

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
POSTGRADO EN CIENCIAS MEDICAS FUNDAMENTALES

ENZIMAS DE LA GLICÓLISIS y DE LA BIOSÍNTESIS DE LOS
ESTEROLES DE *Trypanosoma cruzi*: UNA ALTERNATIVA
COMO BLANCOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS.

JUAN LUIS CONCEPCIÓN

MERIDA-2004

C.C.Reconocimiento

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
POSTGRADO EN CIENCIAS MEDICAS FUNDAMENTALES

ENZIMAS DE LA GLICÓLISIS y DE LA BIOSÍNTESIS DE LOS
ESTEROLES DE *Trypanosoma cruzi*: UNA ALTERNATIVA
COMO BLANCOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Tesis presentada ante la ilustre UNIVERSIDAD DE LOS ANDES por el Msc.
Juan Luís Concepción Curbelo, para optar al título de Doctor en Ciencias
Medicas Fundamentales.

Dirigida por:

Dr. Julio A. Urbina Romero

Laboratorio de Química Biológica.

Centro Biofísica y Bioquímica. (CBB).

Instituto de Investigaciones Científicas. (IVIC).

MERIDA-2004

C.C.Reconocimiento

ENZIMAS DE LA GLICÓLISIS y DE LA BIOSÍNTESIS DE LOS ESTEROLES
DE *Trypanosoma cruzi*: UNA ALTERNATIVA COMO BLANCOS PARA EL
TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

Dedicatoria

A mis padres

Por permitirme ser

Solo yo sé cuanto crecí junto a ustedes Sin ustedes no estaría aquí.

Siempre mi Amor.

A Raquel, tan querida y hermosa

Motivo de inspiración

Donde estés

Mi Amor Eterno.

Andrea C, por su ternura

Que Dios te guarde

Te quiero mucho.

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

Agradecimientos

A Julio Urbina, Tutor, Amigo, por tu Apoyo Incondicional, por la Siempre Acertada Orientación y por ser un Ejemplo a Seguir. Muchísimas Gracias Julio por Permitir Formarme Bajo Tu Supervisión.

A Wilfredo Quiñones, amigo solidario en los malos y buenos momentos, por tu apoyo e importante contribución en esta tesis, siempre estas presente y para ti todo lo mejor.

A Ana Cáceres, por su contribución con este trabajo, y dedicación especial, para ti todo mi cariño.

A Maria Tibisay Ruiz, por la contribución con los cultivos de los parásitos, por estar siempre, por compartir buenos momentos y por brindarme siempre tu hospitalidad, para ti mi afecto.

A Marco Sealey y Salame Rangel, por su contribución con este trabajo, especial dedicación y por permitirme pasar buenos momentos con ustedes.

A todos los estudiantes del Laboratorio de Enzimología de Parásitos que de una u otra manera han contribuido con este trabajo y por vuestra presencia que continuamente han sido un gran estímulo.

Al postgrado de Ciencias Medicas Fundamentales por darme la oportunidad de obtener el doctorado.

A todos aquellos que escapan de mi memoria en este momento, pero que sé que estuvieron cuando necesité de su ayuda.

A todos, GRACIAS

RESUMEN

En la presente investigación se estudiaron varias enzimas importantes de la glicólisis (fosfoglicerato kinasa, hexokinasa, piruvato, fosfato dikinasa y α -glicerol fosfato deshidrogenasa) y de la biosíntesis de esteroides (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa, escualeno sintetasa, 24(25)-SMT) en varias formas de *Trypanosoma cruzi* y algunas en promastigotes de *Leishmania mexicana*, como posibles blancos para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis. Todas las enzimas glicolíticas estudiadas y las de biosíntesis de esteroides fueron ubicadas en los glicosomas, aunque las enzimas de los esteroides tuvieron también una localización en microsomas/mitocondria. La ubicación de estas enzimas fue confirmada a través de tres metodologías diferentes (centrifugación isopícnica, diferencial y permeabilización selectiva con digitonina). Además, la secuencia de la hexokinasa presentó una señal de importación PTS2, en contraste con las secuencias de la fosfoglicerato kinasa (PGKA y C) que no presentaron ninguna señal de importación hacia los glicosomas. La caracterización bioquímica y molecular para las enzimas de la glicólisis mostró una serie de particularidades importantes en cuanto a propiedades y constantes cinéticas (K_m , V_m y K_i), con respecto a su contraparte en vertebrados. La hexokinasa se comportó como una verdadera glucokinasa con una cinética que presentó periodo de retardo, típico de enzimas histeréticas y fue inhibida por PPI. En *Trypanosoma cruzi* se determinaron tres isoenzimas PGKs, la PGKA y C localizadas en el glicosoma y la PGKB en el citosol. A diferencia de otras PGKs en otros organismos, la PGKA de *T. cruzi* presentó una extensión N-terminal adicional de 80 aminoácidos. Adicionalmente, esta enzima está interactuando fuertemente con la membrana del glicosoma, a pesar de que no posee una secuencia de aminoácidos hidrofóbica como para ser una proteína de membrana, este resultado fue confirmado con Tritón X-114 y carbonato de sodio. La piruvato fosfato dikinasa fue localizada principalmente en los glicosomas y fue activada por acetil-CoA, mientras que el acetil-CoA inhibió a la PEPCK. Esta enzima debe jugar un papel muy importante en los glicosomas detoxificando a la organela del PPI producto de las rutas de biosíntesis que ocurren en el glicosoma y además generando ATP y piruvato. La PPDK estaría haciendo el

rol de la pirofosfatasa, de igual forma a como se ha reportado para los peroxisomas. La α -glicerol fosfato deshidrogenasa fue localizada exclusivamente en los glicosomas de *T. cruzi* y esta es la primera vez que se ha reportado en estos parásitos. Esta enzima es activa solamente en un cierto estado del crecimiento de los epimastigotes, aun cuando ella esta presente sin actividad detectable a lo largo de toda la curva de crecimiento. La α -glicerol fosfato deshidrogenasa es posible que juegue un papel fundamental en mantener el balance redox en los glicosomas. La HMG-CoA reductasa, cataliza el primer paso comprometido del mevalonato y es una enzima soluble de la matriz de los glicosoma de *T. cruzi* y *Leishmania mexicana*, contrastando con las HMG-CoA reductasas integrales de membrana (retículo endoplásmico) de otros organismos. Esta enzima asociada a los glicosomas de ambos parásitos, presentaron una cinética clásica del tipo Michaelis-Menten y una fuerte inhibición por lovastatina, un inhibidor clásico de esta enzima. Este es el primer reporte de la presencia de una enzima de la biosíntesis de isoprenoides en los glicosomas. La escualeno sintetasa (SQS) cataliza el primer paso comprometido en la biosíntesis de esteroides y es una enzima unida a membranas en epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *Leishmania mexicana* con una localización subcelular dual, entre glicosomas y vesículas de microsomas/mitocondria. Los estudios cinéticos de la enzima de los parásitos mostraron que los valores de las constantes cinéticas fueron muy similares a la SQS de los mamíferos. El BPQ-OH un potente inhibidor para la enzima de mamíferos, también lo fue para la SQS de *T. cruzi* y *Leishmania mexicana*. La inhibición del crecimiento y lisis celular inducida por el BPQ-OH en ambos parásitos estuvo asociado con una privación completa del escualeno y esteroides endógenos, consistente con un bloqueo en la síntesis de novo de esteroides a nivel de la SQS. Nosotros también investigamos las bases moleculares de la actividad del 4-fenoxifenoxietil tiocianato (WC-9) contra *T. cruzi*. Encontramos que la inhibición del crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi* inducida por este compuesto fue asociada con una reducción en el contenido de los esteroides endógenos del parásito, debido a un bloqueo específico en la síntesis de novo de los esteroides a nivel de la SQS. Los compuestos E5700 y ER-119884 están basados en quinuclidinas. Estos compuestos fueron potentes inhibidores no competitivos o de tipo-mixtos para

la SQS de *T. cruzi* con valores de K_i en el orden de subnanomolar en presencia de PPI. El compuesto E5700 a la concentración de IC_{50} presentó un potente efecto antiproliferativo sobre las formas epimastigotes y amastigotes, respectivamente, sin ningún efecto sobre las células hospedadoras. A la MIC todos los esteroides desaparecen de los parásitos en células tratadas con este compuesto. Los estudios *in vivo* indican que E5700 fue capaz de suministrar una protección total contra la muerte e inhibió completamente el desarrollo de la parasitemia cuando es suministrado a 50mg/Kg.d por 30 días. Este es el primer reporte de un inhibidor de la SQS activo por vía oral, capaz de proporcionar una protección completa contra la fase aguda fulminante de la enfermedad de Chagas. La enzima 24(25) esteroil metil transferasa (SMT) fue localizada como una enzima asociada a membranas en los glicosomas y en las fracciones microsomales de epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *Leishmania mexicana*. Los valores de las constantes cinéticas fueron muy similares a los reportados para la SMT de hongos y levaduras. La enzima SMT de estos parásitos tienen una mayor afinidad por el demosterol que por el lanosterol como sustrato y el azasterol un análogo de esteroides, inhibió a la SMT (glicosomal y microsomal) de forma competitiva con respecto al demosterol y no competitiva para el AdoMet. El glicosoma de *T. cruzi* y *Leishmania mexicana* encierra enzimas de oxidación de la glucosa y de la biosíntesis de esteroides, con propiedades fisicoquímicas distintas a las de sus contrapartes en los mamíferos. Estas diferencias podrían ser utilizadas como potenciales blancos para el desarrollo de nuevos inhibidores específicos para erradicar infecciones provocadas por estos parásitos en los humanos.

ABREVIATURAS

AAA: ATPsas asociadas con diversas actividades celulares.
AA-CoA tiolasa: Acetoacetil-CoA tiolasa.
ABC: ATP-binding cassette transportes.
acetil-CoA: acetil coenzima A.
ADN: Ácido desoxirribonucleico.
ADP: Adenosin difosfato.
ALDRP: Transportador de ácidos grasos de cadena larga.
ALP: Alkil-Lisofosfolipidos.
AOX: Oxidasa alternativa.
A TP: Adenosin trifosfato.
BPQ-OH: Quinuclidina.
CKL: Cisteina-lisina-leucina.
DHAP: Oihidroxiacetona fosfato.
FAD: Oinucleótido de adenina-flavina.
FADH: Oinucleótido de adenina-flavina forma reducida.
FPP: Farnesil pirofosfato.
FRD: Fumarato reductasa.
GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada.
G PDH: Glicerol-3-fosfato deshidrogenada.
GPI: Glicosil-fosfatidil-inositol.
GPO: Glicerol fosfato oxidasa.
H MG-CoA: (3S)-3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA.
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.
HXK: Hexokinasa.
IPP: Isopentil difosfato.
LPG: lipofosfolipidoglican.
MDH: Malato dehidrogenasa.
MPD: Mevalonato difosfato kinasa.
MvK: Mevalonato kinasa.
NAD⁺: Nicotidamida adenina dinucleótido.
NADPH: Nicotidamida adenina dinucleótido forma reducida.
NADP⁺: Nicotidamida fosfato del dinucleótido adenina.
NADPH: Nicotidamida fosfato del dinucleótido adenina forma reducida.
PC: Fosfatidil colina.
PE: Fosfatidil etanolamina.
PEP: Fosfoenol piruvato.
PEPCK: Fosfoeno/piruvato carboxikinasa.
PEX: Proteínas del peroxisoma o peroxinas.
PFK: Fosfofructokinasa.
PGK: Fosfoglicerato Kinasa.
PGKA: Fosfoglicerato Kinasa isoenzima A.
PGKB: Fosfoglicerato Kinasa isoenzima B.
PGKC: Fosfoglicerato Kinasa isoenzima C.
PMP47: Proteína integral de la membrana del peroxima de 47 kDa.
PMPs: Proteínas integrales del peroxisoma.
PMvK: Posfomevalonato kinasa.
PPDK: Piruvato Fosfato Oikinasa.
PPi: Pirofosfato inorgánico.

PPP: Vía pentosa fosfato.
PTS1: Secuencia de importación al peroxisoma de Tipo 1.
PTS2: Secuencia de importación al peroxisoma de Tipo 2.
PyK: Piruvato kinasa.
QKL: Asparagina-lisina-leucina.
RE: Retículo endoplásmico.
RNA: Ácido ribonucleico.
RNAm: Ácido ribonucleico mensajero.
RNAi: RNA de interferencia
SAHM: Ácido salicilhidroxámico.
SKL: Serina-lisina-leucina.
TLC: Cromatografía de capa fina.
TPR: Repetido tetratricopéptido.
VPS: Glicoproteínas variantes de superficie
WD: Triptófano-aspartico.

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

INDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. GLICOLISIS y GLICOSOMAS	4
1.3. RUTA DE LAS PENTOSAS FOSFATO y GLICOSOMAS	11
1.4. BIOGENESIS DE LOS PEROXISOMAS	12
1.4.1. Targeting de proteínas a la matriz de los peroxisomas o glicosomas	12
1.4.2. Importación de proteínas a la matriz	13
1.5. LA MEMBRANA DE LOS PEROXISOMAS	16
1.6. GENES PEX EN TRIPANOSOMATIDES	17
1.7. FUNCIONES METABOLICAS EN LOS GLICOSOMAS	18
1.7.1. Glicólisis	18
1.7.2. β -Oxidación de ácidos grasos	19
1.7.3. Biosíntesis de éter lípidos	22
1.7.4. Preservación de las purinas	24
1.8. RUTA DE LA BIOSÍNTESIS DEL COLESTEROL: CONVERSIÓN DE ACETIL-CoA A FARNESIL PIROFOSFATO	24
1.8.1. Acetoacetil-CoA tiolasa	26
1.8.2. (3S)-3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA sintetasa (HMG-CoA sintetasa)	26
1.8.3. (3S)-3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa)	26
1.8.4. Mevalonato kinasa (MvK)	28
1.8.5. Conversión de mavalonato a farnesil pirofosfato (FPP)	28
1.8.6. Fosfomevalonato Kinasa (PMvK)	28
1.8.7. Mevalonato difosfato descarboxilasa (MPD)	29
1.8.8. Isopentil difosfato isomerasa (IPP)	29
1.8.9. Farnesil difosfato sintetasa (FPP)	29
1.9. Conversión de FPP a Colesterol	30
1.9. FUNCION DE LOS LIPIDOS NEUTROS (ERGOSTEROL) EN LA MEMBRANA PLASMATICA	31
1.10. QUIMIOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	37
1.11. POSIBLES BLANCOS QUIMIOTERAPEUTICOS BAJO UN ENFOQUE RACIONAL PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	39
1.11.1. Inhibidores de la trypanotion reductasa	39
1.11.2. Inhibidores de Purinas Salvage	39
1.11.3. Inhibidores de Cistein Proteasas	42
1.11.4. Inhibidores de la Biosíntesis de Esteroles	42
1.11.5. Alkil-Lisofosfolipidos (ALP)	46
1.11.6. Inhibidores del Metabolismo de Pirofosfato	46
2. OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACIÓN	50
2.1. Expresión y Distribución Intracelular de las Isoenzimas. Fosfoglicerato Kinasa	50

(PGK) en <i>Trypanosoma cruzi</i> .	
2.2. Caracterización Molecular y Bioquímica de la Hexokinasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	50
2.3. Piruvato Fosfato Dikinasa y Metabolismo del pirofosfato en el glicosoma de los epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	50
2.4. La α -glicerolfosfato Deshidrogenasa esta Presente en los Glicosomas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	50
2.5. 3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA Reductasa en <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>Schizotrypanum</i>) <i>cruzi</i> : Localización Subcelular y Propiedades Cinéticas	50
2.6. Escualeno Sintetasa como un Blanco Quimioterapéutico en <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Leishmania mexicana</i>	50
2.7. Mecanismo de acción del 4-Fenoxifenoxetil Tiocianato (WC-9) contra <i>Trypanosoma cruzi</i> , el Agente Causante de la Enfermedad de Chagas	50
2.8. Actividad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de E5700 y ER-119884, dos nuevos inhibidores de la escualeno sintetasa con actividad oral, contra <i>Trypanosoma cruzi</i> .	50
2.9. $\Delta^{24(25)}$ este rol metil transferasa (24-25-SMT) en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> : Localización Subcelular y Propiedades Cinéticas.	51
3. MATERIALES y METODOS	52
3.1. Cultivos de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	53
3.2. Cultivos de los promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	53
3.3. Ruptura de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> por abrasión	53
3.4. Centrifugación diferencial	53
3.5. Fraccionamiento subcelular y purificación de los glicosomas en un gradiente lineal de sacarosa	54
3.6. Permeabilización selectiva con digitonina	54
3.7. Determinación de la latencia de los glicosomas purificados	55
3.8. Separación de proteínas de los glicosomas purificados con Tritón X-114	55
3.9. Tratamiento de los glicosomas intactos con carbonato de sodio	56
3.10. Tratamiento de los glicosomas intactos con proteasas	56
3.11. Biología Molecular de la Fosfoglicerato kinasa	57
3.12. Clonamiento y secuenciamiento del gen de la hexokinasa	59
3.13. Expresión de la hexokinasa recombinante en <i>E. coli</i> y su purificación	60
3.14. Purificación de la hexokinasa natural del glicosoma	61
3.15. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	62
3.16. Análisis por Western blot	62
3.17. Microscopia de inmunofluorescencia	62
3.18. Determinación de proteínas	63
3.19. Ensayos enzimáticos	63
3.20. Análisis cinéticos de la hexokinasa natural y recombinante	66
3.21. Análisis cinéticos de la 3-hidroxi-3-metil:-glutaril-CoA reductasa	67
3.21. Cinética e Inhibición de la actividad Escualeno Sintetasa	67
3.21.1. Estandarización de las condiciones de reacción	67
3.21.2. Determinación de parámetros cinéticos de la enzima escualeno sintetasa	68

3.22. Inhibición de SQS con BPQ-OH, WC-9, E5700 y ER-119884	68
3.23. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de BPQ-OH, E5700 y ER-119884 sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> y promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	69
3.24. Efecto de BPQ-OH, WC-9, E5700 y eR-119884 sobre la síntesis <i>de novo</i> de esteroides en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y promastigotes de <i>L. mexicana</i>	71
3.25. Efecto <i>in vivo</i> de BPQ-OH, E5700 y ER119884 sobre la proliferación de amastigotes de <i>T. cruzi</i>	72
3.26. Estudios <i>in vivo</i> de E5700 y ER-119884	74
3.27. Análisis estadístico	74
3.28. Extracción de lípidos totales	74
3.29. Separación de lípidos neutros y polares	75
3.30. Identificación y cuantificación de lípidos neutros	75

4.1 INVESTIGACIÓN DESARROLLADA 77

4.1. Expresión y Distribución Intracelular de las Isoenzimas Fosfoglicerato Kinasa (PGK) en <i>Trypanosoma cruzi</i> .	78
4.2. Caracterización Molecular y Bioquímica de la Hexokinasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	88
4.3. Piruvato Fosfato Dikinasa y Metabolismo del Pirofosfato en el Glicosoma de los epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	98
4.4. La α -glicerolfosfato Deshidrogenasa está Presente en los Glicosomas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	106
4.5. 3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA Reductasa en <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>Schizotrypanum</i>) <i>cruzi</i> : Localización Subcelular y Propiedades Cinéticas.	113
4.6. Escualeno Sintetasa como un Blanco Quimioterapéutico en <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Leishmania mexicana</i>	124
4.7. Mecanismo de acción del 4-Fenoxifenoxietil Tiocianato (WC-9) contra <i>Trypanosoma cruzi</i> , el Agente Causante de la Enfermedad de Chagas.	144
4.8. Actividad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de E5700 y ER-119884, dos nuevos inhibidores de la escualeno sintetasa con actividad oral, contra <i>Trypanosoma cruzi</i> .	150
4.9. $\Delta^{24(25)}$ este rol metil transferasa (24-25-SMT) en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> y promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> : Localización Subcelular y Propiedades Cinéticas	166

5. GLICOSOMAS (PEROXISOMAS): MODELO DE LA COMPARTIMENTALIZACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO (GLICOLISIS) y DE RUTAS DE BIOSÍNTESIS.

6. CONCLUSIONES	187
7. BIBLIOGRAFÍA	193
8. LISTA DE PUBLICACIONES	227

7.1 The expression and intracellular distribution of phosphoglycerate kinase isoenzymes in <i>Trypanosoma cruzi</i> .	
7.2 Molecular and biochemical characterization of hexokinase from <i>Trypanosoma cruzi</i> .	
7.3 Pyruvate Phosphate Dikinase and Pyrophosphate Metabolism in the Glycosome of <i>Trypanosoma cruzi</i> Epimastigotes.	

7.4 A α -glycerophosphate Dehydrogenase is Present in *Trypanosoma cruzi* Glycosomes.

7.5 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA Reductase in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: Subcellular Localization and Kinetic Properties.

7.6 Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*.

7.7 Mechanism of Action of 4-Phenoxyphenoxyethyl Thiocyanate (WC-9) against *Trypanosoma cruzi*, Causative Agent of Chagas' Disease.

7.8 *In vitro* and *in vivo* activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*.

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

Figura 4.3.4. Un modelo para el metabolismo intermediario del PPI en los glicosomas de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	105
Figura 4.4.1. Presencia de la glicerofosfato deshidrogenasa (GPDH) como una función del crecimiento de los epimastigotes	109
Figura 4.4.2. Tratamiento con digitonina, liberación de GPDH	110

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida	2
Figura 2. Metabolismo energético en las formas sanguíneas de <i>T. brucei</i>	6
Figura 3. Metabolismo energético en las formas procíclicas de <i>T. brucei</i>	8
Figura 4. Implicaciones de "turbo" en el diseño de rutas glicolíticas	10
Figura 5. Red de interacciones entre proteínas PEX	15
Figura 6. Proteínas importantes en los glicosomas	15
Figura 7. Enzimas de la β -oxidación en los glicosomas	21
Figura 8. Enzimas involucradas en la síntesis de éter lípidos en <i>T. b. rupei</i>	23
Figura 9. Compartimentalización de la ruta de esteroides en los peroxisomas	25
Figura 10. Estructura química del Nifurtimox y Benznidazol	39
Figura 11. Estructura química del Tripanotio	41
Figura 12. Estructura química del Allopurinol	41
Figura 13. Estructura química de inhibidores de la cruzipaina	44
Figura 14. Estructura química de inhibidores de la C14 α esteroil demetilasa	45
Figura 15. Estructura química de los alquil-lisofosfolípidos	48
Figura 4.1.1. Mapa físico de los loci de la PGKs en el genoma de <i>T. cruzi</i>	83
Figura 4.1.2. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la isoenzima A de la PGK de <i>T. cruzi</i> .	84
Figura 4.1.3. Liberación de varias enzimas desde epimastigotes intactos de <i>T. cruzi</i> .	85
Figura 4.1.4. Perfil de distribución de un número de enzimas seleccionadas en el fraccionamiento subcelular obtenido por centrifugación diferencial de un homogenato de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	86
Figura 4.1.5. Análisis por Western blot de las isoenzimas de PGK de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	87
Figura 4.2.1. Cinética de la hexokinasa natural y recombinante de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	93
Figura 4.2.2. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la hexokinasa de <i>T. cruzi</i> .	94
Figura 4.2.3. Distribución subcelular de la hexokinasa y otras enzimas seleccionadas, obtenidas por centrifugación diferencial desde un homogenato de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	96
Figura 4.2.4. La hexokinasa natural fue purificada desde una fracción rica en glicosomas de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	97
Figura 4.3.1. Perfil de distribución de un homogenato de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> después de una centrifugación isopícnica. Los experimentos presentados en esta figura fueron realizados dos veces y cinco veces para la PDK y la principal enzima marcadora.	102
Figura 4.3.2. Liberación de algunas enzimas desde <i>T. cruzi</i> con un tratamiento con digitonina.	103
Figura 4.3.3. La PDK fue teñida con FITC y la HK, una proteína específica de los glicosomas fue detectada por un anticuerpo secundario acoplado a Cy3 y procesado por un microscopio escáner láser confocal.	104

Figura 4.4.3. Perfil de distribución después de una centrifugación isopícnica de la glicerofosfato deshidrogenasa.	111
Figura 4.5.1. Distribución de enzimas glicolíticas y otras en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> , determinadas por centrifugación diferencial.	119
Figura 4.5.2. Perfil de distribución de un extracto post-granular-pequeño de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> después equilibrado en un gradiente lineal de sacarosa.	120
Figura 4.5.3. Liberación de la HMG-CoA reductasa y marcadores enzimáticos desde epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> por digitonina.	121
Figura 4.5.4. Cinética de la HMG-CoA reductasa glicosómica de <i>Trypanosoma cruzi</i>	
Figura 4.6.1. Reacción química catalizada por la escualeno sintetasa (SQS)	122
Figura 4.6.2. Perfil de distribución de la fracción granular pequeña (33 000 x 15 min) en un gradiente lineal de sacarosa de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	130
Figura 4.6.3. Gráfico del doble recíproco de la actividad de la SQS de los glicosomas de <i>T. cruzi</i>	131
Figura 4.6.4. Estructura química del 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxiquinuclidina (BPQ-OH).	132
Figura 4.6.5. Efecto del BPQ-OH sobre la actividad de la SOS glicosómica de <i>T. cruzi</i>	134
Figura 4.6.6. Cinética de inhibición por BPQ-OH sobre la SQS glicosomal de <i>T. cruzi</i> .	135
Figura 4.6.7. Efecto del BPQ-OH sobre la proliferación de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	137
Figura 4.6.8. Efecto del BPQ-OH sobre la proliferación de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> .	139
Figura 4.6.9. Dependencia de la concentración del efecto de BPQ-OH sobre la proliferación de los amastigotes de <i>T. cruzi</i> en cultivos de células Vero.	141
Figura 4.7.1. Efecto del compuesto WC-9 sobre la proliferación de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	149
Figura 4.7.2. Efecto de WC-9 sobre la actividad de la SOS glicosomal (A) y mitocondrial (B) de <i>T. cruzi</i>	154
Figura 4.8.1. Estructura química de E5700 y ER-119884	155
Figura 4.8.2. Cinética de inhibición por E5700 sobre la SQS de los glicosomas de <i>T. cruzi</i> .	156
Figura 4.8.3. Cinética de inhibición por ER-119884 sobre la SQS de los glicosomas de <i>T. cruzi</i> .	157
Figura 4.8.4. Reacción química catalizada por la escualeno sintetasa (SQS).	158
Figura 4.8.5. Efecto de E5700 (A) y ER-119884 (B) sobre la proliferación de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	159
Figura 4.8.6. Dependencia de la concentración del efecto de E5700 (A) y ER-119884 (B) sobre la proliferación de amastigotes de <i>T. cruzi</i> cultivados en células Vero	160
Figura 4.8.7. Efecto de E5700, ER-119884 y nifurimox sobre la parasitemia en modelo murino en fase aguda de la enfermedad de Chagas.	161
Figura 4-8.8. Efecto de E5700, ER-119884 y nifurimox sobre la sobre vivencia en un modelo murino en fase aguda de la enfermedad de Chagas	161
Figura 4.9.1. Centrifugación diferencial de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	171
Figura 4.9.2. Centrifugación isopícnica de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	172
Figura 4.9.3. Cinética de inhibición de la SMT (variable AdoMet) del glicosoma de <i>T. cruzi</i> .	173
Figura 4.9.4. Cinética de inhibición de la SMT (variable demosterol) del glicosoma	174

de <i>T. cruzi</i> .	
Figura 4.9.5. Centrifugación diferencial de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .	175
Figura 4.9.6. Centrifugación isopícnica de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .	176
Figura 4.9.7. Cinética de inhibición de la SMT (variable AdoMet) del glicosoma. <i>Leishmania mexicana</i> .	177
Figura 4.9.8. Cinética de inhibición de la SMT (variable demosterol) del glicosoma <i>Leishmania mexicana</i> .	178
Figura 5.1. Compartimentalización de metabolismo energético y rutas de síntesis en los glicosomas de <i>T. cruzi</i> .	181

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ruta y enzimas de peroxisomas y glicosomas	14
Tabla 2. Señales de importación a los peroxisomas de las enzimas de la biosíntesis de colesterol	30
Tabla 4.2.1. Características cinéticas de la hexokinasa natural y recombinante de <i>T. cruzi</i> .	95
Tabla 4.4.1. Consumo de oxígeno en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> en la presencia de ácido salicílico hidroxámico (SHAM) y cianuro (CN).	112
Tabla 4.5.2. Señales de importación a los peroxisomas y glicosomas de las enzimas de la biosíntesis de colesterol (en rojo tripanosomatídeos)	117
Tabla 4.5.1. Partición de la HMG-CoA reductasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> entre la fase acuosa y rica en detergente formada por el Triton X-114.	123
Tabla 4.6.1. Constantes cinéticas de la SQS de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y promastigotes <i>L. mexicana</i> ^a .	133
Tabla 4.6.2. Constantes cinéticas para la inhibición de la SQS glicosomal de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y promastigotes de <i>L. mexicana</i> por BPQ OH ^a .	138
Tabla 4.6.3. Efecto de BPQ-OH sobre la composición de esteroides libres de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i> (stock EP) ^a .	140
Tabla 4.6.4. Efecto de BPQ-OH sobre la composición de esteroides libres de promastigotes de <i>L. mexicana</i> (NR).	142
Tabla 4.7.1. Esteroides libres y precursores presentes en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> (stock EP) en la presencia o ausencia de WC-9 ^a .	148
Tabla 4.8.1. actividad inhibitoria de E5700 y ER-119884 sobre la escualeno sintetasa (SOS) de los epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> ^a	162
Tabla 4.8.2. Constantes de inhibición para E5700 y ER-119884 sobre la escualeno sintetasa (SQS) de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> ^a .	163
Tabla 4.8.3. Esteroides libres y precursores presentes en los epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (stock EP) crecidos en la presencia o ausencia de E5700 ^a .	164
Tabla 4.8.4. Esteroides libres y precursores presentes en los epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (stock EP) crecidos en la presencia o ausencia de ER-119884 ^a .	165
Tabla 4.9.1. Constantes cinéticas de la (S)-adenosil-L-metionina: $\Delta^{24,25}$ esteroide metil transferasa de glicosomas y microsomas de <i>Leishmania mexicana</i> .	169

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana es una parasitosis, endémica del continente americano, distribuida desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina. El agente causal de esta enfermedad es el *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, un protozoo flagelado del orden Kinetoplastide, Familia *Trypanosomatidae*, Phylum *Sarcomastigophora*, Reino *Protista* y Subreino *Protozoo*. Los Kinetoplastidos se caracterizan por poseer un número de particularidades tales como: (1) presencia de un Kinetoplasto, una parte especial del único mitocondrion donde el ADN tiene una estructura inusual (maxicirculos y minicirculos concatenados y densamente empaquetados), (2) edición del RNA de la mitocondria; los genes nucleares son transcritos como largas moléculas de RNA multicistronicas, las cuales son procesadas a RNAm por transplicing; (3) aparente ausencia de promotores para la RNA polimerasa II; y (4) una vía única de compartimentalización metabólica (Vikerman, 1994; De Souza, 2002). Este último hecho es el más peculiar de los kinetoplastidos, tener parte de la glicólisis y otras enzimas de síntesis secuestradas en una organela llamada glicosomas (Oppenheimer, 1977; 1987; Hannaert y Michels, 1994; Michels y col., 2000).

La tripanosomiasis americana fue descubierta por Carlos Chagas en Brasil en 1909 y describe por primera vez, el agente, vector, signos clínicos en humanos y los animales reservorios de esta nueva Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana. El parásito es transmitido entre sus hospedadores por vectores hematófagos Reduviid (Urbina, 2002). *T. cruzi* tiene un ciclo de vida complejo, con estados multiplicativos en ambos hospedadores, en el vector (epimastigotes) y en el vertebrado (amastigotes intracelulares), así como un estado no multiplicativo en ambos hospedadores (trypomastigotes) (Figura 1).

La enfermedad de Chagas es una consecuencia de la intervención del hombre en el ciclo selvático de la misma, la cual involucra la interacción entre los vectores y hospedadores silvestres en diferentes ecosistemas naturales del continente Americano. En general hay un balance entre los parásitos y vectores u hospedadores, dado que el parasitismo no produce daños en los triatomíneos o reservorios silvestres (Barreto MP, 1979). El ciclo doméstico resulta del

contacto humano-vector, producto de la colonización de ecotopos artificiales por el triatomino, como consecuencia de las modificaciones sociales y ecológicas que el hombre produce en el medio ambiente natural.

Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi*

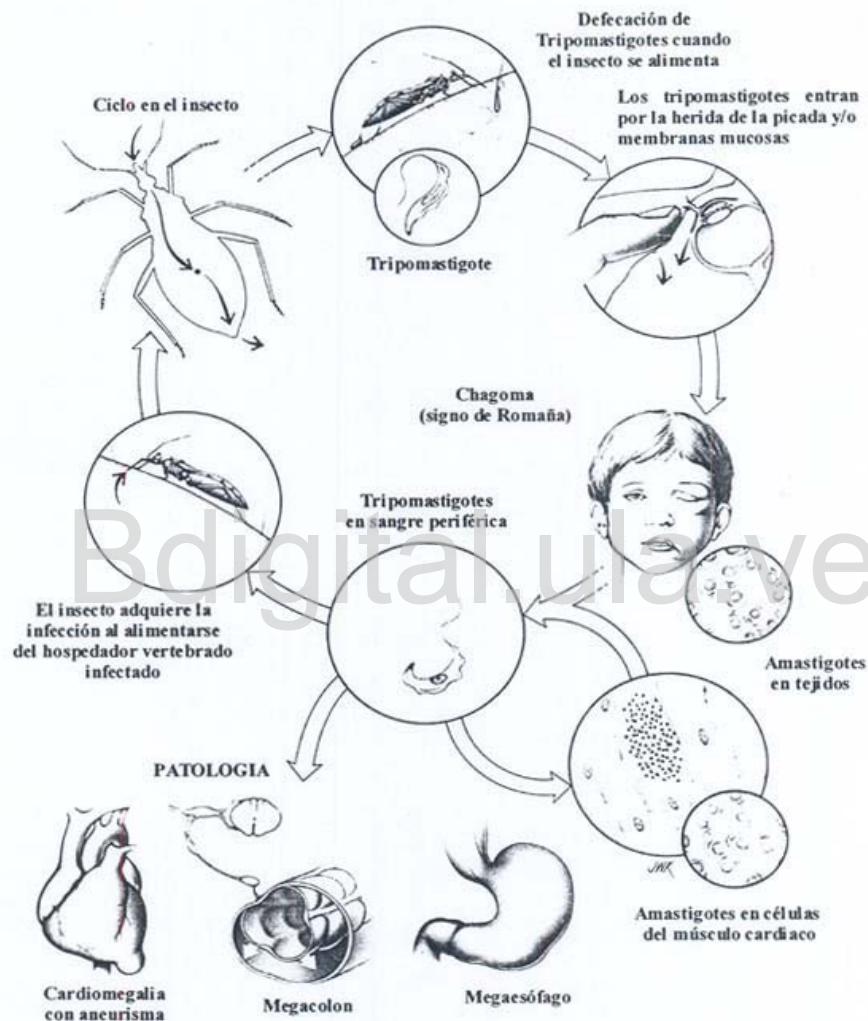


Figura 1. En el vector (Reduviidae) los parásitos proliferan en el lumen del tracto gastrointestinal como la forma epimastigotes (no infectivos), los cuales se diferencian en el recto a la forma tripomastigote (infectivos). Los tripomastigotes metacíclicos son descargados con las heces cuando el vector hematófago se alimenta de un mamífero y alcanza el sistema circulatorio a través de las lesiones en la piel. Esta forma no proliferativa invade una variedad de tipos de células, incluyendo músculo y células del sistema nervioso en el corazón y del tracto gastrointestinal, así como del sistema retículo endotelial. Después que ocurre la invasión por parásito, este se diferencia a amastigotes en el citosol, los cuales proliferan por fisión binaria y eventualmente se re-diferencian a tripomastigotes que normalmente destruyen las células y alcanzan la sangre. El daño a los tejidos resulta de la acción directa y del proceso inflamatorio que ocurre. El tripomastigote sanguíneo puede invadir otras células o puede ser tomado junto con la sangre por el vector al alimentarse, donde ellos se diferencian otra vez a epimastigotes, completando así el ciclo. Modificación de Urbina JA, 2002.

La enfermedad de Chagas es un serio problema de salud pública en Latino América, donde estimaciones recientes indican que entre 18-20 millones de personas están infectadas con *T. cruzi*, mientras que más de 120 millones están en riesgo de adquirir la infección; cada año son reportados 500.000 nuevos casos y mueren 50.000 personas por esta enfermedad y sus complicaciones (Araujo y col., F, 1992). Venezuela es un país endémico para esta enfermedad, con 12.5 millones de personas en riesgo de contraer la infección, 1.2 millones de personas están infectadas y una incidencia estimada de 27.000 nuevos casos por año (Schofield, 1992). La elevada incidencia de la enfermedad de Chagas en nuestro país y continente habla por sí mismo, de que esta enfermedad puede ser tomada como un verdadero **índice de pobreza** de la población Latino Americana.

En la actualidad debido a la pobreza de las personas en las áreas rurales y por la falta de atención gubernamental (salud, educación, vivienda, transporte, comunicaciones y recreación), ha promovido una inmigración de personas infectadas con *T. cruzi* desde las áreas rurales a los centros urbanos de nuestro continente y a otros países no endémicos (USA, Canadá, Japón, Australia y Europa), lo que ha traído como consecuencia la posible transmisión del parásito, muy probablemente a través de transfusiones de sangre, tal y como ha ocurrido en centros urbanos de Latino América (Araujo y col., 1992).

La enfermedad de Chagas tiene dos fases: aguda y crónica. La fase aguda es invasiva, en la que existe una marcada presencia de parásitos en sangre. Puede durar de 1 a 2 meses y se caracteriza por síntomas de fiebre, inflamación en los ganglios linfáticos, hígado y bazo, además de inflamación y enrojecimiento en la zona de infección, que puede ser detectada en pocos casos. No obstante, en algunos casos se puede observar una inflamación en la zona alrededor de los ojos, conocida como signo de Romaña y que constituye la evidencia de una picadura por un insecto vector. Sin embargo, se trata de un signo detectable solo por personas con la experiencia suficiente y además por el contacto permanente con los pacientes, lo que no lo hace un claro síntoma de la enfermedad. La forma crónica es lenta, caracterizada por el debilitamiento del paciente debido a la focalización de un proceso inflamatorio en el o los órgano(s) infectados durante, años o décadas, generando lesiones irreversibles

en el corazón y tracto gastrointestinal en el 30-40% de los casos y en muchos la muerte (Soares y Ribeiro, 1999).

1.2. GLICOLISIS y GLICOSOMAS

En todos los kinetoplastidos estudiados, la mayor parte de la ruta de la glicólisis se encuentra en una organela llamada glicosoma (Oppenheimer, 1987; Hannaert y Michels, 1994; Michels, PAM y col., 2000). Esta organela es un verdadero peroxisoma demostrado por varios criterios: (1) Los glicosomas, semejantes a otros miembros de la familia de los peroxisomas (peroxisomas, microcuerpos de levaduras y glioxisomas de plantas), están rodeados por una membrana simple formada por una bicapa de fosfolípidos, tiene una matriz de proteínas muy electrón densa y no contiene ADN; (2) aunque las enzimas glicolíticas son las más destacadas en los glicosomas, algunas otras enzimas o sistemas enzimáticos también están presentes y de forma similar a los peroxisomas: por ejemplo, enzimas del metabolismo del peróxido, oxidación de ácidos grasos, biosíntesis de éster-lípidos e isoprenoides; (3) los glicosomas y otros miembros de la familia de los peroxisomas tienen procesos de biogénesis homólogos (Hannaert y Michels, 1994; Parson y col., 2001). Las proteínas de la matriz de esta organela son sintetizadas en polisomas libres en el citosol, con señales targeting de importación iguales a la de los peroxisomas y son importadas por un mecanismo similar, involucrando una cascada de varias proteínas (llamadas peroxinas "PEX"), las cuales son homólogas en las diferentes organelas (Parson y col., 2001).

Los glicosomas constituyen un compartimiento rodeado por una membrana, que de acuerdo a evidencias acumuladas, son pobremente permeables para la mayoría de los metabolitos incluyendo nucleótidos de adenina y NAD(H) (Michels y col., 2000). Moléculas transportadoras específicas están involucradas en el movimiento de metabolitos a través de la membrana, de hecho hay fuertes evidencias que indican la existencia de transportadores homólogos a los del tipo ABC involucrados en el transporte de ácidos grasos a través de la membrana de peroxisomas de células de levaduras y mamíferos (Hettema y Taback, 2000). La noción de un compartimiento cerrado implicaría que debería encontrarse una relación

estequiometrica entre los sustratos y productos de todos los procesos simultáneamente dentro de la organela. El glicosoma secuestra enzimas en las cuales no hay cambios netos en la relación ATP/ADP o en la relación NAD^+/NADH durante los procesos metabólicos (glicólisis) en la organela (Oppenheimer, 1987). Por ejemplo, en *T. brucei* la forma sanguínea, donde la glicólisis es virtualmente el único proceso que ocurre en los glicosomas, las enzimas que convierten la glucosa en 3-fosfoglicerato están todas dentro de la organela, mientras que las últimas tres enzimas están en el citósol (Fig. 2). Como consecuencia, el consumo intraglicosomal de ATP por la hexokinasa (HXK) y fosfofrutokinasa (PFK) es balanceado por la producción de ATP por la fosfoglicerato kinasa (PGK). La producción de ATP neto ocurre en el citosol, en la reacción catalizada por la piruvato kinasa (PyK). Similarmente, el NADH resultante de la reacción catalizada por la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es re-oxidado dentro de la organela, seguido por la transferencia de electrones a la gliceraldehido-3-fosfato oxidasa (GPO) en la mitocondria. Este proceso ocurre vía una lanzadera redox que comprende una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), dependiente de NAD^+ en el glicosoma, un transportador putativo en la membrana del glicosoma el cual intercambia glicerol-3-fosfato por dihidroxiacetona fosfato, y la GPO mitocondrial. El transportador permanece aún sin identificar, pero su existencia es inferida por la baja permeabilidad de la membrana del glicosoma y los requerimientos estrictos de acoplamiento de flujo por el cual dos triosas fosfatos son intercambiadas (Bakker y col., 1999). El complejo GPO contiene un FAD – unido a la GPDH, el cual es muy probable que esté asociado con la superficie externa de la membrana interna de la mitocondria, ubiquinonas y una oxidasa Terminal, conocida como una oxidasa alternativa (AOX), la cual es insensible a cianuro, pero que puede ser inhibida por el ácido salicilhidroxámico (SAHM). El proceso redox de la GPO no está acoplado a la formación de ATP.

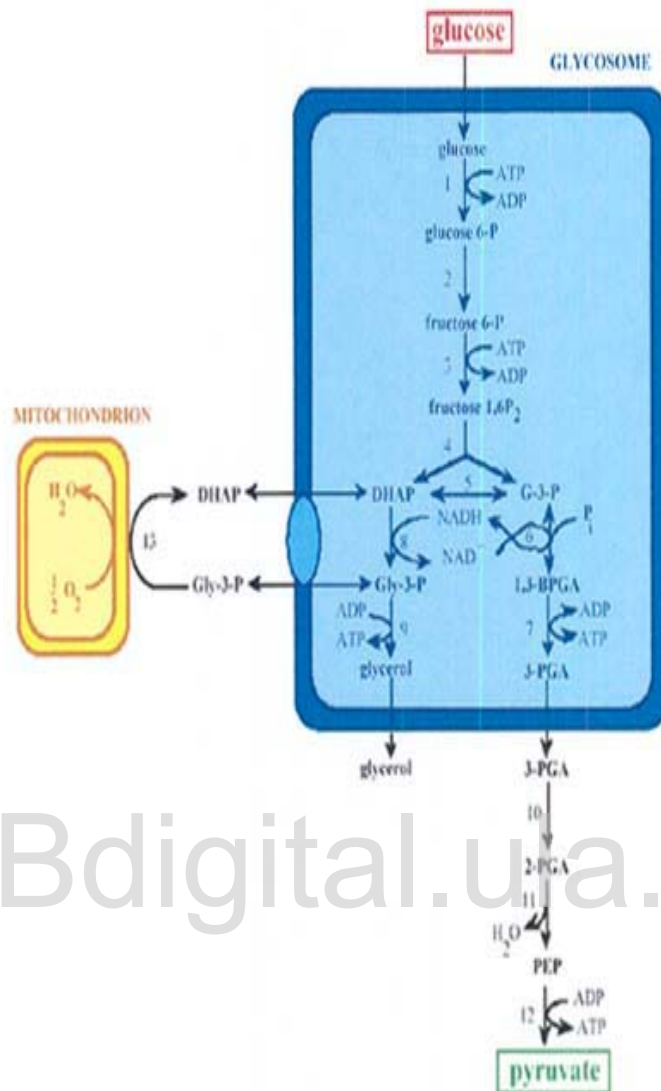


Figura 2. Metabolismo energético de la forma sanguínea de *T. brucei*. Enzimas: 1, hexokinasa; 2, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 3, fosfofructokinasa; 4, aldolasa; 5, triosafosfato isomerasa; 6, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; 7, fosfoglicerato kinasa; 8, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; 9, glicerol kinasa; 10, fosfoglicerato mutasa; 11, enolasa; 12, piruvato kinasa. Hannaert y col., 2003.

El metabolismo energético de la glucosa en la forma procíclica de *T. brucei*, epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *Leishmania spp.* es mucho más elaborado que para las formas sanguíneas de *T. brucei*, ya que además de usar enzimas de la glicólisis en el glicosoma, también utiliza enzimas del ciclo de Krebs, cadena respiratoria y fosforilación oxidativa en la mitocondria (Blum, 1993; Tielens y col., 1998; Urbina, 1994). En estas células, otras dos kinasas dependientes de ATP (*fosfoeno/piruvato* carboxikinasa (PEPCK) y la piruvato fosfato dikinasa (PPDK) se encuentran en el glicosoma (Bringaud y col., 1998), mientras que la PGK están relocalizadas en el citosol, con la consecuencia que el balance A TP/ADP es mantenido (Fig. 3). Similarmente, la presencia en el glicosoma de la malato deshidrogenada (MDH) y de la fumarato reductasa (FRD) dependientes de NADH en estas células, permite regenerar el NAD^+ utilizado por la GPDH o por el fosfoenolpiruvato (PEP) que se vaya por la PyK (Besteiro y col., 2002), por lo que el balance NAD^+/NADH se mantiene en el glicosoma.

Podría ser notado que la descripción estequiométrica del metabolismo en el glicosoma de los trypanosomas procíclicos no está basado únicamente sobre la distribución cuantitativa del flujo a través de varias ramificaciones del catabolismo de carbohidratos, sino también otras reacciones que ocurren simultáneamente dentro de la organela, o transporte de metabolitos a través de su membrana.

Inicialmente se propuso que el confinamiento de las enzimas glicolíticas dentro de una organela era una adaptación evolutiva de los trypanosomatides para sustentar un alto flujo glicolítico (Oppendoes, 1987), razón por lo cual se limitaría la difusión de metabolitos glicolíticos y de esta forma habría un elevado flujo. Sin embargo, esta noción es ahora considerada muy poco probable. Primero, un flujo glicolítico relativamente alto ha sido encontrado únicamente para algunos trypanosomatides que viven en medios ambientes ricos en azúcares (forma sanguínea de *T. brucei* y *Phytomonas* que viven en el látex de plantas y frutos).



C.C.Reconocimiento

Segundo, ha sido demostrado que la levaduras tienen dos veces más alto flujo glicolítico que *T. brucei*, con dos veces menos proteínas glicolíticas no compartimentalizadas (Bakker y col., 2000). Tercero, los cálculos han mostrado que aun cuando las enzimas estuvieran dispersas en el citósol, el flujo glicolítico en los trypanosomatides no puede ser limitado por la difusión de los metabolitos desde una enzima a la siguiente, si no más bien por la actividad catalítica de las enzimas (Bakker y col., 1995).

Otro aspecto interesante de los glicosomas es la aparente pérdida de regulación en la actividad de las enzimas glicolíticas HXK (*T. cruzi* y *T. brucei*) y PFK (*T. c* y *L. donovani*) (Nwagwu y Oppendoes, 1982; Cronin y Tipton, 1985; Lopez y col., 2002; Cáceres y col., 2003). En la mayoría de los organismos, las actividades de estas dos enzimas claves, así como la PyK son altamente reguladas, por sus productos o por moléculas efectoras. Esta regulación sirve para dos propósitos esenciales. Primero, evitar la pérdida de ATP por ciclos fútiles cuando la glicólisis y la gluconeogénesis ocurren simultáneamente. Segundo, ha sido argumentado y confirmado experimentalmente usando mutantes de levaduras, que el diseño de la glicólisis es intrínsecamente dañino por el hecho de que el ATP es primeramente invertido para posteriormente ser producido (Teusik y col., 1998). Esta inversión de ATP hace a la reacción catalizada por la primera enzima virtualmente irreversible y por consiguiente la enzima es insensible a productos posteriormente producidos en la ruta (Fig. 4). Esto podría conducir a una acumulación restringida de intermediarios glicolíticos, a menos que la actividad de los primeros pasos de la ruta (HXK y PFK) estén fuertemente regulados para evitar esto.

En los trypanosomas la acumulación tóxica de intermediarios fosforilados por falta de regulación en la HXK y PFK podría ser evitada por la compartimentalización, ya que las kinasas en el comienzo de la ruta responden a los bajos niveles de ATP/ADP glicosomales, más que a la alta relación del ATP/ADP en el citósol. Por consiguiente, se podría concluir que la compartimentalización de la glicólisis sirve como una función regulatoria que compensa la pérdida de actividad de regulación de sus enzimas (Furuya y col., 2002; Moyerson y col., 2003).

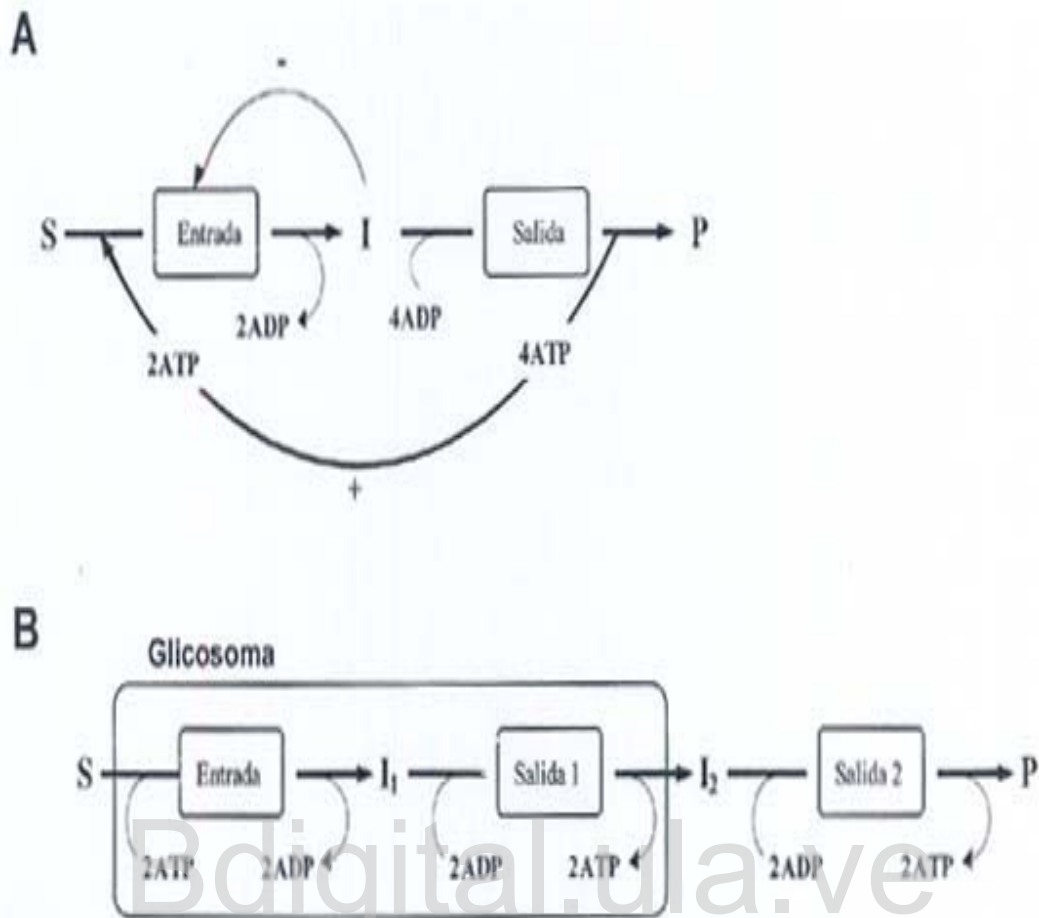


Figura 4. Implicaciones del "turbo" en el diseño de la ruta glicolítica. (A) El diseño de la ruta glicolítica, en sus dos primeros pasos (HK, PFK) la colocan lejos de su equilibrio por continuas inversiones de ATP, conduciendo a una acumulación no restringida de intermediarios, si no hay una fuerte regulación de estos pasos por productos o inhibición por feed-back. (B) La compartimentalización de la mayor parte de la ruta en los tripanosomas (no hay producción neta de ATP dentro del glicosoma), conduciría a una pérdida en la baja relación ATP/ADP sensada por la HK y PFK, colocando así las actividades de estas enzimas bajo control sin necesidad de ser inhibidas por retroalimentación. Abreviaturas: I, intermediarios; S, sustratos; P, productos.

