol. Chem.* 274 20049–20052. 1999.
- **World malaria report 2013,** <http://www.who.int/malaria/wmr2013/>.
- **World Malaria Report,** 2013.
- **Wrabl JO, Grishin NV. Unligil and Rini.** *Proteins.* 54(1):71-87. Jan 1, 2004.
- **Wu, K., Marks, D., Watanabe, R., Paul, P., Rajan, N., and Pagano, R.** *Biochem. J.* 341, 395–400. 1999.
- **Yabu, T. Imamura, S. Yamashita, M. and Okazaki, T.** *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 44, pp. 29971–29982, 2008.
- **Young S. A. and Smith, T. K.** *Molecular Microbiology*, vol. 76, no. 6, pp. 1461–1482, 2010.
- **Yu, J. Zhang, L. Hwang, P.M. Kinzler, K.W. Vogelstein, B.** *Mol. Cell.* 7 673–682; 2001.
- **Zangger H, Mottram JC, Fasel N.** *Cell Death Diff* 2002, 9:1126-1139.
- **Zeledón R, Rabinovich J.E.** *Annu Rev Entomol.* 26:101-33. 1981.
- **Zeledon, R.A.** In *Barron's Medical Microbiology*; University of Texas Medical Branch: Galveston, TX, USA, 1996. Cells 1 365, 2012.
- **Zhang K, Pompey JM, Hsu FF, et al.** *EMBO J* 26:1094–1104. 2007.

BIBLIOGRAFÍA

- **Zhang K, Showalter M, Revollo J, Hsu FF, Turk J, Beverley SM.** EMBO J; 22:6016–6026. 2003.
- **Zhang, K. Hsu, F. F. Scott, D. A. Docampo, R. Turk, J. and Beverley, S. M.** Molecular Microbiology, vol. 55, no. 5, pp. 1566–1578, 2005.
- **Zhang, K., Hsu, F. F., Scott, D. A., Docampo, R., Turk, J., and Beverley, S. M.** Mol. Microbiol. 55, 1566–1578. 2005.
- **Zhang, O. Wilson, M. C. Xu W.** Plos Pathogens, vol. 5, no. 12, Article, ID e1000692, 2009.
- **Zijlstra E.E., Musa A.M., Khalil E.A., el-Hassan I.M., el-Hassan A.M.** Lancet Infect Dis. Review. 3(2):87-98. Feb, 2003.
- **Zong, WX, Thompson CB.** Genes Dev. 20(1):1-15. Review. Jan 1; 2006.

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AC	Ceramidasa ácida
AML	Leucemia mieloide aguda
ARN	Acido ribonucleico
Alk-SMase	Esfingomielinasa alcalina
β -NAD	β -nicotinamida
BSA	seroalbúmina bovina
CCD	Cromatografía en capa delgada
Cdasa	ceramidasa
CDC	Centre for disease control
Cer	Ceramida
CerS	Ceramida sintasa
CGalT	Galactosilceramida sintasa
CHCA	ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
CK	ceramida kinasa
CoA	Coenzima A
CPP	Ceramida-1-fosfato fosfatasa
CVC	Complejo de la vacuola contráctil
Da	Dalton
DAG	Diacilglicerol
DDT	1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano (Dicloro Difenil Tricloroetano),
DEAE	Dietilaminoetil
DHB	Acido 2,4-dihidroxibenzoico
DHCer	Dihidroceramida
DHCerS	Dihidroceramida sintasa
DHGlcCer	Glucosildihidroceramida
DHHexosilcermidas	Hexosildihidroceramidas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	2-[4-[(Z)-1,2-difenilbutil-1-enil] fenoxi]-N-metiletanamina
DS	Desvío estandar
DTT	Ditiotreitol
E.C	Enzyme Commission numbers
E.M.	Espectrometría de masa
GA	Acido gentísico
GalCer	Galactosilceramida
GalCer-SO4	Sulfogalactosilceramida
GC	Glucosilceramida
GCS	Glucosilceramida sintasa
GCT	Glucosilceramida transferasa
GlcCer	Glucosilceramida
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
GSLs	Dlcoesfingolípidos
HPAEC-PAD	Cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico con Detector de pulso amperométrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IC	Concentración inhibitoria
IgG	Inmunoglobulina G
IPC	Inositolfosfoceramida
λ	Longitud de onda
LacCer	Lactosilceramida
LC	Leishmaniasis cutánea

LDC	Leishmaniasis cutánea difusa
LDI	Laser desorption/ionization (desorción/ionización laser)
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral o kala-azar
LDPK	Leishmaniasis dérmica post-kala-azar
MAPP	(1S, 2R)-N-miristoilamino-fenilpropanol-1 (D-e-MAPP)
MALDI	Matriz-assisted laser desorption/ionization (desorción /ionización Laser asistida por matriz)
mM	milimolar
min.	Minutos
MS/MS	Masa/masa
NBD	Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
nHo	Nor-Harmano
PC	Fosfatidilcolina
PDMP	D-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol
PDB	Protein Data Bank
PI	fosfatidilinositol
PLs	Fosfolípidos
PM	Peso molecular
PNGasa F	Péptido: N-glicosidasa F
Ppdo	Precipitado
PPMP	DL- <i>threo</i> -1-fenil-2-palmitoilamino-3-morfolino-1-propanol
rpm	Revoluciones por minuto
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SK	Esfingosina kinasa
SLs	Esfingolípidos
SM	Esfingomielina
Smasa	Esfingomielinasa
SMS	Esfingomielina sintasa
SphK1	Esfingosina 1 quinasa
Sn	Sobrenadante
So	Esfingosina
SPP	Esfingosina-1-fosfato fosfatasa
SPT	Serin-palmitoil transferasa
TAM	Tamoxifeno
TAME	N- α -p-tosil-L-arginin metil éster
TBS	Tris-buffer salino
TFA	Acido trifluoroacético
THAP	2, 4,6-trihidroxiacetofenona
TOF	Time of flight (tiempo de vuelo)
Tr	Tiempo de retención
Tris	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UDP-Galactosa	Uridina difosfogalactosa
UDP-Glucosa	Uridina difosfoglucosa
UV	Ultravioleta
v	Volumen