1.3. RUTA DE LAS PENTOSAS FOSFATO y GLICOSOMAS

La glicólisis no es el único proceso metabólico que ocurre en el glicosoma. Semejante a otros miembros de la familia de los peroxisomas otras rutas de degradación y síntesis ocurren en esta organela. En los glicosomas está presente la ruta de las pentosas fosfatos (PPP), donde este proceso de degradación alternativo de la glucosa, suministra a la célula poder redox (NADPH) para biosíntesis, defensa contra estrés oxidativo y de ribosa 5-fosfato para ser usado en la síntesis de nucleótidos. En las formas sanguíneas de *T. brucei*, el flujo relativo a través de la ruta de las pentosas fosfato podría ser menor, como ha sido inferido de la cantidad de piruvato producido desde la glucosa. Aún en células crecidas en cultivos la cantidad de piruvato observado es cercana al máximo posible de dos moléculas de piruvato producidas por molécula de glucosa consumida. El canalización de la glucosa en la ruta de las pentosas fosfato podría por consiguiente ser muy pequeña. No obstante, las enzimas de la ruta de las pentosas fosfato tienen baja actividad específica, comparadas a las de la vía glicolítica. Sin embargo, las actividades específicas son considerablemente más altas en los procíclicos de *T. brucei*, en los promastigotes de *Leishmania* y en los epimastigotes de *T. cruzi*. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6- fosfogluconolactonasa han sido dos de las enzimas estudiadas en esta ruta, las cuales tienen una distribución dual (glicosoma y citosol) en estos parásitos, en el glicosoma estas enzimas representan entre un 15-50% de la actividad, y el resto en el citosol (Heise y Opperdoes, 1999; Duffieux y col., 2000). Por ejemplo, una peroxidasa fue localizada en los glicosomas de *T. cruzi*, vía glutatión y tryparedoxina, recibiendo sus electrones desde la trypanotióna (Wilkinson y col., 2002). Este sistema de defensa depende últimamente del NADPH producido a través de la ruta de las pentosas fosfato.

Si las reacciones redox involucrando NADPH / NADP⁺ dentro del glicosoma están unidas a través de un mecanismo de lanzadera para las reacciones redox fuera de la organela, o si hay un balance en la formación de NADPH y consumo

por diferentes sistemas enzimáticos en el glicosoma dependiente de esos cofactores, está aún por establecerse.

1.4. BIOGENESIS DE LOS PEROXISOMAS

Los procesos de formación de peroxisomas funcionales involucran múltiples rutas. Los lípidos pueden ser secuestrados es para formar parte de la membrana de la organela. Poco es conocido acerca de este proceso, aunque ha sido demostrado que la composición de lípidos de la membrana de los peroxisomas y glicosomas difieren de los perfiles totales de las células (Oppenheimer, 1984, Quiñones y col., 2004). La importación de proteínas a la matriz requiere de un conjunto de proteínas peroxisomales, así como de receptores citosólicos. Esta vía es distinta de la requerida para la inserción de proteínas dentro de la membrana de los peroxisomas. Varias especies de levaduras han servido como organismos modelo para estudiar las proteínas involucradas en la construcción de un peroxisoma funcional (Elgersman y Taback, 1996). Entre los mutantes seleccionados como defectivos en el crecimiento están los relacionados con la biogénesis de los peroxisomas. Las proteínas correspondientes son llamadas peroxinas (PEX). La mayoría de los genes PEX están moderadamente conservados, con homologías putativas presentes entre diversos organismos como *S. cerevisiae* humanos, y trypanosomatides (Subramani y col., 2000).

1.4.1. Importación de proteínas a la matriz de los peroxisomas o glicosomas

Las proteínas de la matriz del glicosoma y peroxisomas son sintetizadas en ribosomas libres en el citosol y entonces transferidas a la organela, sin ninguna modificación proteolítica. Tres clases de señales topológicas han sido identificadas para las proteínas de la matriz de los peroxisomas. El mejor definido de estos es el tripéptido C - terminal Ser-Lys-Leu (SKL o secuencias relacionadas) (Gould y col., 1989; Sommer y col., 1992). Este motivo, llamado secuencia señal de importación peroxisomal de tipo 1 (PTS1), está presente en muchas de las proteínas de la matriz del peroxisoma. Muchas proteínas del glicosoma también tienen secuencias del tipo PTS1 y esta región es requerida

para la importación al glicosoma. No obstante, algunas degeneraciones aceptables se han encontrado en las señales de importación entre peroxisomas de mamíferos y trypanosomatides (Sommer y col., 1992). Esto sugiere fuertemente que los mecanismos de importación de proteínas a los peroxisomas y glicosomas tienen aspectos comunes. Esta hipótesis ha sido fortalecida por la identificación de un segundo tipo de secuencia señal PTS (PTS2), la cual está presente cerca del N-terminal de varias proteínas del peroxisoma (Swinkels y col., 1991). Una secuencia similar se ha encontrado en proteínas importadas a los glicosomas, como por ejemplo la aldolasa en *T. brucei* y la hexokinasa *T. cruzi* (Blattner y col., 1991; Cáceres y col., 2003). Además, de estos motivos, hay secuencias targeting internas, las cuales permanecen aún por definir (Karpichev y Small, 2000; Peterson y col., 1997). En los trypanosomatides, algunas enzimas son codificadas por un solo gen, sin embargo, sus productos están repartidos entre glicosomas y citosol (Michels y Hannaert, 1994). Estudios de targeting de proteínas receptoras han mostrado que cambios en el tripéptido PTS1 (Sommer y col., 1992), así como alteraciones en las secuencias adyacentes (Lametschwandtner y col., 1998), pueden causar localizaciones duales, probablemente como un resultado de la disminución de la afinidad por el receptor PTS1.

1.4.2. Importación de proteínas a la matriz.

Los genes PEX codifican para las peroxinas, las cuales están involucradas en la importación de proteínas a la matriz. Cuando estos genes son interrumpidos los peroxisomas formados no son funcionales, ya que se forman peroxisomas fantasmas. La importación de proteínas dentro de los peroxisomas involucra múltiples proteínas, incluyendo aquellas que residen en complejos estables y aquellas que interactúan de manera transitoria (Fig. 5). Muchas proteínas PEX contienen motivos de interacción proteína-proteína, incluyendo motivos tetratricopéptido (TPR), repeticiones WD, dominos SH3, y anillos de cisteínas y de zinc (Tabla 1). Interesantemente, ninguna de las proteínas PEX parecen ser homólogas a las proteínas involucradas en la importación a la mitocondria y los cloroplastos.

Tabla 1. Ruta y enzimas de peroxisomas y glicosomas

	Peroxisomas mamíferos	Peroxisomas levaduras	Glioxisomas	Glicosomas
β -oxidación	Si	Si	Si	Si
Catalasa	Si	Si	Si	Especie dependiente
Biosíntesis Eter lípidos	Si	No	No	Si
Glicólisis	No	No	No	Si
Ciclo del glioxilato	No	Si	Si	No
Biosíntesis isoprenoides	Si	No	?	Si
Purinas salvage	No	No	No	Si

El primer paso en la importación de proteínas en los peroxisomas es la interacción de la secuencia targeting con un receptor. Las PTSs son primero reconocidas en el citosol. Idénticamente, ambos receptores PTS1, PEX5, el receptor PTS2, PEX7, parecen hacer un ciclo entre el citosol y peroxisomas (Dodt Gould, 1996; Elgersma y col., 1998). Defectos en estos genes resultan en la ausencia de las proteínas receptoras PTS1 o PTS2 en la organela y las proteínas a importar son encontradas des localizadas en el citosol (Krisans y col., 2002).

Proteínas homólogas a la PEX5 han sido encontradas en muchos otros organismos incluyendo mamíferos, levaduras, *L. donovani* (Jardin y col., 2000) y *T. brucei* (de Walque y col., 1999)

Un número de PMPs integrales y periféricas tienen funciones en los procesos de importación y la interrupción de los genes correspondientes, típicamente conducen a defectos en la importación de proteínas con señales tipo PTS1 y PTS2 (Fig. 6). Entre estas proteínas se encuentran las del complejo docking, las cuales tienen proteínas integrales PEX13, más proteínas periféricas de membrana PEX14 y PEX17 (Girzalsky y col., 1999; Albertini y col., 1997; Huhse y col., 1998). Además del complejo docking, múltiples proteínas PEX que participan en los ciclos de importación han sido identificadas, PEX2, PEX10 y PEX son PMPs integrales, las cuales tienen motivos fingers zinc (Boden y Fremant, 1996).

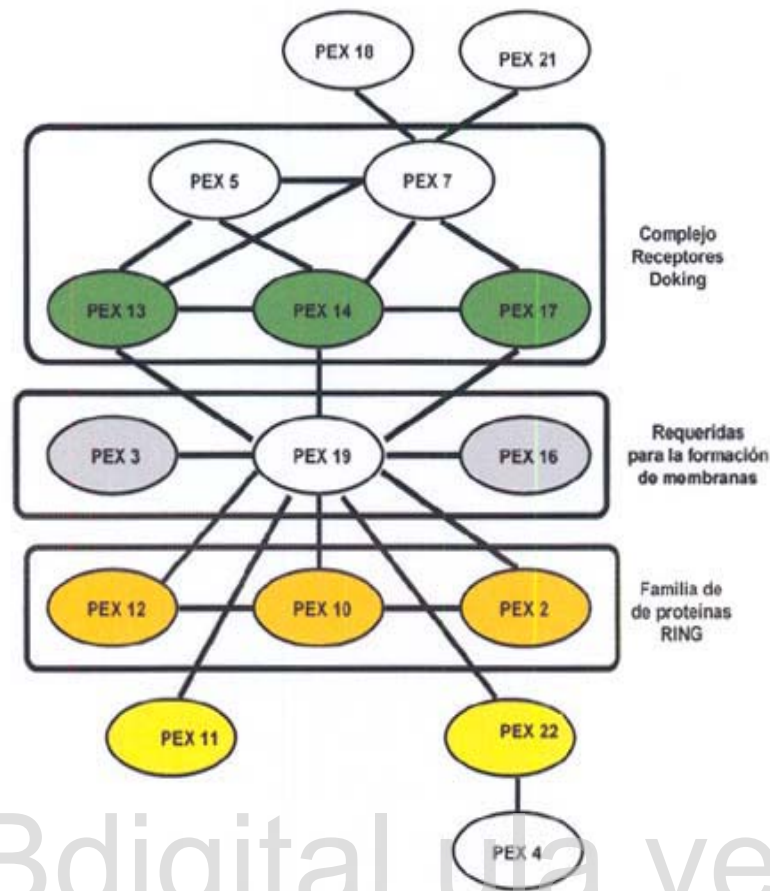


Figura 5. Red de interacciones entre las proteínas PEX. Los óvalos blancos proteínas solubles y los coloreados representan proteínas periféricas e integrales.



Figura 6. Este dibujo involucra proteínas importantes en los peroxisomas. Los receptores citosólicos que reconocen a las PTSs y se muestra una aproximación al complejo docking en la superficie de la membrana de los peroxisomas.

Exactamente cómo las proteínas enlazadas a los complejos PEX atraviesan la membrana de los peroxisomas permanece aún sin aclararse. Sin embargo, sorprendentemente se ha observado que las proteínas en formas plegadas pueden ser importadas dentro de los peroxisomas y glicosomas, esto

ha sido evidenciado por experimentos de cross-linking (Hausler y col., 1996; Walton y col., 1995). Estos datos sugieren que en contraste a las proteínas importadas a los cloroplastos y mitocondrias, la importación de las proteínas a los peroxisomas y glicosomas ocurre de forma plegada y en estados multiméricos.

1.5. La Membrana de los Peroxisomas.

A diferencia de las proteínas que van a la matriz del peroxisoma con secuencias del tipo PTS1 o PTS2, las que van a la membrana PMPs no usan estas secuencias targeting. La PMP47 y la PEX3, son PMPs esenciales para la biogénesis de los peroxisomas, la primera tiene cuatro a cinco dominios transmembranales y la segunda un solo dominio transmembranal en el N-terminal (McCammon y col., 1994; Soukupova y col., 1999). Al comparar las secuencias de las PEX13 y PMP47 de varias especies han identificado pequeños grupos de aminoácidos básicos que son conservados en regiones identificadas como necesarias para su importación hacia los peroxisomas (Dyer y col., 1996). La PEX15 tiene un solo dominio transmembranal y la señal targeting está en el C - terminal y un pequeño grupo de aminoácidos básicos similares a los encontrados para la PEX3 (Dyer y col., 1996). Así, que es muy probable que este grupo de cargas positivas en el C - terminal de algunas proteínas de la matriz de los peroxisomas puedan estar involucradas como señales de sorting.

De las PEX únicamente se han identificado tres por knockouts que producen peroxisomas fantasmas: PEX3 (Hettema y col., 2000), PEX16 (South y Gould, 1999), y PEX19 (Hettema y col., 2000). Estas proteínas podrían estar involucradas en la biogénesis de la membrana de los peroxisomas. La PEX16 es una proteína integral de membrana y muy poco se conoce acerca de su función. La sobreexpresión PEX3 induce la multiplicación de los peroxisomas, sugiriendo un papel en la síntesis de la membrana de los peroxisomas PEX19 es predominantemente citosólica Esta interactúa con numerosas PMPs, incluyendo PEX3. Este descubrimiento condujo a sugerir que la función de PEX19 es de receptor para las PMPs (Sacksteder y col., 2000).

El papel del retículo endoplasmático (RE) en la biogénesis - de los peroxisomas es un tema sujeto a muchos debates. La yuxtaposición de la membrana del RE y peroxisomas por micrografías electrónicas ha conducido a la hipótesis de que los peroxisomas se derivan del RE. Esta hipótesis tiene como desventaja que las proteínas que van a la matriz y a la membrana de los peroxisomas son sintetizadas en polisomas libres en el citosol y son importadas directamente a esta organela. Esta última teoría está apoyada en que dos proteínas miembros de la familia AAA, PEX1 y PEX6, han sido implicadas en la biogénesis de los peroxisomas. Las proteínas AAA son ATPsas asociadas con diversas actividades celulares. Muchas proteínas AAA participan en eventos de fusiones de vesículas. Mutaciones en PEX1 o PEX6 conducen a la pérdida de las funciones de los peroxisomas, y con la aparición de pequeñas vesículas que contienen PMPs y bajos niveles de proteínas de la matriz. PEX1 y PEX6 interactúan con vesículas pre-peroxisomales (Titorenko y col., 2000).

1.6. Genes PEX en tripanosomatídeos.

Varios genes PEX han sido determinados en tripanosomatídeos. Estos genes han sido identificados a través de búsquedas funcionales como la PEX2 (Flaspohler y col., 1997), clonaje del gen y purificación de PEX11 (Lorenz y col., 1998), o por virtud de homología con secuencias PEX de otros organismos, la PEX5 (Jardín y col., 2000; de Walque y col., 1999). Ningún mutante nulo se ha podido obtener para los genes PEX en los trypanosomatídeos. Esto apuntaría en favor de la naturaleza esencial de los glicosomas en el parásito y contrasta con el hecho de que los peroxisomas no son generalmente requeridos para la sobrevivencia en otros organismos (Henderson y col., 2000). Estos datos soportan el concepto de que el bloqueo del proceso de compartimentalización de los glicosomas podría ser un potencial blanco terapéutico. No obstante, ningún inhibidor específico ha sido identificado sobre las funciones de las PEX para ningún organismo.

1.7. FUNCIONES METABOLICAS EN LOS GLICOSOMAS

1.7.1. Glicólisis.

La presencia de enzimas glicolíticas para la conversión de glucosa en 3-fosfoglicerato o 2-fosfoglicerato es la etiqueta que distingue a los glicosomas de los peroxisomas (Oppenheimer y Borst, 1977). Se ha propuesto que no hay síntesis neta de ATP dentro del glicosoma, ya que el 3-fosfoglicerato generado dentro de la organela es metabolizado posteriormente en el citosol, generando ATP por fosforilación a nivel de sustrato. La producción de equivalentes reducidos necesarios para la glicólisis es generado a través de la lanzadera glicerolfosfato entre el glicosoma y la mitocondria (Oppenheimer, 1987).

En los tripanosomatídeos las enzimas glicolíticas en el glicosoma presentan cambios de estado-específico en abundancia, especialmente en *T. brucei* muestra cambios dramáticos. La forma procíclica genera energía a través de respiración mediada por citocromos, mientras que las formas sanguíneas han perdido esta ruta y generan energía únicamente a través de la glicólisis. De hecho los niveles de enzimas glicolíticas en el glicosoma son mucho más altas en la forma sanguínea que en la forma procíclica (Hart y col., 1984).

Modelos matemáticos basados sobre datos cinéticos para cada enzima se han usado para calcular cuál paso en la ruta glicolítica puede ser más efectivo como blanco para inhibir el flujo glicolítico en *T. brucei* (Bakker y col., 1999). El transportador de glucosa al nivel de la membrana plasmática ha sido considerado como el blanco más prominente, seguido por las enzimas del glicosoma: aldolasa, glicerol-3-fosfato dehidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y fosfoglicerato kinasa (Bakker y col., 1999). Estas enzimas han sido escogidas como posibles blancos quimioterapéuticos de acuerdo a los controles de flujo obtenidos con modelos matemáticos. Además de los modelos cinéticos, análisis estructurales indican que varias enzimas glicolíticas pueden ser útiles como blancos para drogas. Por ejemplo, la secuencia PTS2 sobre las subunidades de la aldolasa presenta una estructura única que puede ser blanco para interrumpir la glicólisis (Chudzik DM, 2000). Otra enzima candidata es la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, recientemente cristalizada. Esta enzima, la cual es inhibida por el agente anti-parásito melarsoprol, muestra

diferencias muy importantes con, su contraparte de mamíferos (Suresh y col., 2000). También la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa ha sido cristalizada y se han desarrollado inhibidores en base a la estructura de la enzima (Aronov y col., 1999). Estos compuestos son tóxicos *in vivo* para *T. brucei* y *T. cruzi*.

1.7.2. β -Oxidación de ácidos grasos

En la mayoría de los organismos, los peroxisomas son el sitio donde ocurre la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, corta y ramificada, mientras que en la mitocondria se oxidan los de cadenas medias y largas (Mannaerts y Van Veldhoren, 1996). Los productos de β -oxidación en la mitocondria (acetil-CoA, NADH, FADH) son utilizados en ciclo de Krebs y cadena transportadora de electrones para generar ATP. Los productos generados en los peroxisomas (acetil-CoA, NADH y peróxido de hidrógeno) no están directamente acoplados a un sistema para generar ATP. En este caso la idea es que el acetil CoA pueda ser usado en la biosíntesis de isoprenoides y éter lípidos (Mannaerts y Van Veldhoren, 1996). La compartimentalización de reacciones con un alto potencial de daño oxidativa, así como respiración mediada por citocromos (mitocondria) y fotosíntesis (cloroplastos), puede servir para proteger a las células de daños periféricos. El mismo principio de racionalidad puede ser aplicado a la compartimentalización de la β -oxidación de los ácidos grasos, la cual involucra rondas repetidas de oxidación y producción de peróxido de hidrógeno.

Los peroxisomas son impermeables a moléculas, así como el NADH y acetilCoA (Van Roermund y Van Veldhoren, 1995). Por consiguiente, es generalmente aceptado que los peroxisomas y glicosomas tienen en su membrana proteínas que transportan los sustratos necesarios y productos. Varios transportadores del tipo ABC han sido identificados en los peroxisomas (por ejemplo, PMP70, ALDRP en humanos; Pat1p, Pat2p en *S. cerevisiae*), algunas de las funciones de estas moléculas es transportar ácidos grasos activados (Verleur N, 1997). PEX11, el cual no es un transportador ASC, parece estar involucrado en el transporte de ácidos grasos o un cofactor necesario para la β -oxidación, aunque el mecanismo de su acción no está claro (Van Roermund y col., 2000).

La ruta de β -oxidación parece estar involucrada en la regulación de la abundancia de los peroxisomas. En células humanas deficientes en enzimas que median la β -oxidación se observa un decrecimiento en el número de peroxisomas (Chang y col., 1999). PEX11 también está involucrado en la regulación del tamaño de los peroxisomas y en su abundancia. Interesantemente, aún cuando no hay suficientes evidencias para la proliferación de los glicosomas en respuesta a agentes medioambientales, la sobre-expresión de PEX11 en *T. brucei* conduce a un incremento dramático en el tamaño de los glicosomas (Lorenz y col., 1998).

La enzima marcadora de los peroxisomas es la catalasa, la cual no ha sido encontrada en los glicosomas de *T. brucei* y en varias especies de *Leishmania* analizadas y *T. cruzi*, pero ésta se ha encontrado en los glicosomas de *Phytomonas* y *Crithidia* (Sanchez-Moreno y Oppendoes, 1992). El paso inicial de la β -oxidación es la activación de los ácidos grasos en sus derivados acil-CoA por la acil-CoA sintetasa, seguido por cuatro reacciones consecutivas, oxidación, hidratación, deshidrogenación y transferencia de grupos acil (Fig 7). Aunque todas las actividades de las cinco enzimas de esta ruta están presentes en peroxisomas y glicosomas, únicamente tres de ellas (acil-CoA sintetasa, 2-enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa) han sido identificadas en glicosomas de *T. brucei* y de *Leishmania sp.* (Wiemer, 1996; Hart y col., 1984). Una peculiaridad de la β -oxidación en los tripanosomatídeos es la dependencia de NADP^+ de la 3 - hidroxiacil CoA deshidrogenasa; esta enzima es dependiente de NAD^+ en otras células eucariotas. Consistente con la situación en las células de mamíferos, donde la β -oxidación tiene lugar en ambos peroxisomas y mitocondria, en los tripanosomatídeos ocurre en glicosomas y mitocondria (Wiemer, 1996).

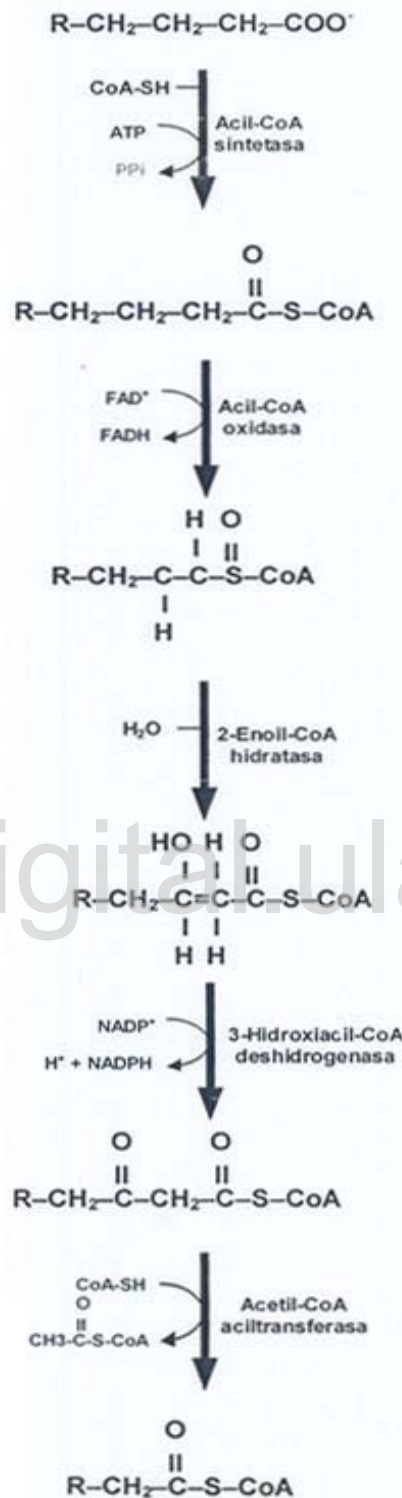


Figura 7. Enzimas de la β -oxidación de los ácidos grasos en los glicosomas de los tripanosomatídeos (Michels y col., 2000).

1.7.3. Biosíntesis de éter lípidos.

Los éter lípidos (alkoxyfosfolípidos) se caracterizan por la presencia de un éter en lugar de un típico acil. Las enzimas de la biosíntesis de éter lípidos se encuentran localizadas exclusivamente dentro de los peroxisomas y glicosomas de los trypanosomas (Oppenheimer, 1984; Heise y Oppenheimer, 1997). La síntesis de éter lípidos no ocurre en células de plantas y de levaduras. La síntesis de éter lípidos en los glicosomas procede desde la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) más acetil-CoA (Heise y Oppenheimer, 1997) (Fig. 8). Experimentos de protección a proteasas sugieren que las primeras dos enzimas, DHAP aciltransferasa (la cual posee una PTS1), y la alquil-DHAP sintetasa residen dentro de la matriz de los peroxisomas, la tercera enzima, acil/alquil-DHAP reductasa, probablemente está en el citosol (Hajra y Das, 1996).

En los trypanosomatídeos, los éter lípidos tienen un papel muy importante en la asociación de moléculas con la superficie de la membrana plasmática a través de anclas de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Ferguson, 1999). Mientras que muchas proteínas, incluyendo las glicoproteínas variantes de superficie (VPS) de *Trypanosoma brucei*, usan anclas de GPI que contienen únicamente éter lípidos, las anclas GPI de los promastigotes de *Leishmania* lipofosfolipidoglican (LPG) contienen un éter lípido inusual 1-O-alkil-2-lisofosfatidilinositol (Turco y Descoteaux, 1992). Algunos análogos de éter lípidos utilizados en tratamientos anti-cáncer son también efectivos contra el parásito *Leishmania* (Croft y col., 1996). Hexadecilfosfocolina (miltefosina), un fosfolípido sintético, ha mostrado una actividad prominente contra la *Leishmaniasis visceral* humana (Sundar y col., 2000). Aunque el mecanismo de la actividad *anti-Leishmania* de la miltefosina no está claro, estos datos sugieren la incorporación de éter lípidos en *Leishmania* y el potencial uso de esta ruta de síntesis como un blanco para drogas.

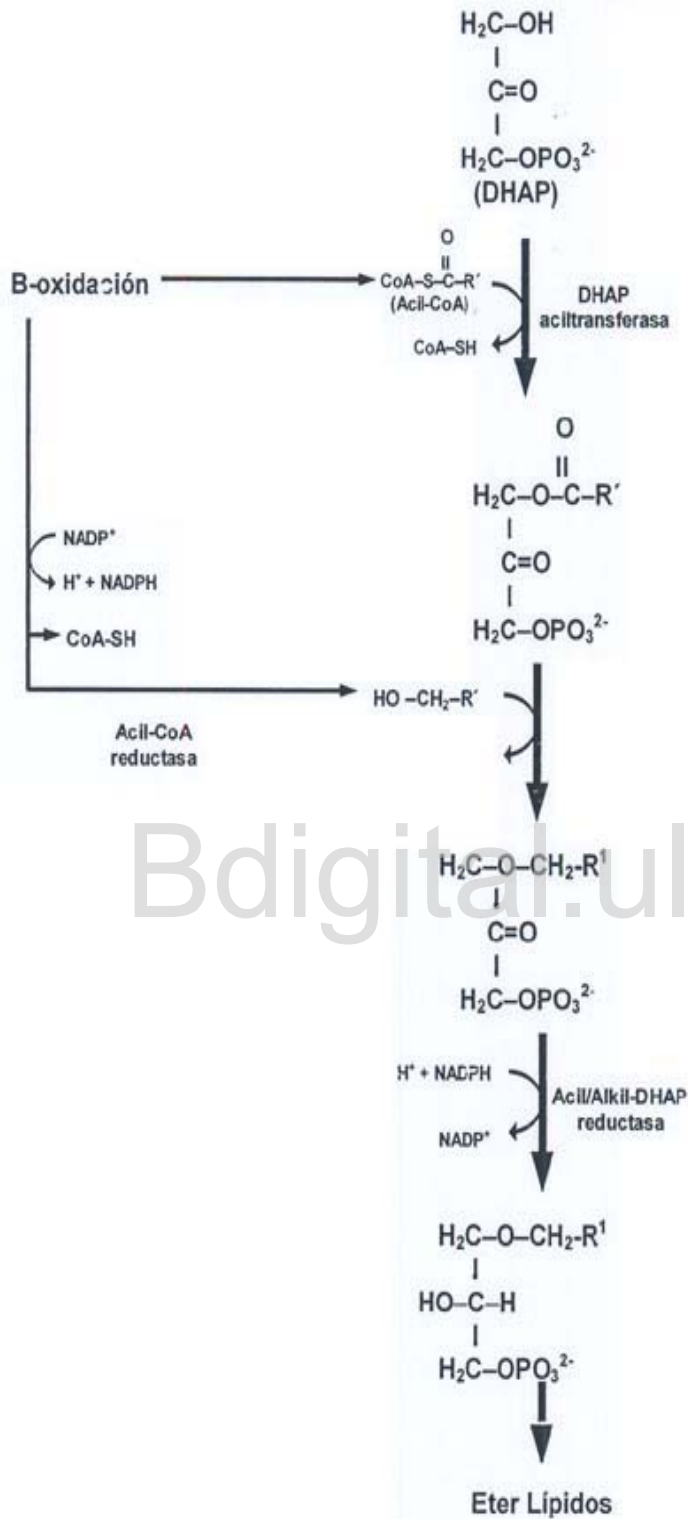


Figura 8. Enzimas involucradas en la síntesis de éter lípidos en los glicosomas de *T. brucei* (Michels y col., 2000).

1.7.4. Preservación de las purinas

Los tripanosomatídeos han perdido la ruta para la síntesis de novo de las purinas y por lo tanto necesitan completamente rescatar las purinas desde el hospedador. Sorprendentemente, varias enzimas de las purinas salvajes en, los tripanosomatídeos están localizadas en el glicosoma, a diferencia de otros eucariotas donde estas enzimas están en el citosol. Las enzimas de esta ruta encontradas en los glicosomas son: guanina fosforibosil transferasa, adenina fosforibosil transferasa y la xantina fosforibosil transferasa (Jardin y col., 1999; Hwang y Ullman, 1997). Cada una de estas enzimas contiene una secuencia PTS1 en el C-terminal. La dependencia de las purinas por parte de los parásitos *T. cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania spp.*, desde el hospedador hace a estas enzimas de interés para la intervención terapéutica. Idénticamente, estas enzimas están pobremente conservadas en los tripanosomatídeos. Sin embargo, mutantes nulos para las enzimas individuales son viables, debido a la facultad para interconvertir purinas (Hwang y Ullman, 1997). Así, un ataque terapéutico podría requerir el uso de sustratos subversivos o múltiples enzimas como blancos.

1.8. RUTA DE LA BIOSÍNTESIS DEL COLESTEROL: CONVERSIÓN DE ACETIL-CoA A FARNESIL PIROFOSFATO

Los peroxisomas fueron caracterizados inicialmente por De Duve, (1960), pero su biogénesis, bioquímica y caracterización molecular han sido estudiadas extensivamente en los años recientes. Los peroxisomas están involucrados en la biosíntesis de éter lípidos, ácidos biliares, colesterol e intermediarios del colesterol, oxidación de ácidos grasos de cadena larga, y catabolismo del ácido titánico y glioxilato (Fig. 9) (Lazarow y Fujiki, 1985).

COMPARTIMENTALIZACION DE LA BIOSINTESIS DE LOS ISOPRENOIDES

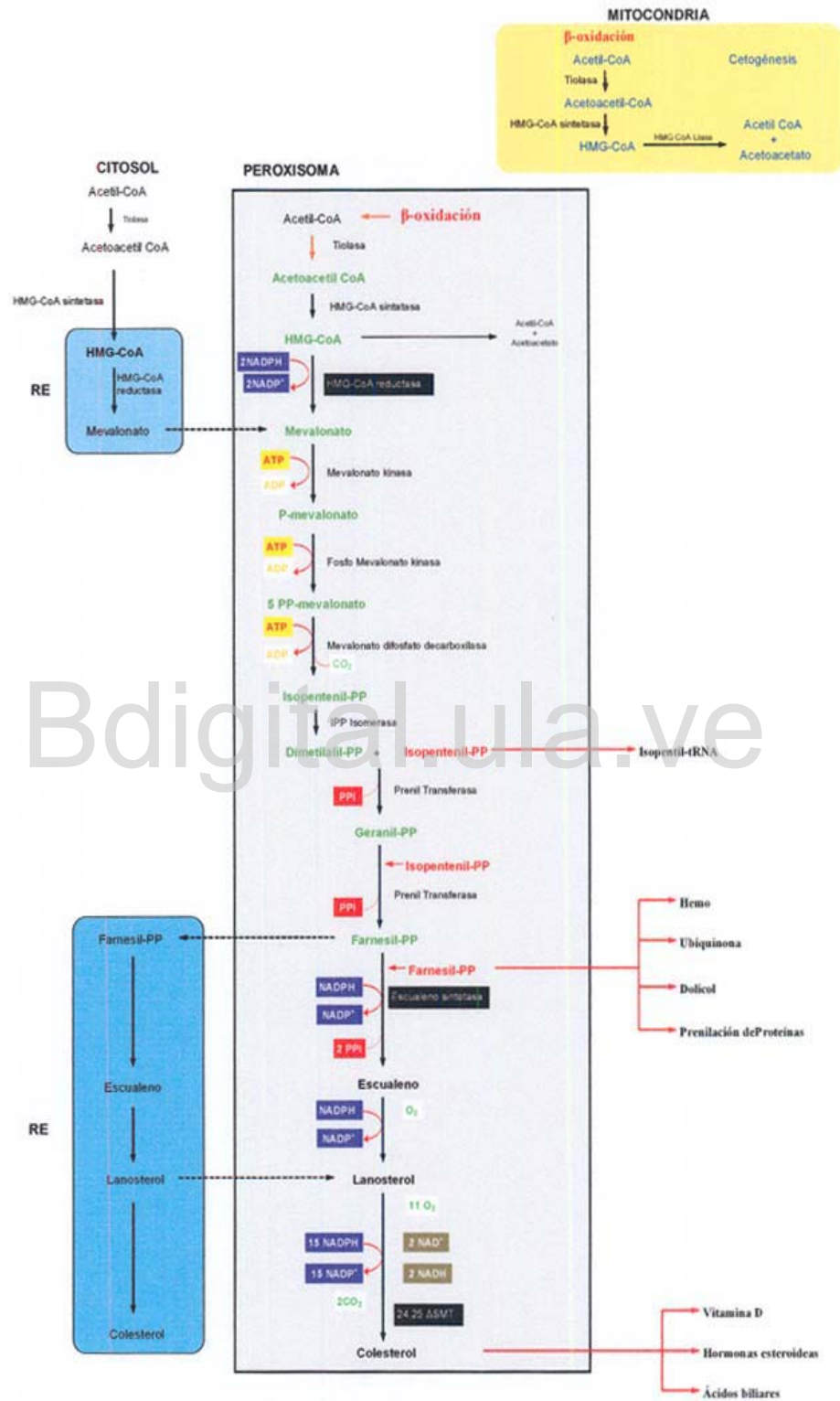


Figura 9. Compartimentalización de la ruta de biosíntesis del colesterol. Los peroxisomas contienen todas las enzimas para la conversión de acetil-CoA a farnesil difosfato. La conversión de acetil-CoA también ocurre en el citosol. La posterior conversión del acetil-CoA a HMG-CoA también ocurre en el citosol. La posterior conversión de HMG-CoA a mevalonato ocurre en ambos ER y peroxisomas. Un simple gen codifica para la acetoacetyl-CoA tioasa. Similamente para la HMG-CoA sintetasa esta codificada por un simple gen (Kisans SK, 2002).

1.8.1. Acetoacetyl-CoA tiolasa.

Acetoacetyl-CoA tiolasa (AA-CoA tiolasa) cataliza la conversión de acetil-CoA a acetoacetyl-CoA en la primera reacción de la ruta de biosíntesis de colesterol. AA-CoA tiolasa en mamíferos es codificada por dos genes y sus productos se localizan en mitocondria y citosol (Fukao y col., 1995; Song y col., 1994). Sin embargo, peroxisomas purificados pueden también sintetizar acetoacetyl-CoA desde acetil-CoA (Thompson y Krisans, 1990; Hovik y col., 1991). Análisis de la secuencia de las proteínas de ambas AA-CoA tiolasa revelaron una secuencia consenso PTS1 (QKL) en el carboxilo terminal de la AA-CoA tiolasa mitocondrial, en adición a la secuencia señal N-terminal para la mitocondria, mientras que ninguna secuencia señal para peroxisomas fue encontrada en la AA-CoA tiolasa citosólica. La localización dual de un producto de un simple gen es un tópico muy interesante para especular y estudiar. La doble localización en los peroxisomas y mitocondrias a sido observada para tres enzimas más (1) HMG-CoA liasa tiene una secuencia N-terminal de importación a la mitocondria y una PTS1 C-terminal (CKL) (Ashmarina y col., 1990; 1999), (2) la $\Delta^{2,4}$ - $\Delta^{2,4}$ -dienol-CoA isomerasa de mamíferos (Filppula SA, 1998) tiene ambas secuencias señales N-terminal para la mitocondria y C-terminal PTS1 (SKL) y (3) la α -metilacil-CoA racemasa de humanos tiene ambas secuencias señales N-terminal para la mitocondria y C-terminal PTS1 (-KASL) (Amery y col., 2000).

1.8.2. (3S)-3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA sintetasa (HMG-CoA sintetasa).

La HMG-CoA sintetasa cataliza la segunda reacción en la ruta de biosíntesis de colesterol, convirtiendo acetoacetyl-CoA en HMG-CoA. Similar a la AA-CoA tiolasa, dos genes han sido identificados para la HMG-CoA sintetasa. Un gen codifica para una enzima mitocondrial, mientras que el otro codifica para una enzima que originalmente se creía que estaba localizada en el citosol (Ayte y col., 1990). Sin embargo, estudios de fraccionamiento subcelular han demostrado que la actividad HMG-CoA sintetasa está presente en los peroxisomas (Krisan, 1988). Este resultado fue confirmado por inmunomicroscopia electrónica y por doble marcaje con inmunofluorescencia, en ambas pruebas se utilizaron anticuerpos contra la catalasa (enzima

marcadora de los peroxisomas) demostrando que la HMG-CoA sintetasa estaba localizada principalmente en los peroxisomas.

El análisis de la secuencia de la HMG-CoA sintetasa de los peroxisomas no reveló ninguna secuencia consenso PTS1 ni PTS2 clásica. No obstante, la HMGCoA sintetasa contiene una secuencia similar a una PTS2. Esta secuencia diverge de la clásica en que los aminoácidos básicos arginina o lisina, han sido reemplazados con una serina [(SV) x5 (QL)] (Olivier y col., 2000).

1.8.3. (3S)-3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa)

La HMG-CoA reductasa, es la enzima que regula la ruta de biosíntesis del colesterol, catalizando la conversión de HMG-CoA en mevalonato. Numerosos estudios incluyendo ensayos de actividad enzimática y western blotting sobre fraccionamientos subcelulares, inmunofluorescencia e inmunomicroscopía electrónica indican que la HMG-CoA reductasa está localizada en ambos peroxisomas y retículo endoplásmico (RE) (Engfelt y col., 1997; Kovacs y col., 2001). La reductasa de los peroxisomas es regulada de una manera independiente de la reductasa del RE por (1) la HMG-CoA reductasa de los peroxisomas es más resistente a inhibidores de tipo estatinas, (2) en comparación a la HMG-CoA reductasa del RE, la velocidad de degradación de la HMG-CoA reductasa no es afectada por la presencia de mevalonato y (3) la HMG-CoA reductasa de los peroxisomas no es fosforilada (Aboushadi y col., 2000). Estos datos indican las HMG-CoA reductasa del RE y de los peroxisomas pueden tener funciones separadas en la biosíntesis de isoprenoides (Aboushadi y col., 2000). Recientemente, dos genes para la HMG-CoA reductasa de mamíferos, levaduras y plantas han sido encontrados (Engfelt y col., 2001; Basson y col., 1986, Enjuto y col., 1994). No obstante, no se han podido determinar secuencias consensos de tipo PTS1 y PTS2 en estas proteínas para su localización en los peroxisomas.

1.8.4. Mevalonato kinasa (MvK).

La mevalonato kinasa (MvK) fosforila el mevalonato en la cuarta reacción de la ruta de biosíntesis del colesterol. La localización en los peroxisomas de la MvK ha sido concluyentemente demostrada a través de experimentos de inmunodetección sobre fraccionamientos subcelulares,

inmunofluorescencia e inmunomicroscopía electrónica (Stamellos y col., 1992; Biardi y col., 1994). Análisis de secuencia de aminoácidos han revelado una secuencia consenso PTS2 (KV) x5 (HA) en la región N-terminal de MvK.

1.8.5. Conversión de mevalonato a farnesil pirofosfato (FPP).

Tres enzimas catalizan las reacciones requeridas para transformar el mevalonato en isopentil difosfato (IPP). Originalmente estas enzimas, fosfomevalonato kinasa (PMvK), mevalonato difosfato kinasa (MPD) e isopentil difosfato isomerasa (IPP), se pensaba que eran enzimas citosolicas; sin embargo, estudios recientes han demostrado que ellas están localizadas en los peroxisomas. Biardi y col., 1996; mostraron que las actividades de MvK, PMvK y MPD eran iguales en células intactas y permeabilizadas con digitonina. La digitonina permeabiliza membranas al formar complejos con el colesterol y la permeabiliza selectivamente cuando se incuba con las células, ya que la membrana plasmática es rica en colesterol, mientras que las membranas internas de las organelas tienen menos colesterol. Por consiguiente las células tratadas con digitonina son carenciadas de componentes citosólicos, mientras que las enzimas de las organelas permanecen retenidas (Biardi y col., 1996). Estos datos indican que las actividades de estas enzimas estaban contenidas en una organela y no en citosol.

1.8.6. Fosfomevalonato Kinasa (PMvK).

PMvK cataliza la conversión de mevalonato 5-fosfato en mevalonato 5-difosfato como la quinta reacción de la ruta de biosíntesis de colesterol. A través de construcciones de fusión con la proteína verde fluorescente (GFP) se ha demostrado que esta enzima requiere una secuencia consenso PTS1 (SRL) funcional en el C-terminal como sistema de importación a los peroxisomas (Oliver y col., 1999).

1.8.7. Mevalonato difosfato descarboxilasa (MPD).

La MPD cataliza la sexta reacción de la ruta de biosíntesis de colesterol en la cual el carbono seis del mevalonato difosfato es deshidratado y descarboxilado para formar isopentil difosfato. Estudios de inmunofluorescencia utilizando una construcción con un epítopo de hemaglutinina (HA) y de la MPD,

indican que la MPD es una proteína de importación a los peroxisomas la cual requiere una secuencia señal de importación del tipo PTS2 (SV) x5 (QL) (Olivier y col., 2000).

1.8.8. Isopentil difosfato isomerasa (IPP).

La IPP isomerasa, la cual isomeriza reversiblemente el doble enlace del IPP, contiene ambas secuencias putativas PTS1 en el C-terminal (-yRM en humanos y -HRM en hamster) y un N-terminal del tipo PTS2 [(HL) x5 (QL), en humanos y en hamster]. Estudios de localización subcelular usando el epítopo (HA) en construcciones de expresión han indicado que la IPP isomerasa es dirigida a los peroxisomas a través del uso de su tripéptido C-terminal. Cuando este tripéptido fue removido desde la IPP isomerasa, la proteína expresada permaneció en el citosol (Paton y col., 1997). Estos estudios sugieren que la secuencia PTS2 putativa no es la responsable de que la IPP isomerasa vaya a los peroxisomas.

1.8.9. Farnesil difosfato sintetasa (FPP).

Esta enzima cataliza dos reacciones de condensación secuenciales de isopentil difosfato con un alil difosfato dimetilalil difosfato y geranio difosfato (Rilling, 1985). El producto de la FPP es utilizado en la síntesis de colesterol, proteínas farnesiladas y geraniladas, dolicol., coenzima Q y grupos hemo (Goldstein y col., 1990). La FPP sintetasa ha sido localizada predominantemente en los peroxisomas, basado en ensayos enzimáticos de fraccionamientos subcelulares, inmunofluorescencia e inmunomicroscopía electrónica (Krisans y col., 1994). Sin embargo, curiosamente la FPP sintetasa no contiene ninguna secuencia relacionada con los dos tipos de señales del tipo PTS 1 y PTS2 necesarias para la importación a los peroxisomas. En contraste con las señales de importación a los peroxisomas de humanos y roedores para la tiolasa AA-CoA, HMG-CoA sintetasa, MvK, PMvK, MPD, y IPP isomerasa las cuales son conservadas (Tabla 2).

Tabla 2. Señales de importación a los peroxisomas de las enzimas de la biosíntesis de colesterol

<i>Enzimas</i>	<i>Señal</i>	<i>Secuencia especie</i>
AA-CoA tiolasa	PTS1	-QKL (humano) -QKL (rata)
HMG-CoA sintetasa	PTS2	V (x5) QL (humano) SV (x5) QL (humano)
HMG-CoA reductasa	Desconocido	
Mevalonato kinasa	PTS2	KV (x5) QL (humano) KV (x5) QL (rata)
Fosfomevalonato kinasa	PTS1	-SRL (humano) -AKL (rata)
Mevalonato-PP descarboxilasa	PTS2	SV (x5) QL (humano) SV (x5) QL (rata)
Isopentil-PP isomerasa	PTS1	-yRM (humano) -HRM (rata)
Famesil-PP sintetasa	PTS2	MNGDQNSDVyAQEKQDFVQH (humano) MNGDQKIDVHNKEKQNFVQH (rata)
Consenso	PTS1	(S/A/C)(K/H/R)(L/M)
	PTS2	(R/K)(L/I/V)(x5)(H/Q)(L/A)

1.8.10. Conversión de FPP a Colesterol.

La conversión de FPP a lanosterol se pensaba que ocurría en el retículo endoplásmico (RE). La escualeno sintetasa, cataliza el primer paso comprometido en la biosíntesis del colesterol. Esta enzima ha sido localizada en varios estudios independientes exclusivamente en el RE (Fig. 9). Los datos incluyen ensayos de actividad enzimática sobre fracciones subcelulares, así como inmunomicroscopía electrónica en el cual el marcaje fue evidenciado únicamente sobre las membranas del RE (Stamellos y col., 1993; Cohen y col., 1996). Además, microsomas aislados son capaces de sintetizar colesterol desde el escualeno, mientras que desde los peroxisomas no (Krisan y col., 1996). La subsiguiente conversión de lanosterol a colesterol se ha propuesto

que tiene lugar en ambos peroxisomas y. en el RE. Esta hipótesis está basada sobre varias. Observaciones individuales incluyendo: (1) estudios de fraccionamiento subcelular que han revelado que la enzimas requeridas para la conversión, (dihidrolanosterol oxidasa, Δ^{14} -esterol reductasa, c-4esterol demetilasa y $\Delta^8_\Delta^7$ -esterol isomeraza) están localizadas en los peroxisomas (Appelkvist y col., 1994) (2) los peroxisomas también han mostrado la acumulación de intermediarios bioquímicos entre la conversión de lanosterol a colesterol (Hashimoto y col., 1994) y (3) el colesterol es sintetizado desde el dihidrolanosterol en peroxisomas aislados, en niveles similares a los producidos por microsomas aislados (Cohen y col., 1992). Mientras estos resultados son intrigantes y los datos sugieren localización en los peroxisomas, estudios posteriores serían necesarios para determinar de forma concluyente la localización subcelular de estas proteínas.

1.9. FUNCION DE LOS LIPIDOS NEUTROS (ERGOSTEROL) EN LA MEMBRANA PLASMATICA

Los estudios de composición lipídica de la membrana plasmática de los trypanosomatides muestran una singular similitud con hongos, levadura y otros eucariotes inferiores, en particular la presencia de esteroides en la membrana, ergosterol en vez del colesterol presente en las células de vertebrado. Este hecho resulta de particular importancia cuando consideramos que la membrana plasmática es el elemento fundamental que separa los componentes celulares del medio ambiente. Su presencia es un prerequisite indispensable para la existencia de los seres vivos. Aun cuando dentro de sus componentes estructurales, por excelencia encontramos a los fosfolípidos, que forman la matriz estructural, sellada impermeable a solutos hidrofílicos, cargados y neutros (como resultado del efecto hidrofóbico), para cumplir sus funciones como elemento regulador de la composición celular, se requiere de la presencia de otros componentes lipídicos y protéicos. Dentro de los lípidos, el más importante lo constituye el grupo de los lípidos neutros, en particular los esteroides, que cumplen diversas funciones muy importantes, entre otras la asociada a la regulación de la fluidez de la membrana.

En los animales el esteroide principal es el colesterol, en cambio, en hongos, levaduras, protozoarios y plantas, el esteroide principal se diferencia estructuralmente del colesterol de los animales por tener insaturaciones (al menos una) en la cadena lateral y además, por la alquilación de la misma en el carbono 24. En los organismos no fotosintéticos, el esteroide representativo principal es el ergosterol y en las plantas el sitosterol. Estos dos esteroides, se diferencian entre sí, por cuanto el sitosterol presenta el mismo grado de insaturaciones en los anillos que en el colesterol; en el ergosterol por otra parte, hay dos insaturaciones adicionales en los anillos y en la configuración del grupo 24-metil (β en ergosterol y α en el sitosterol).

Un denominador común a todos los esteroides es la estructura tetracíclica de triterpenos, con el hidroxilo libre en posición β que les confiere carácter anfipático. Así mismo encontramos una cadena lateral. En general esta estructura esteroidea se inserta en la bicapa de fosfolípidos, con el hidroxilo libre interactuando con las cabezas polares de los fosfolípidos, la estructura planar, rígida de los anillos interactúan con la región proximal de las cadenas acíclicas de los fosfolípidos y la cadena lateral se extiende profundamente hacia el interior de la bicapa (Bloch, 1983).

En los animales, el colesterol modula el estado físico de la membrana. Disminuciones en la proporción colesterol/fosfolípidos disminuyen la microviscosidad de la membrana y alteran en forma concomitante otras de sus funciones: incrementos en el transporte de rubidio por la ATPasa-Na-K, incrementos en el eflujo pasivo de rubidio, glucosa y otros solutos, incrementos en la fragilidad de la membrana (Bloch, 1983; Vanden Bossche y col., 1990). Adicionalmente el colesterol cumple otras funciones, asociadas a la síntesis de hormonas esteroideas, vitamina D y a la proliferación y diferenciación celular (Cornell, 1977).

En los organismos que poseen esteroides alquilados en la cadena lateral (ergosterol, sitosterol) su presencia también se asocia a la modulación de la fluidez de la bicapa. Dependiendo del estado físico de la membrana, pueden incrementar (efecto condensante) o disminuir (efecto licuecente) el orden de las cadenas acíclicas de los fosfolípidos. Estos cambios físicos de la membrana se asocian a cambios en otras propiedades de la misma, como por ejemplo alteraciones en la permeabilidad a la glucosa (Vanden Bossche y col., 1990),

cambios en actividades enzimáticas de la quitina sintetasa de levaduras (Pesti y col., 1981; Koller y col., 1992).

El esteroide más importante en hongos y protozoarios es el ergosterol, el cual fue aislado por primera vez por Tarnet, (1889) del ergot (hongo del centeno), posteriormente Smedly-MacLean y Thomas, 1920 lo aíslan de la levadura cervecera y de la levadura de panadería. En protozoarios se demostró la presencia de ergosterol y otros compuestos relacionados tipo ergosta, en *Leptomonas culicidarum* por Halevy y Sarel (1965). En el análisis el contenido de esteroides fue detectado la presencia de ergosterol, en un amplio grupo de protozoarios, que entre otros incluyó *Polytoma uvella*, *Crithidia oncopelti*, *Polytomella coeca*, *Trypanosoma mega* (forma sanguínea), *Trypanosoma rhodesiense* (forma de cultivo). También fueron reportados casos como *Tetrahimena piriformis* y la forma sanguínea de *T. rhodesiense* en los que no se detectó ergosterol. En la ameba del suelo *Acanthamoeba*, Smith FR, 1968 encuentra también ergosterol. Korn y col. (1969) reportan la presencia en *Trypanosoma cruzi* de ergosterol y compuestos relacionados, incluyendo un componente etilado en el carbono 24, el 24-etilen-7-dehidrocolesterol (stigmata 7, 24(28) dien-3 β -ol) y el ergosta-7, 24(28)-dien-3 β -ol. En *C. fasciculata* al igual que Kusel y Weber (1965), sólo detectaron la presencia de ergosterol. Cuando se crecieron ambos organismos en presencia de colesterol, éste también fue detectado. Goad y col., (1984) investigaron el contenido de esteroides en diferentes especies de *Leishmanias*, encontrando que el esteroide principal era el ergosta-5, 7, 24(28)-trien-3 β -ol y en la mayoría de las especies, el ergosterol como un componente secundario. Solamente en dos subespecies de *L. mexicana* y *pifanoi* no se encontró ergosterol. Así mismo se reportó la presencia de la forma stigmata en las especies estudiadas, a diferencia de *L. mexicana*, con cantidades muy pequeñas o ausente.

Goad y col. (1989) encontraron diferencias en la composición de esteroides entre epimastigotes y tripomastigotes de cultivo de *T. cruzi*. En epimastigotes, encuentran cantidades significativas de ergosterol, dos formas de etiladas stigmata-5,7,22-trien-3 β -ol y stigmata-5,7-dien-3 β -ol, ergosta-5,7-dien-3 β -ol y en menor proporción ergosta-5,24(28)-dien-3 β -ol (24-metilendihidro-lanosterol) y lanosterol. Por el contrario, en la forma

tripomastigote obtenida de cultivo de células, la cantidad de ergosterol y las dos formas etiladas son significativamente menor; por otra parte, el componente ergosta-5, 7 -dien-3 β -ol está en la misma proporción en ambas formas del parásito, así como el lanosterol y su forma metilenada en el carbono 24. Por otra parte, el colesterol (incorporado del medio pasivamente) está presente también en ambos casos (epimastigotes y tripomastigotes), pero en mayor proporción, en la forma tripomastigote (posiblemente por la mayor accesibilidad dentro de las células en cultivo durante la fase de amastigote). Finalmente, además detectan dos componente nuevos, ergosta-5-en-3 β -ol y ergosta-5,24(28)-dien-3 β -ol, asociados a la captación del desmosterol (precursor del colesterol) de las células hospedadoras.

Sobre la alquilación en el carbono 24, característica de las formas ergosta y stigmata, Bloch, 1983, hace importantes consideraciones, relacionadas con el carácter desorganizador en las cadenas acílicas de los fosfolípidos, generado por grupo metilo o etilo en esa posición en la cadena lateral (insertada hacia el centro de la bicapa); concluye Bloch, que la función principal de esta alquilación es la de disminuir la temperatura de transición de fase de la membrana en organismos expuestos a fuertes cambios de temperatura ambiental, lo cual les permite un intervalo mayor para el control de la fluidez de la membrana frente a los cambios térmicos. Así, Semer y Gelerinter (1979), en estudios realizados en vesículas de lecitina/ergosterol, encontraron un incremento de orden a bajas concentraciones de ergosterol, al aumentar el esteroles se revierte el efecto condensante, indicando un debilitamiento de las interacciones de Van der Waals. Este comportamiento explicaría también los resultados de Gollub y col. (1977) del requerimiento de ácidos grasos insaturados para el crecimiento de levaduras con mutaciones que las hacen auxótrofas para esteroides. Los ácidos grasos insaturados compensarían la disminución de fluidez provocada por la falta de ergosterol o sus análogos etilados (stigmata). Vanden Bossche y col., en 1983, estudiando el patrón de ácidos grasos en *C. albicans*, crecida en presencia de inhibidores de la síntesis de ergosterol (miconazol y Ketoconazol), encuentran un desplazamiento de ácidos grasos, de mono a di-insaturados, en particular en fosfatidil colina (PC) y fosfatidil etanolamina (PE).

Estas consideraciones de Bloch (1983) son importantes por cuanto el costo energético para transmetilar la cadena lateral es muy elevado (12 equivalentes de ATP/transmetilación), por tanto debe estar plenamente justificado este costo para ser seleccionado evolutivamente.

El trabajo realizado con levaduras auxótrofas para esteroides le permitieron a Rodríguez y col., 1982, establecer la existencia de diferentes niveles de funciones de los esteroides en *Saccharomyces cerevisiae*. Diferentes concentraciones de ergosterol (inferiores a las requeridas por si solo, para mantener el crecimiento de levadura auxótrofas para ergosterol) combinadas con colestanol a una concentración fija permiten obtener un crecimiento sostenido, que no se soporta solamente en colestanol. Este es un indicio de que además de la función de "bulk", asociada al control de la fluidez, que puede ser cubierta por el colestanol, hay otros niveles de funciones altamente específicas que requieren del ergosterol. En particular, la capacidad de disparar el crecimiento en colestanol (5 µg/ml) con cantidades muy pequeñas de ergosterol (10 ng/ml), que Rodríguez la denomina "Sparking". Esta función, altamente específica, pudiera estar asociada a los mecanismos más finos, que bioquímicamente controlan el proceso de proliferación celular. Sin embargo, hasta el presente no se ha podido dilucidar este importante aspecto y la función "sparking" (chispazo), queda definida en los términos operacionales aquí presentados.

Posteriormente Rodríguez y col., 1983, precisa que uno de los requerimientos para que un esteroide pueda satisfacer la función "sparking" es la de poseer la insaturación C-5,6 o la de ser un sustrato para que la Δ^5 -desaturasa pueda actuar. En este sentido, la presencia del metilo (C 28) en la cadena lateral potencia, *in vivo* la especificidad de la Δ^5 -desaturasa.

En 1985, Rodríguez y col., define en términos operacionales los cuatro niveles de funcionamiento de los esteroides en la membrana de *S. cerevisiae*, basados en los diferentes intervalos de concentraciones de ergosterol requeridos para cumplir con estas diferentes funciones:

Función	Cantidad de Ergosterol requerida.
Sparking	1-10 ng/ml
Dominio Crítico	100 ng/ml
Dominio	0.5-1.0 µg/ml

Bulk 10-15 µg/ml

Las funciones "sparking" y dominio crítico, requieren de un esteroide complementario, Colestanol 5 µg/ml en el primer caso y lanosterol 5 µg/ml en el segundo. La función dominio fue definida por los autores, en función de la cantidad mínima de ergosterol/mg de peso seco encontrada en muestras de una mutante auxótrofa para esteroide y crecida en ergosterol solo, a diferentes concentraciones [0.5-15.0 µg/ml]; la concentración mínima requerida, parece ser de 0.3 µg/ml de peso seco. Esta concentración se incrementa hasta un máximo de 2.5 µg/ml de peso seco cuando alcanzamos la cantidad de 10-15 µg/ml de ergosterol en el medio. Mayores concentraciones de ergosterol no incrementan este valor, el cual consideró Rodríguez como el necesario para satisfacer la función "bulk".

La función "dominio crítico", como su nombre lo indica, está asociada a la presencia necesaria en ciertas regiones de la membrana, de dominios (regiones segregadas) del ergosterol, asociadas a otros componentes de la membrana, posiblemente proteicos, que requieren de un entorno lipídico muy particular, el ergosterol, para cumplir sus funciones a cabalidad. Este nivel de ergosterol que satisface esta función, es insuficiente para regular la fluidez de la membrana como un todo. Es importante destacar que, si se satisface el requerimiento de ergosterol para el "sparking", esta función puede ser satisfecha por el colestanol o ergostanol, pero no por el lanosterol.

Pinto y col. (1983) en el mismo año, complementa los trabajos de Rodríguez, estableciendo algunos requisitos estereoquímicos para el cumplimiento de algunas de las funciones establecidas para los esteroides. En particular, utilizando levaduras crecidas en condiciones anaeróbicas, en presencia de un inhibidor de la biosíntesis de esteroides (2,3-iminoescualeno) establecen el requerimiento estricto del grupo alquilo en el carbono 24 en una determinada configuración (13) y tamaño (metilo). En particular, las funciones regulatorias establecidas por Rodríguez, "sparking" y dominio crítico tendrían este requisito estereo-específico.

Las concentraciones requeridas para las funciones "dominio" y "bulk", satisfacen las exigencias de la célula para el control de la fluidez y la diferencia principal reportada por Rodríguez, parece ser, más que en la velocidad de

crecimiento, en el rendimiento final obtenido, cuando se suplementa las células con una u otra concentración de ergosterol (Rodríguez y col., 1985).

Parks y col. (1986) reporta el aislamiento, en un extracto acuoso de levaduras, de un factor, capaz de reemplazar al ergosterol en la función "sparking" (SERF). Este factor, además de ser soluble en agua, no está enlazado a la membrana, contiene carbohidratos, es termoestable y parece actuar en niveles equivalentes a los hormonales. Ensayos en TLC y HPLC demuestran que "SERF" es completamente diferente al ergosterol. Este factor puede ser i) un metabolito directo del ergosterol, ii) un compuesto inducido, o iii) funcionalmente activado por trazas del colesterol.

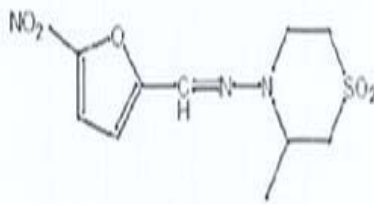
1.12. QUIMIOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Las aproximaciones para obtener compuestos para el tratamiento de las enfermedades parasitarias son muy antiguas. La vía del ensayo y error caracterizó durante mucho tiempo la obtención de drogas con relativa eficiencia antiparasitaria. Este ha sido el camino escogido por muchos años para el ensayo de compuestos con el fin de combatir la enfermedad de Chagas, probándolos en animales y en humanos: emetinas, acridinas, arsenicales, antimoniales, diaminidinas, sulfamidinas, antibióticos, piperazinas, derivados de purinas, derivados nitrofuranos e imidazólicos, extractos vegetales (diversos) entre otros. Estos compuestos tuvieron resultados poco alentadores, pues en la mayoría de los casos los resultados fueron negativos.

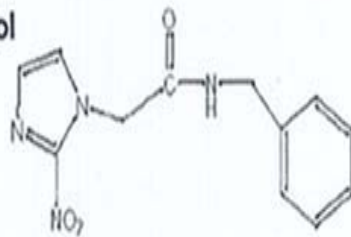
En 1961 dos contribuciones importantes cambian parcialmente la vía empírica: Brener utilizando nitrofuransa y utilizando luego el nifurtimox y benznidazol, encontró algún efecto sobre las formas amastigotes. Otra contribución importante fue la relacionada con la normalización de metodologías de trabajo, selección de drogas, protocolos terapéuticos y criterios para la evaluación de los resultados. Sin embargo, la quimioterapia específica de esta parasitosis permanece aún insatisfactoria, de hecho las únicas drogas disponibles son nitrofuranos como el nifurtimox (Bayer), recientemente discontinuado y nitromidazoles como el benznidazol (Roche), drogas introducidas de forma empírica desde hace tres décadas (Figura 10). Ambas drogas tienen actividad significativa en la fase aguda y muy poca o

nada en la fase crónica, además, la eficacia varía de acuerdo al área geográfica, probablemente debido a las diferencias en susceptibilidad a las drogas entre diferentes cepas de *T. cruzi* (Cancado y col., 1997; Croft y col., 1997; Filardi y Brener, 1987). El nifurtimox actúa reduciendo los grupos nitros de los radicales nitroanión inestables, produciendo radicales de oxígeno tóxicos (superoxido, peroxido). *Trypanosoma cruzi* no tiene mecanismos eficientes para eliminar los metabolitos de oxígeno, particularmente peroxido de hidrógeno, haciéndolo más sensible al estrés oxidativo que las células de los vertebrados. (Stoppani AOM, 1999; Docampo R, 1990). El Benznidazol parece actuar modificando macromoléculas por intermediarios de nitroreducción (Stoppani, 1999; Docampo y Moreno, 1986; Docampo, 1990). Estas drogas tienen fuertes efectos secundarios, vómitos, polineuropatía periférica, dermatopatía alérgica e incluyendo anorexia. No obstante, la mayor limitación de estos compuestos es su baja eficiencia para erradicar a los parásitos en la forma crónica de la enfermedad, la cual es la más establecida hoy en día en Latino América y que es considerada como una condición incurable (Urbina, 1999; Cancado y col., 1997). Sin embargo, estudios realizados con tratamientos con benznidazol, aunque son incapaces de inducir cura parasitológica, pueden disminuir la progresión clínica de la enfermedad (Viotti y col., 1994).

Nifurtimox



Benznidazol



Bdigital.ula.ve

Figura 10. Estructura química de drogas disponibles para tratamientos de la enfermedad de Chagas. Nifurtimox (Lampit) es un producto de Bayer y el Benznidazol es un producto de Roche. Urbina, 2003.

1.13. POSIBLES BLANCOS QUIMIOTERAPEUTICOS BAJO UN ENFOQUE RACIONAL PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

En las dos últimas décadas se han obtenido avances muy significativos en el conocimiento de la biología molecular, bioquímica y fisiología del parásito. Estos avances han permitido hacer aproximaciones mucho más racionales en la búsqueda de posibles blancos de acción para la selección de nuevas drogas contra la enfermedad de Chagas. Algunos de los blancos más relevantes:

1.13.1. Inhibidores de la trypanotioin reductasa. Este sistema es único de los kinetoplastidos, el cual reemplaza al glutatión y glutatión reductasa en estas células como el principal sistema intracelular tiol-redox (Fairlamb y Cerami, 1992; Fairlamb, 1992). Así, inhibidores del metabolismo del trypanotioin son potencialmente candidatos ideales como drogas anti- *T. cruzi* (Fig. 11), solas o en conjunto con drogas que produzcan radicales tales como el nifurtimox o benznidazol (Fairlamb, 1999; Bond y col., 1999).

1.13.2. Inhibidores de Purinas Salvaje. La hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa en los trypanosomatidos está involucrada en la búsqueda de purinas del hospedador, ya que estos parásitos son deficientes en la biosíntesis de novo de esta ruta, razón por la cual esta enzima es un blanco bioquímico válido para estos organismos (Quintas y col., 1996). El alopurinol (4-hidroxi-pirazol-(3,4d)) pirimidina (Fig. 12) ha sido utilizado en humanos por largo tiempo como un tratamiento de la gota, este compuesto es transformado en los vertebrados en oxipurinol, un potente inhibidor de la xantina oxidasa. En los trypanosomas, los cuales son deficientes en xantina oxidasa, el compuesto actúa como un análogo de las purinas y es incorporado al ADN interrumpiendo la síntesis de RNA y proteínas (Marr y col., 1978; Berens y col., 1982; Quintas y col., 1996; Stoppani, 1999). Sin embargo, hay resultados controversiales en cuanto a la eficiencia de esta droga en modelos murinos, posiblemente debido a diferentes susceptibilidades entre cepas de *T. cruzi* (Avila y Avila, 1981; Avila y col., 1981).

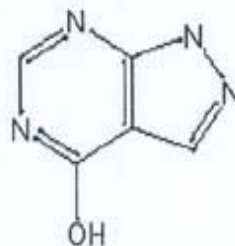
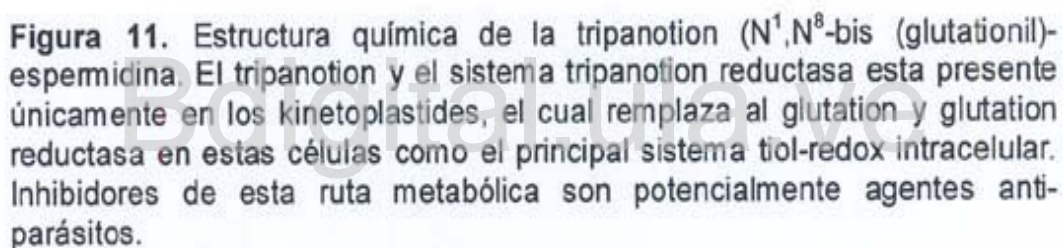


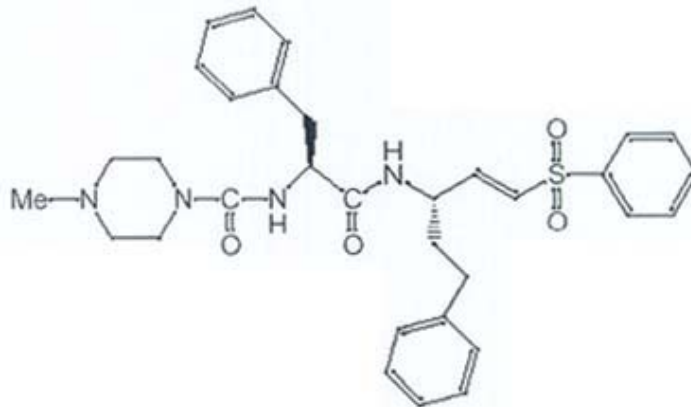
Figura 12. Allopurinol bloquea las purinas salvage por inhibición de la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). Urbina JA, 2003.

1.13.3. Inhibidores de Cistein Proteasas. La cruzipaina es la cistein proteasa responsable para la mayor actividad proteolítica de todos los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* (Stoppani, 1999; Urbina y col., 1993, Labriola y col., 1993; Campetella y col., 1992; Bontempi y col., 1984). Inhibidores de la cistein proteasa, un péptido análogo que inhibe específicamente la actividad de esta proteasa bloqueando la proliferación de ambos epimastigotes (Franke de Cazzulo y col., 1994; Engel y col., 1998) y amastigotes intracelulares (Harth y col., 1993; Meirelles MNL, 1992) y además detiene la metacicloogénesis *in vitro* (Franke de Cazzulo y col., 1994). A nivel celular y bioquímico se ha encontrado que este compuesto bloquea la maduración de la cruzipaina y su transporte a los lisosomas (Engel JC, 1998). Estos hechos indican que es un blanco antiparásito ideal y consistente con la hipótesis del diseño racional, tal como el N-metil-piperazina-urea-F-hF-vinilsulfono-fenil (Fig. 13), capaz de prolongar la sobrevivencia e inducir cura en modelos murinos en fase aguda y crónica de la enfermedad de Chagas, con toxicidad mínima (Engel y col., 1998; Engel y col., 1999). Esta droga para la cruzipaina promete ser una aproximación a una quimioterapia específica para la enfermedad de Chagas.

1.13.4. Inhibidores de la Biosíntesis de Esteroles. Las drogas más comúnmente usadas para el tratamiento de enfermedades causadas por hongos y levaduras son los compuestos que interfieren con la biosíntesis de novo o función de los esteroides (Lyr y Seyd W, 1995; Yamaguchi y col., 1992). La inhibición de la biosíntesis de esteroides ha sido muy útil, ya que los esteroides endógenos son esenciales para la supervivencia de estos organismos patógenos; Estos compuestos en su mayoría son oralmente activos, tienen un amplio espectro de actividad y muy baja toxicidad (Ryder, 1992; Mercer, 1993; Vanden Bossche, 1995). *T. cruzi* también tiene requerimientos absolutos de esteroides endógenos específicos para la viabilidad y proliferación y son muy susceptibles *in vitro* a inhibidores de la biosíntesis de esteroides, incluyendo azoles, inhibidores del citocromo P-450 dependiente de esteroides C14 α demetilasa (Fig. 14) (Docampo y col., 1981; Beach y col., 1986; Goad y col., 1989; Saralde y col., 1988; Urbina y col., 1988; 1991; 1996; 1998; Lazard K, 1991), terbinafina, un inhibidor de la escualeno epoxidasa (Urbina y col., 1988; 1993; Maldonado y col., 1993), mevinolin (lovastatina), un inhibidor de la 3-

hidroxi-3-metil-glutaril CoA reductasa (Florin-Christensen, y col., 1990; Urbina y col., 1993; 1995), azasterol, inhibidor de $\Delta^{24(25)}$ esterol metil transferasa (Urbina y col., 1995; 1996; Vivas J; 1996; Contreras y col., 1997). La ruta de biosíntesis de esteroides en estos organismos es químicamente validada como blanco quimioterapéutico. No obstante, algunos inhibidores de la biosíntesis de esteroides, tales como el ketoconazol e itraconazol son incapaces de erradicar a *T. cruzi* de animales infectados experimentalmente o en pacientes humanos (McCabe y col., 1988; Moreira y col., 1992; Brener y col., 1993; Fragata Filho y col., 1993). Recientemente, Urbina ha encontrado que un nuevo derivado de triazol, así como el D0870 y el SCH 56592 (posaconazol), fueron capaces de inducir una elevada cura parasitológica (70-100%) en modelos murinos, tanto en fase aguda como crónica para la enfermedad de Chagas (Urbina y col., 1988; 1996; 1997; 1999; 2000; Liendo y col., 1998). Los nuevos triazoles tienen una actividad *in vivo* anti- *T. cruzi* especial, atribuido a su potente y selectiva acción sobre blancos del parásito y a sus especiales propiedades farmacocinéticas en animales y humanos (Clemons y col., 1993; De Wit y col., 1995; Girijallabhan y col., 1995; Nomeir y col., 1995; Laughlin y col., 1997). Estos compuestos están dentro de las mejores aproximaciones racionales para obtener una cura parasitológica radical, tanto en fase aguda como crónica de la enfermedad de Chagas (Urbina y col., 2000; Urbina y col., 2003).

(a) N-metil-piperazine urea F-hF-vinil-sulfona-fenil



(b) Alkil-tio semicarbazona

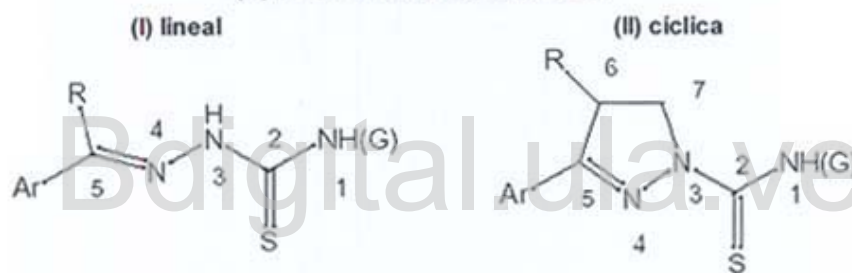
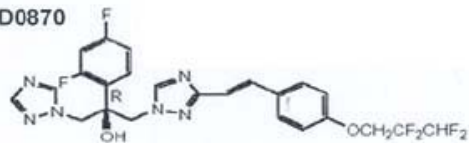
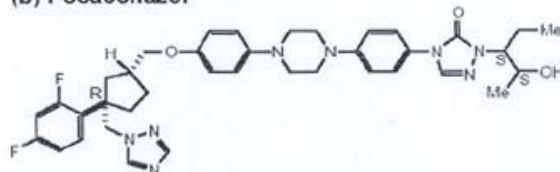


Figura 13. Estructura química de inhibidores específicos de la cruzipaina, una cistein proteasa presente en todos los estados de *Trypanosoma cruzi*. (a) Inhibidor irreversible de la cruzipaina con actividad tripanocida, tanto *in vitro* como *in vivo*. (b) Estructura general de alkil-tio-semicarbazonas (I) lineal y (II) ciclica, un nuevo inhibidor de la cruzipaina con actividad contra parásitos intracelulares *in vitro*. Urbina JA, 2003.

(a) D0870



(b) Posaconazol



(c) Ravuconazol

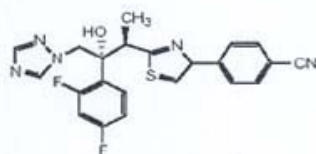


Figura 14. Estructura química de nuevos derivados de triazoles, inhibidores de la C14 α esteroil demetilasa de *Trypanosoma cruzi*. Los compuestos desde (a-c) tienen un potente y selectiva actividad intrínseca anti-*T. cruzi* y propiedades fármaco-cinéticas especiales, las cuales permiten erradicar al parásito en modelos animal en las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas. Urbina JA, 2003.

1.13.5. Alkil-Lisofosfolípidos (ALP). Los ALP son análogos sintéticos de lisofosfolípidos, desarrollados en las dos últimas décadas como agentes antitumores y antileucemia [88-90]. Estos compuestos han mostrado ser activos contra parásitos tripanosomatídeos incluyendo "*T. cruzi*, *in vitro* e *in vivo*, (Fig. 15) (Croft y col., 1987; 1993; 1996; 1997; Urbina y col., 1997; Achterberg V, 1987; Bourass y col., 1996; Konstantinov y Gercken, 1997; Le Fichoux y col., 1998; Kuhlencord y col., 1992; Santa-Rita y col., 2000). A pesar de que hay información significativa sobre el mecanismo de acción de estos compuestos contra células tumorales de vertebrados (Haase y col., 1991; Bergmann y col., 1994; Wieder y col., 1995; Vogler y col., 1996), el mecanismo de acción antiparásito no es bien conocido. En *T. cruzi* este compuesto bloquea selectivamente la biosíntesis de fosfatidil-colina (Lira y col., 2001).

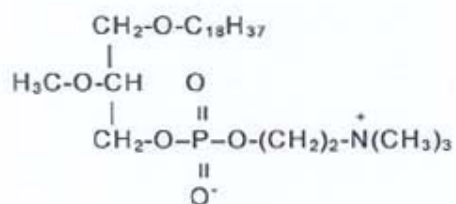
1.13.6. Inhibidores del Metabolismo de Pirofosfato. Un descubrimiento importante en este campo es que el pirofosfato inorgánico (PPi) y los polifosfatos de cadenas cortas son los compuestos de fosfatos más abundantes en tripanosomatídeos (*T. cruzi*, *T. brucei*, *L. mexicana*) (Urbina y col., 1999; Moreno y col., 2000) y parásitos apicomplexas (*Toxoplasma gondii*) (Rodríguez y col., 2000), estos fosfatos son entre 10-15 veces más abundantes que el ATP. El PPi está principalmente acumulado en los acidocalcisomas (Urbina y col., 1999; Moreno y col., 2000, Rodríguez y col., 2000), vacuolas ácidas especializadas en estos parásitos, las cuales tienen grandes concentraciones de calcio en su interior (Moreno y Zhong, 1996; Docampo y col., 1995; Lu y col., 1997; Vercesi y Docampo, 1994; 1996). La abundancia de este compuesto, junto con la presencia de enzimas que utilizan el PPi recientemente descubiertas en *T. cruzi*, tales como pirofosfatasas que translocan protones en los ácido-calcisomas (Scott y col., 1998) y la piruvato fosfato dikinasa en glicosomas (Bringaud y col., 1998), sugieren que estos compuestos de fosfatos puede cumplir un papel primario en la sobrevivencia de estos parásitos. Esto ha sido corroborado con el pamidronato, alendronato y residronato (análogos de pirofosfato no metabolizables), utilizados corrientemente en humanos para el tratamiento de desórdenes de reabsorción de calcio en los huesos (Roger y col., 1997; Licata, 1997; Rodan y Marten, 2000), selectivamente inhiben la proliferación de amastigotes de *T. cruzi*

(Urbina y col., 1999). El residronato, pamidronato e ibandronato han mostrado ser capaces de inhibir fuertemente la proliferación de *T. cruzi* en modelos murinos de la fase aguda de la enfermedad de Chagas (Fig. 16) (Urbina y col., 1999). El mecanismo de acción de estos bifosfonatos contra los parásitos podría involucrar una inhibición directa de la bomba de protones dependiente de pirofosfato (Urbina y col., 1999; Rodríguez y col., 2000), pero también es probable que esté asociado al bloqueo de la síntesis de isoprenoides al nivel de la farnesil-pirofosfato sintetasa, como ha sido demostrado por su efecto contra los osteoclastos (Rodan y Marten, 2000; Fisher y col., 1999; van Beek E. y col., 1999; Martin y col., 1999). Así, que el metabolismo a PPi es un nuevo blanco quimioterapéutico potencial en *T. cruzi* y los bisfosfonatos pueden jugar un papel importante en la quimioterapia específica de la enfermedad de Chagas y otras infecciones causadas por parásitos protozoarios.

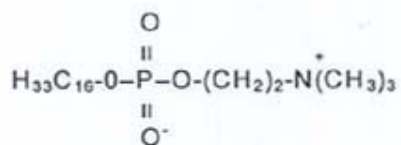
Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

Et-18OCH₃



MILTEFOSINA



ILMOFOSINA

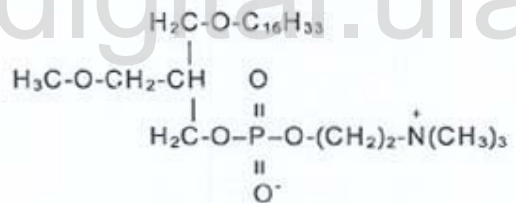
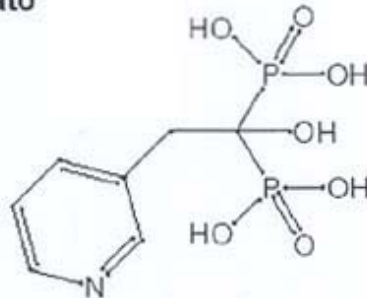
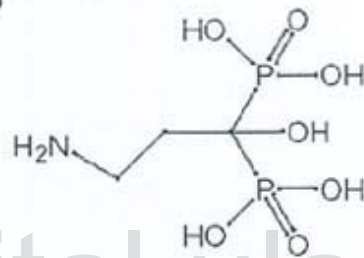


Figura 15. Estructura química de alquil-lisofosfolipidos. Estos compuestos actúan selectivamente bloqueando la síntesis de novo de la fosfatidil-colina en los parásitos, con actividad *in vivo* e *in vitro* anti-*T. cruzi*. Urbina JA, 2002.

(a) Residronato



(b) Pamidronato



(c) Ibandronato

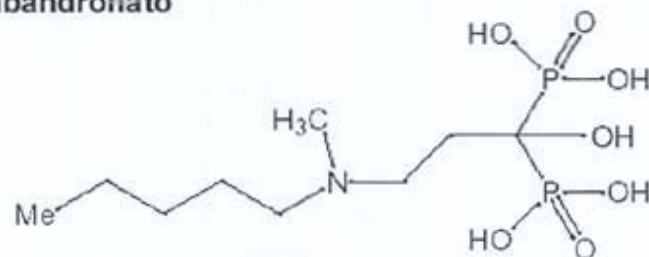


Figura 16. Estructura química de bifosfonatos, analogos al pirofosfato no metabolizables con una actividad selectiva anti-T. cruzi. Estos compuestos son usados corrientemente en los tratamientos de desordenes óseos en humanos. (a) Residronato y (b) Pamidronato son inhibidores específicos de la farnesil-pirofosfato sintetasa, mientras que (c) Ibandronato es un inhibidor de ambas farnesil-pirofosfato sintetasa y escualeno sintetasa. Urbina JA, 2003.

2. OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACIÓN

2.1. Expresión y Distribución Intracelular de las Isoenzimas Fosfoglicerato Kinasa (PGK) en *Trypanosoma cruzi*.

2.2. Caracterización Molecular y Bioquímica de la Hexokinasa de *Trypanosoma cruzi*.

2.3. Piruvato Fosfato Dikinasa y Metabolismo del pirofosfato en el glicosoma de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

2.4. La α -glicerolfosfato Deshidrogenasa esta Presente en los Glicosomas de *Trypanosoma cruzi*.

2.5. 3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA Reductasa en *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: Localización Subcelular y Propiedades Cinéticas.

2.6. Escualeno Sintetasa como un Blanco Quimioterapéutico en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*.

2.7. Mecanismo de acción del 4-Fenoxifenoxetil Tiocianato (WC-9) contra *Trypanosoma cruzi*, el Agente Causante de la Enfermedad de Chagas.

2.8. Actividad *in vitro* e *in vivo* de E5700 y ER-119884, dos nuevos inhibidores de la escualeno sintetasa con actividad oral, contra *Trypanosoma cruzi*.

2.9. $\Delta^{24(25)}$ esterol metil transferasa (24-25-SMT) en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*: Localización Subcelular y Propiedades Cinéticas.

3. MATERIALES y METODOS

C.C.Reconocimiento

3.1. Cultivos de los epimastigotes de *T. cruzi*

Los epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Elpidio Padrón (EP) fueron crecidos en medio de Infusión Hígado Triptosa (LIT), suplementado con 5% de suero fetal inactivado a 57°C por 30 min, 20 mM de glucosa y 10 mM de hemina. Los cultivos fueron agitados a 80 rpm. a 28°C hasta alcanzar la fase exponencial, 0.6 unidades de densidad óptica a 600 nm.

3.2. Cultivos de los promastigotes de *Leishmania mexicana*

Los promastigotes de *L. mexicana* cepa AZV fueron crecidos en medio Schneider' suplementado con 20% de suero fetal de ternera, inactivado a 56 °C por 30 min y 10 mM de glucosa. El cultivo fue agitado suavemente a 25 °C, hasta que este alcanzo la fase exponencial a 0.6 unidades de densidad óptica a 600 nm.

3.3. Ruptura de los epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *Leishmania mexicana* por abrasión

Los parásitos fueron colectados y lavados desde fase exponencial por centrifugación a 3000 x g por 15 min en Tampón A: 0,225 M de sacarosa, 20 mM de KCl, 10 mM de KH₂PO₄, 5 mM de MgCl₂, 1mM de Na₂EDTA, 20 mM de TrisHCl, pH 7,2. El sedimento celular fue lavado por centrifugación a 3000 x g por 15 min en Tampón B: 0,25 M de sacarosa, 1mM de Na₂EDTA, 25 mM de Tris-HCl, pH 7,4. Las células y carburo de silicio fueron colocadas en un mortero frío en una relación 1:1 (p/p) y se le agrego un volumen mínimo de Tampón B con un cocktail de inhibidores (1µM Pestatina, 0,165µM Antipain, 5 µM Leupeptin, 100µM TLCK, 500 µM PMSF, 2,8 µM E-64 y 100 µM EDTA). Las células fueron rotas por abrasión hasta alcanzar un 90% de ruptura, visualizado por microscopia de luz. El carburo de silicio fue eliminado por centrifugación a 150 x g por 3 min a 4°C.

3.4. Centrifugación diferencial

Las fracciones siguientes fueron obtenidas por centrifugación diferencial a partir de las células rotas por abrasión: Homogenato (H), libre de núcleos y parásitos enteros a 1500 x *g* por 5 min; Fracción Granular Gruesa (FGG), fue obtenida a 6000 x *g* por 10 min; Fracción Rica en Glicosomas (FRG), a 45.000 x *g* por 15 min; Fracción Microsomal (FM), fue el sedimento después de ultracentrifugar el sobrenadante a 105.000 x *g* por 120 min; y Fracción Citosólica (C), el sobrenadante de esta ultracentrifugación (Oppenheimer y col. 1984, Taylor y Gutteridge. 1987 Concepción y col. 2001).

3.5. Fraccionamiento subcelular y purificación de los glicosomas en un gradiente lineal de sacarosa

El homogenato y la fracción rica en glicosomas (FRG) fueron cargadas en un gradiente lineal de sacarosa entre 0.3-2.5 M y se ultra centrifugó a 250.000 x *g* por 120 min a 4°C. En el caso del homogenato el gradiente fue fraccionado en volúmenes 2 ml y en el caso de la FRG una banda que correspondiente a los glicosomas (1.23 g . cm⁻³) fue extraída lateralmente desde el gradiente de sacarosa. La banda extraída del gradiente de sacarosa fue diluida tres veces en tampón B y centrifugada a 45.000 x *g* por 30 min. (Concepción y col. 2001).

A cada una de las fracciones obtenidas de la centrifugación isopícnica, se le determinó la actividad de los marcadores enzimáticos: **Glicosoma** (hexokinasa [HK], piruvato fosfato dikinasa [PPDK], malato deshidrogenasa [MDH], fosfoenol piruvato carboxikinasa [PEPCK], fosfogluco isomerasa [PGI] y glicerol fosfato deshidrogenasa [GPDH]); Lisozomas (fosfatasa ácida); Membrana Plasmática (fosfatasa alcalina); Citosol (alanina amino transferasa [ALAT], glucosa-6-fosfato deshidrogenasa [G6PDH], enzima málica [E], fosfoglicerato kinasa [PGK] y Piruvato Kinasa [PK]); Retículo Endoplásmico (esterasa y glucosa-6-fosfatasa); y Mitocondria (isocitrato deshidrogenasa [ISDH], succinato deshidrogenasa [SDH]), Todas estas determinaciones fueron realizadas de acuerdo con el Bergmeijer (1983), la enzima málica como lo

describió Avilan y García (1994) y la piruvato fosfato dikinasa como fue descrito por Bringaud y col (1998).

3.6. Permeabilizacion selectiva con digitonina

Los epimastigotes de *T. cruzi* y los promastigotes de *L. mexicana* en fase exponencial (1×10^8 células/mililitro), fueron colectaron por centrifugación a $3000 \times g$ por 10 min a 4°C y el sedimento celular fue lavado una vez con tampón A. Las células fueron fraccionadas a una concentración de proteínas de 1 mg/ml y concentraciones crecientes de digitonina fueron añadidas a las fracciones. La mezcla de células y digitonina fue incubada por 20 min. a temperatura ambiente y transcurrido la incubación se centrifugo a $3000 \times g$ por 10 min. El sobrenadante fue usado para determinar las actividades de las enzimas liberadas al medio y los sedimentos para el análisis por Western blot. El 100% de la actividad de estas enzimas se determino solubilizando 1 mg de parásitos con 0,1% de Tritón X-100 y 150 mM de cloruro de sodio, (Concepción y col. 2001).

3.7. Determinación de la latencia de los glicosomas purificados

La latencia de los glicosomas es un parámetro físico que permite inferir sobre la integridad de la organela aislada. En ausencia de detergentes que solubilizcen la membrana que rodea la organela, la actividad de las enzimas glicólíticas contenidas en el interior es baja, ya que la membrana evita que los cofactores, sustratos y sistemas acoplantes lleguen a las enzimas de la matriz. Cuando esta membrana se solubilizada con Tritón X-100 (0,1% PN) y 150 mM NaCl, el acceso de los sistemas acoplantes es libre y la actividad de estas enzimas aumenta significativamente (Oppendoes, 1984). La latencia de las enzimas HK y PPK se midió para determinar la integridad de la organela.

$$\text{Latencia} = \frac{\text{Actividad final (glicosomas solubilizados)} - \text{Actividad inicial}}{\text{Actividad final (glicosomas solubilizados)}} \times 100\%$$

3.8. Separación de proteínas de los glicosomas purificados con Tritón X-114

Un volumen (0,3mg de proteínas) de glicosoma purificado fue mezclado con cuatro volúmenes de 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 (Tampón C) y Tritón X-114 al 2% (v/v) concentración final. Esta mezcla fue congelada a -20 °C por 12 horas, se descongeló y se colocó a 30°C hasta la aparición del punto de nube. Posteriormente se centrifugo a 300 x g por 4 min. El sobrenadante se separo y se lavo 2 veces con Tritón X-114 a una concentración final del 2%. La fracción rica en detergente se resuspendió en el volumen inicial de tampón C y se le agrego 0,1 % de Tritón X-114. Ambas fracciones fueron incubadas a 0°C hasta que la solución se torno transparente; posteriormente se incubo a 30°C hasta la aparición del punto de nube (5 min. aproximadamente) y se centrifugo a 300 x g por 4 min. La fracción rica en detergente se resuspendió en tampón C previamente frío y se le coloco acetona fría, esta se dejo precipitar por 15 min. a 4°C, seguidamente se centrifugo a 18.000 x g a 0 °C. El sedimento conteniendo proteínas integrales y periféricas fueron resuspendidas en tampón C. Las fracciones ricas en detergente y solubles se le añadió un cocktail de inhibidores (Ko y Thompson, 1995; Bordier, 1981).

3.9. Tratamiento de los glicosomas intactos con carbonato de sodio

Glicosomas purificados (1 mg de proteínas) se diluyeron 100 veces en 100 mM Na₂CO₃ frío a pH 11,5 preparado al momento e incubado a 0°C por 1/2 h, después de la incubación la muestra fue ultracentrifugada á 233.000 x g por una hora en una ultracentrifuga Sorvall (OTD) en un rotor T865. El sedimento (membranas) fueron resuspendidas suavemente en agua destilada fría (Fujiki y col. 1982). Las proteínas de la matriz del glicosoma y periféricas permanecen en el sobrenadante. Estas proteínas al igual que las de la fracción membranal fueron precipitadas con 0,1 ml de deoxicolato al 0,15% por 1 ml de muestra y se incubo por 10 min. a temperatura ambiente con agitación suave, seguidamente se añadió ácido tricloroacetico al 100% a una porcentaje final del 0.1 %. Las muestras se incubaron a 0°C por una hora y seguidamente se centrifugo a 30.000 x g por 15 mino Posteriormente este sedimento se vuelve a

precipitar con acetona fría en una relación 1:2 volumen de muestra por volumen de acetona, para eliminar el ácido tricloroacético y el deoxicolato (Concepción y col., 1999).

3.10. Tratamiento de los glicosomas intactos con proteasas

Los glicosomas purificados, (1 mg de proteínas) con una latencia $\geq 90\%$ para piruvato fosfato dikinasa (PPDK), se le agregó 10 μg ó 20 μg de pronasa. La mezcla se incubo por 20 min a 0°C , esta mezcla fue centrifugada a $45000 \times g$ por 20 min y se lavo dos veces con tampón B mas la mezcla de inhibidores de proteasas. Los glicosomas tratados con proteasas fueron tratados con Tritón X114 y carbonato de sodio. Como tratamiento control se empleo una fracción glicosomica solubilizada con 0,1% de Tritón X-114 y 150 mM NaCl, la cual fue tratada con las mismas concentraciones de proteasas, después de la incubación la reacción fue detenida con tampón de muestra y hervida por 5 min. (Concepción y col., 2001).

3.11. Biología Molecular de la Fosfoglicerato kinasa

La purificación de ADN de alto peso molecular de los epimastigotes de *T. cruzi* fue realizado por el procedimiento descrito por Van der Ploeg y col. La existencia de un gen *PGKA* típico en *T. cruzi* fue verificado por PCR. Los primers para los extremos del gen fueron diseñados basándonos en dos regiones de aminoácidos las cuales son altamente conservadas en todas las secuencias de las PGK, y localizadas sobre ambos lados del inserto específico de *PGKA* (primer no.1 en sentido y primer no.2 antisentido). Los oligonucleotidos degenerados especificados fueron usados para amplificar ADN, usando la enzima vent ADN polimerasa de alta fidelidad (New England Biolab, USA). El producto de PCR obtenido fue fraccionado por electroforesis a través de geles de agarosa, purificado y usado para re-amplificación. Los fragmentos del tamaño esperado (aproximadamente 660 pb para un gen *PGKA* y de 420 pb para los genes *PGKB* y *PGKC*) fueron purificados desde los geles, ligados al plasmido pZErO-2 (Invitrogen, USA) previamente digerido con EcoRV, clonado y secuenciado.

Un mapa de los sitios de restricción del locus PGK de *T. cruzi* fue construido por análisis con Southern blot del ADN geonómico totalmente digerido. Los Blots fueron hibridizados con sondas radiomarcadas, comprendiendo las mitades de los extremos 3' y 5', respectivamente del gen *PGKC* de *T. brucei* (Osinga y col., 1985) y el segmento amplificado del gen *PGKA* de *T. cruzi*. La hibridación fue realizada (Bernard y col., 1981) en las siguientes condiciones de astringencia: los lavados post hibridación se hicieron a 65°C, 0.1 x SSC, 0.1 % SDS (1 x SSC = 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio, pH 7.0).

En orden de determinar la secuencia completa del gen *PGKA*, una librería genómica fue construida en *E. coli* MB406, usando como vector el fago AGEM-11 (Promega, USA) como ha sido reportado previamente para otros organismos kinetoplastidos (Hannaer y col., 1992; Hannaert y col., 1998). la librería fue analizada por hibridación con un fragmento específico radió marcado del gen *PGKA* de *T. cruzi*, usando la astringencia post-hibridación de los lavados descrita arriba. Después de hacer una re-selección, lisados de fagos de cuatro clones positivos fueron preparados y su ADN fue purificado usando el kit Wizard lambda Prep. System (Promega). Sin embargo, todos los intentos de subclonar el gen *PGKA* desde los fagos lambda recombinantes fueron fallidos. Por consiguiente, y a causa de que la información requerida no estaba presente en la base de datos del genoma de *T. cruzi*, diferentes partes del gen fueron amplificadas, clonados y secuenciados. Dos fragmentos de aproximadamente 800 pb y 1.3 kb conteniendo la mitad del extremo 3' del gen *PGKA*, mas el extremo 5' del gen *PGKB* y la región intergénica, respectivamente, fue amplificado con un primer específico con sentido del gen *PGKA*, (correspondiente a los residuos 213-220) y dos oligonucleótidos degenerados como primers antisentido, específicos sobre la base de varios alineamientos de las secuencias de PGK de kinetoplastidos (residuos 482-490 y 32-37, respectivamente) y usando una Taq ADN polimerasa (TaKaRa Shuzo Co, Japón). la parte 5' del gen *PGKA* fue determinada con el kit TOPO Walker (Invitrogen). Este involucro primero un primer que híbrido una extensión del ADN del fago λ recombinante como un templado y un oligonucleótido específico para el inserto *PGKA* con un primer antisentido (correspondiente a los residuos 133-140). Subsecuentemente, después de ligar el producto a un

linker, un PCR fue realizado con un primer específico para el linker con sentido y un oligonucleotido correspondiente a los residuos 95-101 como primer antisentido.

El análisis de la secuencia fue realizado sobre ambas bandas usando el kit de la ADN polimerasa de T7 Amersham Pharmacia Biotech (UKISweeden) y [³⁵S] dATP (NEN Life Sciences Products, USA) un Li-COR (modelo 4000L) sistema de secuenciación automático (LI-COR, USA).

3.12. Clonamiento y secuenciamiento del gen de la hexokinasa

Una librería genómica de *T. cruzi* (cepa y) en *E. coli* MB406 con el vector λGEM11 (Promega USA) fue construida como ha sido descrito previamente (Hannaert y col., 1992). El ADN digerido parcialmente con Sau3AI fue ligado a los brazos de λGEM11 generados con BamHI y empaquetados hasta el fago λ con el sistema Packagene (Promega). La librería genómica resultante fue escaneada con un fragmento de 230 bp obtenido por amplificación vía PCR utilizando DNA genómico de epimastigotes de *T. cruzi* y un par de primers degenerados obtenidos sobre la base del motivo de unión a ATP de la hexokinasa de *T. brucei*. Los oligonucleótidos utilizados fueron primer sentido 5'-CCGAATTCTSGGSGGNACNAAYTTYMG-3' (el sitio de corte para EcoRI se destaca en negrita) y el primer antisentido 5'-GGCTCTAGAGGGAANWSGAASGTRAANCC-3' (el sitio de corte para XbaI se destaca en negrita). La amplificación se realizó en 30 ciclos de PCR con una temperatura de desnaturalización de 95°C por 30 seg, temperatura de **annealing** a 42°C por 30 seg y la fase de elongación a 72°C por 60 seg con la ADN polimerasa Vent y el correspondiente buffer de reacción (New England Biolabs, USA). La sonda fue marcada con [³²P] dCTP por nick translation. La búsqueda fue realizada por hibridización utilizando las condiciones de astringencia descritas previamente (Michels y col., 1991). Las placas positivas fueron purificadas y reevaluadas. El lisado de fagos con títulos elevados fue preparado y el ADN purificado con el sistema de purificación de ADN Wizard Lambda Prep. (Promega). Uno de estos fagos recombinantes contenía un inserto de aproximadamente 12 kb que fue seleccionado para posteriores análisis. Este fue digerido con EcoRV y un fragmento de 3.9 kb resultante fue

subclonado hasta el vector pBluescript (Stratagene, USA). El clon fue utilizado como templado para la amplificación del gen completo de la hexokinasa utilizando dos oligonucleótidos: primer sentido 5' - **CGGGATCC**ATGTCTAGACAACAA T A-3' y el primer antisentido 5'- CGGAATTCTTAITTTGTCGTTTACAACCAGC-3'. El primer sentido contiene una secuencia que corresponde a los aminoácidos MSRRLN los cuales constituyen el hexapéptido del N-terminal de la hexokinasa de *T. brucei* (el número de acceso de GenBank es AJ345044 y CAC69958. El primer antisentido es complementario al extremo del gen que se encuentra en una secuencia parcial de ADNc para la hexokinasa de *T. cruzi* (disponible en el banco de datos del proyecto 'genoma del parásito bajo el número de acceso AA676060). El primer sentido y el antisentido contienen un sitio de corte para BamHI y EcoRI respectivamente indicado en negrita. El gen de la hexokinasa fue amplificado utilizando la ADN polimerasa Vent por 30 ciclos de PCR con una temperatura de desnaturalización de 95°C, una temperatura de annealing de 62°C por 60 seg y la fase de elongación a 72°C por 120 seg. El producto amplificado de 1.416 kb fue purificado y digerido con BamHI y EcoRI y ligado al pBluescript SK (Stratagene) para el secuenciamiento. A partir de la secuencia del gen amplificado se diseñaron primers para obtener las secuencias codificantes de los extremos N y C terminales del gen en el clon genómico.

3.13. Expresión de la hexokinasa recombinante en *E. coli*; y su purificación

Para expresar hexokinasa en *E. coli* se utilizó el sistema pTrcHis (Invitrogen, USA) para este propósito el gen completo de la hexokinasa fue amplificado a partir de un clon positivo usando los mismos oligonucleótidos descritos anteriormente. El gen de la hexokinasa completo después del tratamiento con BamHI y EcoRI fue ligado en el vector de expresión pTrcHisB, el plásmido resultante pTchk fue utilizado para transformar la cepa de *E. coli* XL 1Blue (Stratagene). El pTrcHis dirige la producción de una proteína con una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal bajo el control del promotor trc (*trp- lac*) y permite la purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad. a metales (Ni) inmovilizados (IMAC).

Las células de *E. coli* transformadas fueron crecidas a 37°C en medio Luria Bertani en presencia de 100 µg/ml de ampicilina. La expresión fue inducida a una D.O._{600nm} de 0.35-0.45 por la adición de 250 µM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) y el crecimiento se continúa por 3 horas más. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 12000 x g por 15 min. a 4 °C y el pellet celular se resuspendió en 50 ml de buffer de lavado (20 mM de fosfato de sodio, pH 7.8, 500 mM de NaCl y 100 µg/ml de lisozima de huevo. Las células fueron lisadas por sonicación con 3 ciclos de 30 seg a máxima intensidad. Los ácidos nucleicos fueron degradados por incubación con 5 µg/ml de ARNasa y ADNasa por 15 min. sobre hielo. El lisado fue centrifugado a 12000 x g por 20 min. a 4°C y el sobrenadante cargado en una resina Probond (Stratagene). La elución de la proteína recombinante se realizó con el buffer de lavado a pH 6.0 más 50 mM de imidazol. La pureza de la hexokinasa se siguió por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie R-250. La etiqueta de 6 histidinas fue cortada a partir de la proteína recombinante por incubación con 10 U de enteropeptidasa (Sigma) toda la noche a temperatura ambiente en 20 mM de Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM NaCl, 100 mM KCl. Luego de este tratamiento la etiqueta de 6 histidinas se removió utilizando la misma resina Probond. La enterokinasa se separó de la hexokinasa por cromatografía sobre una columna DEAE-celulosa equilibrada con 20 mM TrisHCl, pH 7.6, 3 mM MgCl₂.

3.14. Purificación de la hexokinasa natural del glicosoma

La fracción enriquecida en glicosomas se lavó dos veces en buffer B y fue utilizada para la purificación de la hexokinasa. Esta fue solubilizada con 0.1 % de Tritón X-100 y 150 mM de NaCl y centrifugada a 33.000 x g por 15 min. a 4°C; el sobrenadante resultante contiene cerca del 80% de la actividad hexokinasa glicosómica. La enzima se precipitó a partir del sobrenadante con sulfato de amonio 30-70%. El precipitado se colectó por centrifugación a 12.000 x g por 15 min. a 4°C y resuspendido en buffer C (24 mM Tris-HCl, pH 7.6, 3 mM de MgCl₂). Esta fracción se cargó a una columna DEAE-52 (Whatman, USA) preequilibrada con el mismo buffer. La hexokinasa eluyó en el paso de lavado y las fracciones colectadas fueron precipitadas con 70% de sulfato de

amonio. Esta fracción se resuspendió buffer C más 150 mM de NaCl y se cargó a una Sefarosa CL-6B (75 cm x 2.5 cm) y eludía con la misma solución a una velocidad de flujo de 30 ml por minuto. Las fracciones colectadas que contenían actividad hexokinasa fueron analizadas por SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie R-250. La misma columna se utilizó para la determinación de la masa molecular nativa de la proteína natural y la recombinante.

3.15. Electroforesis en condiciones desnaturizantes

Todos los geles fueron hechos al 12,5% de acrilamida, utilizando el sistema de Laemmli 1970, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250. Los marcadores de peso molecular fueron: albúmina bovina, albúmina de huevo, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, tripsinogeno, inhibidor de tripsina, α -lactoglobulina (66000, 45000, 36000, 29000, 24000, 20100, 142000 daltons, respectivamente). Los marcadores de peso molecular preteñidos fueron empleados en los Western blot: fosforilasa B, albúmina bovina, albúmina de huevo, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina, lisozima (106000, 81000, 47500, 35300, 28200, 20800 daltons respectivamente).

3.16. Análisis por Western blot

Para el Western blot las proteínas de las diversas fracciones fueron primero separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en la presencia de SDS (Harlow y col., 1988), transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos anti-PGKB, anti-PGKA (contra los 80 aminoácidos N-terminal), anti-HK, anti-GPDH, dos anticuerpos anti-PPDK (un monoclonal [H-112] y un policlonal [Bringaud y col., 1998]); fueron usados a una dilución de 1:1500, mientras que el anticuerpo secundario conjugado-peroxidasa fue diluido 4.000 veces.

3.17. Microscopía de inmunofluorescencia

Epimastigotes fijados con 4% de formaldehído preparado al momento en buffer fosfato salino (PBS) fueron adheridos a portaobjetos cubiertos con poli (Lisina), permeabilizados por 25 min. en PBS, 0.2% Triton X-100 y bloqueados con 50 mM de cloruro de amonio y 3% de suero de albúmina bovino (BSA) en PBS. La incubación con los anticuerpos primarios fue por una hora en PBS (dilución: 1/80 para un anti-HK producido en conejo, 1/50 para un anti-PPDK producido en ratón). Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón producidos en cabra (marcados con FITC) y anti-IgG de conejo producido en cabra (marcados con Cy3), ambos anticuerpos secundarios fueron diluidos 1/200 (Amersham, USA). Los cubreobjetos fueron montados con 90% de glicerol en PBS y 5% w/v de 1,4diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO). Los parásitos fueron analizados usando un microscopio láser confocal con un sistema de selección (Olympus Fluoview confocal scanning system).

3.18. Determinación de proteínas

Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry 1951, las muestras fueron precipitadas con deoxicolato y ácido tricloroacético, para eliminar las sustancias interferentes. La albúmina de suero bovino fue utilizada como estándar.

3.19. Ensayos enzimáticos

Hexokinasa, la actividad HK fue determinada como la aparición del NADPH a 340 nm., en una cubeta de un mililitro en tampón trietanolamida (TEA) 0,1 M, pH 7,6; 0,1 M $MgCl_2$ y 0.6 mM glucosa, 8 mM adenosin trifosfato (ATP), 0.24 mM $NADP^+$, 2 U glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6PDH) y la muestra a evaluar. **Fosfoglucosa isomerasa**, la actividad PGI fue determinada como la aparición del NADPH a 340 nm., en una cubeta de un mililitro en tampón trietanolamida (TEA) 0,1 M, pH 7,6; 0,1 M $MgCl_2$ y 0,41 mM de fructosa 6 fosfato, 0.24 mM $NADP^+$, 2 U glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6PDH) y la muestra a evaluar. **Malato deshidrogenasa**, la actividad MDH fue

determinada como la desaparición del NADH a 340 nm., en una cubeta de un mililitro en tampón Tris-HCl 0,3 M, pH 7,6; 20 µl de una solución de 14 mg/ml ácido oxalacético, 0,41 mM NADH y la muestra a evaluar. **Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa**, la actividad APDH fue determinada como la desaparición del NADH a 340 nm., en una cubeta de un mililitro en tampón trietanolamina (TEA) 0,3 M, pH 7,6; 20 µl de una solución 3 mg/ml dihidroxiacetona fosfato, 0,41 mM NADH y la muestra a evaluar. **Piruvato fosfato dikinasa**, la actividad PPDK fue determinada como la desaparición del NADH a 340 nm., en una cubeta de un mililitro en tampón Tris-HCl 0,25 M, pH 8,3; 7 mM (MgCl₂), 1 mM fosfoenol piruvato (PEP), 1 mM adenosil monofosfato (AMP), 5 mM pirofosfato de sodio (NaPPi), 0,41 mM NADH, 2 U lactato deshidrogenasa (LDH) y la muestra a evaluar. **Adenilato kinasa** (AK), **Pirofosfatasa** (PPase), **Piruvato carbocilasa** (PC), fueron ensayadas según (Bringaud y col., 1998; Kohler y Bachean 1980; Heinonen y Latí 1981). **Fosfoenol piruvato carboxikinasa**, la actividad PEPCK fue determinada como la desaparición del NADH a 340 nm., en una cubeta de un mililitro en tampón PIPES 0,1 M, pH 7,0; 10 mM (MgCl₂), 10 mM (MnCl₂), 1 mM fosfoenol piruvato (PEP), 8 mM adenosin difosfato (ADP), 0,1 M bicarbonato de sodio (NaHCO₃), 0,41 mM NADH, 2 U malato deshidrogenasa y la muestra a evaluar. **Fosfatasa ácida y alcalina**, la actividad FA o FAK fue determinada a 405 nm.; en una cubeta de un mililitro en tampón citrato 0,1 M, pH 5,6; y para la fosfatasa alcalina tampón glicina 0,1 M, pH 10,5; con 0,1 mM (ZnCl₂) y 1 mM (MgCl₂), para ambos ensayos se emplea 30 µl de una solución de 0,6 M, para-nitrofenil fosfato. **Alanina amino transferasa**, la actividad ALAT fue determinada como la desaparición del NADH a 340 nm., en una cubeta de un mililitro en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6; y 7 mM de 2-oxoglutarato, 7 mM alanina, 0,41 mM NADH, 2 U lactato deshidrogenasa y la muestra a ensayar. **Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa**, la actividad G6PDH fue determinada como la aparición del NADPH a 340 nm., en una cubeta de un mililitro en tampón trietanolamida (TEA) 0,1 M, pH 7,6; y 1 mM glucosa-6-fosfato, 0,8 mM NADP⁺ y la muestra a ensayar. **Enzima málica**, la actividad EM fue determinada como la aparición del NADPH a 340 nm., en una cubeta de un mililitro en tampón hepes 50 mM, pH 8,0; 1 mM (MnCl₂), 3 mM NADP⁺, 20 mM L-malato y la muestra a ensayar. **Fosfoglicerato kinasa**, la actividad PGK fue determinada como la desaparición del NADH a 340 nm., en una cubeta de un mililitro en tampón

trietanolamida (TEA) 0,1 M, pH 7,6; 20 mM sulfato de magnesio y 1 mM ATP, 8 mM glicerato 3 fosfato, 0,4 mM NADH, 2 U gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y la muestra a ensayar. **Alanina deshidrogenasa**, la actividad ADH fue determinada como la desaparición del NADH a 340 nm., en una cubeta de un mililitro en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6; 20 mM alanina, 0,41 mM NADH y la muestra a ensayar. **Esterasa**, la actividad ES fue determinada como la descomposición del p-nitrofenil Acetato a 420 nm., en una cubeta de un mililitro en tampón normal compuesto por 140 mM NaCl, 11 mM KCl, Tris-HCl 75 mM, pH 7,4; y 9 μ l de una solución 12 mg/ml p-nitrofenil acetato preparado en metanol y la muestra a ensayar. **Isocitrato deshidrogenasa**, la actividad ISDH fue determinada como la aparición del NADPH a 340 nm., en una cubeta de un mililitro en tampón imidazole 0,1 M, pH 8,0; con 3,5 mM $MgCl_2$, y 8 mM $NADP^+$, 30 μ l de una solución de 40 mg isocitrato en 10 ml de tampón imidazole y la muestra a ensayar. **3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa**, los ensayos de la HMGCoA reductasa se realizaron en un volumen total de 150 μ l. La mezcla de reacción contenía: 0.25 M Sacarosa, 10 mM Hepes, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5 mM DTT, 20 μ l /ml leupeptina 50 μ l /ml aprotinina, 10 mM fenatrolina, 50 μ l /ml inhibidor de tripsina, 1 mM benzamidina 50 μ M de PMSF, 5 mM DTT, 90 mM glucosa-6-fosfato, 9 mM NADP, 6U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenada, 1.2 mM ^{14}C -HMG-CoA (30 nmol/25 μ l, 2500 dpm/amol), 150 μ g de proteínas de las distintas fracciones de los parásitos, la mezcla fue incubada por 60 min. a 28°C. Luego de la incubación la reacción fue detenida con 25 μ l de 5 N HCl. Una vez detenida la reacción, se agregaron 25 μ l de estándar interno (3H -mevalonato, 50000 dpm/0.8 mg) y se incubo otros 20 minutos a 37°C para asegurar el proceso de lactonización del ácido mevalónico. La reacción detenida fue centrifugada a 6000 x g por 10 minutos, con el objeto de eliminar las proteínas. La separación del producto de las reacciones se realizo mediante cromatografía en capa fina en placas de silicagel 60 de 20 x 20 cm. Las placas fueron activadas antes de la separación a 110 °C durante 30 minutos. En las placas activadas se aplicaron 50 μ l de las muestras, secando con corriente de aire. Las placas fueron desarrolladas en campana de cromatografía en un sistema de acetona: benceno 1: 1. Una vez que se ha terminado la corrida, las placas se dejan secar a temperatura ambiente y pueden ser reveladas con

vapor de yodo. El mevalonolactona normalmente se localizo entre las zonas de Rf 0.38-0.7. Se raspa el silica gel donde este localizado el mevalonolactona, se añadieron 3 ml de liquido de centelleo (acuasol) y se mide en un contador de radioactividad (Shapiro y Rodwell, 1971). **Escualeno sintetasa**, los ensayo de la SQS se realizaron en un volumen total de 100µl. La mezcla de reacción contenía: 50 mM MOPS/NaOH, pH 7.5, 10 mM KF, 10 mM MgCl₂, 1mM NADPH, 4 mM de glucosa-6-fosfato, 25 µM de [1(n)-³H] FPP (5 µCi/ensayo), 50mM de ascorbato, 20 unidades/ml de ascorbato oxidasa, 2 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 100 µg de proteínas de cada fracción. Luego de incubar durante dos horas a 28°C, se añadió 100 µl de Propan-2-ol para detener la reacción.

Para la estimación cuantitativa de la producción de escualeno, se utilizaron dos métodos:

a) Extracción con Hexano:

A la mezcla de reacción se agregó 1 ml de hexano, para extraer la fracción lipídica. Se desechó la fase acuosa y se realizó la extracción con hexano 2 veces más. Luego, la muestra se dejó evaporar en una campana hasta un volumen mínimo. La radiactividad extraída en el hexano se cuantificó con un Top-Count, agregando 1 ml de Líquido de centelleo, MicroscintTM-40.

b) Spot-Wash:

Se colocó 25 µl de la mezcla de reacción en placas de Sílica Gel TLC (20 x 20 cm), divididas en cuadritos de 2 x 2 cm. Se dejó secar, y éstas se lavaron dos veces con 1% de SDS en 0.2 M de Tris base (pH no ajustado). Cada lavado se hizo en bandejas poco profundas por 15 min. con agitación constante. Luego de estar secas, los cuadros se cortaron y se cuantificó la producción de escualeno radiactivo en un Top-Count, agregando 1 ml de Líquido de centelleo (Tait, 1992).

3.20. Análisis cinéticos de la hexokinasa natural y recombinante

Los Km para la glucosa fueron determinados variando las concentraciones entre 0.014 y 0.4 mM, mientras que el Km para el ATP fue

medido con concentraciones variables entre 0.01 y 2 mM. En todos los estudios con hexosas como sustratos, así como glucosa y con G6-P como potencial inhibidor, la actividad hexokinasa fue monitoreada a través de la producción de ADP. La reacción fue entonces acoplada a un sistema regenerante de ATP, consistiendo de 5 mM de fosfoenol piruvato, 3 U ml⁻¹ piruvato kinasa, 2 U ml⁻¹ lactato deshidrogenasa, y 0.4 mM NADH. Los estudios de inhibición fueron realizados hechos incluyendo una de las siguientes moléculas en la mezcla de reacción: G6-P, pirofosfato de sodio (PPi), ADP, fructosa o trealosa 6-fosfato (T6-P). Los requerimientos de cationes divalentes fueron ensayados al añadir 5 mM de MgCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, o NiCl₂. La actividad de la enzima fue ensayada como se menciona anteriormente y una unidad (U) de actividad hexokinasa es definida como la cantidad de la enzima que cataliza la formación de 1 µmol de G6-P o ADP por minuto.

3.21. Análisis cinéticos de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa

Para el análisis de la actividad dependiente de los sustratos de la HMG-CoA reductasa del glicosoma de epimastigotes de *T. cruzi* y el efecto de la lovastatina (inhibidor), un análisis de regresión convencional fue aplicado a los datos experimentales transformados a un grafico con la ecuación de cinética general, donde *K_{is}* y *K_{ii}* son las constantes de disociación para la enzima-inhibidor y el

$$1/V = \frac{K_a (1 + [I]/K_{is}) + [S] (1 + [I]/K_{ii})}{V_m [S]}$$

complejo enzima-sustrato-inhibidor, respectivamente.

3.21. Cinética e Inhibición de la actividad Escualeno Sintetasa:

Las reacciones se hicieron bajo las condiciones señaladas anteriormente para la determinación de la actividad escualeno sintetasa.

3.21.1. Estandarización de las condiciones de reacción:

- Curva de tiempo: se llevaron a cabo los ensayos de SOS a diferentes tiempos para determinar el tiempo óptimo en el que la producción de escualeno fuese lineal. Los tiempos ensayados fueron: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 60 minutos. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 25 μ M de FPP, 1 mM de NADPH, 150 μ g de proteínas y se cuantificó la producción de escualeno radiactivo mediante el método de Spot-Wash descrito anteriormente.
- Curva de concentración de proteínas: los ensayos de SQS se llevaron a cabo utilizando diferentes concentraciones de proteínas para determinar el rango en el que la producción de escualeno fuese lineal. Las concentraciones de proteínas probadas fueron las siguientes: 5, 10, 20, 30 y 50 μ g. Las condiciones de reacción fueron: 25 μ M de FPP, 1 mM de NADPH, y el tiempo óptimo determinado en el ensayo anterior.

3.21.2. Determinación de parámetros cinéticos de la enzima escualeno sintetasa:

En todos los ensayos se usaron 150 μ g de proteínas, y la duración de la reacción de 30 min. y 28°C. Se probaron concentraciones de FPP entre 0.5 y 20 μ M, y de NADPH entre 5 y 200 μ M. Cada una de las concentraciones de FPP se probó independientemente con cada una de las seis concentraciones de NADPH. Se graficaron los inversos de las velocidades iniciales vs los inversos de las concentraciones de los sustratos (gráficas de Lineweaver Burk), para la determinación de los respectivos K_m y $V_{m\acute{a}x}$. Estas determinaciones se realizaron tanto para los **Glicosomas Purificados** como para la **Fracción Microsomal** (Sasiak y Rilling, 1988; Mookhtiar y col., 1994; Soltis y col., 1995; Amin y col., 1996 y Ward y col., 1996).

3.22. Inhibición de SQS con BPQ-OH, WC-9, E5700 y ER-119884

Los ensayos de inhibición con BPQ-OH, WC-9, E5700 y ER-11988 se realizaron tanto en la **Fracción Microsomal** como de **Glicosomas Purificados**.

- Determinación del K_i para la BPQ-OH, WC-9, E5700 y ER-11988: los ensayos se realizaron variando las concentraciones de FPP (utilizando un rango de concentraciones entre: 0.5 y 12 μM), para diferentes concentraciones de BPQ-O, WC-9 entre 0 y 30 nM y para E5700 y ER - 119884 (10 y 500 pM, en presencia/ausencia de 20 μM de PPI); y una concentración fija y saturante de 1 mM de NADPH. Se graficaron los inversos de las velocidades iniciales *versus* los inversos de las concentraciones de FPP, para cada concentración de BPQ-OH, WC-9, E5700 y ER-119884 (Ward y col., 1996).
- Curva dosis-respuesta (IC_{50}): este ensayo se llevó a cabo incubando previamente a la enzima (150 μg de proteína) con BPQ-OH durante 15 min. La concentración de FPP para la **Fracción Microsomal** fue de 25 μM (aproximadamente 10 veces el K_m : 2.35 μM), mientras que para los **Glicosomas Purificados** fue de 18 μM (aproximadamente 6 veces el K_m : 2.82 μM). Se utilizaron concentraciones de BPQ-OH entre 0 y 6000 nM y 5 mM de NADPH. Se graficó la producción de escualeno ($\mu\text{moles}/\mu\text{g}$ de proteína/min) vs la concentración de BPQ-OH para determinar el IC_{50} y el tipo de inhibición que produce (Ward y col., 1996).

3.23. Efecto inhibitorio *in vitro* de BPQ-OH, E5700 y ER-119884 sobre el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y promastigotes de *Leishmania mexicana*

El estudio del efecto de los inhibidores se hizo en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y promastigotes de *Leishmania mexicana*. Para ello, se siguió el curso temporal del crecimiento celular por cambios en la absorbancia a 600 nM. La población celular se calculó a partir de una curva de calibración de absorbancia vs el número de células/ml.

Los cultivos en paralelo [10 ml de medio de cultivo LIT (*T. cruzi*), y medio Schneider (*L. mexicana*)], fueron inoculados inicialmente con 2×10^6 células/ml y 3.5×10^6 células/ml, respectivamente. Los cultivos de *T. cruzi* se mantuvieron a 28°C en agitación, mientras que los de *L. mexicana* se mantuvieron a 28°C

sin agitación. Al alcanzar una densidad de células de 6×10^6 células/ml para *T. cruzi*, y de 5×10^6 células/ml para *L. mexicana* (fase exponencial de crecimiento), se agregó, en condiciones estériles, BPQ-OH.

Las drogas se prepararon en solución de dimetilsulfóxido (DMSO). Por diluciones seriadas se prepararon una serie de soluciones stock para abarcar de 0 a 10 μ M (concentraciones finales en el cultivo) para *T. cruzi*, y de 0 a 30 μ M para *L. mexicana*. Para evitar los efectos del DMSO, se prepararon las soluciones concentradas 100X para obtener un 1 % de DMSO final en los cultivos.

Los controles de este experimento fueron cultivos a los que se agregó el mismo volumen de DMSO (100 μ l) utilizado para el inhibidor y cultivos sin DMSO, ni droga (posible efecto del DMSO solo).

Se siguió el curso temporal de los cambios de absorbancia con mediciones cada 24 horas. Adicionalmente se hicieron observaciones al microscopio de los posibles cambios morfológicos, inducidos por los cambios en los esteroides de membrana. Para el efecto tripanocida se notó la lisis celular, evidenciada por una disminución de la absorbancia (Vivas, 1996). El ensayo de cada una de las concentraciones de BPQ-OH, E5700 y ER-119884 fueron hechos por triplicado.

Los valores de IC_{50} se calcularon a partir de un análisis de regresión no lineal en GraFit. Se hizo de dos maneras independientes: a) graficando los porcentajes de crecimiento relativo vs la concentración de BPQ-OH, E5700 y ER119884 y b) graficando la tasa de crecimiento relativa vs la concentración de las drogas.

Donde:

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células/ml final} - \text{N}^\circ \text{ de células/ml inicial (después agreg. BPQ-OH, E5700, ER-119884)}}{\text{N}^\circ \text{ de células/ml inicial}} \times 100$$

$$\% \text{ de crecimiento relativo} = \frac{\% \text{ crecimiento para una concentración de BPQ-OH, E5700, ER-119884}}{\% \text{ crecimiento para el control}} \times 100$$

$$\text{Tasa de crecimiento} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células/ml final} - \text{N}^\circ \text{ de células/ml (48 horas antes de detener el ensayo)}}{48 \text{ horas}} \times 100$$

$$\text{Tasa de crecimiento relativo} = \frac{\text{Tasa de crecimiento para una concentración de BPQ-OH E5700, ER-119884}}{\text{Tasa de crecimiento para el control}} \times 100$$

También se realizó de manera independiente un ensayo en el que se midió diariamente, conjuntamente con la D.O., la actividad esterasa (como manera de cuantificar la viabilidad celular) y se contó el número de células/mi por el método de Pizzi-Brener. Para este ensayo se probaron concentraciones de BPQ-OH entre 0 y 150 μM .

La actividad esterasa se midió mediante el siguiente ensayo (estandarizado para 5×10^6 células): se agregó un volumen de cultivo que correspondió a una densidad celular aproximada de 5×10^6 células, se completó hasta 1 ml con tampón normal y 9 μl de p-nitrofenil acetato (12 mg/1 ml de metanol al 100%). El blanco solo contenía 1 ml de tampón normal y 9 μl de pNPA, para medir la tasa de descomposición espontánea de este compuesto en p-nitrofenol. Luego se calculó la actividad enzimática se hizo una curva patrón de actividad enzimática vs número de células/mi, para cultivos de *T. cruzi*, en ausencia de la droga.

Cada uno de estos parámetros (D.O. y actividad esterasa) se transformó en número de células/mi y se graficó vs el tiempo.

3.24. Efecto de BPQ-OH, WC-9, E5700 y eR-119884 sobre la síntesis de novo esteroides en epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. mexicana*

Los cultivos de *Trypanosoma cruzi* se iniciaron con una densidad celular promedio de 2×10^6 células/ml fueron incubados por 48 horas, momento en el cual se le agregó BPQ-OH (6×10^6 células/ml) y se incubaron por 192 horas más.

Los cultivos de *Leishmania mexicana* se iniciaron con una densidad celular promedio de 3.5×10^6 células/ml. La droga se agregó cuando la celular promedio fue de 5×10^6 células/ml, y se incubaron por 96 horas más.

Las células se cosecharon por centrifugación (1000 x g por 15 min., 4°C) y se lavaron dos veces con buffer normal (Tris 70 mM, pH 7.2, NaCl 140 mM, KCl 11 mM, MgCl₂ 10 mM). El segundo lavado se realizó en tubos corex. El sedimento celular de la segunda centrifugación rindió el material de partida "masa de parásitos". Los lípidos totales se extrajeron con 30 ml de cloroformo/metanol 2:1 durante 24 horas (mínimo) a 4°C; la mezcla de extracción se filtró en un papel de filtro Whatman # 1 para separar el material insoluble. Esta fracción rindió los lípidos totales en cloroformo/metanol. Para su ulterior procesamiento, este material se secó en un rotoevaporador BUCHI, modelo RE111, añadiendo en varias oportunidades cloroformo/metanol 2: 1, para evitar la precipitación del material lipídico. Una vez evaporado a sequedad se resuspendió en 1 ml de cloroformo, obteniéndose los lípidos totales en cloroformo (L T/cloroformo).

Para separar los lípidos neutros de los lípidos polares se siguió el procedimiento descrito por Hirsch y Ahrens en 1958 (adaptado en el Laboratorio de Química Biológica del IVIC) con una cromatografía en columna de ácido silícico. Se agregaron 4 volúmenes de cloroformo a la columna, y de este lavado se obtuvieron los lípidos neutros. Esta fracción se rotoevaporó a sequedad y se resuspendió en Qn volumen mínimo de cloroformo. Seguidamente se filtró en un papel de filtro Whatman N° 1, para eliminar restos de sílica que pudieran quedar.

La fracción de lípidos neutros fue analizada por cromatografía gas/líquida convencional (separación isotérmica en una columna de vidrio 4-m empacada con 3% OV/1 sobre una malla Chromosob 100/200, con nitrógeno como gas de corrida a 24 ml por min, y detección de flama de ionización en un cromatógrafo de gases Varian 3700). Para el análisis cuantitativo y la asignación de estructuras los lípidos neutros fueron separados en una columna capilar de alta resolución (25 m x 0.20 mm columna Ultra-2, 5% de fenil/metil/silicona, 0.33 µm de espesor de la película) en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 Plus equipado con un detector de masa sensible HP 5973A. Los lípidos fueron inyectados en cloroformo; la columna se mantuvo a 50°C por un minuto y luego se incrementó la temperatura a 270°C a una velocidad de 25°C/min y finalmente a 300°C a una velocidad de 1°C/min. El gas de corrida (He) fluyó a una velocidad constante de 0.5 ml/min. La

temperatura del inyector fue de 250°C y el detector se mantuvo a 280°C (Urbina y *col.*, 1996; Liendo y *col.*, 1998; Urbina y *col.*, 1998; Liendo y *col.*, 1999).

3.25. Efecto *in vivo* de BPQ-OH, E5700 y ER119884 sobre la proliferación de amastigotes de *T. cruzi*

Los amastigotes fueron cultivados en células Vera y mantenidas en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado a 56°C durante 1 hora, e incubados bajo una atmósfera de 95% *aire*/5% CO₂ a 37°C. Las células fueron infectadas durante dos horas provenientes de cultivos celulares en una proporción 10:1 tripomastigotes/célula. Una vez infectadas, las células se lavaron tres veces con buffer fosfato salino (PBS) para remover los parásitos no adheridos. Seguidamente se agregó medio fresco suplementado con 2% de FBS y se añadió la BPQ-OH en las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 100 µM; y para E5700 y ER 119884 entre 10-500 pM. Para estos experimentos se hicieron controles con ketoconazol y nifurtimox a una concentración final de 1 µM (controles positivos, puesto que estas drogas tienen efectos sobre la proliferación de los amastigotes a esta concentración), y sin la adición de ninguna droga (control negativo, para tener un patrón del nivel de infección de las células Vera en ausencia de droga). Las células se incubaron por 96 horas con la droga, con un cambio de medio y droga a las 48 horas. Las láminas con las células se fijaron con PBS y 2.5% de glutaraldehído y, luego fueron teñidas con solución May-Grunwald y tinción Giemsa. La cuantificación del número de células infectadas y el número de parásitos por células, se realizó mediante el uso de microscopía de luz (Martin y *col.*, 2000; Lira y *col.*, 2001). La monocapa de células Vero debe ser confluyente al momento de hacer la infección; de lo contrario puede verse afectada por este proceso y la aplicación de la droga.

Los cálculos de IC₅₀ para BPQ-OH, E5700 y ER-119884 en amastigotes de *T. cruzi* se hicieron a través de un análisis de regresión lineal en GraFit, graficando: a) el porcentaje relativo de amastigotes/células infectadas vs la concentración de BPQ-OH, b) el porcentaje relativo de células infectadas por campo vs la concentración de BPQ-OH.

Donde:

$$\% \text{ relativo de amastigotes/célula} = \frac{\% \text{ amastigotes/célula para una concentración de BPO-OH, E5700, ER-119884} \times 100}{\% \text{ amastigotes/célula para el control}}$$

$$\% \text{ relativo de células infectadas/campo} = \frac{\% \text{ células infectadas para una concentración de BPO-OH, E5700, ER-119884} \times 100}{\% \text{ células infectadas para el control}}$$

3.26. Estudios *in vivo* de E5700 y ER-119884

Estos experimentos se hicieron con un modelo murino de la enfermedad de Chagas en fase aguda. Grupos de 10 ratones NMRI-IVIC (20-25 gr) fueron infectados con 10^5 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* por ratón, los tratamientos orales comenzaron 24 horas después y dados por 30 días consecutivos, usando 25 o 50 mg/Kg.d de E5700 y ER-119884. Controles negativos (no tratados) recibieron únicamente el vehículo, 1 % de metilcelulosa mas 0.5% Tween-80. Como control positivo, un grupo de animales recibió la droga de referencia nifurtimox a 50 mg/Kg.d. Los animales fueron seguidos por 40 días post-inoculación. La supervivencia fue seguida diariamente y la parasitemia semanalmente por exámenes directos en el microscopio.

3.27. Análisis estadístico

El método no-paramétrico de Kaplan-Meier fue usado para estimar la función de sobrevivencia de los diferentes grupos experimentales. Los rangos de los ensayos (rangos-grandes, los cuales dan igual peso a todas las observaciones y el test de Peto-Peto Wilcoxon, el cual usa un estimado de la función de la sobrevivencia para este tipo de resultados), fueron usados para compararlos entre ellos. El análisis fue hecho usando una herramienta de sobrevivencia de StarView 4.5 (Survival Functions for StatView, Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA) corrido en un Power Macintosh G4 Cube computer.

3.28. Extracción de lípidos totales

Las muestras para la extracción de lípidos fueron resuspendidas en un mililitro de agua destilada y seguidamente se agregaron 30 ml de Cloroformo: Metanol 2:1. Esta mezcla se incubó por 48 horas a 4°C, las muestras fueron filtradas a través de un papel Whatman N° 2 y recogidas en un balón para luego ser rotaevaporadas a 45°C al vacío. A las muestras secas se le colocaron 15 ml de cloroformo, si la muestra no se tornaba turbia se consideraba deshidratada, de lo contrario se repetía el procedimiento de rotaevaporación hasta que la muestra quedara totalmente deshidratada. Finalmente la muestra de lípidos totales fue resuspendida en un volumen de 5 ml de cloroformo (Urbina y col. 1993, Urbina y col. 1995).

3.29. Separación de lípidos neutros y polares

La separación de los lípidos se realizó en una columna de ácido silícico (previamente activado a 120°C por 12 h), luego el ácido silícico se resuspendió en cloroformo y se empacó en columnas de vidrio de 5ml. La columna fue equilibrada con 4 volúmenes de cloroformo y seguido fue cargada con las muestras de lípidos totales resuspendida en cloroformo. Los lípidos neutros fueron eluidos con 5 volúmenes de cloroformo y los polares con 8 volúmenes de una mezcla Cloroformo: Metanol 1:1. Los lípidos neutros y polares fueron secados por rotaevaporación empleando las mismas condiciones del proceso de deshidratación. Los lípidos neutros se resuspendieron en un mililitro de cloroformo para ser analizados por el cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas y los polares en 500 µl de cloroformo para el posterior análisis de fosfolípidos por cromatografía de capa fina (TLC), en placas de silica gel Merk 5721 (Urbina y col. 1993, Urbina y col. 1995).

3.30. Identificación y cuantificación de lípidos neutros

El análisis cuantitativo y para la asignación estructural, estos fueron separados en una columna capilar de alta resolución [25 m x 0,20 mm (diámetro interno) columna Ultra-2, 5% Fenil Metil Siloxano, 0,33 µm de espesor de

película], dentro de un Cromatógrafo de gases Hewlett - Packard 5890 serie 11, equipado con un detector de masas HP5971A. Una muestra de 1µl de lípidos neutros fue inyectada a la columna del cromatógrafo de gases. La columna fue mantenida a 50°C por un minuto, para luego ascender a 270°C a una velocidad de 25°C por minuto y finalmente ascendió a 300°C a una velocidad de 1°C por minuto. La fase móvil fue helio, cuyo flujo se mantuvo constante a 1 ml por minuto, la temperatura del inyector fue de 250°C y la del detector fue mantenida a 280°C. (Liendo y col. 1999). La identificación de lípidos neutros fue realizada, comparando el patrón de ión molecular del lípido problema con una base de datos de patrones con estructuras conocidas. La cuantificación de estos lípidos se hizo integrando el área bajo la curva de cada pico en el cromatograma.

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

4. INVESTIGACIÓN DESARROLLADA

4.1. Expresión y Distribución Intracelular de las Isoenzimas Fosfoglicerato Kinasa (PGK) en *Trypanosoma cruzi*.

La enzima fosfoglicerato kinasa (enzima de la glicólisis y gluconeogénesis) cataliza la reacción desde 1,3-bifosfoglicerato a 3-fosfoglicerato, esta reacción es dependiente de magnesio. Este es el primer paso en la glicólisis donde ocurre formación de ATP junto con el 3-fosfoglicerato.

Mediante el análisis por PCR y Southern blot, nosotros encontramos tres genes PGK (A, B y C) en el genoma de *T. cruzi* (Fig. 4.1.1). Los genes parecen estar arreglados en tándem, con el gen *PGKA*, caracterizado por una inserción de 240 pb, en el extremo 5' del locus (Fig. 4.1.2). Esta organización es similar a la observada previamente en *T. brucei*, *T. congolense* y *C. fasciculata*. La presencia de estas isoenzimas codificadas por estos tres genes fue confirmada por análisis con Western blot (Fig. 4.1.1).

Por fraccionamiento subcelular se encontró que la actividad PGK estaba presente tanto en el citosol (aproximadamente 65-80%) como en los glicosomas (20-35%) (Fig. 4.1.3, y 4.1.4). La fracción del citosol celular contenía un polipéptido de 47 kDa revelado por Western blot, utilizando un anticuerpo anti-PGK de *T. brucei* y el cual es presumiblemente el producto del gen *PGKB*, por analogía con la misma situación en otros trypanosomatídeos. El antisero reaccionó con ambos polipéptidos de 56 y 48 kDa en los glicosomas purificados (Fig. 4.1.5 A y B). Usando un antisero específico (monoclonal anti-PGKA), se confirmó la identidad de un polipéptido de 56 kDa como la PGKA (Fig. 4.1.5 C), mientras que la proteína de 48 kDa podría ser el producto del gen *PGKC*. La PGKA es responsable para un estimado entre el 15-25% del total de la actividad celular y la PGKC entre 5-10%.

En estudios previos (Taylor y Gutteridge, 1987) toda la actividad PGK en epimastigotes de *T. cruzi* fue localizada en el citosol; ninguna actividad fue asociada con glicosomas. En contraste, en el presente estudio, usando tres métodos diferentes de fraccionamiento celular, una parte significativa del total de la actividad en las células fue encontrada en los glicosomas. La actividad PGK fue reproduciblemente detectada en la organela, aún cuando las células fueron recogidas en diferentes estadios de crecimiento de los cultivos. La

discrepancia con los resultados de Taylor y Gutteridge (1987) podrían posiblemente ser explicados por diferentes niveles de expresión de las PGKs glicosomal debido al uso de otras cepas de *T. cruzi* y/o diferentes condiciones de cultivo.

Todas las tres isoenzimas PGKs se expresan simultáneamente en los epimastigotes de *T. cruzi*. La expresión simultánea de PGKC en glicosomas y PGKB en el citosol, en una relación de 20/80, también fue observada en promastigotes y amastigotes de especies de *Leishmania* (Adjé y col., 1997; McKoy y col., 1997). Esta relación refleja posiblemente la actividad específica para diferentes rutas metabólicas: degradación de azúcares a piruvato, involucrando la PGKC y metabolismo anaplerótico (vía PEPCK y MDH) y quizás también en gluconogénesis involucrando a la PGKB (Oppenheimer, 1987). En contraste, la expresión de ambas PGKs en *T. brucei* es mutuamente excluyente (Osinga y col., 1985; Gibson y col., 1988). La inducción de la expresión de PGKs en las formas sanguíneas de *T. brucei*, aún a niveles muy bajos, por genética reversa, demuestra que es letal para la células (Blattner, 1998). La expresión mutuamente excluyente de PGKB y PGKC podría estar relacionada con la importancia de mantener un balance neto de ATP producido y consumido dentro del glicosoma (Oppenheimer, 1987; Michels y col., 2000; Blattner y col., 1998). En los glicosomas se consume ATP en la parte inicial de la ruta por la HK y PFK y éste es nuevamente regenerado en la reacción catalizada por la PGK. En las formas procíclicas de *T. brucei*, la PGK está presente en el citosol, pero el balance de ATP en el glicosoma es mantenido por la actividad de la PEPCK. Nosotros asumimos que en *T. cruzi* y especies de *Leishmania*, ambas la PGK y PEPCK glicosomal serían las responsables de mantener el pool de ATP en la organela a un nivel apropiado. Cómo ocurre el flujo relativo a través de la ruta glicolítica y cómo son coordinadas las reacciones anapleróticas y el control de la relación ATP/ADP en la organela es aún desconocido. La abundancia relativa de las PGKs detectadas en los epimastigotes de *T. cruzi*, para las isoenzimas PGKA y PGKC, contrastan con la situación en *T. brucei*, donde la PGKA es únicamente una enzima menor. Es posible que la inserción específica de 80 aminoácidos de esta enzima sirva como una función regulatoria, es decir que permita ajustar la actividad de las enzimas de acuerdo a los requerimientos metabólicos de las células, y así

mantener el balance de ATP dentro del glicosoma. La inserción podría formar un dominio para la unión de ligandos regulatorios u ofrecer un sitio para una modificación capaz de modular la actividad. Sin embargo, algunos intentos se han hecho para identificar metabolitos o modificaciones que afecten la actividad de la PGKA recombinante purificada de *T. brucei*, permaneciendo aún sin resultados satisfactorios (Swinkels y col., 1992). Además, investigaciones en la base de datos con la secuencia de inserción no reveló ningún motivo específico o similitud significativa con secuencias conocidas. La PGKA podría jugar un papel importante en dirigir el flujo a través de diferentes ramas del metabolismo de carbohidratos de *T. cruzi*, consecuentemente garantizando el balance de ATP/ADP. En contraste, este papel en *T. brucei* podría ser limitado, a causa de la expresión mutuamente excluyente de la PGKC enzima meramente glicolítica y piruvato kinasa, y las enzimas PGKB, PEPCK y malato deshidrogenada (MDH) (también) involucradas por otra parte en el metabolismo anaplerótico. Falta por establecerse por qué la PGKA está ausente en *Leishmania*, donde las diferentes rutas del metabolismo de carbohidratos operan simultáneamente. Esto podría deberse al hecho de que la PGKC en *Leishmania* haya adquirido una nueva manera de regulación a través de una extensión de 62 residuos de aminoácidos en el C-terminal (Adjé y col., 1997).

Basados en fraccionamiento con detergente (Triton X-114) y carbonato, se determinó que la PGKA está fuertemente asociada con la membrana del glicosoma a través de interacciones hidrofóbicas, mientras que la PGKC está presente en la matriz de la organela. Este resultado difiere del observado para la localización de la PGKA de *T. brucei*, donde la enzima fue encontrada en la fase acuosa al tratar a los glicosomas con Triton X-114. Sin embargo, la predicción de la secuencia de aminoácidos del polipéptido no suministra ninguna pista obvia de cómo la PGKA puede interactuar con la membrana del glicosoma. La secuencia no contiene ningún dominio potencialmente hidrofóbico transmembranal, o alguna extensión o inserción de acuerdo a la secuencia de la PGKA de *T. brucei*, u a otra isoenzima correspondiente a algún otro tripanosomatide analizado, que potencialmente pudiera constituir un ancla a la membrana. La unión podría ser vía interacción con proteínas específicas de la membrana o por uniones covalentes a grupos hidrofóbicos así como palmitato, miristato o un compuesto isoprenil. Justamente, la secuencia tiene

numerosos sitios potenciales de N - miroistilización. Finalmente, nosotros no podemos excluir la posibilidad de que la PGKA de *T. cruzi* esté unida a las proteínas de la membrana del glicosoma a través de interacciones electrostáticas que puedan permanecer estables con el tratamiento de carbonato a pH 11.5. Sería necesario en futuras investigaciones explorar las diferentes posibilidades.

El hecho de que la PGKA de *T. cruzi* tenga una extensión N-terminal de 80 aminoácidos adicional, una estructura terciaria o cuaternaria distinta y que además pueda jugar un papel importante de regulación en el glicosoma, bien sea en la glicólisis o gluconeogénesis, convierte a la PGKA de *T. cruzi* en un potencial blanco terapéutico, debido a las diferencias fisicoquímicas que presenta con respecto a su contraparte en los mamíferos. Análogos de adenosina (tubercidina) inhiben la glicólisis en *T. brucei*, actuando específicamente en la PGK con un IC_{50} de 7.5 μM y se ha concluido que 5 μM de tubercidina mata a los tripanosomas teniendo como blanco a los glicosomas, especialmente por inhibición de la fosfoglicerato kinasa (Drew y col., 2003).

La PGKA localizada en el glicosoma puede desempeñar un papel fundamental en la energética del glicosoma. El hecho de que existan rutas de síntesis en el glicosoma, las cuales demandan A TP (purinas, éter lípidos, isoprenoides) y de que parte del fosfoenolpiruvato (PEP) se vaya vía formación de piruvato a través de la piruvato kinasa hacia la mitocondria, o que parte de la glucosa-6-fosfato sea desviada hacia la ruta de las pentosas fosfato, significaría que se crearía un desbalance de A TP en los glicosomas y por lo cual la glicólisis se detendría, ya que no se podría fosforilar la glucosa en sus pasos iniciales. El hecho de que la PGKA en *T. cruzi* se exprese de forma constitutiva, podría implicar que esta enzima esté a cargo de regenerar el A TP necesario para fosforilar los pasos iniciales de la glicólisis, cuando no todo el PEP entra al glicosoma, lo cual hace que la PEPCK no pueda regenerar los equivalentes de A TP consumidos o para necesidades de las rutas de síntesis en esta organela. Además, el hecho de que la PGKA siempre esté presente en el glicosoma, independientemente del estadio morfológico del parásito (epimastigote, amastigote y tripomastigote), estaría apoyando la hipótesis de que en *T. cruzi* haya gluconogénesis, de hecho se ha logrado por estudios con

librerías de ARN de interferencia en *T. brucei*; identificar varios genes de esta ruta (Morris y col., 2002). Una PGKA en el glicosoma implicaría que la glicólisis no se pare cuando ocurre gluconeogénesis, ya que el A TP consumido en el paso de 3-fosfoglicerado a 1,3-difosfoglicerato estaría en el citosol a cargo de la PGKB.

Para mejor información acerca de la metodología, resultados y discusión ver publicación 1.

Concepción JI, Adjé CA, Quiñones W, Chevalier N, Dubourdieu M, Michel PAM. The expression and intracellular distribution of phosphoglycerate kinase isoenzymes in *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology. (2001), 118:11-121.

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

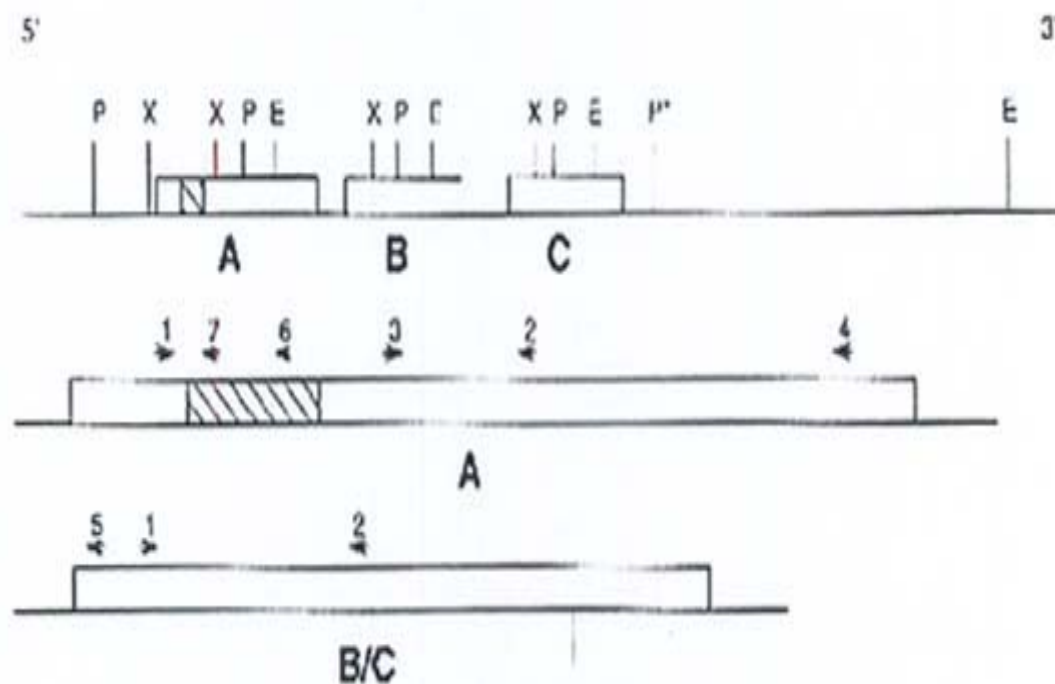


Figura 4.1.1. Mapa físico de los locus de la PGKs en el genoma de *T. cruzi*. Las cajas representan una aproximación de las regiones que codifican para las proteínas, inferido desde los datos de las secuencias disponibles y de las secuencias conocidas de otras PGKs. Las regiones rayadas corresponden a una inserción de 240 pb en el gen PGKA. Abreviaturas: E, *EcoRI*; P, *PstI*; X, *XhoI*. P* indica la posición de un sitio polimorfo *PstI* entre los dos alelos. La posición de los primers usados para la amplificación de diferentes partes de los genes PGKA y PGKB/C.

```

      10      20      30      40      50      60      70
TcrUA  MNSTILKKVDDVWFLTANHVLTSDVFVPTNNGTITNDVHRAAIPTRRVIDQKQICILASHLGRF
TbruA  MSTAPNAKNIS...S.G...T...KR...N...HQ...K...R...L...
TconA  MSHVTGVTSNIRI...ID.I...T...VR...N...Q...A...T...Q...I...L...
CfasA  MLLSTQSIPI...S.D...VAG...R...N...TSS.G.DD.F...S...R...IV...L...
TbruB  MSIKERKGINECD.KG.K...R...N...LED.N...S.L.AVQR.LTE...S.V...
LmexB  MSIVL.KGI.DVA.RD.K...R...N...VE...E...P...S...L...QK.LKM...S...
TcrUB  -----
TcrUB*  MAIKR.KGI.QVDVKG.X...K...N...VED.K...S.L...KK.LES...S.V...N...#

      90      100      110      120      130      140      150
TcrUA  KGVSYTSAKKDIQKRYHGGLPNDSRGKTAFFAVLPGDEXAKILALSSAKDKASKLSLSEGGKTAVPFSLSRECK
TbruA  K...MVAGVR.IRR.YHKAQPH.NK...SV.P...R.VK...K...AREE.THISPEVK...ML.A...P.D...
TconA  A.I.MTT.VR.VRR.YHKAMPH.NK...SV.PP.R.IK...Q...LREE.THIMPQVK...IL.A...P.D...
CfasA  T...DYDT.HAEQE...QTIVQLPNS...SG.R.DA.AT...W...QREK.AT.SNPYG...A...A...P...
TbruB  ...MAR-----
LmexB  ...AKMSU-----
TcrUB  ...TKAA-----
TcrUB* #####-----

      160      170      180      190      200      210      220
TcrUA  QTLVHYISENKEQIFPQLSLSSCYEEKILRPIAVRLASIMNQIVFYAIDCHDAKMEISLLRGEVMLENNVR
TbruA  KS...HQ.IA.N.DSAL...MSV.A...OYS...V...G...L...SV.V.R.K...N...
TconA  KQ...HQ.LD.K.DNGL...SV.A...OYS...V...G...K...L.R.K...N...
CfasA  RR...LRPMS.N.ELF...G...A...KFFS.E.V...K...D...G...LG.QAD.AK...C...L...
TbruB  -----GKELGSAGGIP.F.QKA...K.V.KA.S...SRP.T.P.LN.ADVV.KMSP.D.V...
LmexB  -----PKPEKGV...AA...V.A.S...EEK.A.P.LN.SIVV.K.K...D.L...
TcrUB  -----AAACDDSV...AGA...K.V.K...G...VP.V.P...ASTVEK.SP.G.V...
TcrUB* #####VP...AGA...K.V.K...G...VP.V.P...ASTVEK.SP.G.V...

      230      240      250      260      270      280      290      300
TcrUA  YVEEGSEK-EZERDAMARVLASYGDVYISDAPCTAHRESATMGPVKVLGHGAAGYLMEKEISYFAKVLGSPARP
TbruA  S...NGEN-A...E...KI...N...P...
TconA  K...D...E...K...IFV...D...I...S...N...P...
CfasA  TN.N.SD...RK.ML...I...A...N...D...SL...R...QQ...S...NN...P...
TbruB  K...ST...E...KI...S...D...E...N...P...
LmexB  T...A...K...A.L.V...D...S...Y...N...SR...NN...P...
TcrUB  V...K...
TcrUB* V...K...###

      310      320      330      340      350      360      370
TcrUA  LVAIVGCAKVSQKIQLLQKMLQRIDHIIIGGAMAYTELKQCHKICSSHCECDKLARSILKKAEDRKVTVLTP
TbruA  E...R...K...Y...YS...K...S...EF...Q...I...
TconA  S...Y...HR...T...DR...O...
CfasA  L...I...L...M.V.E.L.DCV.S.F...GL...RS...YS...T.HP...AFVPP.QA.PLAGSG.O.R.V...
TbruB  Y...L...YS...I...S...EF...O...I...
LmexB  H...G...NY.V...Q...RK...I...D...L...K...QK.C.O...
TcrUB  -----
TcrUB* #####

      380      390      400      410      420      430      440      450
TcrUA  VDHVCHTEFKAVEAPVWTCGCHFDGYMALDIGPRTIEKYVEIVAKCKSAWNGMPCGVFEMAPYSKGTFAIAKVM
TbruA  I...DS...I...DQNI.E.H...K...K...QTIG...V...A...
TconA  DT.V...ADADI...H...K...AN...TIG...T...V...A...
CfasA  E...AHTRPA...T.TSAN...VAG...L...QSITHI.RQ.S.V...L...M...PV.AG...S...RVV...
TbruB  I...DS...I...DQNI.H.H...K...K...QTIG...V...A...
LmexB  NK...DS...DQV...Y...K...HM.E.VIGK...PC...V...A...
TcrUB  -----
TcrUB* #####NPA...NK.V...H...IXER...

      460      470      480      490      500      510
TcrUA  GDSIQNHGLMSIIGGDSASAAELSGEAPKMSHVSTGGGASLELKGKTI.PGVAVLDOKE
TbruA  RG...KR...E...G...AAR---I...
TconA  EC...KN...Q...TH...I...
CfasA  SQSSAAK.TT...V...C...MHX...AH...T...S...V...AA...N...
TbruB  RG.DEB...L...NR...T...
LmexB  CG...KD...L...P...L...KN...I...T...Q...
TcrUB  -----
TcrUB* X...X...XFX...K...

```

Figura 4.1.2. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la isoenzima A de la PGK de *T. cruzi* con otras secuencias disponibles de PGKA de otros tripanosomatídeos, algunas secuencias de la PGKB y la secuencia parcial de la PGKB o C de *T. cruzi*. Los aminoácidos han sido alineados para obtener la máxima identidad posicional. Los puntos indican los aminoácidos que son idénticos a una de las posiciones correspondientes en la enzima PGKA de *T. cruzi* y los huecos indican la ausencia de los aminoácidos correspondientes en esa posición. Abreviaturas. C. fasc, *C. fasciculata*; T. bru, *T. brucei*; T. con, *T. congolense*; T. cru, *T. cruzi*; L. mex, *L. mexicana*

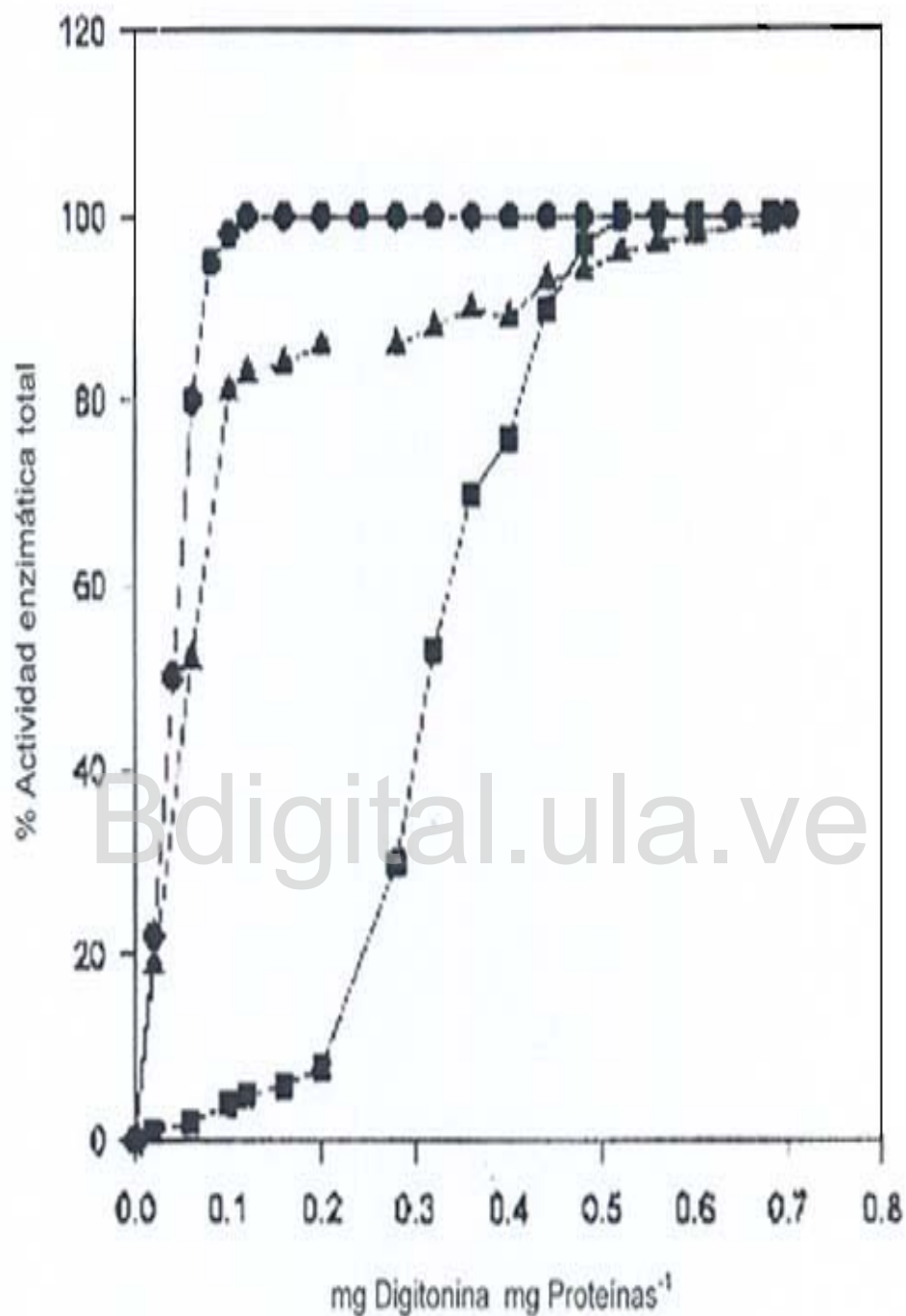


Figura 4.1.3. Liberación de varias enzimas desde epimastigotes intactos de *T. cruzi* por tratamiento con concentraciones incrementadas de digitonina. Las actividades enzimáticas fueron determinadas en los sobrenadantes de las células tratadas con digitonina después de una centrifugación. Alanina aminotransferasa (●), fosfoenolpiruvato carboxikinasa (■), fosfoglicerato kinasa (▲).

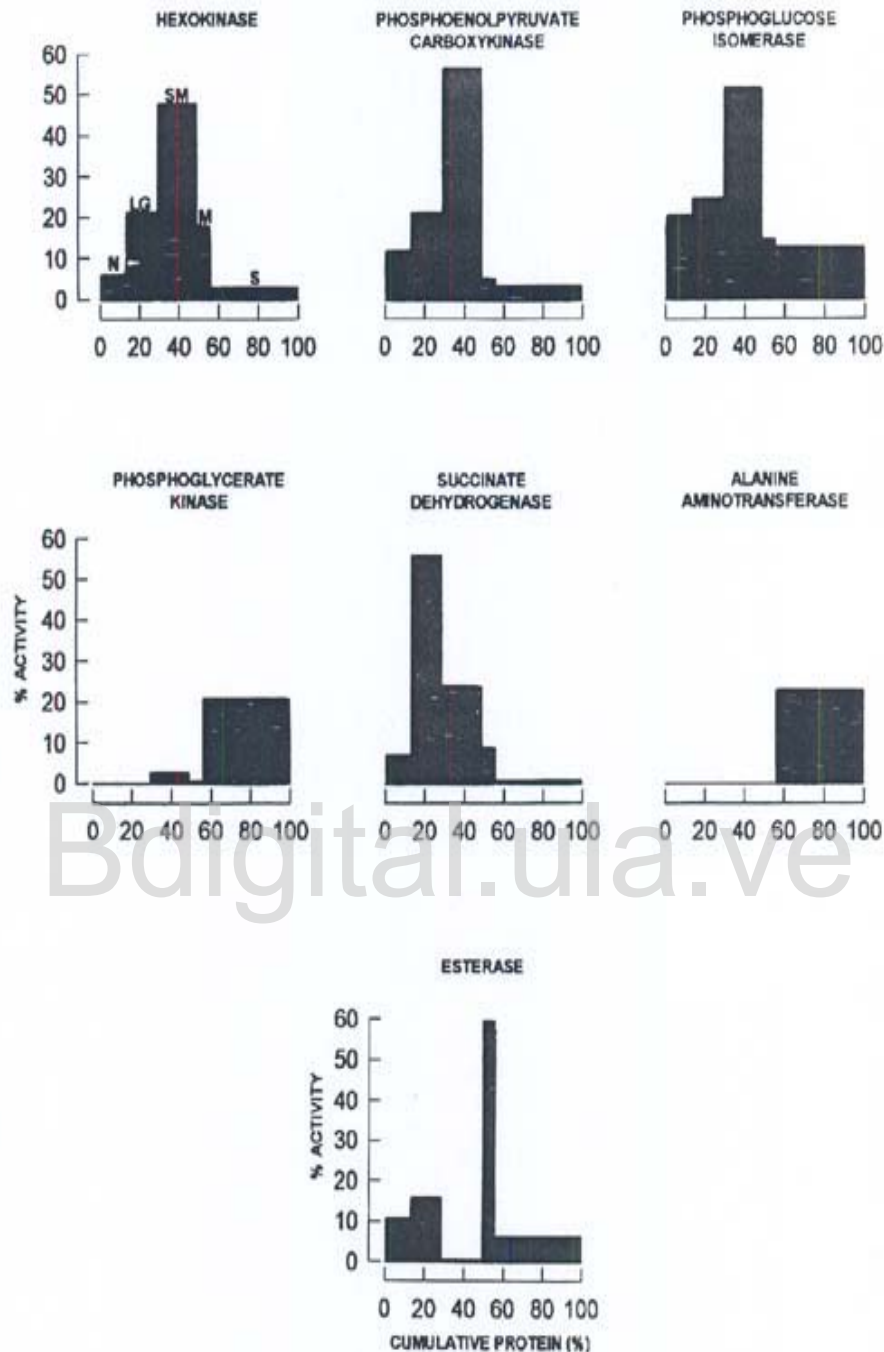


Figura 4.1.4. Perfil de distribución de un número de enzimas seleccionadas en el fraccionamiento subcelular obtenido por centrifugación diferencial de un homogenato de epimastigotes de *T. cruzi*. Las fracciones fueron graficadas de acuerdo a el orden de su aislamiento (desde derecha a izquierda): nuclear (N), granular gruesa (LG), granular pequeña (SG), microsomal (M) y sobrenadante final (S). El contenido de proteínas acumuladas son indicadas en las absisas. Estos resultados representan la media de dos experimentos. Triton X-100 (0,1%) estuvo presente en todos los ensayos enzimáticos.

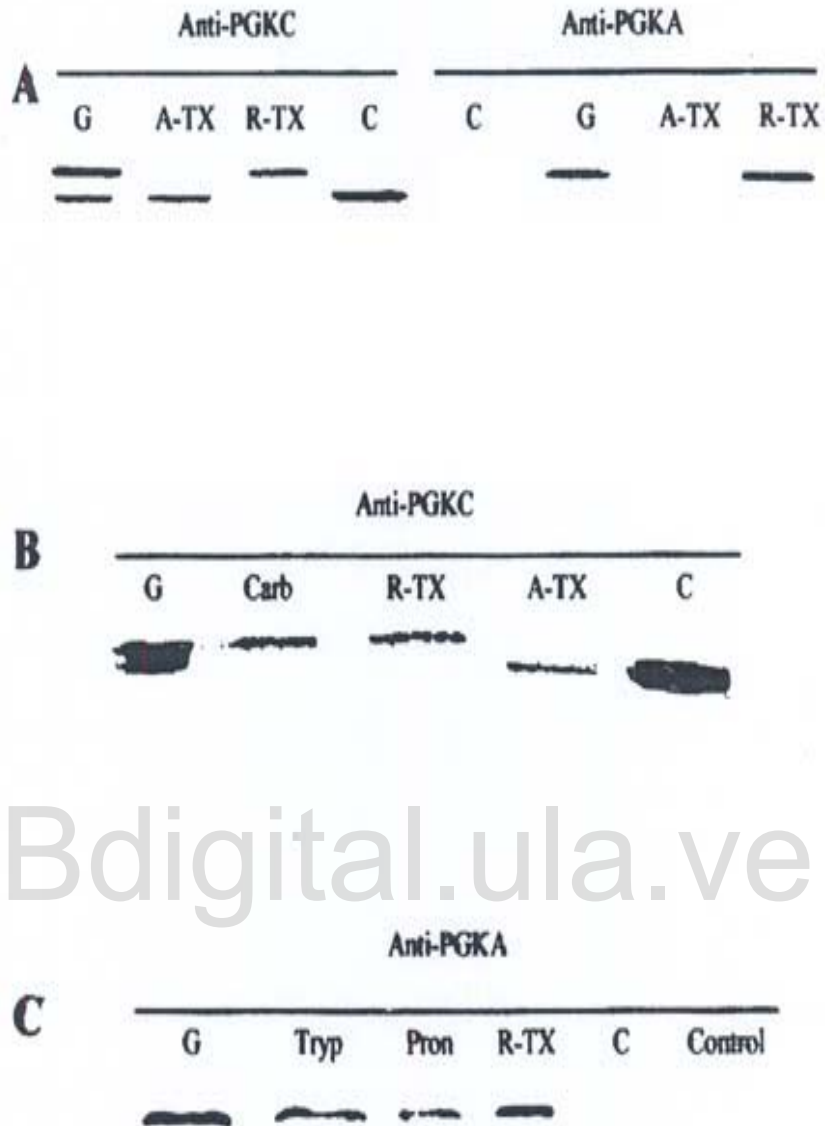


Figura 4.1.5. Análisis por Western blot de las isoenzimas de PGK de epimastigotes de *T. cruzi*. Proteínas (40 µg/línea) de varias fracciones subcelulares fueron fraccionadas por SDS-PAGE, transferidas y probadas con su anti-PGKC de *T. brucei* (panel A, parte de la mano izquierda y panel B) o un antisuero contra la inserción específica de la enzima PGKA de *T. brucei* (panel A, parte de la mano-derecha y panel C). En todos los casos, los glicosomas purificados por ultra-centrifugación isopícnica y el citósol fue el sobrenadante de una centrifugación a 105 000 x g. Las abreviaturas encima de las líneas en los diferentes paneles indican: G, glicosomas purificados intactos; A-TX, fase rica en detergente de los glicosomas intactos tratados con T X-114; C, citósol; Carb, glicosomas tratados con carbonato alcalino; Tryp, glicosomas tratados con tripsina; Pron, glicosomas tratados con pronasa; Control, glicosomas tratados con pronasa en la presencia de Triton X-100 (0.2%).

4.2. Caracterización Molecular y Bioquímica de la Hexokinasa de *Trypanosoma cruzi*.

En *Trypanosoma cruzi*, al igual que en la mayoría de los tripanosomatídeos, la mayor parte de la ruta glicolítica está secuestrada en una organela semejante a los peroxisomas, el glicosoma (Oppenheimer, 1987). Las enzimas glicolíticas en *T. cruzi*; han sido mucho menos estudiadas en comparación a las de *T. brucei*. La hexokinasa (EC 2.7.1.1 o EC 2.7.1.2 específica para la glucosa), que cataliza el primer paso de la glicólisis para producir glucosa 6-fosfato (G6-P), no ha sido previamente estudiada en *T. cruzi*; como una proteína aislada.

En este trabajo, nosotros presentamos un análisis más exhaustivo sobre la hexokinasa de este parásito. La hexokinasa de *T. cruzi*; fue clonada, secuenciada, y expresada como una enzima recombinante en *Escherichia coli*. Además, la enzima natural fue purificada a homogeneidad y sus propiedades cinéticas comparadas con la enzima recombinante. Los resultados contribuyen a un mejor entendimiento de las diferencias entre la hexokinasa de *T. cruzi* y la enzima homóloga en el hospedador, permitiendo proponer a la hexokinasa como un potencial blanco para el diseño específico de drogas contra *T. cruzi*.

Las constantes cinéticas (K_m para la glucosa y ATP) de la proteína recombinante, después de eliminarle el (His)₆-tag en el N-terminal, fueron muy similares a las de la proteína natural purificada (Fig. 4.2.1.A y B). La enzima de *T. cruzi* es una enzima similar tanto a las hexokinasas del tipo 50 kDa de los no vertebrados como a las del tipo IV de los vertebrados y además tiene una secuencia señal en el N-terminal del tipo PTS2 (Fig. 4.2.2. y Tabla 4.2.1) de acuerdo con su localización glicosomal en el parásito (Fig. 4.2.3.). Esta tiene una baja identidad con ambas hexokinasas de tipo I, II, III de 100 kDa de mamíferos y con la hexokinasa del tipo IV de 50 kDa. De hecho la hexokinasa de *T. cruzi* presenta únicamente alta identidad en su secuencia con su contraparte en *T. brucei*;, la cual también tiene una señal del tipo PTS2 (Fig. 4.2.2.) (Willson y col., 2002). Además, la hexokinasa de *T. cruzi*; se parece a la de *T. brucei*; en su masa molecular de la subunidad (50 kDa), la pérdida de inhibición por G6-P y su alta afinidad por la glucosa. Otro hecho común de la enzima en ambos tripanosomatídeos es la estructura oligomérica en forma de

complejos (Fig. 4.2.4. A, B y C). Mientras todas las otras hexokinasas caracterizadas, solo existen como monómeros y dímeros, la hexokinasa nativa de *Trypanosoma cruzi* se encuentra principalmente como un aparente tetrámero (alrededor de 200 kDa), aunque otras formas fueron también detectadas a través de cromatografía en columnas de filtración, y de igual manera la enzima nativa de *Trypanosoma brucei* se comporta en las columnas de filtración como una proteína con una masa de 295 kDa (Misset y col., 1986). La posible relevancia fisiológica para este comportamiento de agregación de la enzima está por determinarse. A pesar de sus similitudes, la hexokinasa del *T. brucei* y *T. cruzi* presentan grandes diferencias en cuanto a que la primera es capaz de fosforilar glucosa, fructosa, manosa y galactosa (Verlinde y col., 2001), mientras que la segunda es específica para la glucosa. Este hecho que fue observado para ambas, tanto la hexokinasa natural del *Trypanosoma cruzi* como la proteína recombinante, permite clasificar a esta enzima como una verdadera glucokinasa. Las hexokinasas que son altamente específicas para la glucosa se encuentran más frecuentemente en bacterias y eucariotas unicelulares (Cardenas y col., 1998), no obstante, en estos mismos grupos de organismos, también se han reportado algunas hexokinasas con baja especificidad (Cardenas ML, 1998). Sin embargo, se debe destacar que muchas de estas hexokinasas de organismos unicelulares no pertenecen a la misma familia de enzima, así como las hexokinasas encontradas por ejemplo, en vertebrados, levaduras y tripanosomatídeos (Henze y col., 2001).

Con respecto a sus propiedades cinéticas, la hexokinasa de *T. cruzi* se parece a las hexokinasas 1 y 2 de *E. histolytica*, así que pertenecen a la misma familia, Sin embargo, estas proteínas comparten únicamente 30% de identidad (Kroschewski y col., 2000). Estas hexokinasas de *E. histolytica* tienen también un bajo Km. para la glucosa y no es capaz de fosforilar la fructosa. A pesar de la diferente especificidad en sustratos para la hexokinasa de *T. brucei* y *T. cruzi*, los residuos de unión a la glucosa son muy conservados entre las enzimas de ambos tripanosomatídeos. Además, uno puede suponer que, los residuos adicionales de aminoácidos de estas enzimas están implicados en la unión del azúcar para conferir especificidad, o los estados conformacionales serían los responsables de las diferentes especificidades para los azúcares. La causa de estas diferencias entre estas dos enzimas y el significado fisiológico

de la presencia de una glucokinasa en vez de una hexokinasa clásica en el glicosoma de *T. cruzi*, está por esclarecerse.

La comparación de la hexokinasa del *T. cruzi* con su contraparte en mamíferos indica que, aunque es similar en su afinidad por la glucosa a la hexokinasa I, II y III, es más similar a la hexokinasa IV con respecto a otras propiedades cinéticas. Ninguna de las dos enzimas fue regulada por la glucosa 6-fosfato y ambas son específicas para la glucosa. Sin embargo, ellas son muy diferentes en la afinidad por sus sustratos, la hexokinasa de *T. cruzi* tiene un K_m muy bajo (43 μM versus 12 mM en la hexokinasa IV de humanos). Estas dos características, la pérdida de inhibición por la glucosa 6-fosfato y la alta afinidad para la glucosa, es común a las hexokinasas de todos los tripanosomatides estudiados (Berens y col., 1980; Racagni y col., 1983; Nwagwu y Oppendoes, 1982; Urbina y Crespo, 1984). Estas diferencias en las propiedades funcionales y en la secuencia, comparadas con la enzima del hospedador, sugiere que la hexokinasa del *T. cruzi* podría constituir un blanco muy interesante para drogas, como ya ha sido señalado para la enzima de *T. brucei* (Verlinde y col., 2001).

Los datos presentados en este trabajo proporcionan un fuerte indicio para la existencia de dos actividades de hexokinasas en epimastigotes de *T. cruzi*, una específica para la glucosa y localizada dentro del glicosoma, y otra con una actividad fructokinasa, posiblemente presente en el citosol. Este descubrimiento también explica la posible contradicción antes mencionada entre este estudio y reportes previos (hechos con enzimas no purificadas (Racagni y col., 1983; Urbina y Crespo, 1984), de acuerdo a la especificidad de la hexokinasa de *T. cruzi*; para sus sustratos de azúcares; sin embargo, es clara la necesidad de usar enzimas purificadas cuando se quieren evaluar sustratos específicos. Desde el punto de vista metabólico, la presencia de una hexokinasa citosólica explicaría la presencia de una fuente de glucosa 6-fosfato para la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, enzima inicial de la ruta a las pentosas fosfatos, de forma similar, esta enzima en *T. brucei*, está localizada en el citosol (Barrett, 1997; Heise y Oppendoes, 1999). Una última opción es que la producción de fructosa dependiente de ADP medida, pueda no depender de una hexokinasa clásica sino de una fructokinasa específica.

Como se ha mencionado anteriormente, la hexokinasa de *T. cruzi* no es inhibida por glucosa 6-fosfato. Idénticamente, esto es característico de las hexokinasas en los tripanosomatídeos y de muchas hexokinasas del tipo 50 kDa de no vertebrados (Cardenas y col., 1998; Wilson, 1995), aunque las hexokinasas sensibles a glucosa 6-fosfato han sido reportadas también para *Schistosoma mansoni* (Tielens y col., 1994), y para algunos equinodermos (Cardenas y col., 1998; Mochizuki y Hari, 1977). Esta pérdida de inhibición indica que la hexokinasa de tripanosomatídeos no es regulada por sus productos. Hasta ahora no está claro que los tripanosomatídeos puedan necesitar tal regulación. Esto ha sido propuesto por Bakker, de que no es necesario una inhibición debido a la compartimentalización de la glicólisis (Bakker y col., 2000). Mediante simulación por computadoras de la glicólisis en la forma sanguínea de la *T. brucei*, ellos han demostrado que la hexokinasa, así como también la actividad de la fosfofructokinasa puede ser controlada en el glicosoma por la relación ATP/ADP la cual se comporta de manera independiente de la relación ATP/ADP del citosol. Aunque la hexokinasa de *T. cruzi* no es regulada por glucosa 6-fosfato, ésta es inhibida por PPi ($K_i = 0.5$ mM) (Fig. 4A y B; publicación 2); el significado fisiológico del PPi no es claro pero merece ser investigado con más detalle. En algún caso esto indica que la hexokinasa de *T. cruzi* tiene una propiedad nueva y que podría ser regulada de una manera no clásica.

Recientemente se han realizado algunos experimentos de inhibición con bifosfonatos (inhibidores que simulan al PPi) sobre la hexokinasa purificada de *T. cruzi*, glicosomas aislados y consumo de glucosa en parásitos permeabilizados. Los resultados obtenidos son muy prometedores, ya que se encontró una fuerte inhibición de la hexokinasa natural y del consumo de glucosa en células permeabilizadas con digitonina. Esto convierte a la hexokinasa en un potencial blanco quimioterapéutico para atacar a la enfermedad del Chagas.

Para mejor información acerca de la metodología, resultados y discusión; ver publicación 2.

Cáceres AJ, Portillo R, Acosta H, Rosales D, Quiñones W, Avilan L, Salazar L, Dubourdieu M, Michels PAM, Concepción JL. Molecular and

biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*.
Molecular and Biochemical parasitology. (2003), 126:251-262.

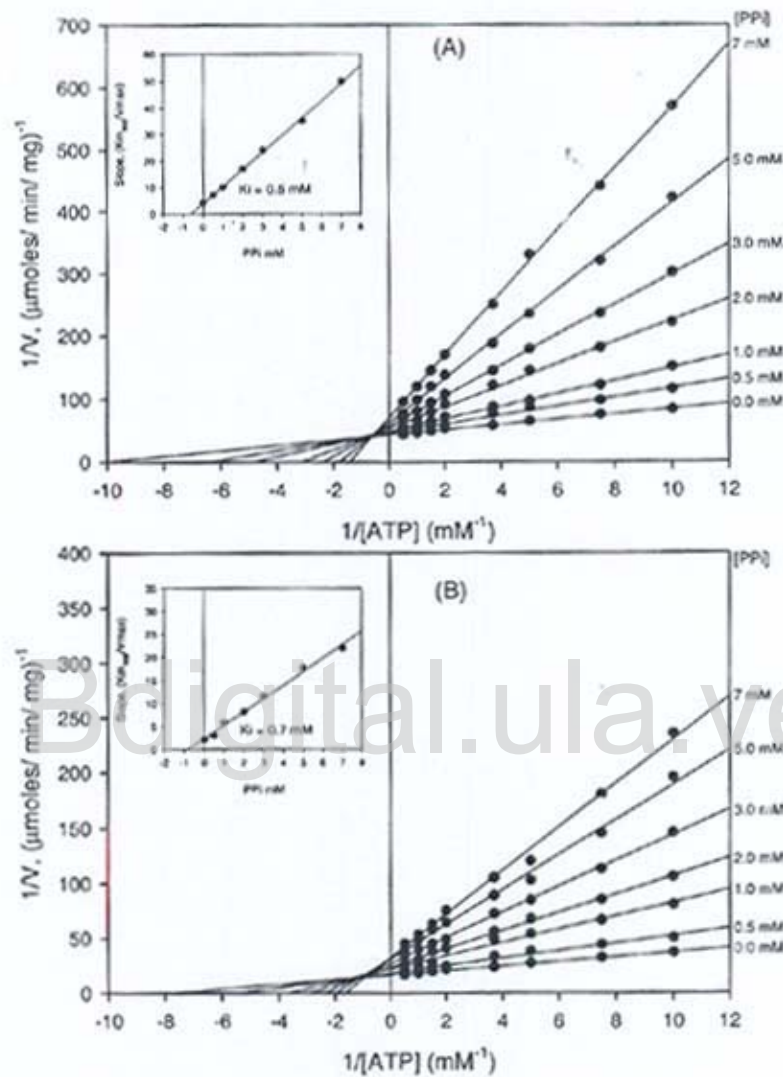


Figura 4.2.1. Cinética de la hexokinasa natural y recombinante de *Trypanosoma cruzi*. (A) natural purificada y (B) recombinante purificada, la ctividad de la enzima fue medida como una función de ATP en la presencia de las concentraciones de PP_i especificadas. Las constantes de inhibición fueron determinadas desde las pendientes en cada curva como es mostrado en los recuadros.

tc	MSARLNLLQ	HI.....AV	KCKDSQIMRH	LKRMALASL	ANOFI	39
tb	MSRRLNNLE	HI.....SI	QGNQGETIVRA	VNRQVANAAL	TNOFT	39
hsd	-----MV	HLGPKKPCAR	-MLDDRARME	AAKKEKVEQI	LAFT	24
scb	-----MV	HLGPKKPCAR	KGSMAQVPKE	LMQOI..ENF	EKIFT	35
ehi	-----MV	HLGPKKPCAR	-----MQEI	I.DQFA	9	
tc	VCKDHLKQLM	LYMVHOMIEG	LE...GREST	LRMLPSYVYK	IDPSK	81
tb	MSVISMRCIM	TYLLYEMVEG	LE...GREST	VRMLPSYVYK	ADPKR	81
hsd	LQEEELKKVM	RRMQKEMDRG	LRLTHEBAS	VKMLFTYVRS	TPEGS	69
scb	VPTFTLQAVT	KHFI SELEKG	LS...KKGGN	IPMPGWMMD	FPTGK	77
ehi	IQEKLLEIIV	QRMSEELTNG	LQ...DKPST	LKMLPSYA..P	IPTGK	50
tc	ATGVFYALDL	GGTNFRVLRV	TCKEGV...	ADRYDAKF	VIPQ.	120
tb	ATGVFYALDL	GGTNFRVLRV	ACKEGAV...	VDSSTAF	KIPK.	120
hsd	EVGDFLSLDL	GGTNFRVLMV	KVGE..GEEGQ	WSVRTKHQMY	SLPED	113
scb	ESGDFLAIDL	GGTNLRVLLV	KLGGDR.	PDITCSKY	RLPDA	117
ehi	EVGTFMGTFDV	GGTNLRVLLV	EIPEPGVIRGE	...LKSVEC	IMPKT	91
tc	QALQGTAEEL	FGFIACSVKK	MMEQKAPEDL	NRTVPLGFTF	SFPTE	165
tb	YALEGNATDL	FDFIASNVKK	TMETRAPEDL	NRTVPLGFTF	SFPVE	165
hsd	AMFGTAEML	FDYISECISD	FLDKHOMK.	HKKLPGLGFTF	SFPVR	155
scb	MRTTONPDEL	KEFIACSLRA	PIDEQFTQGI	SEPIPLGFTF	SFPAS	162
ehi	ST...IVDQF	FGFIACGIKE	FVENNNLK.	EKEIKAGLTF	SFAVE	131
tc	CKGVHGHFLI	KWKGFSTIRG	VEGKDVVELL	OKALKEMEV.	KVKVV	209
tb	CKVNRBGVLI	RWTKGFSTKG	VGGNDVIAL	CAAFGRVSL	KVNVV	209
hsd	HEDIKGIIL	NWTKGFKASC	AEGNNVVGLL	ROAIKRGGDF	EMDVF	200
scb	CKINELIQQ	RWTKGFDPN	IENHVVPMK	CKQITRNNI	PIEVV	206
ehi	CIALDKGIQQ	SWSKGWQVKE	STCKDTHVIF	HNOLAKTNN	NI RIV	175
tc	ALCNDIVGIL	ITNYFFDPDT	OVGV..IGTGS	NACYFEDAYA	VTKEP	254
tb	ALCNDIVGIL	ISHYFKDPEV	OVGV..IGTGS	NACYFETASA	VTKDP	254
hsd	AMVNDIVAIM	ISCYVEDHOC	EVGMIVGTGC	NACYMEEMQN	VE	242
scb	ALINDIVGIL	VASYTDPET	KMGVI FGTGV	NGAYVDVCSB	IEKLQ	251
ehi	AFINDIVGIF	ANLAYDASC	GMGLI FGTGT	NGCYIEKTSN	FA...	218
tc	SVAARG...T	TQTPINMECG	NFOSKYKFVL	PVLAIDEAMD	AMTPN	296
tb	AVAARG...S	ALTPINMESG	NFOSKYRFVL	PTTKSDLDLD	DASLN	296
hsd	LME...GDE	GRMCVNTIEWG	AFGDSGELDE	FLLEBYDRLVD	ESSAN	283
scb	GKLSDDI PPS	APMAI NCEYG	SEONEH.VVL	IRLKYDITID	EESPR	295
ehi	ASKLKSVCKE	DYMI VNTIEWG	AL.DI PELG.	YNAFROKMD	DVLSIN	260
tc	RNFOTCEKRV	SGMYLGEISAR	RMIAHLASLH	CLPSALASH	MARPW	340
tb	KGGCALEKMI	SGMYLGEIAR	RVI VHLSSIN	CLPAALQTA	LGNRG	340
hsd	PGOOLYEKLI	GGKYMGEIVR	LVLLRLVDEN	LLFHGEASEO	LRTRG	328
scb	PGOOTFEKMS	SGYYLGELLR	LALMDMYKOG	FIFKNQOLSK	FQKPF	340
ehi	KGEHYFEKMI	SGI YMGWLAR	LALRELIKK	VIFERYADAE	VFSGS	305
tc	SFEI.....	KFMGM...IS	ADRMPCLOFT	RQVFCELTQV	DVTDV	376
tb	SFES.....	RFAGM...IS	ADRMPCLOFT	RSTICKVCGV	DVOSI	376
hsd	AFET.....	RFVVSQ...V	ESDTGDRKOT	YNI LSTLGL	RPSIT	361
scb	VMDT.....	SYPAR...IE	EDPFENLEDI	DOLFQNEFGI	N.TTV	375
ehi	PDDTDCDHSK	KYTSRNTGIV	EDTTRELI LV	DEMLKSLGV	NDSTL	349
tc	ADLHVIRDVG	CLVHGAAQI	.SAFCSA..	PLVKIRKEGH	AI..V	416
tb	EDLRIIRDVG	RLVHGAAQOL	.SASECCA..	PLVKIQTQGR	AI..I	416
hsd	TDCQVRRAG	ESVSTRAAHM	CSAGLAGVIN	RMRESRSQOV	MRTIV	406
scb	QERKLI RRLS	ELLGARAARL	SV..CGI	AAI..COKREY	KIGHI	414
ehi	ERKMLKAIT	EAVVKRAAYL	AAAATVCLYR	KMVPYMKEL	RTTIA	391
tc	AI DGSVFEKT	PSFRRLLGON	MNAL LG...	PCCDVITA	LARDG	455
tb	AI DGSVFEKI	PSFRRLVLDN	INRL LG...	PCCDVHAV	LAKDG	455
hsd	GVGGSVYKLH	PSFKERFHAS	VRRL...	TPSCETIFI	ESEBG	444
scb	AADGSVYNRY	PGFKEKAANA	UKDIYQWTOT	SLDYPYIKIV	PAEDG	459
ehi	GVGGSVFEKS	VPFKRFYLEA	LDLL.....	CPVEKVITCO	LSKDG	429
tc	SGI GAAFISA	LIVNDK----	-----471			
tb	SGI GAAFISA	MVVNDK----	-----471			
hsd	SGRGAALV.S	AVACKKACML	GO-----465			
scb	SGAGAAVIAA	LAQKRIAEKG	SVGI I GA486			
ehi	SGLGAVI VAA	AVACKQ----	-----445			

Figura 4.2.2. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la hexokinasa de *T. cruzi*, con otras secuencias de hexokinasa. tc, *Trypanosoma cruzi*; tb, *T. brucei*; hsd, isoenzima D o IV humana; scb, *Saccharomyces cerevisiae* B. Los asteriscos indican la secuencia PTS2. Los puntos indican los residuos de unión a la glucosa. Las cajas que al menos dos secuencias de aminoácidos son idénticas o altamente conservadas. Número de acceso: tc, AJ437577.

Tabla 4.2.1. Características cinéticas de la hexokinasa natural y recombinante de *T. cruzi*.

Fraction	Activity pH optimum	Kinetic constant								
		K_m (mM)		k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}/\text{mM}$)	K_i (mM)				
		Glucose	ATP			ADP	G6-P	PPi	T6-P	Fructose
Natural	7.5–8.8	0.043 ± 0.008	0.320 ± 0.103	68160	1.58×10^6	1.3	NI ^a	0.5	NI	NI
His-tagged recombinant	7.5–8.8	0.203 ± 0.021	0.526 ± 0.097	16585	8.17×10^4	1.5	NI	0.7	NI	NI
Recombinant ^b	–	0.060 ± 0.010	0.380 ± 0.087	18913	3.15×10^5	–	–	–	–	–

^a NI: not inhibition.

^b Protein without tag.

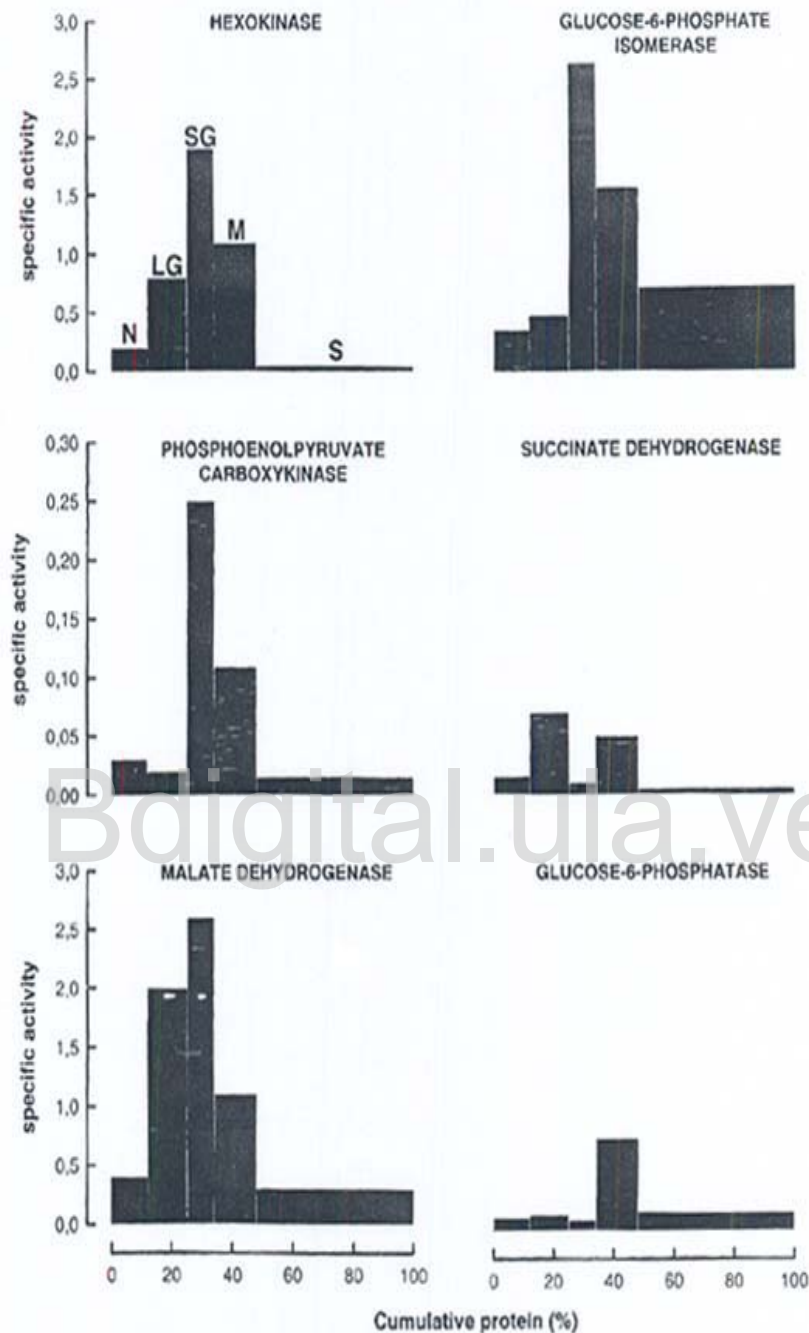


Figura 4.2.3. Distribución subcelular de la hexokinasa y otras enzimas seleccionadas, obtenidas por centrifugación diferencial desde un homogenato de epimastigotes de *T. cruzi*. Las fracciones fueron graficadas de acuerdo a el orden de su aislamiento (desde derecha a izquierda): nuclear (N), granular gruesa (LG), granular pequeña (SG), microsomal (M) y sobrenadante final (S). El contenido de proteínas acumuladas son indicadas en las absisas. Estos resultados representan la media de dos experimentos. Triton X-100 (0,1%) y NaCl (150 mM) estuvieron presentes en todos los ensayos enzimáticos.

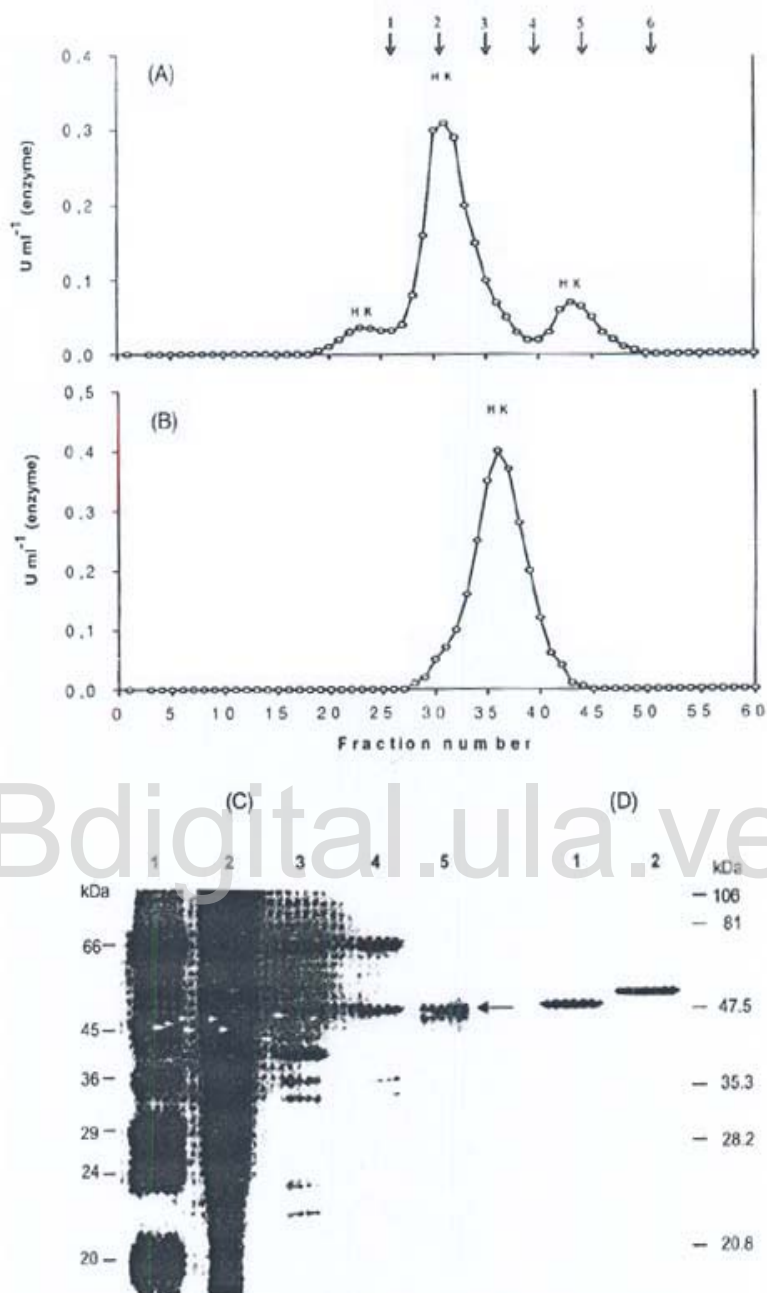


Figura 4.2.4. La hexokinasa natural fue purificada desde una fracción rica en glicosomas de epimastigotes de *T. cruzi*. El perfil de elución obtenido desde una Sepharosa CL-6B equilibrada en la presencia de (A) 150 mM NaCl y (B) 500 mM de NaCl. La actividad hexokinasa fue medida en cada fracción. Marcadores de peso molecular: (1) Apoferritina, 443 kDa; (2) β-amilasa, 200 kDa; (3) dímero de albúmina de suero bovino, 132 kDa; (4) monómero de albúmina de suero bovino, 66 kDa; (5) albúmina de huevo, 45 kDa, y (6) α-lactoalbúmina, 14.2 kDa. (C) Pasos de purificación analizados por SDS-PAGE. Línea 1, marcadores de peso molecular; línea 2, homogenato de epimastigotes de *T. cruzi*; Línea 3, paso de sulfato de amonio; Línea 4, paso de DEAE celulosa, y Línea 5, paso en Sepharosa CL-6B. Las flechas indican la proteína purificada. (D) Immunoblotting de la hexokinasa natural purificada (1) y hexokinasa recombinante (his)₆-tagged (2).

4.3. Piruvato Fosfato Dikinasa y Metabolismo del Pirofosfato en el Glicosoma de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

En este trabajo se presenta la localización y funciones metabólicas de piruvato fosfato dikinasa (PPDK), una enzima recientemente detectada en tripanosomatídeos (Bringaud y col., 1998). Tres tipos de experimentos muestran que la PPDK está mayormente localizada en la matriz de los glicosomas de los epimastigotes de *T. cruzi*, estando de acuerdo con lo reportado para *T. brucei* (Bringaud y col., 1998), además el gen clonado de la PPDK de *T. cruzi* tiene una típica secuencia PTS1 (AKL) en el C-terminal (Maldonado y Fairlamb, 2001). Sin embargo, en la mayoría de nuestros experimentos la PPDK fue también detectada en otro compartimiento. Es de hacer notar que en el genoma de *T. cruzi*; se ha reportado la presencia de únicamente dos genes idénticos, arreglados en tándem (Maldonado y Fairlamb, 2001). Otras proteínas han mostrado tener una localización dual, aún cuando son codificadas por un solo gen; la alanina-glioxilato aminotransferasa de mamíferos está presente en peroxisomas y mitocondria (Oatey y col., 1996) y la hexokinasa de espermatozoides está presente en la mitocondria, citosol y flagelo (Travis y col., 1999).

Una vez confirmado que la PPDK está ubicada principalmente en la matriz de glicosoma, confirmado por microscopia de láser confocal, permeabilización con digitonina, y fraccionamiento subcelular (gradiente isopícnico en sacarosa) (Fig. 4.3.1, 4.3.2 y 4.3.3.), nuestro principal objetivo fue proponer una función para esta enzima muy especial. Una observación esencial fue que ninguna actividad pirofosfatasa fue encontrada en los glicosomas purificados a diferencia de lo encontrado en los peroxisomas de rata donde hay actividad pirofosfatasa (Shimizu y Nakano, 1993). En ausencia de esta enzima, la PPDK podría únicamente trabajar en la dirección de consumo de PEP y PPi, de forma similar a la de ameba (Wood y col., 1985). Idénticamente al inspeccionar la bibliografía sobre la termodinámica de esta enzima no hay duda que en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica, la reacción catalizada por la PPDK es altamente exergónica (-5.2 Kcal/mol o menos) en la dirección de producción de piruvato. No obstante, el crecimiento de los epimastigotes en un estado de proliferación celular sobre un medio

complejo más glucosa, el glicosoma podría ser abastecido constantemente con altas concentraciones de PEP glicolítico y con PPi producido por varias rutas, lo cual cambiaría aún más el equilibrio hacia la formación de piruvato. Los niveles de AMP y ATP no parecen ser relevantes para evaluar la dirección de la PPDK, ya que la relación en la concentración podría ser mantenida constante con la presencia de la adenilato kinasa (Fig 1A, publicación 3). Sin embargo, el pH de la matriz del glicosoma constituye un factor esencial a tener en cuenta, ya que dos protones están involucrados en la reacción de la PPDK, explicando que la energía libre estándar falla en 2.5 Kcal por unidad de pH (Reeves y col., 1968). Por consiguiente la irreversibilidad de la PPDK podría ser aún mayor, si el glicosoma es un compartimiento ácido, como es el caso de los peroxisomas (Nicolay y col., 1987).

La termodinámica de la PPDK es de hecho muy similar a las pirofosfatasa (PPasa), haciendo posible que la PPDK pueda hidrolizar el PPi en dos iones de fosfato y cambiar el equilibrio de las reacciones que producen PPi intraglicosomal. Generalmente es admitido que la activación de los ácidos grasos no tendría lugar si no hubiera hidrólisis del PPi. Con respecto a la detección de la ruta de oxidación de ácidos grasos y su activación en el glicosoma, es muy significativo. En este caso la falta de una actividad pirofosfatasa en esta organela, donde ocurren diversas reacciones enzimáticas que producen PPi no tendría sentido alguno, no obstante, la presencia de la PPDK en este mismo compartimiento haría las veces de la PPasa, vista como otra enzima exergónica que consume PPi, haciendo las veces de pirofosfatasa.

El piruvato, un producto obligado de la PPDK en los glicosomas, podría en principio ser excretado al citosol. Sin embargo, la presencia de la alanina deshidrogenasa (ADH) en el glicosoma, implicaría que al menos parte del piruvato es reducido a alanina antes de ser excretado. El sistema PPDK más ADH sería el equivalente a PEPCK más MDH; ambos sistemas estarían encargados de mantener el balance redox y de energía en los glicosomas. En este sentido es lógico proponer que el PEP glicolítico, es decir, el que re-entra a los glicosomas, sea usado por alguno de estos dos sistemas, dependiendo de la disponibilidad de PPi (y AMP), y por supuesto dependiente de la actividad de biosíntesis en los glicosomas. Al respecto, es muy significativo que la PPDK sea activada por el acetil-CoA (la disponibilidad de este sustrato podría

parcialmente ser determinante en la velocidad de síntesis) y la PEPCK inhibida por el PPi. En condiciones donde no hubiera nada de síntesis y ninguna degradación de ácidos grasos en el glicosoma, la PEPCK, MDH y fumarato reductasa (FRD) podrían ser los pasos esenciales para el mantenimiento del balance redox y de energía. En condiciones donde haya biosíntesis de isoprenoides, nucleótidos y β -oxidación de ácidos grasos, la PPDK (activada por acetil-CoA) podría competir con la PEPCK (inhibida por PPi) por el PEP en los glicosomas, por consiguiente consumiendo el PPi producido y generando una contribución termodinámica a estas reacciones. La pérdida sensible de PEP a través de la actividad piruvato kinasa (PK) en el citosol podría ser compensada por la actividad fosfoglicerato kinasa (PGKA y PGKC) para regenerar el ATP en el glicosoma (Concepción y col., 2001b), y la glicerolfosfato deshidrogenada (acoplada a la glicerolfosfato oxidasa en la mitocondria) para la reoxidación del NADH (Concepción y col., 2001a). El ATP necesario para las reacciones de biosíntesis podría ser suministrado por la ya mencionada PGK, aparentemente regulada por los niveles de ATP (Concepción y col., 2001b), mientras que el NADPH podría ser facilitado por la ruta de β -oxidación de los ácidos grasos, unido a la reducción del NADP^+ y no a el NAD^+ como ocurre normalmente en la mitocondria. Las necesidades de NADPH para las rutas de biosíntesis pueden ser suministradas por la derivación de los electrones en cuestión desde la molécula de glucosa a través de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ ; de hecho, esta enzima ha sido localizada de forma parcial en los glicosomas, tanto de *T. cruzi* como de *T. brucei* (Heise y Oppenheimer, 1999). De acuerdo con la propuesta de este trabajo, la PPDK del glicosoma sería esencial para acoplar la glicólisis, la β -oxidación de ácidos grasos y varias rutas de síntesis (Fig. 4.3.4).

Sorprendentemente, en muchos trabajos recientes, la PPDK no ha sido reconocida como una enzima esencial para las formas procíclicas de *T. brucei*. (Coustou y col., 2003), lo que estaría en una aparente contradicción con nuestra hipótesis, ya que el metabolismo de las formas procíclicas de *T. brucei* es considerada de forma general muy similar a la de epimastigotes de *T. cruzi*.

La presencia en el glicosoma de una piruvato carboxilasa (PC), consume ATP, junto con la PEPCK (ΔG° cercano a cero) y una PPDK, es

intrigante, ya que se puede formar un ciclo fútil. Contrariamente a lo que uno podría pensar, este ciclo fútil no estaría asociado a un consumo neto de ATP, sino más bien a la formación de dos ADP a partir de un ATP más un AMP (Fig. 4.3.1A,). No obstante, la reacción neta de este ciclo fútil es la hidrólisis del PPI a 2Pi. Aunque con los resultados obtenidos en este trabajo es difícil decir si este ciclo fútil tiene un significado metabólico, uno podría proponer que una posible función es que se eliminaría el PPI sin un consumo neto de PEP, por ejemplo, sin una glicólisis activa, es posible que se produzca PPI por las rutas de biosíntesis y β -oxidación, bajo condiciones de oxidación de aminoácidos. La PC y el ciclo fútil podría ser activo únicamente en la presencia de acetil-CoA y por consiguiente degradación de ácidos grasos

Resumiendo, en el glicosoma de *T. cruzi*, y probablemente en otros tripanosomatídeos que albergan importantes rutas biosintéticas que producen PPI, incluyendo la β -oxidación de los ácidos grasos. En la ausencia de pirofosfatasa en el glicosoma, la PPDK podría ser la encargada de hidrolizar el PPI en presencia de PEP, haciendo posible termodinámicamente las reacciones que producen PPI y eliminando al mismo tiempo el PPI tóxico. El significado biosintético de esta enzima es ilustrado por su activación con acetil-CoA.

Para mejor información acerca de la metodología, resultados y discusión ver publicación 3.

Acosta H, Dubourdieu M, Cáceres A, Bringaud F, Concepción JL. Pyruvate Phosphate Dikinase and Pyrophosphate Metabolism in the Glycosome of Trypanosoma cruzi epimastigotes. (2004), Comparative Biochemical Physiology. (aceptado para publicar).

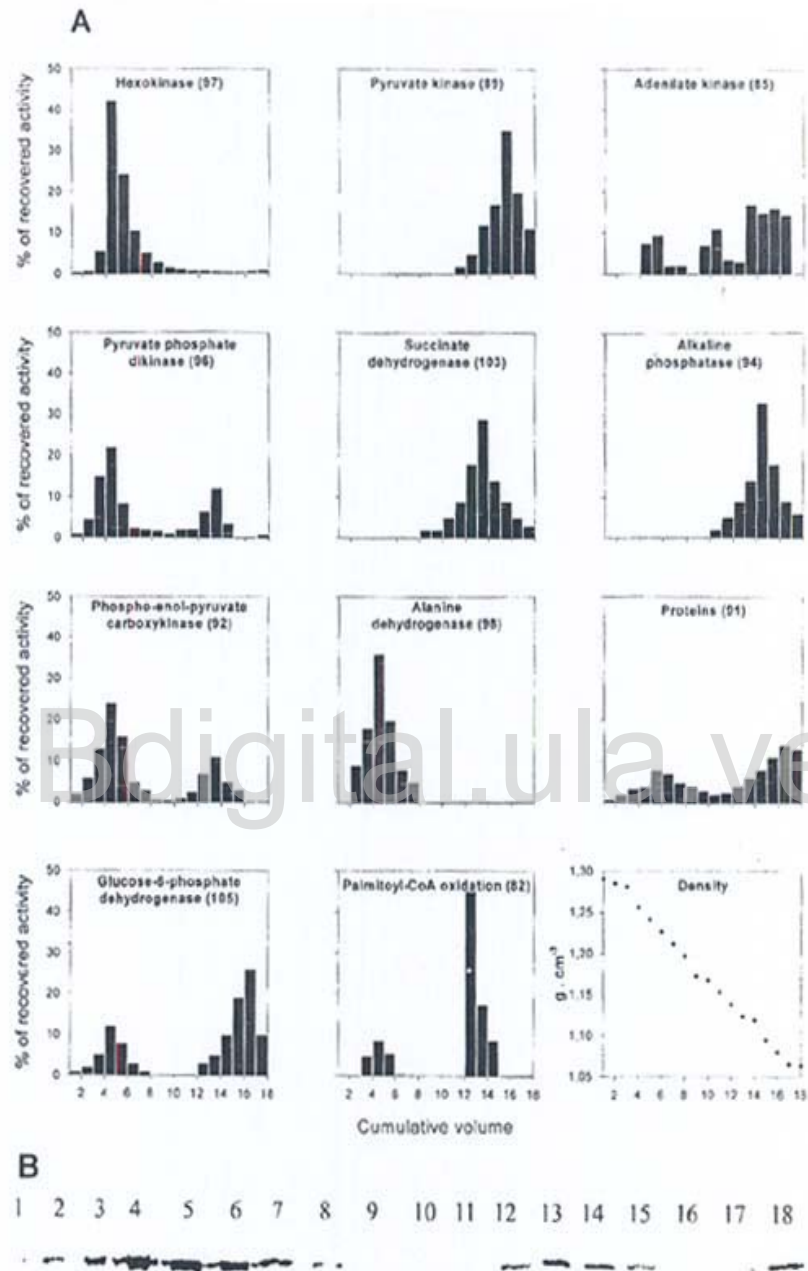


Figura 4.3.1. Perfil de distribución de un homogenato de epimastigotes de *T. cruzi* después de una centrifugación isopícnica. Los experimentos presentados en esta figura fueron realizados dos veces y cinco veces para la PPDK y la principal enzima marcadora. Las densidades de las fracciones varían entre 1.05 a 1.27 g cm⁻³. A, la determinación de las actividades enzimáticas fueron realizadas dos veces sobre cada fracción. Para cada enzima analizada en los experimentos, las actividades correspondientes a las 18 fracciones fueron sumadas en orden de calcular el porcentaje recuperado (números entre paréntesis) con respecto a la actividad total determinada sobre el homogenato. Ninguna actividad PPase fue detectada en la parte baja del gradiente. B, Cada fracción del gradiente fue analizada por SDS-PAGE y un Western blot en la presencia de un anticuerpo monoclonal anti-PPDK. La banda observada en la mayoría de las fracciones

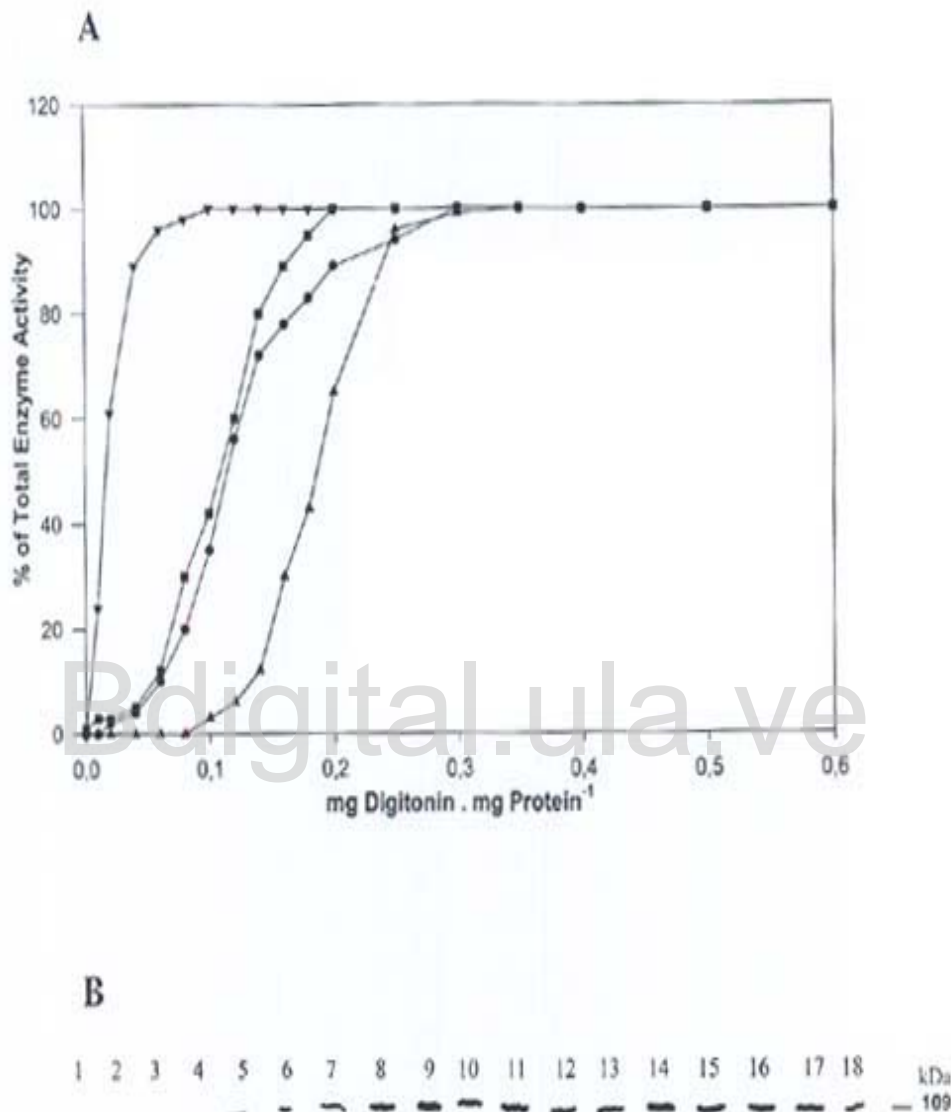


Figura 4.3.2. Liberación de algunas enzimas desde *T. cruzi* con un tratamiento con digitonina. Las enzimas fueron liberadas desde los epimastigotes enteros al incrementar las concentraciones de digitonina. **A**, Las actividades fueron determinadas en los sobrenadantes de las células centrifugadas después de una incubación de 20 minutos en la presencia de la proporción de digitonina indicada. PPDK (●), Piruvato kinasa (▼), Hexokinasa (■), Isocitrato deshidrogenasa (▲). **B**, Western blot análisis de los sobrenadantes en la presencia de un policlonal anti-PPDK.

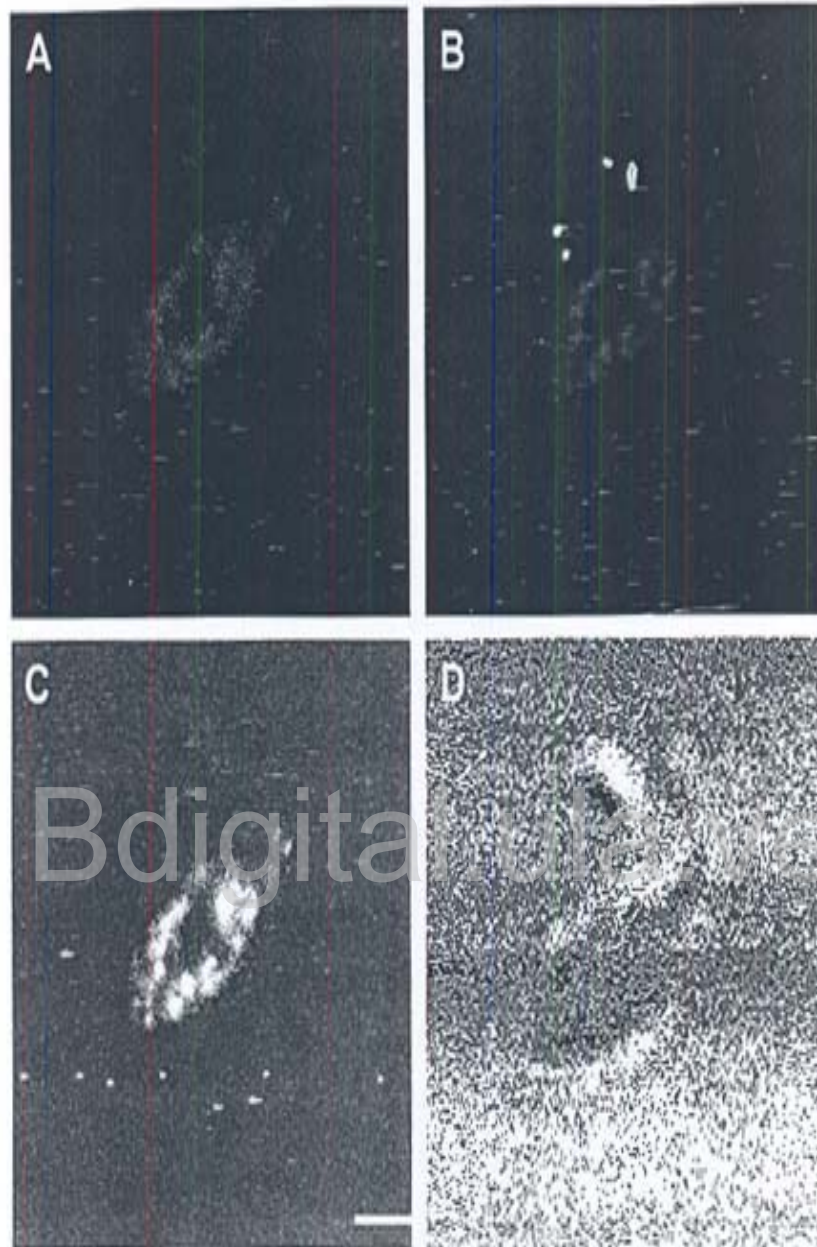


Figura 4.3.3. La PPDK fue teñida con FITC y la HK, una proteína específica de los glicosomas fue detectada por un anticuerpo secundario acoplado a Cy3 y procesado por un microscopio escáner láser confocal. Panel A, los parásitos fueron incubados con un anti-PPDK y visualizados con un anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína; Panel B, los parásitos fueron teñidos con un anti-HK y visualizados con un anticuerpo secundario conjugado a Cy3; Panel C, la imagen resultante de la superposición de las imágenes anti-PPDK y anti-HK; Panel D, muestra una imagen de contraste de interferencia. Barra, 5 μm .

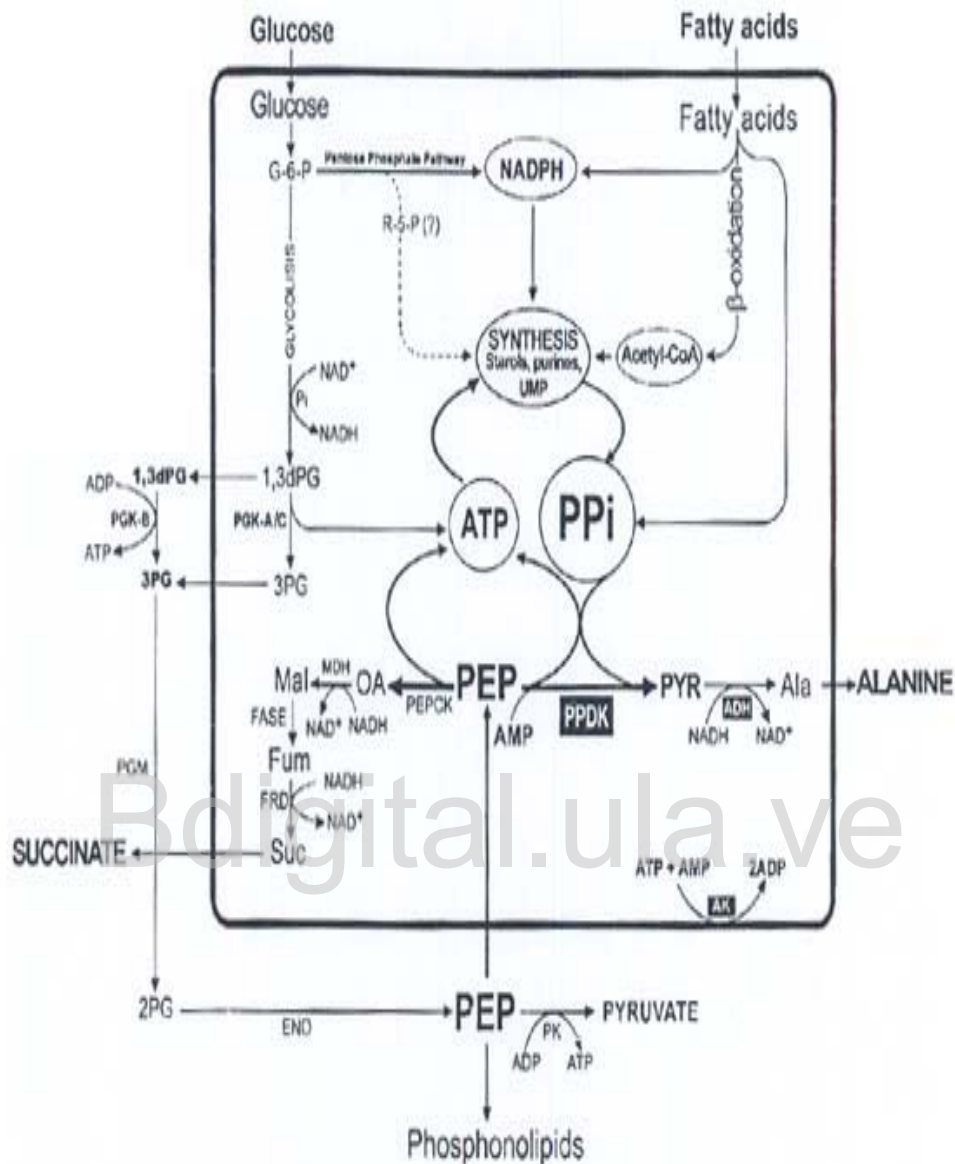


Figura 4.3.4. Un modelo para el metabolismo intermediario del PPI en los glicosomas de los epimastigotes de *T. cruzi*. Todas las reacciones indicadas con flechas continuas en este modelo han sido demostradas en el parásito. Las abreviaturas de los metabolitos son: G-6-P, Glucosa-6-fosfato; 1,3dPG, 1,3Difosfoglicerato; 3PG, 3Fosfoglicerato; Mal, Malato; OA, Oxalacetato; Fum, Fumarato; Suc, Succinato; PEP, Fosfoenolpiruvato; PYR, Piruvato, Ala, alanina. Las abreviaturas de las enzimas son: PPDK, piruvato fosfato dikinasa; PEPCCK, fosfoenol piruvato carboxikinasa; ADH, alanina deshidrogenada; AK, adenilato kinasa; FASE, fumarasa; FRD, fumarato reductasa; PGK, fosfoglicerato kinasa, PGM, fosfogliceromutasa; ENO, enolasa, y PK, piruvato kinasa.

4.4. La α -glicerolfosfato Deshidrogenasa está Presente en los Glicosomas de *Trypanosoma cruzi*;

La α -glicerolfosfato deshidrogenasa (GPDH) juega un papel muy importante en el balance redox del glicosoma de *T. brucei*. Esta enzima no había sido detectada en *T. cruzi* (Taylor y Gutteridg, 1977; Cazzulo y col., 1988), aunque está presente en todos los otros tripanosomatídeos conocidos (Tilens y Van Hellemond, 1998). En estos organismos, la GPDH es parte del sistema encargado de reoxidar el NADH glicosomal por un oxígeno molecular a través de una lanzadera clásica de dihidroacetona-fosfato/ α -glicerolfosfato y una α -glicerolfosfato oxidasa o GPO alternativa mitocondrial (Tielens y Van Hellemond, 1998). Un hecho común observado por diferentes autores es la inhibición del consumo de oxígeno por el ácido salicilhidroxámico (SHAM) en epimastigotes de *T. cruzi* (Felix y col., 1978; Stoppani y col., 1980; Engel y col., 1990) y la oxidación directa de glicerolfosfato por extractos de mitocondria (Affrachino y col., 1985), una indicación de la posible presencia de un sistema GPO (generalmente referido como una oxidasa alternativa sensible a SHAM) y también de un sistema generador de α -glicerolfosfato. En este trabajo nosotros obtuvimos otra visión de la actividad GPDH (EC 1.1.1.8) en *T. cruzi*.

La actividad GPDH fue determinada en extractos de epimastigotes en distintos puntos de la curva de crecimiento. En la Fig. 4.4.1.A se muestra que la actividad específica GPDH, la cual no fue detectada al comienzo de la fase exponencial, incrementa hacia el final de la curva de crecimiento. Sin embargo, un antisuero hecho contra la GPDH de *T. brucei* evidenció un máximo de reconocimiento al comienzo del crecimiento. Estas observaciones indican que la mayoría de la enzima se expresa durante la fase la exponencial temprana pero de forma inactiva (Fig. 4.4.1.8)

Cuando los epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial de crecimiento fueron permeabilizados con concentraciones crecientes de digitonina, la GPDH fue liberada a la misma concentración de digitonina que la HK, un marcador clásico del glicosoma (Fig. 4.4.2.), lo que indica que la GPDH está localizada en el glicosoma.

En glicosomas altamente purificados por centrifugación isopícnica en un gradiente lineal de sacarosa y diferencial (Concepción y col., 1998 y 1999); la

distribución de la actividad GPDH fue absolutamente igual a la PEPCK y HK (Fig. 4.4.3.). Los Western blot realizados con el anticuerpo anti-GPDH muestran la misma distribución que la actividad enzimática, indicando una localización exclusiva de la GPDH en los glicosomas.

La actividad GPO fue determinada midiendo la velocidad del consumo de oxígeno en células enteras en presencia y ausencia de SHAM (un inhibidor de la GPO), utilizando un respirómetro de Warburg. El SHAM inhibió el consumo de oxígeno alrededor de un 23%, y además, también se observó una inhibición del consumo de glucosa entre 30 y 60% (Tabla 4.4.1). Estos resultados estarían indicando la presencia de un sistema GPO en los epimastigotes de *T. cruzi*.

En este trabajo se evidenció que *T. cruzi* puede sintetizar, al igual que todos los otros tripanosomatídeos estudiados (Tielens y Van Hellemond, 1998), una α -glicerolfosfato deshidrogenasa glicosomal. Esto podría ayudar a resolver los resultados contradictorios surgidos en varios reportes independientes a cerca de la no-detección de la GPDH en *T. cruzi* (Taylor y Gutteridge, 1987; Cazzulo y col., 1988), y la presencia de una actividad glicerolfosfato oxidasa mitocondrial sensible a SHAM (Felix y col., 1978; Stoppani y col., 1980; Affranchino y col., 1985; Engel y col., 1990).

Los anticuerpos anti-GPDH evidenciaron altos niveles de proteína GPDH al comienzo de la curva de crecimiento, contrariamente a lo observado con la actividad GPDH. Estos resultados estarían indicando una posible activación posttrasduccional y una posible explicación para los niveles variables de la actividad GPDH. La variación en la actividad/expresión de la GPDH podría estar correlacionada con la actividad piruvato kinasa (PK), ya que la mayoría de la GPDH glicosomal, podría ser necesaria para mantener el balance redox en situaciones en la que la actividad PK sea alta y por consiguiente el PEP que debería entrar al glicosoma sea menor. Un incremento de cinco veces de la actividad PK fue observado al final de la fase exponencial de la curva de crecimiento de los epimastigotes (datos no mostrados). En algunos casos la baja actividad específica de la GPDH sería compatible con un papel auxiliar para mantener un balance redox, ya que la actividad PK es generalmente baja. La producción de glicerol observada en amastigotes (Sanchez-Moreno y col., 1995) confirma la presencia de un gen para la rGPDH en *T. cruzi*. Este gen es

homólogo al de *T. brucei*. La presencia de al menos dos sistemas de reoxidación del NADH en el glicosoma de *T. cruzi*, permite explicar varias observaciones que podrían no ser únicamente racionalizadas, basándose en una membrana del glicosoma permeable; por ejemplo, que la actividad glicolítica fuese muy poco afectada por una dramática inhibición de la PEPCK (Urbina y col., 1990).

En resumen, la α -glicerolfosfato deshidrogenasa había sido considerada como ausente en *Trypanosoma cruzi*, en contradicción con todos los otros tripanosomatídeos estudiados. Después de observar que la malato deshidrogenasa (MDH) sola no puede mantener el balance redox intraglicosomal, se demostró que la actividad GPDH está exclusivamente localizada en el glicosoma de *T. cruzi* por tratamientos con digitonina y centrifugación isopícnica. Anticuerpos contra la GPDH de *T. brucei* muestran que esta enzima parece estar esencialmente presente e inactiva al comienzo del crecimiento de los epimastigotes. La GPDH está aparentemente unida a un sistema de reoxidación de glicerolfosfato sensible al ácido salicilhidroxámico y juega un papel esencial en el balance redox en el glicosoma.

Para mejor información acerca de la metodología, resultados y discusión ver publicación 4.

Concepción JL, Acosta H, Quiñones H, Dubourdieu M. A α -glycerophosphate Dehydrogenase is Present in *Trypanosoma cruzi* Glycosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz. (2001), 96(5):697-701.

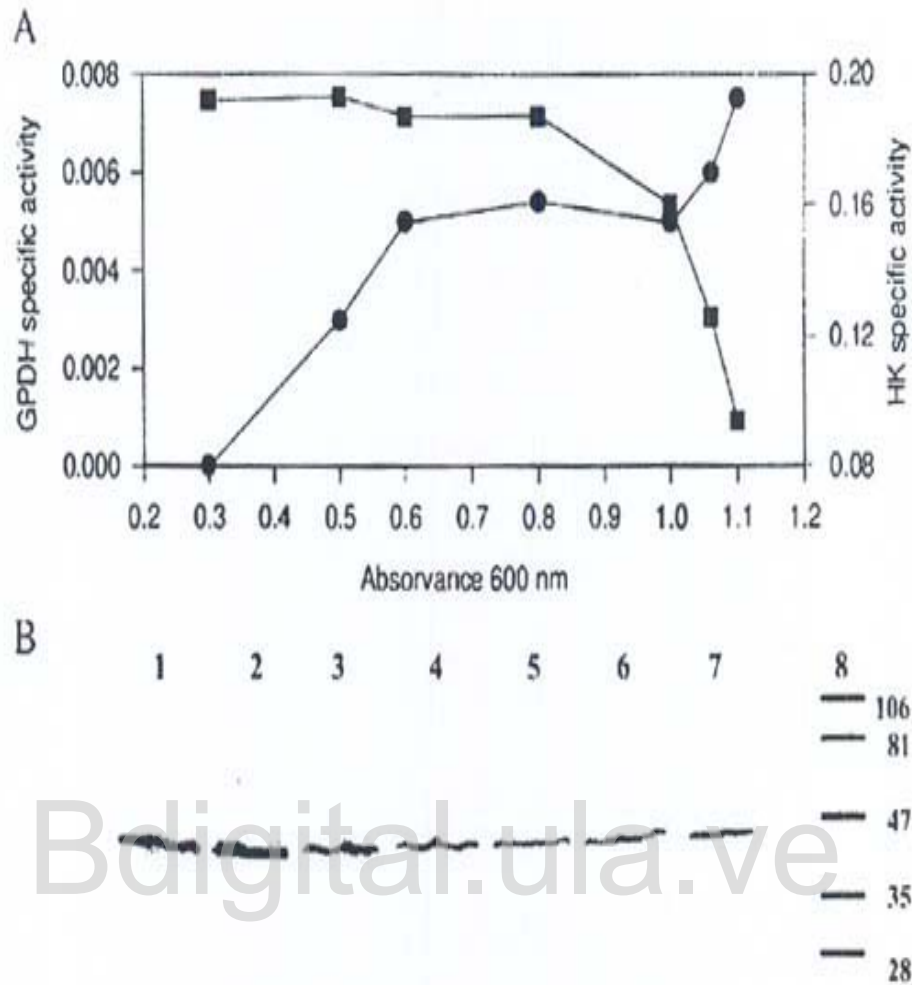


Figure 4.4.1. Presencia de la glicerofosfato deshidrogenasa (GPDH) como una función del crecimiento de los epimastigotes. Los epimastigotes fueron crecidos como ha sido descrito previamente (Concepción y col., 1999). Muestras de células fueron tomadas varias veces durante el crecimiento, lavadas, tratadas con Triton X-100 y 0.15 M NaCl y analizadas para actividad GPDH y la proteína GPDH por Western blot. A: actividad específica como una función del crecimiento de la (absisas indican la absorbancia al tiempo de cosechar las células) GPDH (●) y Hexokinasa (HK) (■). Las proteínas y la actividad HK fueron determinadas como fue descrito previamente por Concepción y col. (1998). La actividad GPDH fue determinada de acuerdo a Niesel y col. (1982). B: los extractos de las células fueron corridos por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, seguido de un Western blot (Concepción y col., 1999) en la presencia de un antisuero de conejo hecho contra la GPDH de *Trypanosoma brucei*. Las líneas 1-7 corresponden a las 7 muestras de células de A y 8 muestra los marcadores de peso molecular. El contenido de proteínas fue el mismo en todas las líneas. La banda observada corresponde a una masa molecular aproximada de 32 kDa. Estos experimentos fueron realizados dos veces con células crecidas independientemente.

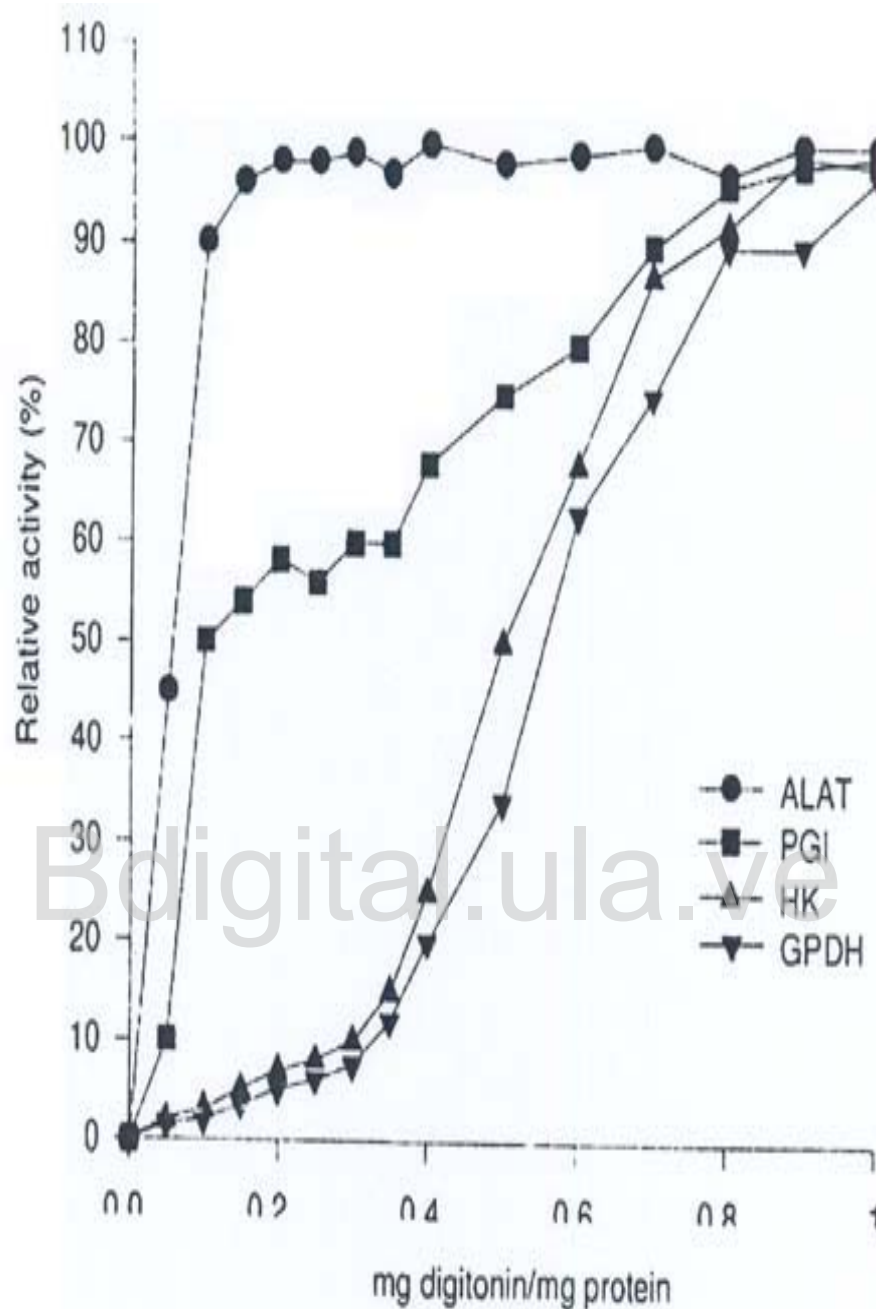


Figura 4.4.2. Tratamiento con digitonina. Los experimentos fueron realizados exactamente a como fue descrito por Concepción y col.(1998, 1999); las actividades fueron determinadas en los sobrenadantes de las células centrifugadas, después de haber sido incubadas 30 min en la presencia indicada de las proporciones de digitonina y proteínas. Las actividades de la alanina amino transferasa (ALAT ●), fosfoglucoasa isomerasa (PGI ■), hexokinasa (HK ▲) y glicerofosfato deshidrogenada (GPDH ▼) fueron determinadas de acuerdo a Bergmeyer (1983). En los experimentos presentados, la actividad específica de la GPDH fue de 0.06 U/mg de proteínas. Estos experimentos fueron realizados tres veces.

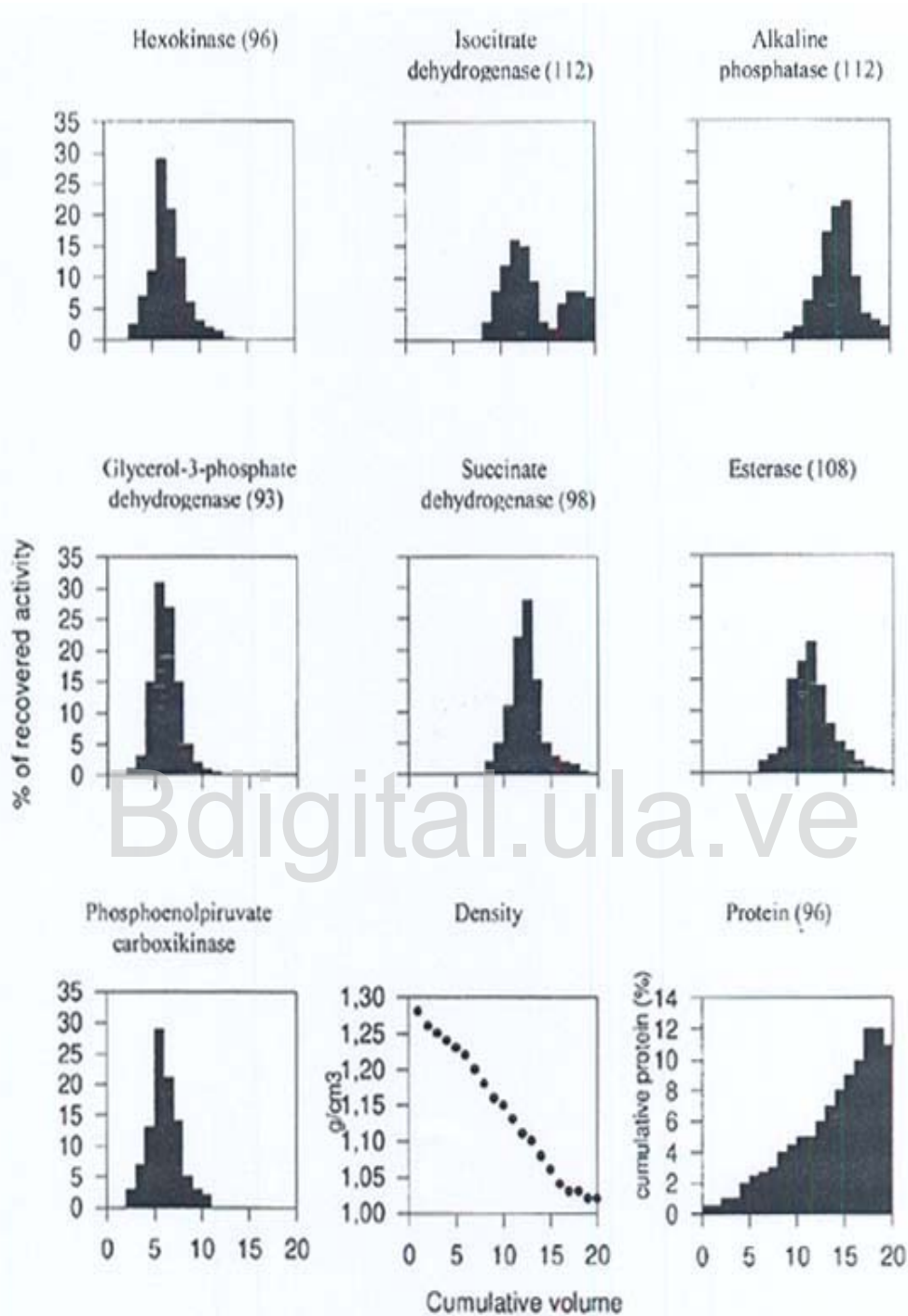


Figura 4.4.3. Perfil de distribución después de una centrifugación isopícnica de la glicerofosfato deshidrogenasa. Una fracción granular pequeña fue corrida sobre un gradiente lineal de sacarosa (0.3 a 2.5 M) y 20 fracciones fueron colectadas desde el gradiente de densidad (la densidad varió desde 1.02 a 1.28 g . cm⁻³). Los experimentos (repetidos cuatro veces) fueron realizados como fue descrito por Concepción y col. (1998). La determinación de las actividades enzimáticas fueron realizadas de acuerdo a Bergmeyer (1983) o como fue descrito para los experimentos previos.

Tabla 4.4.1. Consumo de oxígeno en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en la presencia de ácido salicil hidroxámico (SHAM) y cianuro (CN).

SHAM (%)	94	60	57	43	82	92	83	100	82
CN ⁻ (%)	26	13	17	56	28	25	47	50	49
SHAM+CN ⁻ (%)	78	0	28	-	23	49	51	51	-

Cada experimento fue realizado con células crecidas independientemente en la mitad de la fase exponencial (0.6 a 0.9 de DO, 600 nm). El consumo de oxígeno fue determinado con un respirómetro Warburg a 28°C en la presencia de 3 mM de glucosa después de cosechar las células en búfer fosfato salino por aproximadamente 4 h. El CO₂ fue atrapado con 0.3 ml de 20% de hidróxido de potasio en el centro del pozo de una fiola. Los resultados están expresados como el porcentaje del consumo de oxígeno en el sistema no inhibido (aproximadamente 2 µmoles/h). Las concentraciones de SHAM y CN fueron 1.2 mM y 0.1 mM respectivamente.

4.5. 3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA Reductasa en *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: Localización Subcelular y Propiedades Cinéticas.

El parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* y diferentes especies del género *Leishmania*, así como hongos y levaduras, requieren de la presencia de esteroides específicos endógenos para la viabilidad y proliferación celular (Urbina y col., 1993); estos hechos han conducido a un interés creciente en el desarrollo de inhibidores de la biosíntesis de esteroides (581), los cuales se fundamentan principalmente en quimioterapias anti-fúngicas (Rahier y col., 1990; Mercer, 1993; Vander 80ssche H, 1995), como agentes anti-parásitos (Croft y col., 1997; Urbina y col., 1996). La ruta de biosíntesis de esteroides de varios de estos organismos ha sido inferida por el análisis de la composición de esteroides en ausencia y presencia de 581, los cuales actúan en diferentes puntos de la ruta (Urbina y col., 1991; 8erman y col., 1984; Hart y col., 1989). Sin embargo, en contraste con hongos y levaduras (Park y col., 1995), prácticamente nada se conoce acerca de las propiedades cinética, moleculares, y genéticas de las enzimas involucradas y su localización subcelular.

La enzima 3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa' [mevalonato:NADP⁺ oxido reductasa; HMG-CoA reductasa; EC 1.1.1.34] es el primer paso comprometido y de regulación en la ruta de la biosíntesis de los isoprenoides, produciendo una gran familia de compuestos, incluyendo esteroides. Resultados previos han mostrado que el mevinolin (lovastatina), un potente inhibidor competitivo de esta enzima, corrientemente utilizado como un agente hipercolesterolemico en humanos (Endo, 1991), puede bloquear la síntesis de esteroides y la proliferación celular de los epimastigotes y amastigotes de *T. cruzi* *in vitro* y potenciar el efecto del ketoconazol *in vivo* (Urbina y col., 1993; Florin-Chistensen y col., 1990).

La HMG-CoA reductasa es una enzima integral de membrana en los organismos eucariotas. Inicialmente esta enzima fue localizada en el retículo endoplásmico (Rotilman y Simoni, 1992; Learned y col., 1989), y más recientemente a sido localizada principalmente en los peroxisomas (Werner y col., 2002). En *T. cruzi* esta enzima fue clonada, secuenciada y

sobreexpresada, y los resultados indican que en este organismo la enzima a perdido las secuencias de integración a la membrana (Peña-Días y col., 1997).

En este trabajo nosotros nos enfocamos sobre la localización subcelular de la enzima y sus propiedades cinéticas; los resultados indican que la mayoría de la enzima está asociada con los glicosomas (semejante a los peroxisomas), una organela perteneciente a la familia de los microcuerpos, única de los kinetoplastides, la cual contiene la mayoría de las enzimas de la ruta glicolítica (Oppendoes, 1987).

Por centrifugación diferencial de extracto de epimastigotes de *T. cruzi* se encontró que la HMG-CoA reductasa está asociada con una fracción granular pequeña (Fig. 4.5.1), en esta fracción también estaba presente la actividad de la hexokinasa (HK) y de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK), enzimas marcadoras de los glicosomas. En la centrifugación isopícnica (Fig. 4.5.2.) indica que la mayoría de la actividad HMG-CoA reductasa migra junto con los marcadores glicosomales, a 1.23 9 cm^{-3} y un segundo pico pero mucho menor está asociado con un compartimiento soluble (citosol). Ninguna actividad HMG-CoA reductasa estuvo asociada con los marcadores mitocondriales (succinato deshidrogenasa) o con el retículo endoplásmico (glucosa 6-fosfatasa) o con membrana plasmática o bolsa flagelar (fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida). El 78% de la actividad estuvo asociada con el glicosoma, 12% citosol y 10% microsomas.

Cuando los glicosomas purificados fueron tratados con Triton X-114 a 30°C (Tabla 4.5.1.), la HMG CoA reductasa, hexokinasa y la fosfoglucosa isomerasa fueron encontradas en la fracción soluble. Para confirmar el carácter soluble de esta enzima y descartar cualquier posible artefacto, se realizaron estudios con epimastigotes intactos, los cuales fueron permeabilizados con concentraciones crecientes de digitonina, siguiendo la liberación de la HMG CoA reductasa y los marcadores enzimáticos (ASA T para el citosol y la PEPCK para el glicosoma. Como se puede ver en la Fig. 4.5.3, la liberación de la HMG CoA reductasa desde las células intactas fue una función bifásica, es decir a bajas concentraciones del detergente sólo fue liberada ASA T y a medida que se incrementaron las concentraciones de detergente (aproximadamente 0.08 mg) la HMG CoA reductasa y la PEPCK comenzaron ser liberadas. Estos resultados demuestran claramente que la HMG CoA

reductasa en *T. cruzi* es una proteína soluble y está distribuida en dos compartimientos diferentes.

Una investigación cinética de la HMG CoA reductasa asociada a glicosomas purificados fue hecha. Se observó que esta enzima tiene una cinética clásica tipo Michaelis-Menten con respecto a ambos sustratos (Fig. 4.5.4.). La lovastatina un análogo en el estado de transición, mostró ser un potente inhibidor competitivo con respecto a HMG CoA con un $K_i = 23$ nM. Estos resultados están de acuerdo con reportes previos de inhibición para la enzima en hígado de rata (Alberts y col., 1980).

Las evidencias presentadas en este trabajo de una HMG CoA reductasa soluble en *T. cruzi*, están completamente de acuerdo con la secuencia del gen que codifica para la enzima en este organismo, el cual indica que ha perdido el Nterminal, secuencia de integración a la membrana en otros organismos eucariotas (Peña-Días y col., 1997). Por otra parte nuestros resultados son contradictorios con los encontrados para esta enzima en *T. brucei*, donde la enzima a sido localizada en microsomas (Coppens y col., 1995); esta discrepancia podría ser explicada por la diferencia entre los organismos estudiados. Además ninguna actividad soluble fue reportada en ese estudio, y esto pudo deberse a la falta de inhibidores de proteasas en el proceso de fraccionamiento subcelular, puesto que se ha demostrado que esta enzima es particularmente sensible a degradación proteolítica (Peña-Dias y col., 1997). Esta explicación está de acuerdo con el hecho de que la actividad especifica encontrada en los glicosomas purificados en este trabajo fue comparable (2 a 3 veces mas alta) a la encontrada en microsomas purificados de hígado de rata y peroxisomas (Keller y col., 1986) pero 100 a 300 veces más alta que la reportada para los microsomas de *T. brucei* (Coppen y col., 1995). Un soporte a nuestro argumento de que la HMG CoA reductasa en *T. cruzi* está principalmente ubicada en el glicosoma, llega de la secuencia del gen clonado, el cual predice una secuencia (MRL) semejante a la SKL en el C-terminal de la proteína y también una secuencia tipo PTS2 (Peña-Dias y col., 1997); esta secuencias señales del tipo PTS1 y PTS2 son características de las proteínas que son importadas a los glicosomas en los tripanosomatides y a los peiOxisomas en otros eucariotas (Sommer y col., 1994). Sin embargo, en un trabajo reciente (Peña-Días y col., 2004) han publicado que la HMG-CoA

reductasa de *T. cruzi* y *Leishmania mexicana* están localizadas principalmente en la mitocondria, a través de estudios de inmullomicroscopia electrónica, permeabilización selectiva con digitonina y usando un algoritmo de preedición de secuencias de importación. No obstante, cuando se analiza la secuencia del gen de la HMG-CoA reductasa más que una secuencia de importación a la mitocondria, lo que se observa es una secuencia tipo PTS2 de importación a los glicosomas, además esa secuencia también presenta en el C-terminal cuatro aminoácidos básicos (Tabla 4.5.2.). Estas particularidades en la secuencia de la HMG-CoA reductasa en *T. cruzi* son muy similares a las de la HMG-CoA reductasa localizada en los peroxisomas de hígado de rata. Además Peña-Días no explica quien suministra el NADPH en la mitocondria para una ruta tan exigente desde el punto de vista redox y de energía y sólo propone la posibilidad de una transhidrogenasa $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ como solución a la ubicación en la mitocondria.

En conclusión, nuestros resultados indican que la HMG-CoA reductasa en *T. cruzi* es una enzima soluble y predominantemente localizada en la matriz del glicosoma. Esta conclusión está de acuerdo con los estudios de clonaje y expresión heteróloga del gen que codifica para esta enzima en *T. cruzi*, la cual establece que la enzima existe como una proteína soluble (Peña-Días y col., 1997). Este ha sido el primer trabajo publicado donde se reporta una HMG-CoA reductasa soluble para un organismo eucariota. Este también es el primer trabajo sobre la presencia de una enzima de la biosíntesis de isoprenoides en el glicosoma. La localización de esta enzima en el glicosoma no es completamente sorprendente; pues está totalmente demostrado que la ruta de isoprenoides se encuentra en su totalidad localizada en los peroxisomas (Werner y col., 2002), como ya se mencionó en la introducción, los glicosomas son considerados peroxisomas, puesto que usan la misma maquinaria de importación y secuencias señales del tipo PTS1 y PTS2 (Hannaert y col., 2003). Además, la fuente de equivalentes de NADPH para reoxidar y conducir a la reacción, pueden ser suministrados por la ruta de las pentosas fosfato a través de las enzimas glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, ambas enzimas están presentes en los glicosoma de todos los tripanosomatides estudiados (Hannaert y col., 2003). También en los

glicosomas al igual que en los peroxisomas se encuentra localizada la ruta de β -oxidación de los ácidos grasos (además de las mitocondria), el producto final de esta ruta es el aceti-CoA, sustrato indispensable para que pueda haber síntesis de novo de esteroides (Hannaert y col., 2003; Werner y col., 2002). Estos hechos apoyan fuertemente la posibilidad de que en los tripanosomatídeos la ruta de isoprenoides se encuentre localizada en los glicosomas.

La localización subcelular particular de la HMG-CoA reductasa en *T. cruzi* puede ser explotada de forma racional en el desarrollo de drogas antiparasitarias, usando como blancos ambas, la actividad de las enzimas y los sistemas de transporte requeridos para permitir el flujo de los sustratos a los glicosomas. En nuestro laboratorio se están haciendo esfuerzos por caracterizar y entender algunos de los sistemas de transporte de sustratos a los glicosomas en *T. cruzi*.

Para mejor información acerca de la metodología, resultados y discusión ver publicación 5.

Concepción JL, Pacanowska D, and Urbina JA. 3-Hydroxy-3-methylglutarylCoA Reductase in Tripanosoma (Schizotrypanum) cruzi: Subcellular Localization and Kinetic Properties. Archives of Biochemistry and Biophysics. (1998), 352:114-120.

Tabla 4.5.2. Señales de importación a los peroxisomas y glicosomas de las enzimas de la biosíntesis de colesterol (en rojo tripanosomatídeos)

Enzimas	Señal	Secuencia especie
AA-CoA tiolasa	PTS1	-QKL (humano)
		-QKL (rata)
HMG-CoA sintetasa	PTS2	V (x5) QL (humano)
		SV (x5) QL (humano)
		VS (x4) QS (<i>Leishmania major</i>)
		Desconocido (humanos)
HMG-CoA reductasa		V (x5) QS (<i>Leishmania major</i>)
		V (x5) QL (<i>T. brucei</i>)
		SE (x4) QL (<i>T. cruzi</i>)
Mevalonato kinasa	PTS2	KV (x5) QL (humano)
		KV (x5) QL (rata)
Fosfomevalonato kinasa	PTS1	-SRL (humano)
		-AKL (rata)
Mevalonato-PP descarboxilasa	PTS2	SV (x5) QL (humano)
		SV (x5) QL (rata)
Isopentil-PP isomerasa	PTS1	-YRM (humano)
		-HRM (rata)
		MNGDQNSDVYAQEKQDFVQH (humano)
Farnesil-PP sintetasa	PTS2	MNGDQKLDVHNKEKQNFIOH (rata)
		KV (x5) QE (<i>Leishmania major</i>)
		SV (x4) QA (<i>T. cruzi</i>)
Escualeno sintetasa	PTS2	R (x6) QA (rata)
		R (x6) QL (<i>Leishmania major</i>)
Consenso	PTS1	(S/A/C)(K/H/R)(L/M)
	PTS2	(R/K)(L/I/V)(x5)(H/Q)(L/A)

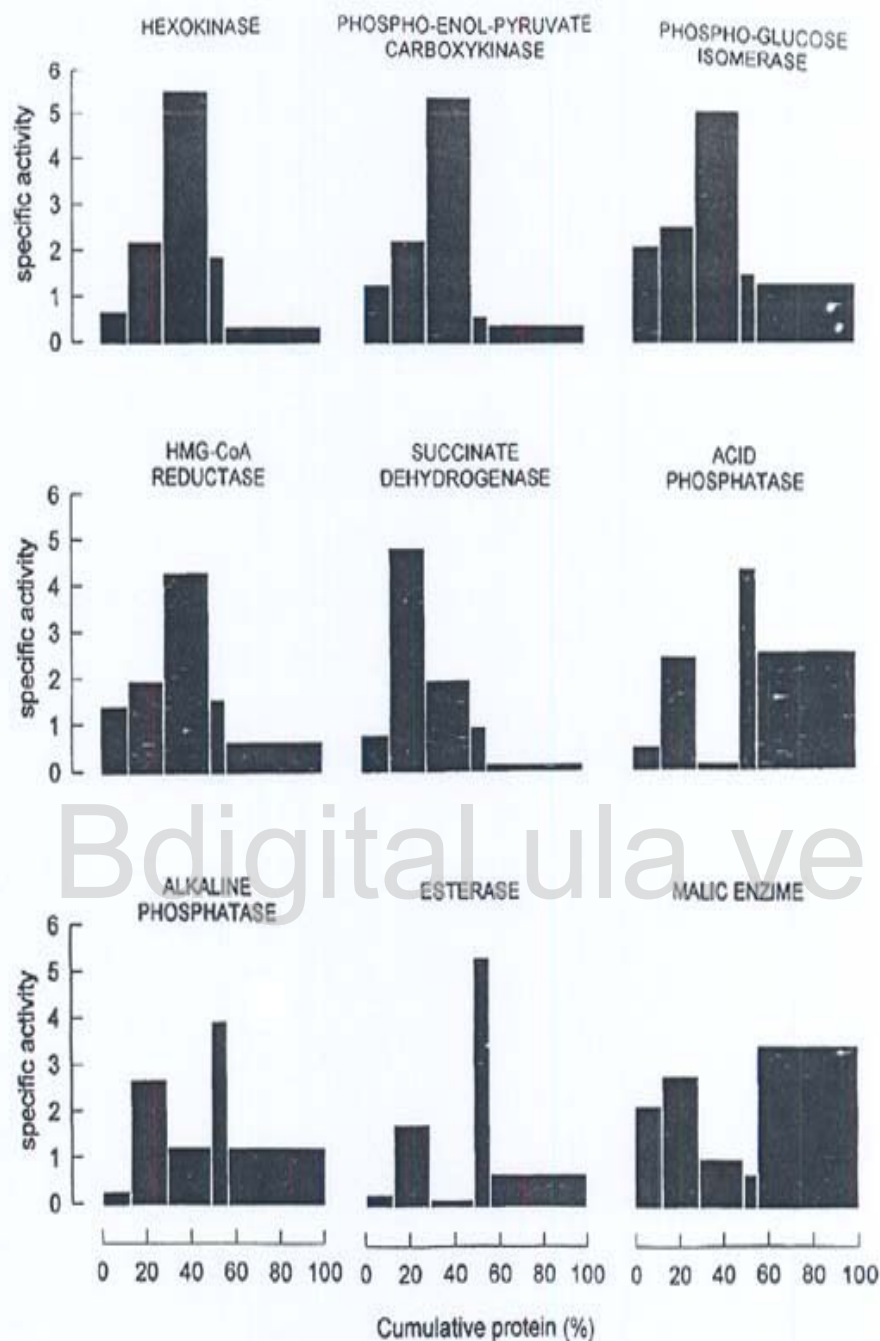


Figura 4.5.1. Distribución de enzimas glicolíticas y otras en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, determinadas por centrifugación diferencial. Las fracciones fueron graficadas en el orden de su aislamiento, desde izquierda a derecha: nuclear, granular gruesa, granular pequeña, microsomal, y sobrenadante final. La absisa indican la cantidad de proteínas acumuladas, mientras que las ordenadas muestran las actividades específicas en $\mu\text{moles/min mg}$ de proteínas. Todos los ensayos contenían 0.1% de Triton X-100 y 150 mM NaCl.

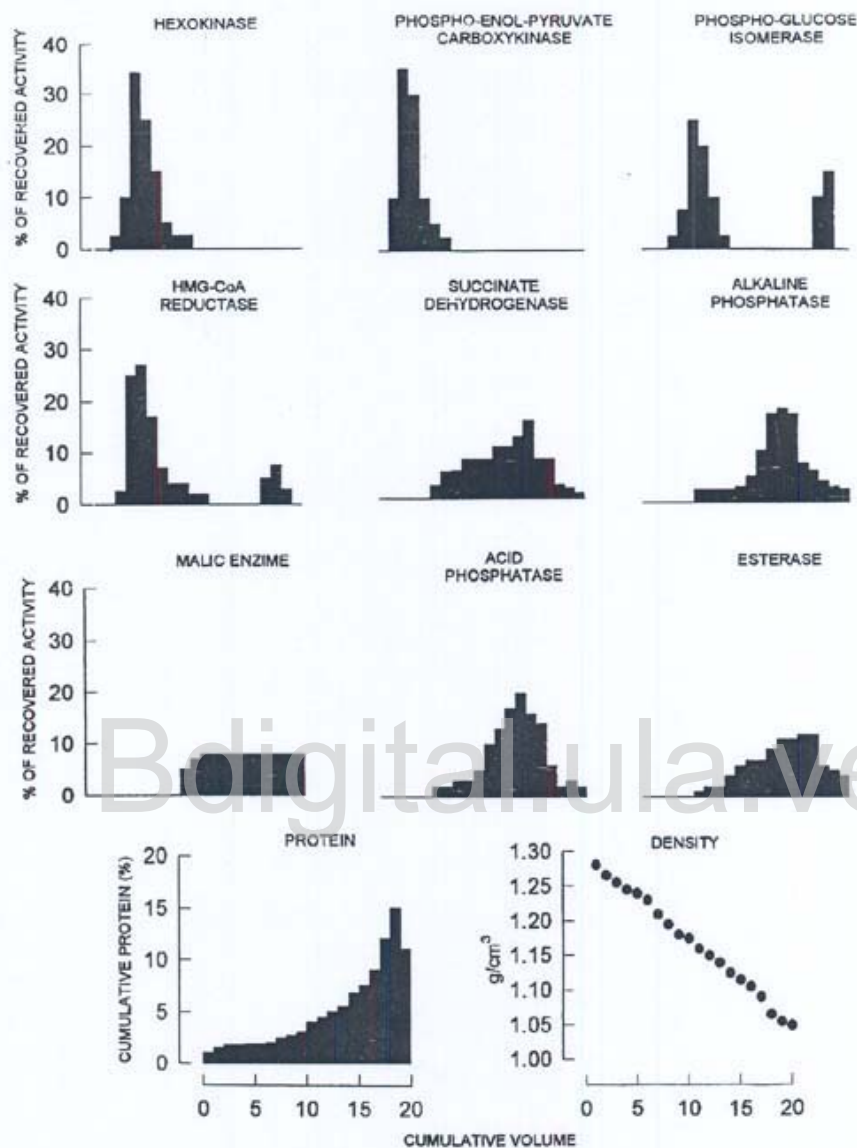


Figura 4.5.2. Perfil de distribución de un extracto post-granular-pequeño de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* después equilibrado en un gradiente lineal de sacarosa. El volumen acumulado y la escala de densidades, divididas en 20 fracciones de incrementos idénticos, se extiende desde 1.05 a 1.28 g cm⁻³. El área de la superficie de cada histograma es equivalente a la cantidad fraccional de constituyentes presentes en cada fracción. Las fracciones fueron ensayadas tres veces para la actividad en la presencia de 0.1% de Triton X-100. El material recuperado de la fracción post-granular-pequeña esta entre 94 y 105% para proteínas y actividades enzimáticas.

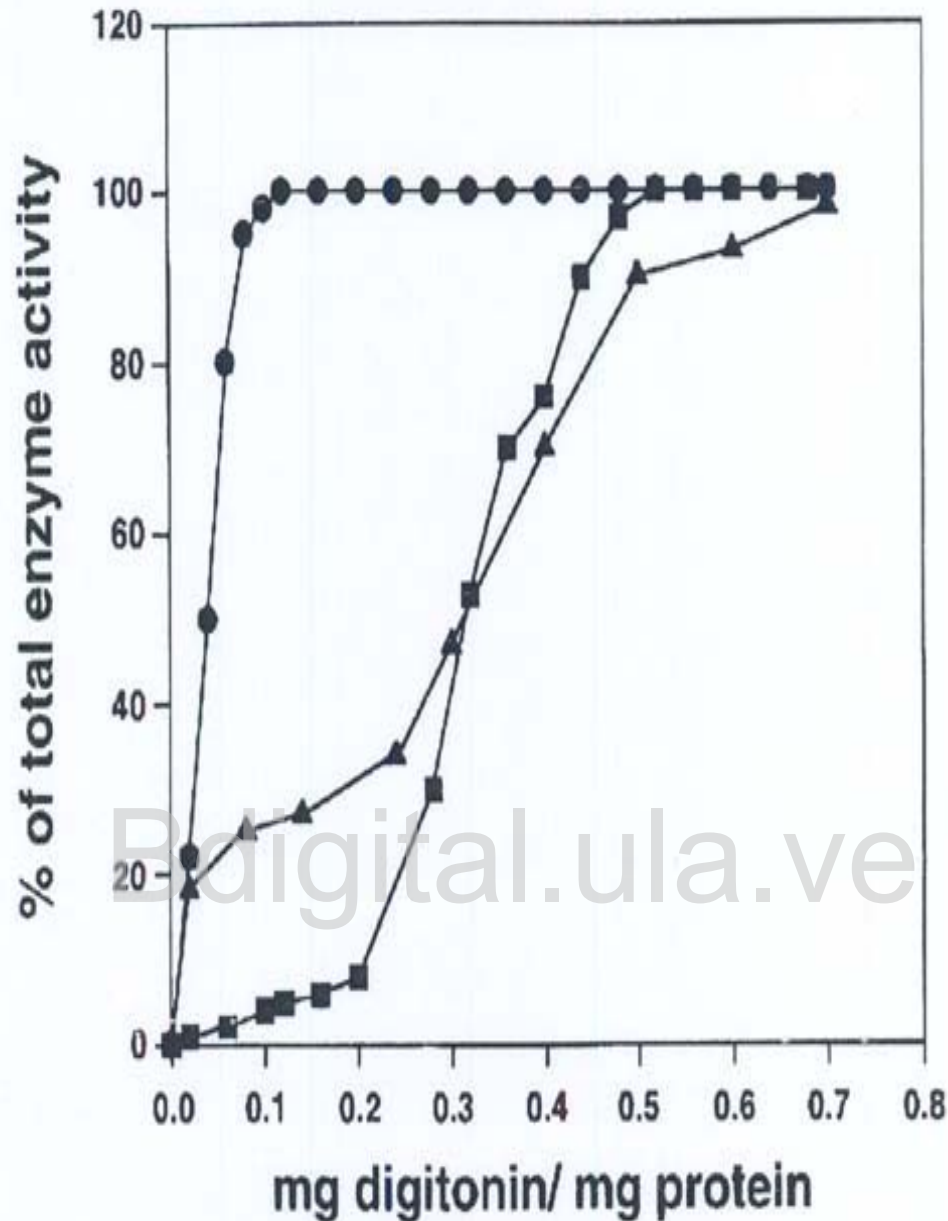


Figura 4.5.3. Liberación de la HMG-CoA reductasa y marcadores enzimáticos desde epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* por digitonina. Epimastigotes intactos (1mg/ml de proteínas totales de las células) fueron incubados en presencia de las concentraciones indicadas del detergente y la actividad de las fracciones (como un porcentaje de la actividad medida en las células tratadas con 0.2% de Triton X-100) de HMG-CoA reductasa (▲), ASAT (●, marcador del compartimiento citosólico), o PEPCK (■, marcador del compartimiento glicosómico) liberadas por las células en 30 min fueron medidas como fue descrito en materiales y métodos.

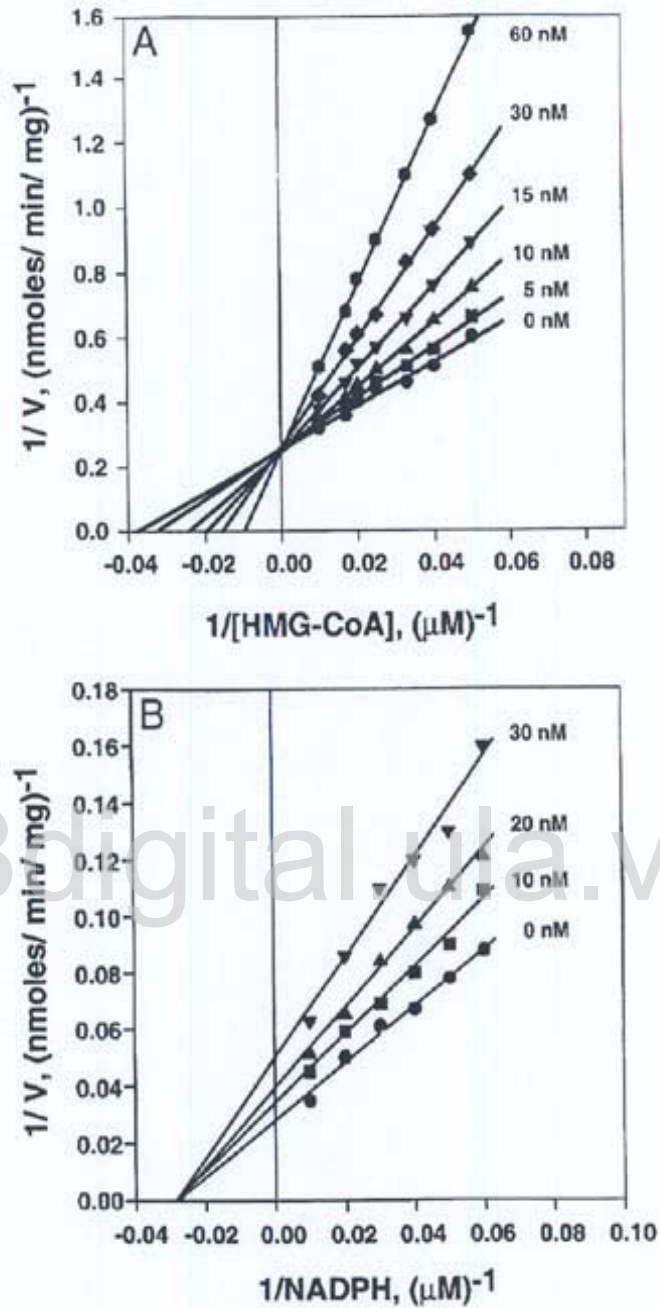


Figura 4.5.4. Cinética de la HMG-CoA reductasa glicosómica de *Trypanosoma cruzi*. Glicosomas altamente purificados de *T. cruzi* fueron obtenidos por centrifugación diferencial, seguido de dos pasos de purificación en gradientes de lineales de sacarosa como ha sido descrito en el procedimiento experimental. La actividad presente en los glicosomas fue medida como una función de la HMG-CoA (A) o NADPH (B) en la presencia de 0.1% de Triton X-100 y las concentraciones indicadas de lovastatina. Cuando las concentraciones de HMG-CoA fueron variadas, el nADPH fue constante a 3 mM, mientras que cuando el NADPH fue variado el HMG-CoA fue constante a 80 μM .

Tabla 4.5.1. Partición de la HMG-CoA reductasa de *Trypanosoma cruzi* entre la fase acuosa y rica en detergente formada por el Triton X-114.

Fraction	Total protein (mg)	Specific activity (nmol/min mg protein)	Total activity (nmol/min)
Homogenate	4.54	1.22	5.53
Homogenate, aqueous phase	2.72	1.44	3.92
Homogenate, X-114 rich phase	1.81	0.26	0.47
Purified glycosomes	3.06	12.07	36.93
Purified glycosomes, aqueous phase	2.10	16.36	34.36
Purified glycosomes, X-114-rich phase	0.69	0.17	0.12

^aUn mililitro de cada fracción subcelular fue repartido entre fase rica en detergente y acuosa formada por el Triton X-114 a 30°C y entonces ensayados para la actividad HMG-CoA reductasa como fue descrito en el procedimiento experimental.

4.6. Escualeno Sintetasa como un Blanco Quimioterapéutico en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*.

La escualeno sintetasa (SOS, EC 2.5.1.21) cataliza una reacción inusual de dimerización reductiva cabeza a cabeza de dos moléculas de farnesil pirofosfato (FPP) en una reacción de dos pasos (Fig. 4.6.1.). Este es el primer paso comprometido en la biosíntesis de esteroides; el bloqueo a este nivel no afecta la producción de otros isoprenoides esenciales y la acumulación de isoprenoides intermediarios (FPP y precursores) pueden realmente ser metabolizados y excretados (Gonzales-Pacanowska y col., 1988). Por estas razones la SOS está actualmente bajo intensos estudios como un posible blanco de drogas para disminuir el colesterol en humanos (Bergstrom y col., 1988; Watson NS, 1996). Avances muy significativos se han hecho por entender el mecanismo de reacción de la SOS de vertebrados (Poulter, 1990; Mookhtiar y col., 1994) y recientemente ha sido reportado para esta enzima de humanos la estructura cristalina de forma soluble (Pandit y col., 2000). La SQS es también un sitio importante para la regulación de la síntesis de esteroides. Estudios hechos en vertebrados y levaduras han mostrado que los niveles de RNAm de la SQS responden de forma muy sensible a la presencia de fuentes exógenas de esteroides y a la inhibición de la HMG-CoA reductasa, mientras que en plantas la regulación de la SQS tiene lugar a nivel post-transcripcional (Devarenne y col., 1998). También, recientes estudios de micro-array de genes en levaduras (Bammert y Fostel, 2000) y *Candida albicans* (De Backer y col., 2001), así como estudios de sobreexpresión/selección en *Leishmania major* (Cotrim PC, 1999), han mostrado que la expresión de la SQS es activada fuertemente en estas células en presencia de inhibidores de la biosíntesis de esteroides. Estos estudios sugieren que la SQS es un paso limitante y probablemente un paso regulatorio en esta ruta. Sin embargo, no hay ningún reporte de estudios hechos sobre las propiedades de la SQS en parásitos tripanosomatídeos y la validación de esta enzima como un blanco anti-parásito.

En este trabajo nosotros presentamos la primera caracterización de la localización subcelular y propiedades cinéticas de la SOS de epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *Leishmania mexicana* y también mostramos que un

inhibidor de esta enzima tiene actividad selectiva anti-parásito, asociado con la eliminación de esteroides endógenos de los parásitos.

La SQS en epimastigotes de *T. cruzi* fue separada en dos fracciones bien definidas por centrifugación isopícnica en un gradiente de densidad de sacarosa (Fig. 4.6.2.). Un componente, comprende el 45% de la actividad, formado por una banda bien definida y correspondiente a los glicosomas ($d = 1.23 \text{ } 9 \text{ cm}^{-3}$) y que copurifica con los marcadores clásicos del glicosoma, así como hexokinasa (dependiente de ATP y PPI), fosfoenolpiruvato carboxikinasa y piruvato fosfato dikinasa. El resto de la actividad fue asociada con vesículas microsomaes/mitocondriales, ya que esta fracción se solapa con marcadores de la mitocondria (isocitrato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa) y de retículo endoplásmico (glucosa-6-fosfatasa) (Fig. 4.6.2.).

Experimentos de partición con Tritón X-114 muestran que la SQS, tanto en glicosomas como en microsomas se encuentra en la fracción rica en detergente, lo que indicaría que la SQS tiene un fuerte carácter hidrofóbico y por lo tanto es muy probable que sea una enzima de membrana. Esencialmente los mismos resultados fueron obtenidos en los estudios de fraccionamiento subcelular para la SQS en los promastigotes de *Leishmania mexicana* (resultados no mostrados).

Los estudios de cinética para la SQS de *T. cruzi* a partir de glicosomas purificados y en presencia de Tritón X-100, mostraron una cinética del tipo de Michaelis-Menten (Fig. 4.6.3.). Gráficos similares fueron obtenidos para la enzima mitocondrial/microsomal y para *L. mexicana* en ambas fracciones glicosomal y mitocondria/microsomal. Las constantes cinéticas para las dos formas de la enzima en ambos organismos son presentadas en la Tabla 4.6.1. Nosotros sintetizamos y purificamos el 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxiquinuclidina (3bifenil-4-il-1-aza-biciclo[2.2.2]-octan-3-01; BPQ-OH, Fig. 4.6.4., un potente y específico inhibidor de la SQS de mamíferos (Brown y col., 1996; McTaggart y col., 1996; Ward y col., 1996). Nosotros investigamos si la SQS en ambos parásitos tiene un comportamiento cinético de inhibición bifásica con la BPQ como ocurre en mamíferos (Ward y col., 1996), para esto se hizo un estudio de dosis respuesta para la SQS de glicosomas y mitocondria/microsomas con BPQ-OH, colocando concentraciones de sustratos fijas a concentraciones saturantes y los resultados fueron graficados con la ecuación 4.6.1. (Ward y

col., 1996). En la Fig. 4.6.4., se muestran los resultados con la SQS de los glicosomas de *T. cruzi*, donde los valores experimentales dan un excelente ajuste ($r^2 = 0.99$) a la (ecuación 1, publicación 6) con los siguientes parámetros: $V_{os} = 0.81 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteínas, $V_{oi} = 0.037 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteínas, $K_{is} = 46 \text{ nM}$, $K_{ii} = 74 \mu\text{M}$. Así, > 95% de la SQS glicosomal de *T. cruzi* fue altamente sensible al inhibidor, mientras que la actividad remanente fue refractaria. Un comportamiento similar fue observado para la enzima mitocondrial/microsomal y para ambas fracciones en promastigotes de *Leishmania mexicana* (datos no mostrados). Los estudios cinéticos (Fig. 4.6.4.) muestran que el BPQ-OH fue un inhibidor del tipo no competitivo de la forma sensible de la SQS glicosomal de *T. cruzi* y el valor derivado de K_i (48 nM) coincide con el valor obtenido a concentraciones de sustrato fijo (ver Fig. 4.6.5). Nosotros también encontramos una inhibición no competitiva para la BPQ-OH mitocondrial/microsomal para la enzima de *T. cruzi*, así como para las SQS de *Leishmania mexicana* de ambas fracciones; los valores de las constantes de inhibición estuvieron todos en el rango de nanomolar (Tabla 4.6.1).

La BPQ-OH indujo una respuesta dosis-dependencia en la reducción de la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* crecidos axenicamente, con un IC_{50} de 19 μM y con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 30 μM (Fig. 4.6.6). A todas las MIC ensayados los esteroides endógenos del parásito (ergosterol, analogos del 24-etil y precursores) y escualeno desaparecen de las células tratadas (Tabla 4.6.3). Contra los promastigotes de *Leishmania mexicana* el IC_{50} y la MIC fue 12 y 30 μM , respectivamente (Fig. 4.6.7.) y la inhibición del crecimiento estuvo otra vez correlacionada con la desaparición de los esteroides característica de los promastigotes (episterol y 5-dehidroipisterol, ver Tabla 4.6.4); ningún escualeno fue detectado en el control células de *Leishmanias* tratadas.

En vertebrados, levaduras y plantas, la SQS es una proteína conservada unida a la membrana, exclusivamente asociada al retículo endoplásmico, junto con el resto de las enzimas biosintéticas (Thompson y col., 1998). Los resultados del presente estudio muestran que la SOS en los tripanosomatides está también unida a la membrana, pero con una localización subcelular dual: glicosomas, organela semejante a peroxisomas y única en los protozoarios Kinetoplastides, en la cual ocurre la mayoría de la ruta glicolítica (Oppenheimer,

1987), y mitocondria/retículo endoplásmico (Fig. 4.6.3). La misma localización dual fue también observada para otras enzimas de la ruta de isoprenoides, así como HMG-CoA reductasa y la este rol 24-metil transferasa (Fig. 4.6.3). Estos resultados son consistentes con reportes previos que indican una localización glicosomal y/o mitocondrial de la HMG-CoA reductasa en *T. cruzi* (Concepción y col., 1998), *T. brucei* (Heise y Opperdoes, 2000) y *L. major* (Peña-Díaz y col., 2003), dependiendo del organismo y condiciones de crecimiento. Nuestras propias observaciones indican que la distribución de las enzimas de la biosíntesis de esteroides en *T. cruzi* y *Leishmania mexicana* entre los compartimientos glicosomas y microsomas/mitocondria, depende fuertemente de la fase de crecimiento del cultivo y su probable asociación. con los cambios en el metabolismo energético de las células.

Gráficos doble-recíprocos lineales fueron obtenidos para la síntesis de escualeno variando las concentraciones de FPP a diferentes concentraciones fijas de NADPH para la SOS glicosomal y microsomal/mitocondrial de *T. cruzi* y *L. mexicana* (Fig. 4.6.4). Gráficos lineales doble recíprocos también se han reportado para la SOS microsomal de levaduras (Beytia y col., 1973; Agnew y Popják, 1978), usando los mismos rangos de concentraciones de FPP (1-20 μ M) usados en el presente trabajo y ellos fueron inicialmente interpretados como un mecanismo ping-pong para esta enzima (Beytia y col., 1973). Estudios mas recientes con una forma soluble de la enzima recombinante de levaduras (Mookhtiar y col., 1994) mostrando gráficos doble-recíprocos parabólicos, consistentes con un mecanismo secuencial ordenado, pero únicamente cuando los rangos de concentración estaban por debajo de 1 μ M. En algunos casos, los valores aparentes de los parámetros de Michaelis-Menten de la enzima del parásito (Tabla 4.6.1) son muy cercanos a los reportados para la enzima microsomal de levaduras (Beytia y col., 1973; Agnew y Popják, 1978).

Las cinéticas bifásicas para la inhibición de la SQS de mamíferos por derivados de quinuclidina, incluyendo BPQ-OH, han sido reportadas y analizadas en detalle en estudios previos (McTaggart y col., 1996; Ward y col., 1996); este fenómeno ha sido atribuido a diferentes conformaciones o isoformas de la enzima. La SQS en *T. cruzi* y *L. mexicana* tienen una cinética de inhibición bifásica con el BPQ-OH (Fig. 4.6.5), pero la contribución de la BPQ-OH a la forma insensible es muy baja < 5%). También los valores de las

constantes de inhibición (nanomolar, Tabla 4.6.2) y el tipo de inhibición (no competitiva, ver (Fig. 4.6.6), son muy similares a los obtenidos con la enzima de mamíferos (Brown y col., 1996; Mc Taggart y col., 1996). Los valores de estas constantes de inhibición están dos o tres órdenes de magnitud por debajo de los K_m s de los sustratos de la reacción (Tabla 4.6.1). Estos resultados sugieren que la BPQ-OH, llevando un grupo aza en el centro de una molécula relativamente hidrofóbica, podría actuar mimetizando el carbocatión en el estado de transición de la reacción (Brown y col., 1996; Mc Taggart y col., 1996; Ward y col., 1996).

Nosotros investigamos el efecto de BPQ-OH sobre la proliferación y composición de esteroides de epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *Leishmania mexicana* intactos. Los resultados (Tabla 3 y Fig. 4.6.7 y 8) indican una reducción dosis-respuesta en la relación de (colesterol) endógeno a exógeno, sin acumulación de escualeno, lo cual es consistente con el bloqueo de la síntesis de novo de los esteroides al nivel de la SQS. La reducción relativa en el contenido endógeno de esteroides fue asociada con el decrecimiento en la velocidad del crecimiento alrededor de 10 μ M y una completa pérdida de la viabilidad celular a 30 μ M, cuando los parásitos fueron completamente carenciados de esteroides. Sin embargo, un hecho muy remarcable fue que la BPQ-OH fuese capaz de erradicar los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* sin ningún efecto deletéreo sobre las células hospedadoras (Fig. 4.6.9), ya que este inhibidor también inhibe la SQS de las células de mamíferos (Mc Taggart y col., 1996; Ward y col., 1996). Este resultado se debe probablemente a la capacidad de las células hospedadoras a compensar el bloqueo de la síntesis de novo de colesterol por una regulación en la expresión de los receptores LDL y tomar estos esteroides desde el medio de crecimiento (Goldstein y Broun, 2001).

En conclusión, nuestros resultados soportan la noción de que la SQS puede ser útil como un blanco quimioterapéutico en los parásitos *T. cruzi* y *Leishmania mexicana*, así que inhibidores para la SQS podrían ser utilizados como drogas selectivas anti-parásitos, aún cuando ellas no sean específicas para las enzimas del parásito. Este descubrimiento justificaría posteriores estudios, tanto *in vitro* como *in vivo* para el desarrollo de inhibidores específicos

para la SQS de los parásitos y que puedan conducir a compuestos para una terapia anti-parásito.

Para mejor información acerca de la metodología, resultados y discusión ver publicación 6.

Urbina JA, Concepción JL, Rancel S, Visbal G, Lira R. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. Molecular and Biochemical Parasitology. (2002), 125:35-45.

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

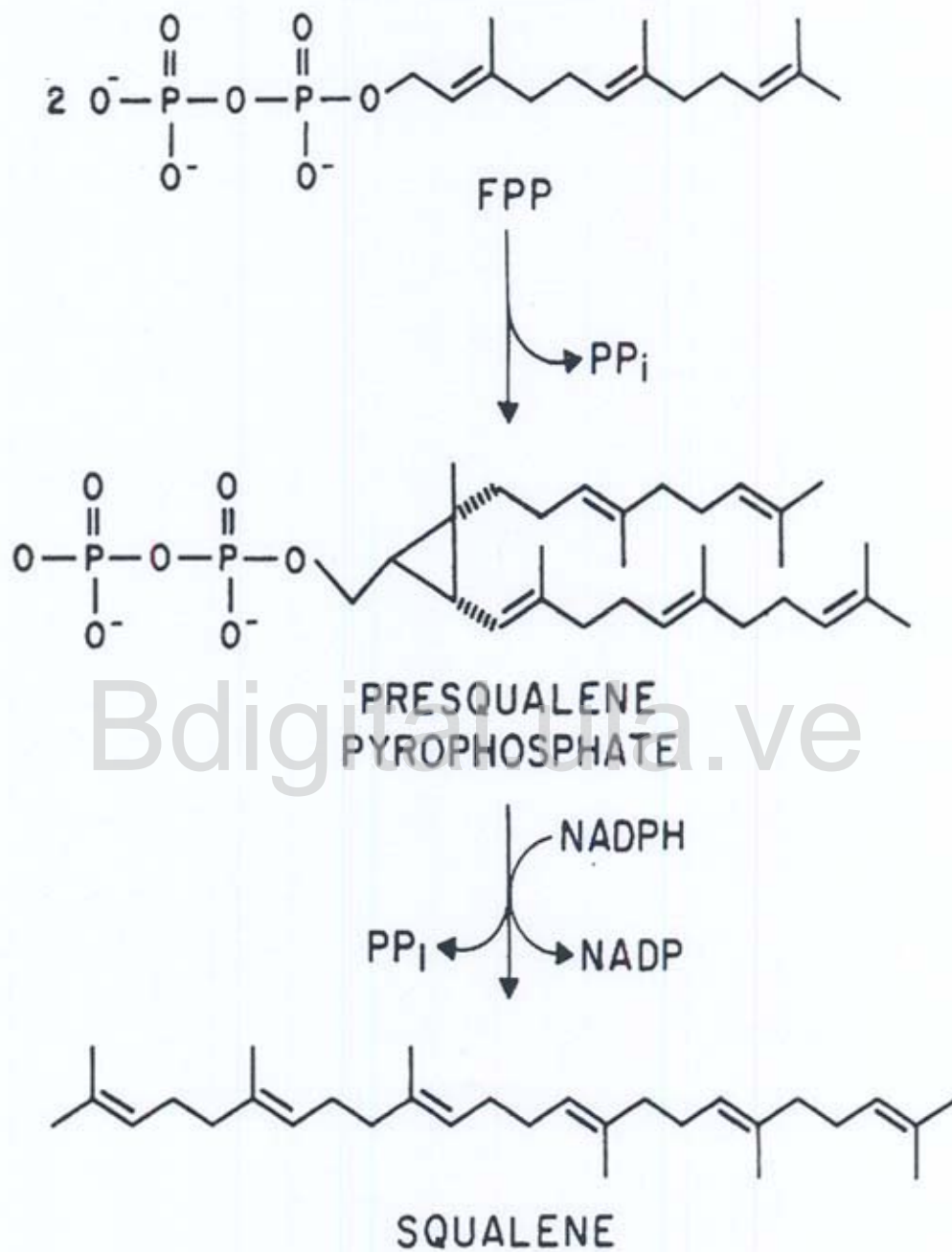


Figura 4.6.1. Reacción química catalizada por la escualeno sintetasa (SQS)

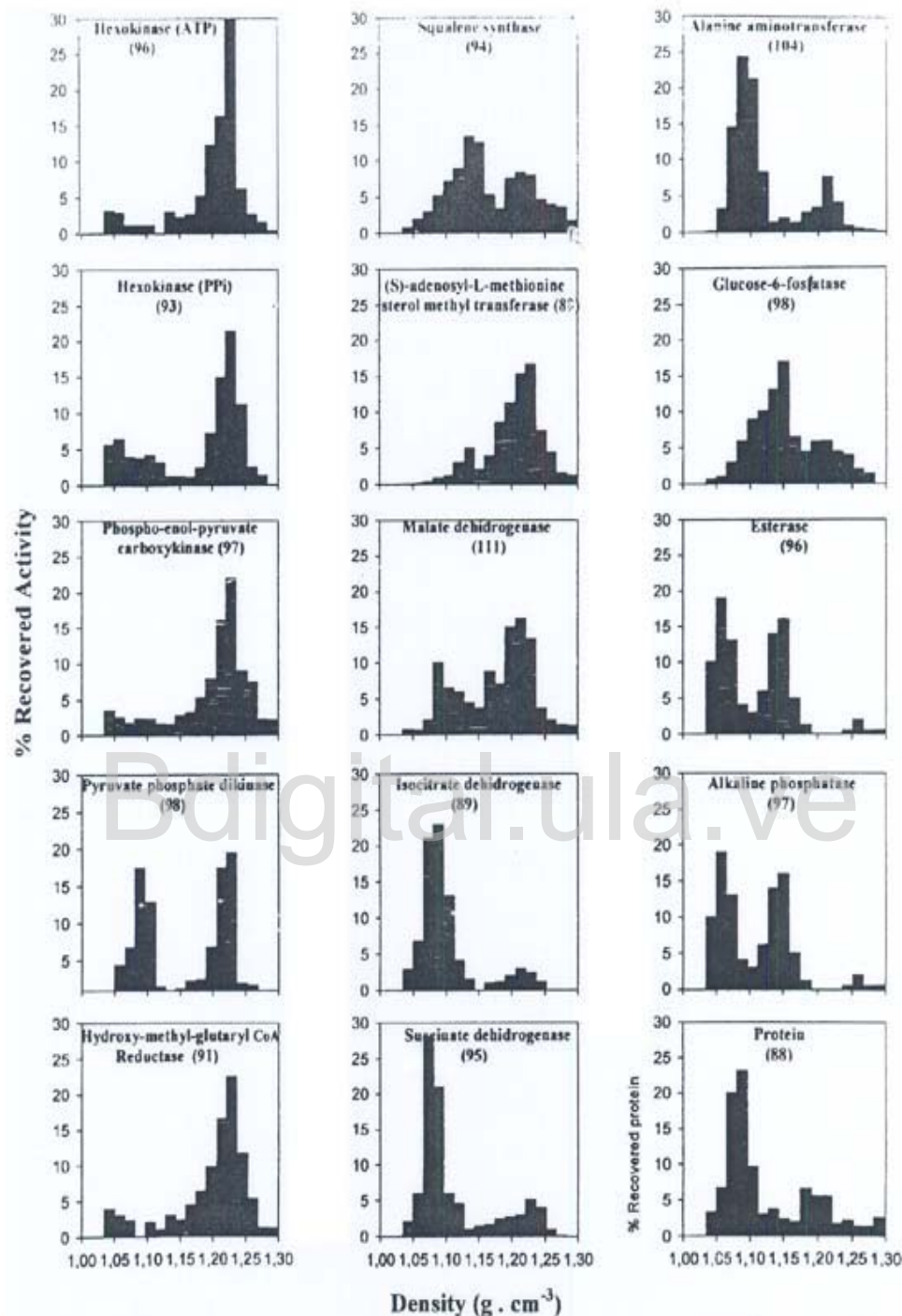


Figura 4.6.2. Perfil de distribución de la fracción granular pequeña (33 000 x 15 min) en un gradiente lineal de sacarosa de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Los porcentajes de las actividades enzimáticas recuperadas o proteínas son graficadas contra densidad en el rango 1.03-1.27 g cm⁻³. Las actividades fueron medidas en la presencia de 0.1 % de Triton X-100; los rangos recuperados (entre paréntesis) fueron desde 88 a 111%.

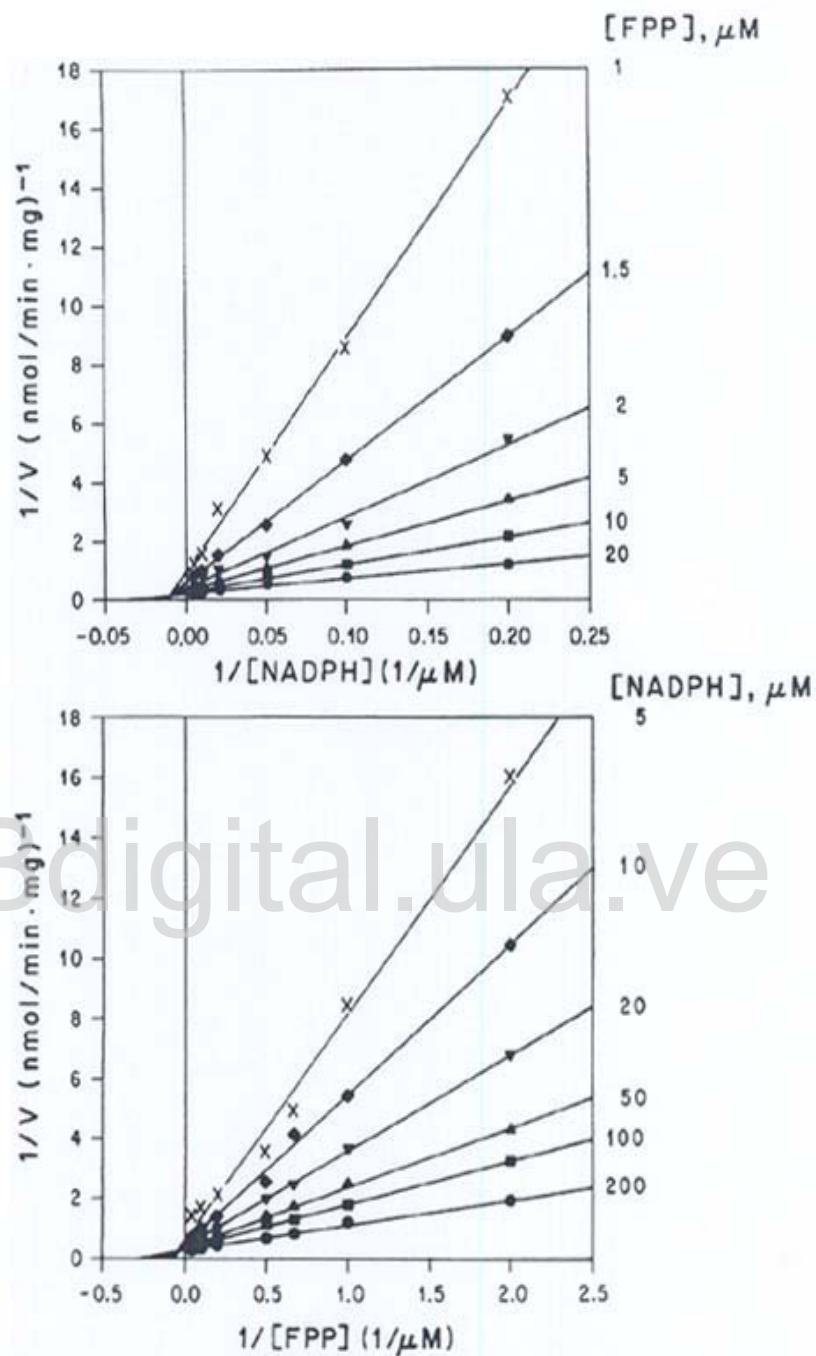
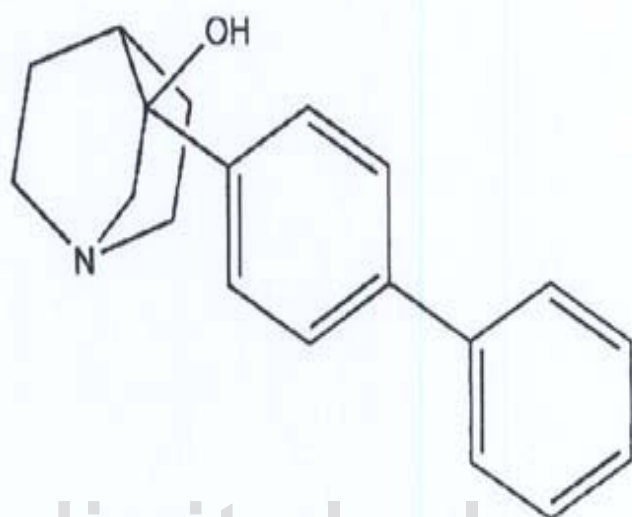


Figura 4.6.3. Grafico del doble reciproco de la actividad de la SQS de los glicosomas de *T. cruzi* como una función de la concentración variable de NADPH (tope) y de FPP (fondo), en la presencia de las concentraciones fijas indicadas de co-sustratos. Gráficos secundarios de los interceptos vs. Recíprocos de las concentraciones de co-sustratos, producen los valores de K_m y V_m indicadas en la tabla 1.

Tabla 4.6.1. Constantes cinéticas de la SQS de epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes *L. mexicana*^a.

Source	K_m (μM)	
	FPP	NADPH
<i>T. cruzi</i> glycosomal	2.8	40
<i>T. cruzi</i> microsomal/mitochondrial	2.3	33
<i>L. mexicana</i> glycosomal	3.2	62
<i>L. mexicana</i> microsomal/mitochondrial	2.8	57
	V_m ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ per protein)	
<i>T. cruzi</i> glycosomal	0.97	0.43
<i>T. cruzi</i> microsomal/mitochondrial	1.18	0.76
<i>L. mexicana</i> glycosomal	0.75	0.58
<i>L. mexicana</i> microsomal/mitochondrial	0.98	0.84

^aGlicosomas altamente purificados y vesículas microsomales/mitocondriales fueron obtenidas desde un homogenato de células preparadas por abrasión con carburo de silicio, seguido centrifugación diferencial e isopícnica. La SQS fue ensayada en la presencia de 0.1 % de Triton X-100, como fue descrito por Tait (1992).



3-Biphenyl-4-yl-1-aza-bicyclo[2.2.2]octan-3-ol

Figura 4.6.4. Estructura química del 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxiquinuclidina (BPQ-OH).

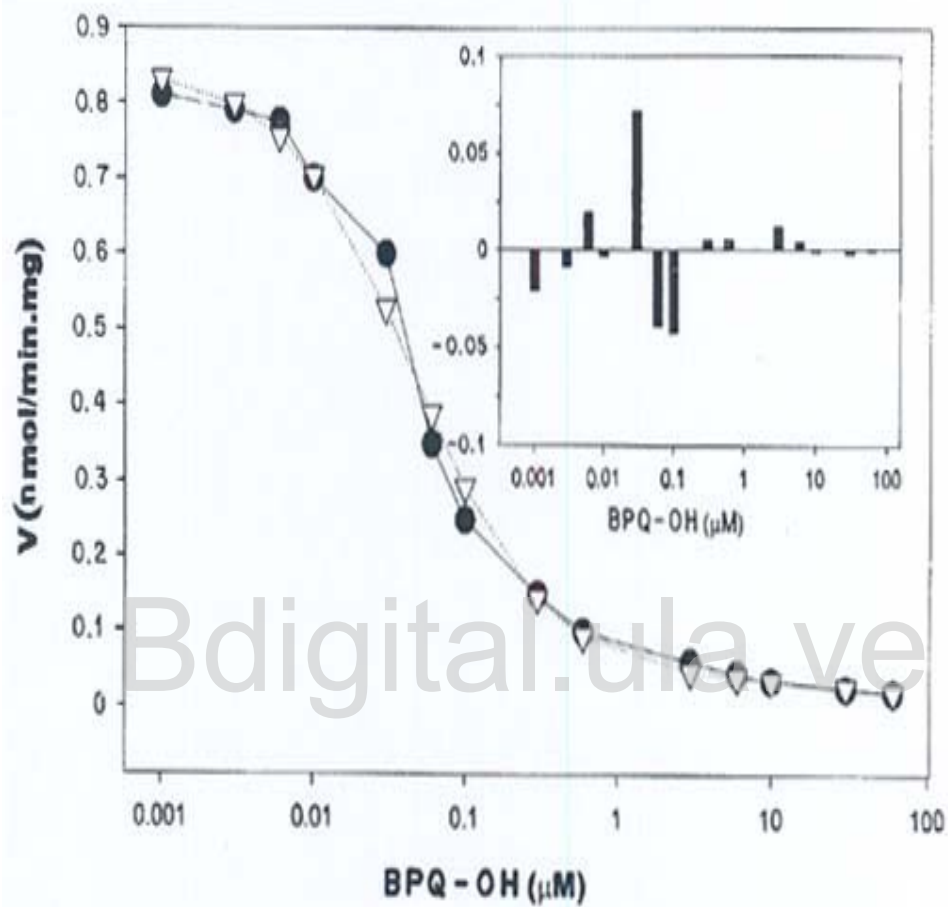


Figura 4.6.5. Efecto del BPQ-OH sobre la actividad de la SQS glicosómica de *T. cruzi*, en presencia de concentraciones de sustrato saturantes. Los círculos cerrados corresponden a los valores experimentales, mientras que los triángulos abiertos son las predicciones de los valores usando la ecuación 1. La cinética de inhibición bifásica fue observada con > 95% de la actividad con un $K_i = 46$ nM. Insertada: residuos de la grafica. La actividad SQS fue medida en la presencia de 0.1 % de Triton X-100.

Ecuación 4.6.1.

$$V = \left[V_{os} \left(1 + \frac{[\text{BPQ-OH}]}{K_{is}} \right)^{-1} \right] + \left[V_{oi} \left(1 + \frac{[\text{BPQ-OH}]}{K_{ii}} \right)^{-1} \right]$$

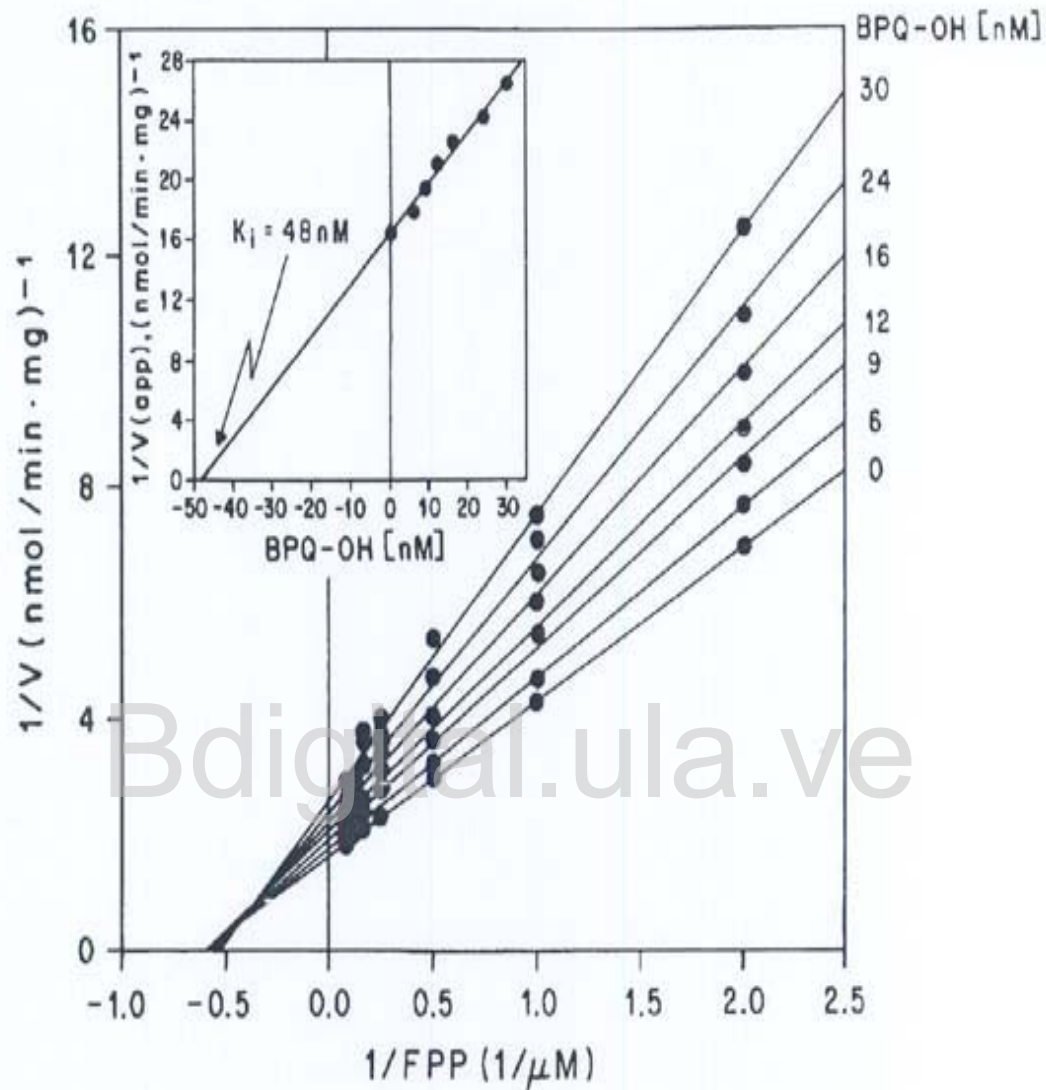


Figura 4.6.6. Cinética de inhibición por BPQ-OH sobre la SQS glicosomal de *T. cruzi*. Un grafico doble reciproco de la actividad enzimático como una función de la concentración variable de FPP, en la presencia de las concentraciones fijadas de BPQ-OH, es presentada. Insertada: grafico secundario de los interceptos como una función del BPQ-OH, el cual da el valor de K_i (48 nM). La actividad SQS fue medida en la presencia de 0.1 % de Triton X-100.

Tabla 4.6.2. Constantes cinéticas para la inhibición de la SQS glicosomal de los epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. mexicana* por BPQ-OH^a.

Source	K_i (nM)
<i>T. cruzi</i> glycosomal	48
<i>T. cruzi</i> microsomal/mitochondrial	12
<i>L. mexicana</i> glycosomal	54
<i>L. mexicana</i> microsomal/mitochondrial	62

^a Glicosomas altamente purificados y vesículas de microsomas/mitocondrias fueron obtenidas desde un homogenato de células preparadas por abrasión con carburo de silicio, seguido por una centrifugación diferencial e isopícnica. La actividad SQS fue medida en la presencia de 0.1 % de Triton X-100, como fue descrita por Tait (1992).

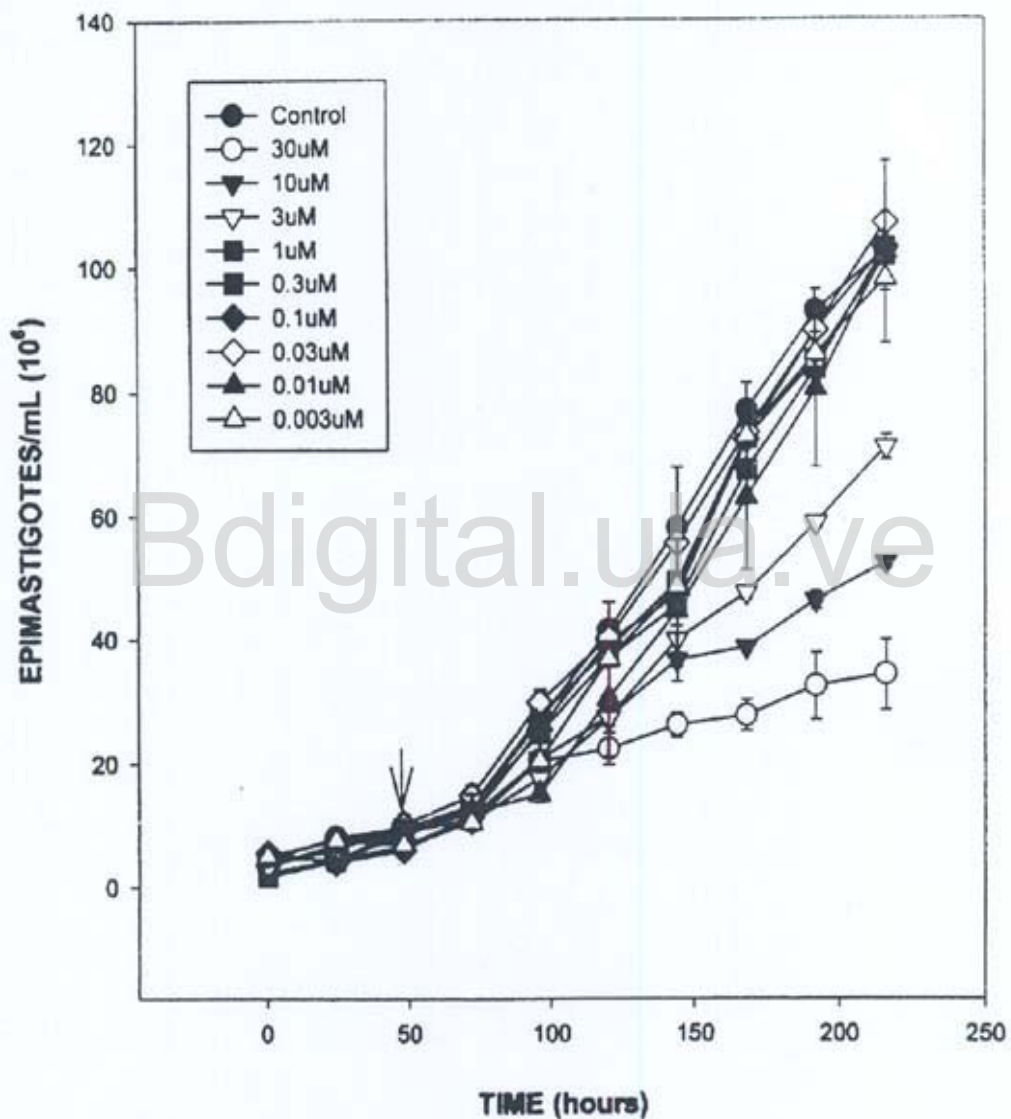
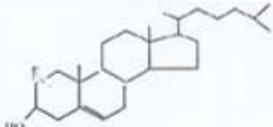
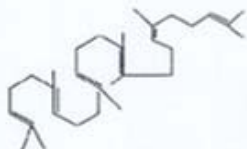
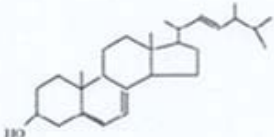
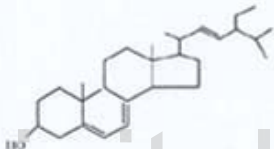
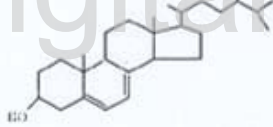
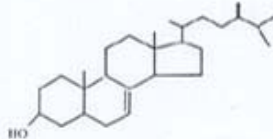
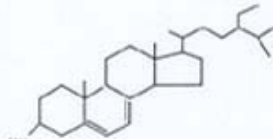


Figura 4.6.7. Efecto del BPQ-OH sobre la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi*. Los epimastigotes fueron cultivados en medio LIT a 28°C, con agitación. La flecha indica el tiempo en el que se colocó la droga, a las concentraciones indicadas. Los experimentos fueron hechos por triplicado y las barras indican la desviación estándar.

Tabla 4.6.3. Efecto de BPQ-OH sobre la composición de esteroides libres de los epimastigotes de *T. cruzi* (stock EP)^a.

EXOGENOUS:					
CHOLESTEROL		24.6	25.2	49.1	>99
ENDOGENOUS, 14-DESMETHYL:					
SQUALENE		17.6	6.2	6.8	<1
24-METHYL-5,7,22-CHOLESTA- TRIEN- 3 β -OL (ERGOSTEROL)		26.8	22.2	6.0	<1
24-ETHYL-5,7,22-CHOLESTA- TRIEN - 3 β -OL		28.3	13.2	24.3	<1
ERGOSTA-5,7-DIEN- 3 β -OL		28.6	22.5	4.9	<1
ERGOSTA-7,24(24 β)-DIEN-3 β -OL		28.9	4.1	<1	<1
24-ETHYL-5,7- CHOLESTA- DIEN-3 β -OL		31.2	6.6	8.9	<1

^a Los esteroides fueron extraídos desde los epimastigotes de *T. cruzi* cultivados en medio LIT en la presencia o ausencia de la droga por 120 horas; la droga fue añadida a una densidad de 5×10^4 epimastigotes ml^{-1} . Los esteroides fueron separados de los lípidos polares por una columna de cromatografía de ácido silícico y analizados por un sistema de cromatografía cuantitativa de capilaridad gas-líquido y espectrofotometría de masa. Los resultados son expresados como masa porcentual.

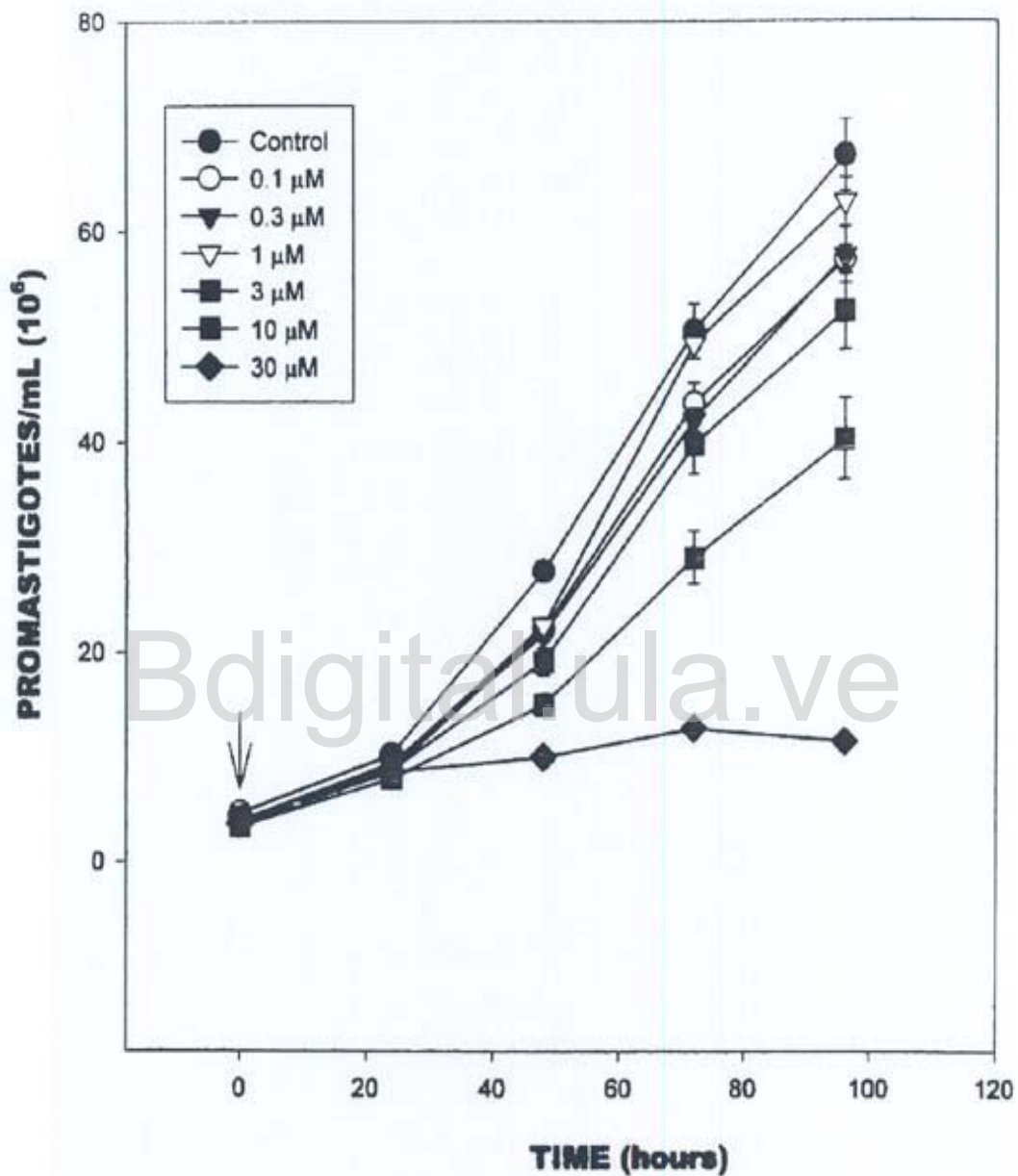
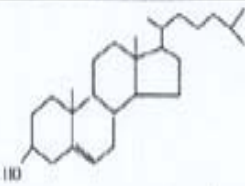
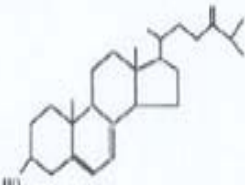
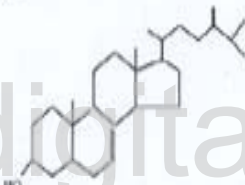
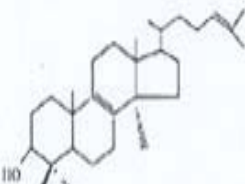


Figura 4.6.8. Efecto del BPQ-OH sobre la proliferación de los promastigotes de *L. mexicana*. Los promastigotes fueron cultivados en medio LIT a 26°C, sin agitación. La flecha indica el tiempo en el que se colocó la droga, a las concentraciones indicadas. Los experimentos fueron hechos por triplicado y cada barra indica la desviación estándar.

Tabla 4.6.4. Efecto de BPQ-OH sobre la composición de esteroides libres de promastigotes de *L. mexicana* (NR).

COMPOUND	MOLECULAR STRUCTURE	CONTROL	1 μ M BPQ-OH	3 μ M BPQ-OH	10 μ M BPQ-OH	30 μ M BPQ-OH
<i>Exogenous:</i>						
Cholesterol		8.07	12.05	14.8	34.8	>99
<i>Endogenous, 14 desmethyl:</i>						
Ergosta-5,7,24(24 ¹)-trien-3 β -ol (5-dehydroepisterol)		82.43	79.71	79.24	57.9	n.d
Ergosta-7,24(24 ¹)-dien-3 β -ol (episterol)		7.69	7.29	5.95	7.2	n.d
<i>Endogenous, 14 methyl:</i>						
Lanosterol		1.81	0.94	n.d.	n.d	n.d

Los esteroides fueron extraídos desde las células expuestas a las concentraciones de droga indicada a las 96 horas. Los esteroides fueron separados de los lípidos polares por una columna de cromatografía de ácido silícico y analizados por un sistema de cromatografía cuantitativa de capilaridad gas-líquido y espectrofotometría de masa. Los resultados son expresados como masa porcentual.

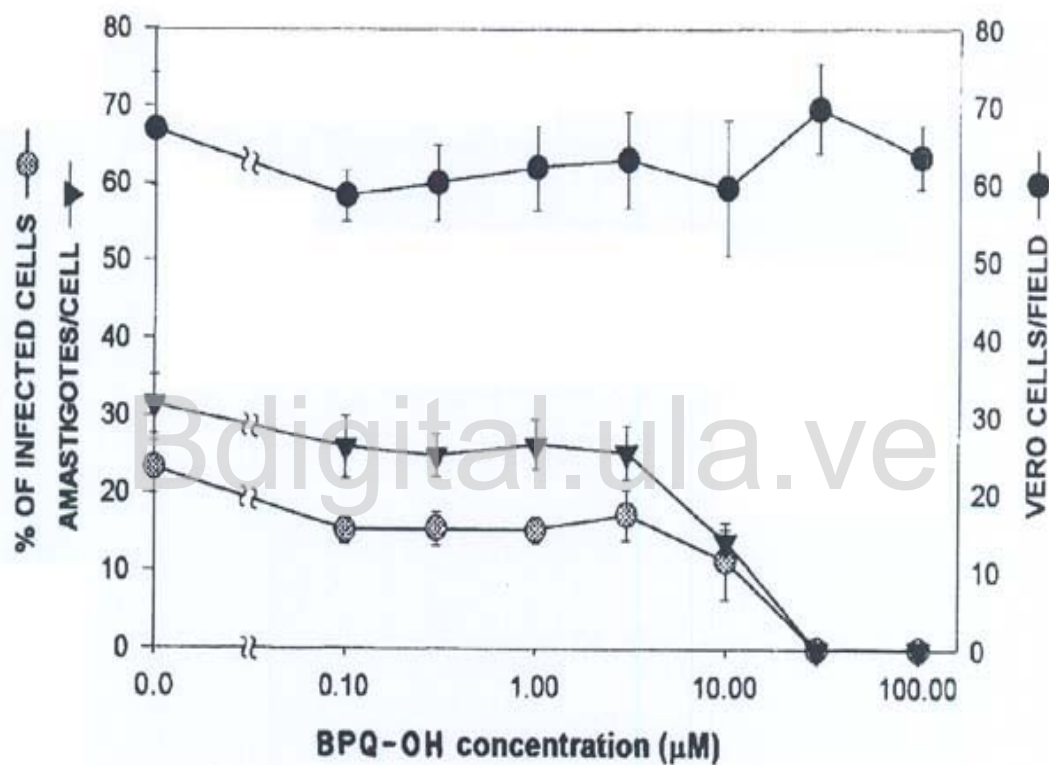


Figura 4.6.9. Dependencia de la concentración del efecto de BPQ-OH sobre la proliferación de los amastigotes de *T. cruzi* en cultivos de células Vero a 37°C. (○) porcentaje de células infectadas, (▼) número de amastigotes por célula y (●) número de células Vero por campo, después de 96 horas de incubación, como una función de la concentración de droga. Las células Vero fueron infectadas con *T. cruzi*, como fue descrito en materiales y métodos. Los experimentos fueron hechos por cuadruplicado y cada barra representa la desviación estándar.

4.7. Mecanismo de acción del 4-Fenoxifenoxietil Tiocianato (WC-9) contra *Trypanosoma cruzi*, el Agente Causante de la Enfermedad de Chagas.

Nosotros decidimos investigar el posible efecto del 4-fenoxifenoxietiltiocianato (WC-9), el más potente miembro de este grupo de compuestos, sobre la biosíntesis de novo de esteroides en epimastigotes de *T. cruzi*, ya que trabajos previos indican la interferencia por este tipo de compuestos en la biosíntesis de esteroides en mamíferos (Vlaudusic y col., 1994; 1995).

El WC-9 induce un efecto dosis-dependiente sobre el crecimiento de los epimastigotes de la cepa Elpidio Padrón (EP) (Fig. 4.7.1). Cuando la cepa EP fue crecida en medio de Infusión Hígado Triptosa (UT), la MIC para este organismo (definida como la concentración mínima requerida para inhibir el crecimiento en >99% después de 96 horas) fue de 1 μ M, de acuerdo con resultados obtenidos previamente con la cepa Y (Cinque y col., 1998). También analizamos el contenido de esteroides libres del control y células tratadas por cromatografía capilar de gas-líquida acoplada a un espectrofotómetro de masas (Urbina y col., 2002). Nosotros mostramos (Tabla 4.7.1) que el efecto inhibitorio de WC-9 sobre el crecimiento está asociado con la falta endógena de esteroides del parásito, ergosterol y su análogo 24-etil, y un incremento concomitante en la proporción relativa de colesterol, el cual es tomado pasivamente del medio de crecimiento por los epimastigotes (Urbina y col., 2002). El hecho de la desaparición completa de esteroides del parásito, con ninguna acumulación de intermediarios de los esteroides tales como lanosterol o escualeno (Tabla 4.7.1), indicaría que esta droga está bloqueando la ruta de biosíntesis a nivel de preescualeno (Urbina y col., 2002).

Esta hipótesis fue probada, investigando el efecto del compuesto WC-9 sobre dos enzimas claves de la ruta de biosíntesis de poli-isoprenoides: farnesil difosfato sintetasa (FPPS [EC 5.3.3.2]) y escualeno sintetasa (SQS [EC 2.5.1.1]). El producto de la reacción catalizada por la FPPS, farnesil pirofosfato (FPP), es el principal punto de ramificación de la ruta de poli-isoprenoides, mientras que la SQS cataliza el primer paso comprometido en la biosíntesis de esteroides. Usando una FPPS recombinante de *T. cruzi*; expresada en *Escherichia coli* (Montalvetti y col., 2001), nosotros demostramos que el WC-9

fue esencialmente inactivo contra esta enzima (9% de inhibición con 4 μ M y 13% con 40 μ M). En cambio el WC-9 ensayado para la SQS de glicosomas y microsomas/mitocondria de epimastigotes de *T. cruzi* (Urbina y col., 2002), mostró una potente inhibición para ambas SQS (Fig. 4.7.2), con 50% para la concentración inhibitoria (IC_{50}) de 88 y 129 nM, respectivamente, a concentraciones de sustrato saturante para la enzima (25 μ M de FPP y 1 mM NADPH). La actividad inhibitoria de WC-9 sobre la SQS purificada puede explicar el efecto de este compuesto sobre la composición de esteroides libres (Tabla 4.7.1) y el crecimiento (Fig. 4.7.1) de epimastigotes enteros y sugiriendo una relación fuerte entre estos dos últimos fenómenos. La curva dosis-respuesta para la actividad de WC-9 contra la SQS de *T. cruzi* (Fig. 4.7.2) fue consistente con una inhibición no competitiva, con un $K_i = IC_{50}$; este valor de K_i fue de 2 a 3 órdenes de magnitud por debajo del K_m del sustrato (Urbina y col., 2002). Esto sugiere que el WC-9, con un centro sulfa electrofílico unido a un motivo relativamente no polar (hidrofóbico), podría actuar mimetizando el estado de transición carbocatiónico de la reacción, conduciendo a la formación del intermediario ciclopropil-carbinil presqualeno difosfato (Radisky y Pouter, 2000; Blagg y col., 2002; Jarstfer y col., 2002). Basado en esta hipótesis, se podría diseñar nuevos y más potentes inhibidores para la SQS, usando la estructura básica del WC-9 (incrementando el carácter electrofílico del 4-fenoxifenoxietil sustituyente).

En conclusión, nuestros resultados indican que el mecanismo primario del efecto antiproliferativo del WC-9 contra *T. cruzi* es la privación endógena de esteroides por un bloqueo específico al nivel de la SQS en la biosíntesis de novo. Esta es la primera explicación a nivel molecular del mecanismo de acción del 4 - fenoxifenoxietil derivado contra este parásito, y esto sugiere que este y compuestos relacionados podrían representar una nueva clase de inhibidores de la SQS.

Para mejor información acerca de la metodología, resultados y discusión ver publicación 7.

Urbina JA, Concepción JL, Montalvetti A, Rodríguez JB, Docampo R. Mechanism of Action of 4-Phenoxyphenoxyethyl Thiocyanate (WC-9) against Trypanosoma cruzi, the Causative Agent of Chagas' Disease. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. (2003), 47:2047-2050.

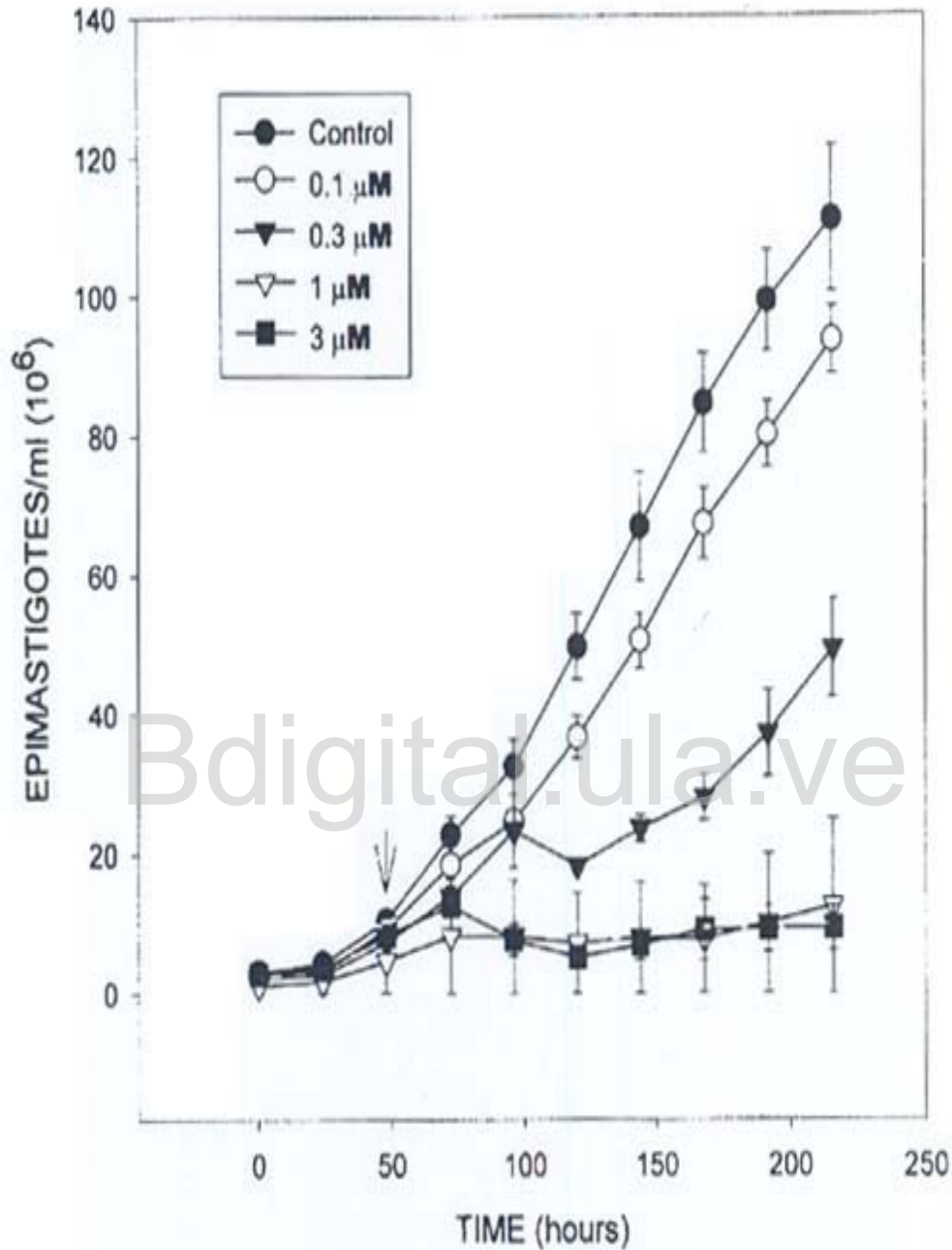
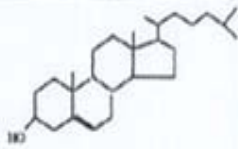
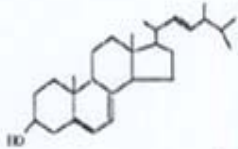
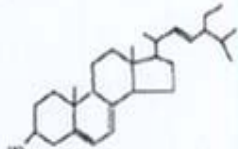
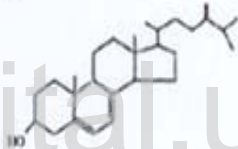
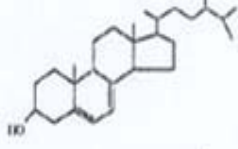
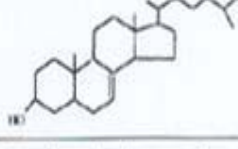


Figura 4.7.1. Efecto del compuesto WC-9 sobre la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi*. Los epimastigotes fueron cultivados en medio LIT a 28°C con fuerte agitación. La flecha indica el momento en el cual se añadió la droga a las concentraciones indicadas. La densidad celular fue medida por turbidez a 560 nm. y por conteo directo con un hemocitometro. Los experimentos fueron hechos por triplicado, y cada barra representa una desviación estándar.

Tabla 4.7.1. Esteroles libres y precursores presentes en epimastigotes de *T. cruzi* (stock EP) en la presencia o ausencia de WC-9^a.

Sterol or precursor	Structure	Retention time (min)	Mass %			
			Control	WC-9 concn		
				0.1 μ M	0.3 μ M	1 μ M
Exogenous						
Cholesterol		24.7	32.4	31.0	57.1	83.7
Endogenous						
24-Methyl-5,7,22-cholesta-trien-3 β -ol (ergosterol)		26.9	32.1	31.5	17.4	16.3
24-Ethyl-5,7,22-cholesta-trien-3 β -ol		29.6	13.5	13.2	15.8	<1
Ergosta-5,7,24(24')-trien-3 β -ol		28.4	9.6	12.0	4.3	<1
Ergosta-5,7-dien-3 β -ol		25.7	8.7	9.6	3.1	<1
Ergosta-7,24(24')-dien-3 β -ol		28.9	3.7	2.7	2.3	<1

^a Los esteroides fueron extraídos desde los epimastigotes de *T. cruzi* cultivados en medio LIT en la presencia o ausencia de WC-9 por 120 horas; la droga fue añadida a una densidad de 5×10^4 epimastigotes ml^{-1} . Los esteroides fueron separados de los lípidos polares por una columna de cromatografía de ácido silícico y analizados por un sistema de cromatografía cuantitativa de capilaridad gas-líquido y espectrofotometría de masa. Los resultados son expresados como masa porcentual.

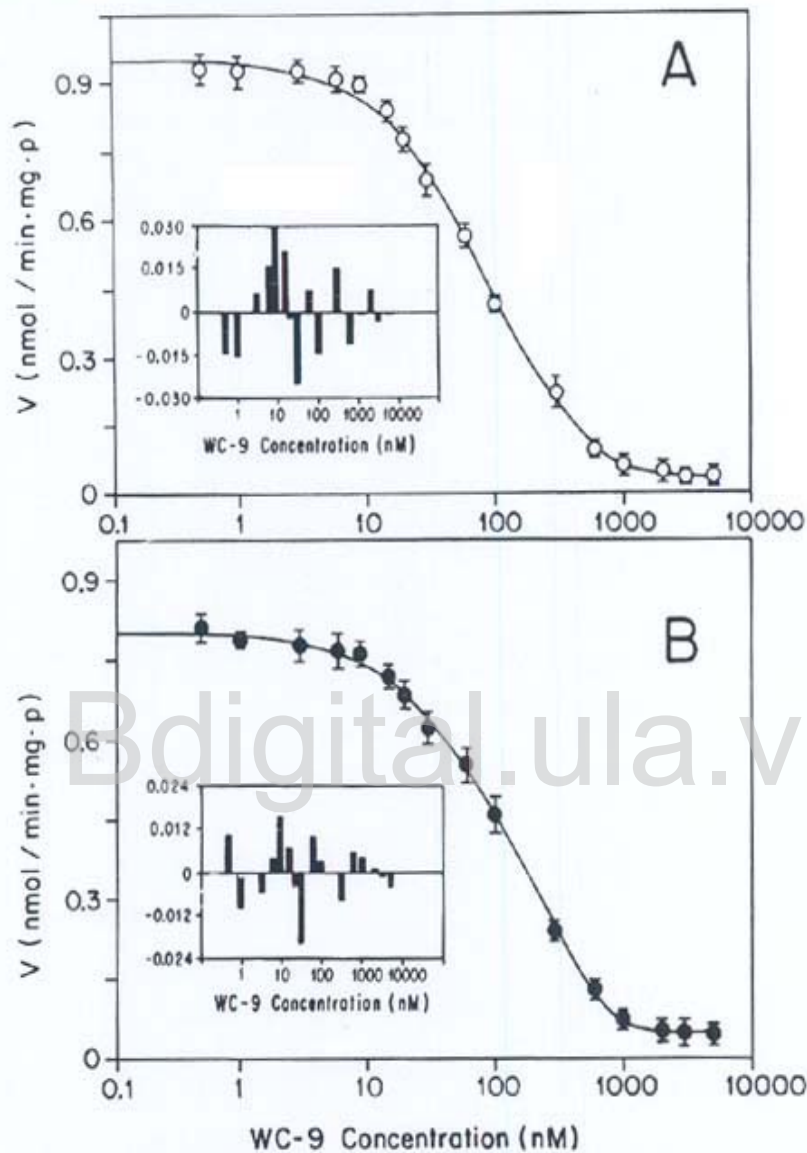


Figura 4.7.2. Efecto de WC-9 sobre la actividad de la SQS glicosomal (A) y mitocondrial (B) de *T. cruzi*, en la presencia de concentraciones saturantes de los sustratos. Las curvas de dosis-respuesta fueron graficadas con una regresión no lineal con la ecuación $V = V_0 \{1 + ([I]/K_i)^n\}^{-1}$, mientras V es la medida de la actividad enzimática, V_0 es el control de la actividad (no inhibida), y K_i es la constante de inhibición aparente. Los resultados fueron $K_i = 88 \pm 4$ nM y $n = 1.05 \pm 0.04$ para la enzima glicosomal y $K_i = 129 \pm 6$ nM y $n = 0.99 \pm 0.03$ para la enzima mitocondrial, consistente con una inhibición no competitiva. Insertado, los residuos de la regresión.

4.8. Actividad *in vitro* e *in vivo* de E5700 y ER-119884, dos nuevos inhibidores de la escualeno sintetasa con actividad oral, contra *Trypanosoma cruzi*.

En este trabajo nosotros investigamos la actividad *in vitro* e *in vivo* del E5700 y ER-119884, dos nuevas quinuclidinas como inhibidores de la SQS que fueron desarrollados como agentes que disminuyen el colesterol y triglicéridos en humanos, contra *T. cruzi*.

Estos derivados nuevos de quinuclidina utilizados en este trabajo E570Q y ER119884 (Fig. 4.8.2), fueron un orden de magnitud más potentes que la BPQ-OH como inhibidor de la enzima SQS del parásito y su actividad fue incrementada por la presencia PPI a nivel micromolar (Fig. 4.8.2 y 4.8.3; Tabla 4.8.1 y 4.8.2). Los compuestos fueron inhibidores no competitivos o de orden mixto y sus valores de K_i (Tabla 4.8.2) tres o cuatro ordenes de magnitud por debajo de los K_m para los sustratos FPP y cuatro o cinco ordenes de magnitud por debajo de los valores correspondientes para el NADPH (Urbina y col., 2002). Estos hechos soportan la noción de que los derivados de quinuclidina, con grupos aza cargados positivamente en el centro la molécula relativamente hidrofóbica (Fig. 4.8.2), pueden actuar mimetizando el estado transición carbocatiónico de la reacción catalizada por la SQS (Fig. 4.8.1), la cual también involucra un par de iones con el nivel del grupo pirofosfato (Blagg y col., 2002; Jarstfer y col., 2002; Radisky y Poulter, 2000). En este contexto es interesante hacer notar que recientemente se ha descubierto que *T. cruzi* y otros parásitos Tripanosomatides y Apicomplexas contienen grandes niveles de PPI y otros polifosfatos de cadena corta, que están ampliamente distribuidos en la célula, aunque el mayor almacén es una organela especializada, llamada ácidocalcisomas (Moreno y col., 2000; Ruiz y col., 2001). Es una posibilidad muy intrigante que la presencia de niveles significativos de PPI en el parásito, hagan más susceptibles a la SQS a los efectos de los derivados de quinuclidina, que sobre la SQS de otros eucariotas, incluyendo sus células hospedadoras de mamífero, donde los niveles del PPI son muy bajos, debido a la presencia de una alta actividad pirofosfatasa soluble.

Ambos derivados de quinuclidina fueron potentes inhibidores del crecimiento *in vitro*, particularmente contra la forma clínica relevante del

parásito, amastigotes intracelulares, con valores de IC_{50} en rangos del orden sub-nanomolar (Fig. 4.8.6); Ellos están entre los compuestos más activos anti- *T. cruzi* jamás ensayados (Urbina y col., 2002; 2001; 2003). En epimastigotes, la inhibición del crecimiento y la pérdida de viabilidad inducida por estos compuestos estuvo asociada con una desaparición completa de los esteroides endógenos de los parásitos (Fig. 4.8.5 y Tabla 4.8.3 y 4.8.4), como se ha visto con otros inhibidores de la SOS que actúan contra este parásito (Urbina y col., 2002; 2003). Esta composición química alterada podría conducir a modificaciones drásticas de las propiedades físicas de las membranas celulares, así como permeabilidad pasiva y esteroides que median la interacción de proteínas con lipid rafts (Simons y Ikonen, 1997; Brown y London, 2000). En contraste aquí no hubo ningún efecto sobre la viabilidad y proliferación de las células hospederas del mamífero, aún a concentraciones diez veces mayores que las requeridas para erradicar los parásitos intracelulares (Fig. 4.8.6), a pesar de que estos compuestos son también potentes inhibidores de la SOS de mamíferos. Como se ha discutido en (Urbina y col., 2002), la actividad antiparasítica de estos compuestos y no para las células hospederas se podría explicar por la capacidad de estas últimas para compensar el bloqueo de la síntesis de novo del colesterol, regulando la expresión de receptores LDL y tomando los esteroides desde el medio de crecimiento (Goldstein Brown, 2001). En contraste, el parásito no tiene ninguna vía para poder compensar la biosíntesis de ergosterol cuando es bloqueado con quinuclidina. También podría ser que la SOS de mamíferos sea menos susceptible a la inhibición por compuestos de quinuclidina, debido a la ausencia de pirofosfato inorgánico intracelular en ellos. En este contexto el E5700 tiene una potente acción anti- *T. cruzi*, y muy baja actividad anti-fúngica *in vitro* (MIC > 200 μ g/ml o 440 μ M contra *C. albicans*, *A. fumigatus* y *S. cerevisiae*; Eisai Company Ltd., datos no publicados), este pobre efecto podría ser explicado por una pobre penetración de los compuestos debido a la presencia de pared celular.

Aunque los derivados de quinuclidina tienen actividades anti- *T. cruzi in vitro* comparables, E5700 fue claramente el más potente *in vivo*, siendo capaz de suprimir completamente el desarrollo de la parasitemia y dando una protección total contra la muerte con 50 mg/Kg.d, mientras que ER-119884 a la misma dosis tiene una protección parcial, comparable a la vista con E5700 a 25

mg/Kg.d (Figs. 4.8.7 y 4.8.8). Cuando el efecto de estos compuestos fueron investigados sobre la síntesis del colesterol, triglicéridos y sobre los niveles de los lípidos en el plasma, el mismo patrón de actividades *in vitro* e *in vivo* fue observado: ambos compuestos tuvieron potencias comparables contra la SQS purificada de rata y en la reducción de la síntesis de colesterol y triglicéridos en cultivos de hepatocitos primarios de rata, pero E5700 fue mucho más activo en reducir los niveles de lípidos del plasma en monos rhesus después de 7 días de tratamiento. La alta actividad *in vitro* de E5700 como agente anti-parásito y de disminuir el colesterol es muy probable que sea debido a las mejores propiedades farmacocinéticas. Estudios en ratas (Eisai Company Ltd., datos no publicados), han mostrado que los valores C_{max} de E5700 obtenidos después de suministrar dosis orales de 30 a 100 mg/Kg.d fue de 10 a 70 veces más alto que la MIC contra los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* obtenidos en el presente trabajo (MICs, 100 nM; ver Fig. 4.8.6; posteriormente, en el modelo rata, este compuesto mostró una amplia distribución, alcanzando tejidos y órganos relevantes tales como corazón, bazo, hígado, intestino largo y pequeño y que fueron uno o dos ordenes de magnitud más altos que los encontrados en el plasma (Eisai Company Ltd., datos no publicados). Asumiendo una distribución similar en ratones, los amastigotes intracelulares en los animales tratados con E5700 a 50 mg/Kg.d estarían expuestos a niveles de droga en el estado estacionario en dos o tres ordenes de magnitud más altos que la MICs, lo que explicaría el bloqueo completo de la proliferación inducida por este compuesto. No obstante, ninguna cura parasitológica fue obtenida en estos animales, aun después de 30 días de tratamiento, un hecho probablemente relacionado con el corto tiempo de residencia ($MRT = AUMC/AUC$, donde AUMC es el área bajo el primer mes de la concentración en el plasma) de E5700 en ratones (2.5-3.8 h. Eisai Company Ltd., datos no publicados). Nuevos experimentos serían necesarios, para explorar el efecto de dosis más frecuentes, así como combinaciones con otros inhibidores de la biosíntesis de esteroides tales como azoles anti-fúngicos (inhibidores de la C14 α demetilasa) (Urbina y col., 2003). También es posible que, para lograr una cura parasitológica total, sean necesarios compuestos con un tiempo de vida-media terminal mayor que los del E5700 y esto podría ser un elemento clave en la optimización para su aplicación.

En conclusión, nuestros resultados han mostrado que nuevos inhibidores basados en quinuclidina E5700 y ER-119884 tienen una actividad selectiva y fuera de lo común *in vitro* contra *T. cruzi*. También se encontró que E5700 fue capaz de dar una protección completa contra infecciones de *T. cruzi* en un modelo murino en la fase aguda fulminante para la enfermedad de Chagas. Esta es la primera demostración de una actividad antiparasítica de un inhibidor activo vía oral contra la SQS.

Para mejor información acerca de la metodología, resultados y discusión ver publicación 8.

Ubina JA, Concepción JL, Caldera A, Payares G, Sanoja C, Otomo T, and Hiyoshi. *In vitro* and *in vivo* activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. (2004), en prensa.

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

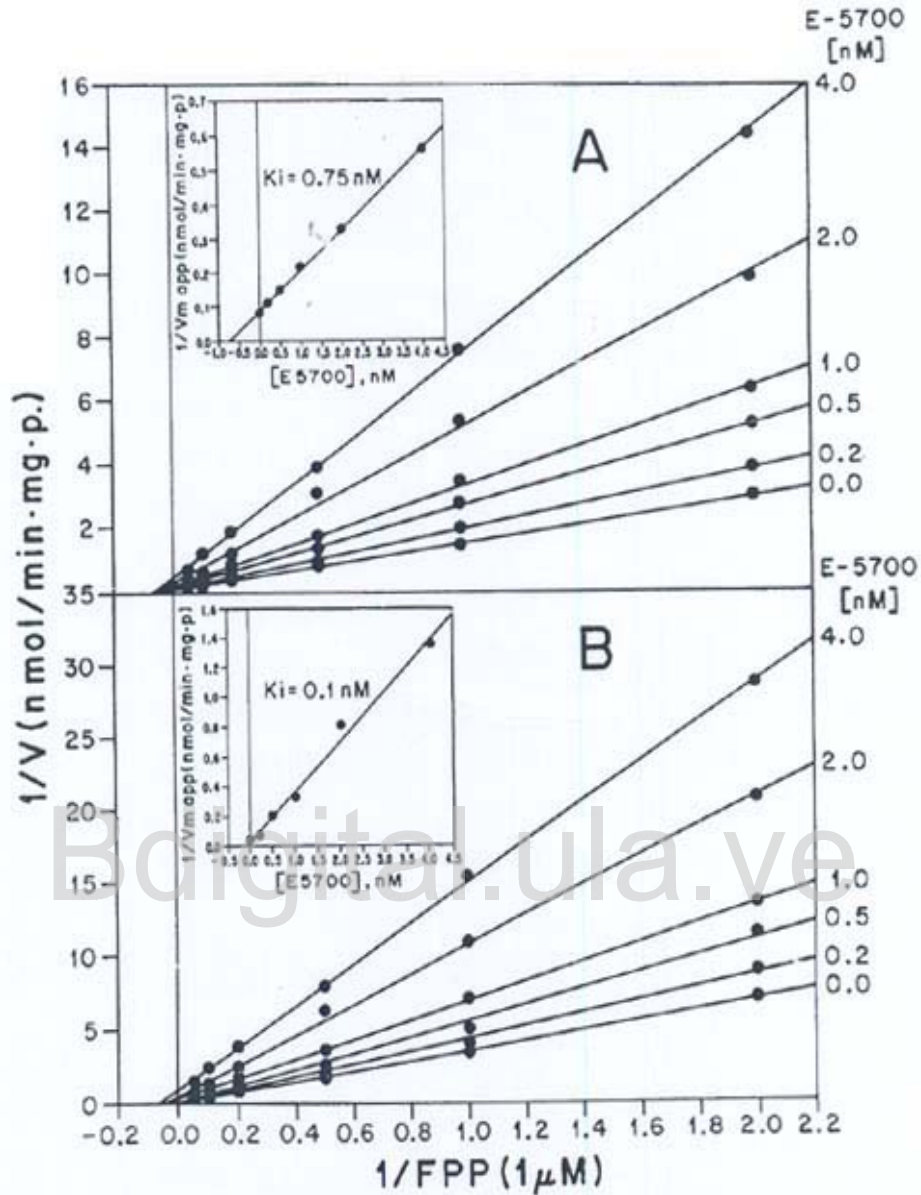


Figura 4.8.2. Cinética de inhibición por E5700 sobre la SQS de los glucosomas de *T. cruzi*. Gráfico de los dobles recíprocos de la actividad de la enzima como una función de las concentraciones variables de FPP, en la presencia de las concentraciones fijas indicadas de E5700 en la ausencia (A) y presencia (B) de 20 μM de pirofosfato inorgánico (PPI). Insertado: gráficos secundarios de los interceptos como una función de E5700. La actividad SQS fue medida en la presencia de 0.1% de Triton X-100.

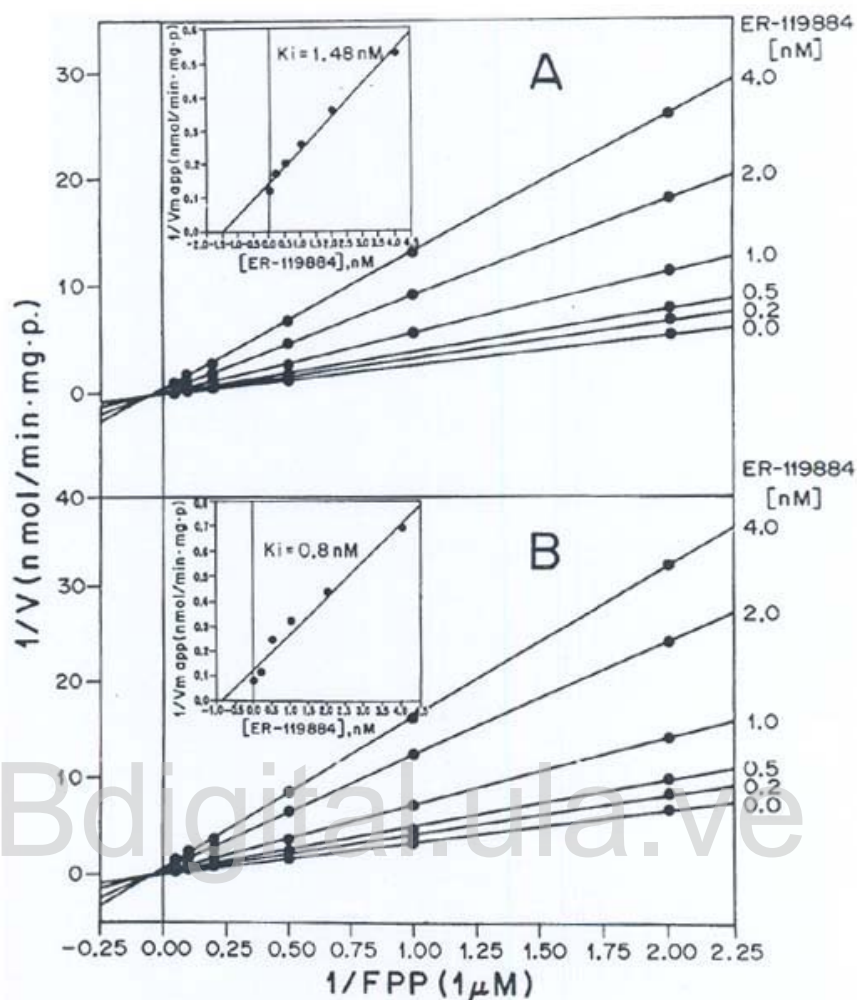


Figura 4.8.3. Cinética de inhibición por ER-119884 sobre la SQS de los glicosomas de *T. cruzi*. Grafico de los dobles recíprocos de la actividad de la enzima como una función de las concentraciones variables de FPP, en la presencia de las concentraciones fijas indicadas de ER-119884 en la ausencia (A) y presencia (B) de 20 μM de pirofosfato inorgánico (PPI). Insertado: gráficos secundarios de los interceptos como una función de ER-119884. La actividad SQS fue medida en la presencia de 0.1% de Triton X-100.

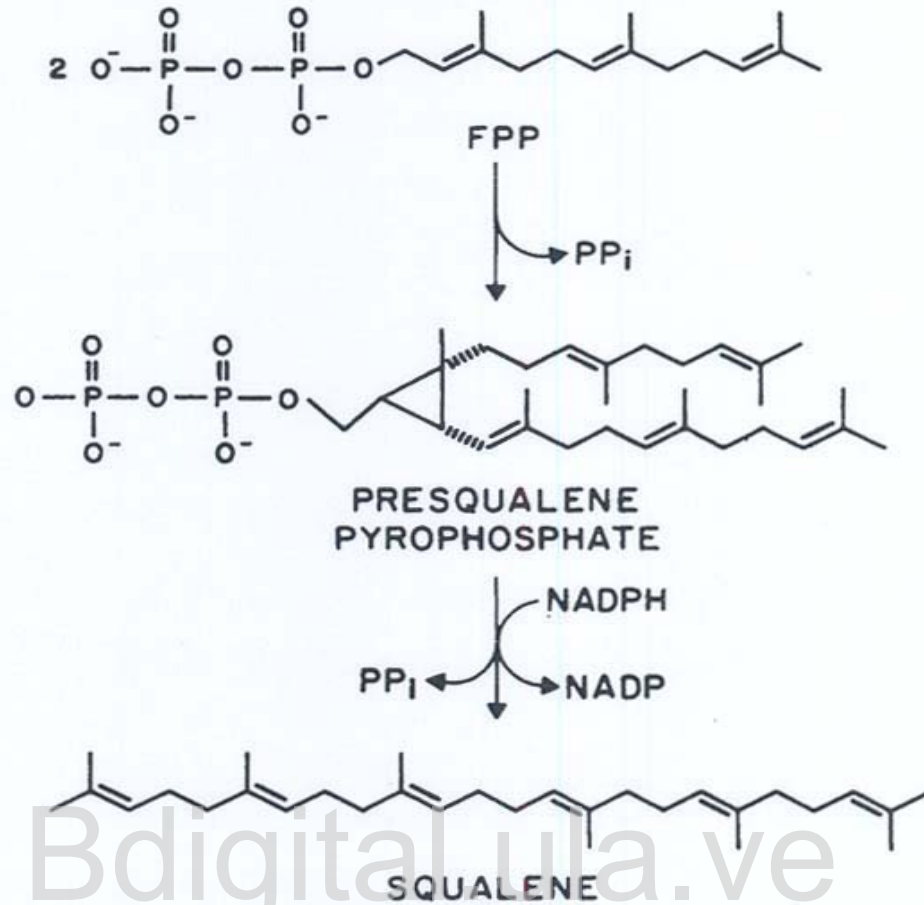


Figura 4.8.4. Reacción química catalizada por la escualeno sintetasa (SQS).

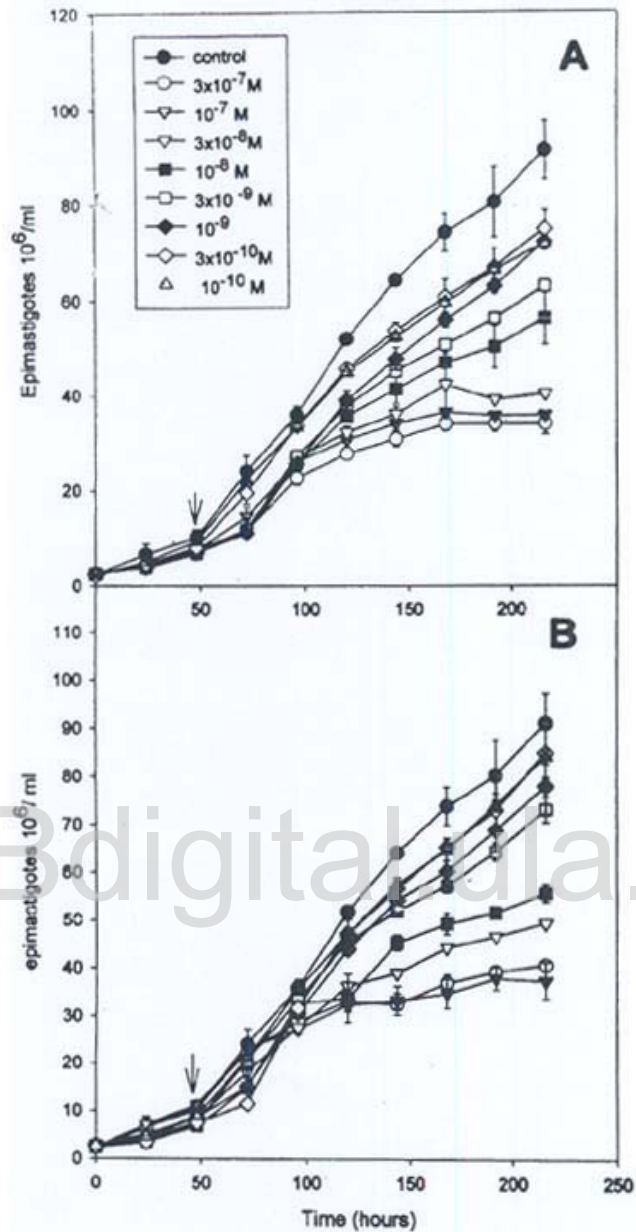


Figura 4.8.5. Efecto de E5700 (A) y ER-119884 (B) sobre la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi*. Los epimastigotes fueron cultivados en medio LIT a 28°C, con agitación, como fue descrito en materiales y métodos. La flecha indica el tiempo en el cual fue añadida las drogas, a las concentraciones indicadas. Los experimentos fueron hechos por triplicado y cada barra corresponde a una desviación estándar.

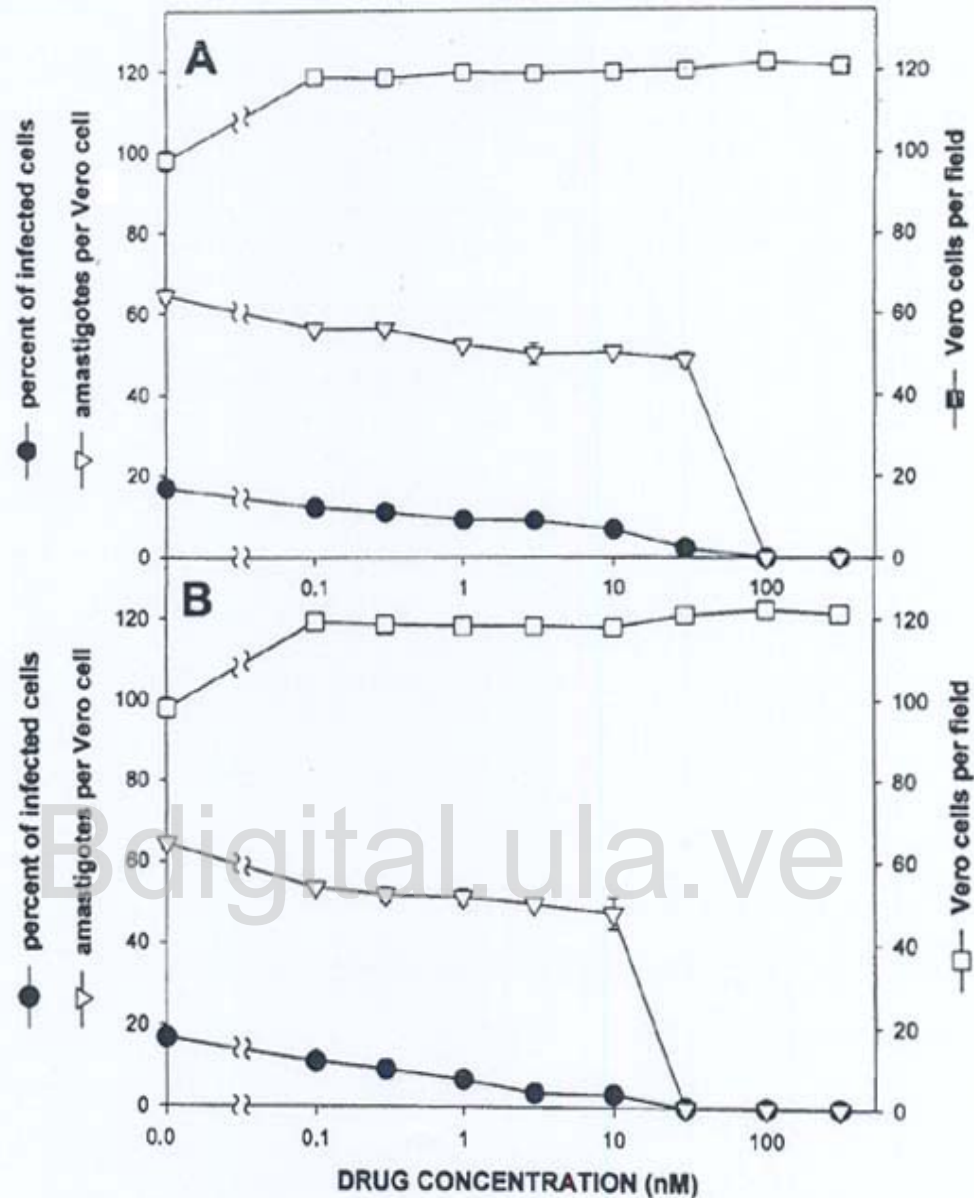


Figura 4.8.6. Dependencia de la concentración del efecto de E5700 (A) y ER-119884 (B) sobre la proliferación de amastigotes de *T. cruzi* cultivados en células Vero a 37°C. Porcentaje de células infectadas (●), número de amastigotes por célula (▽) y número de células Vero por campo (□) después de 96 horas de incubación, como una función de la concentración de drogas. Las células Vero fueron infectadas con *T. cruzi*, como fue descrito en materiales y métodos. Los experimentos fueron hechos por cuadruplicado y cada barra representa una desviación estándar.

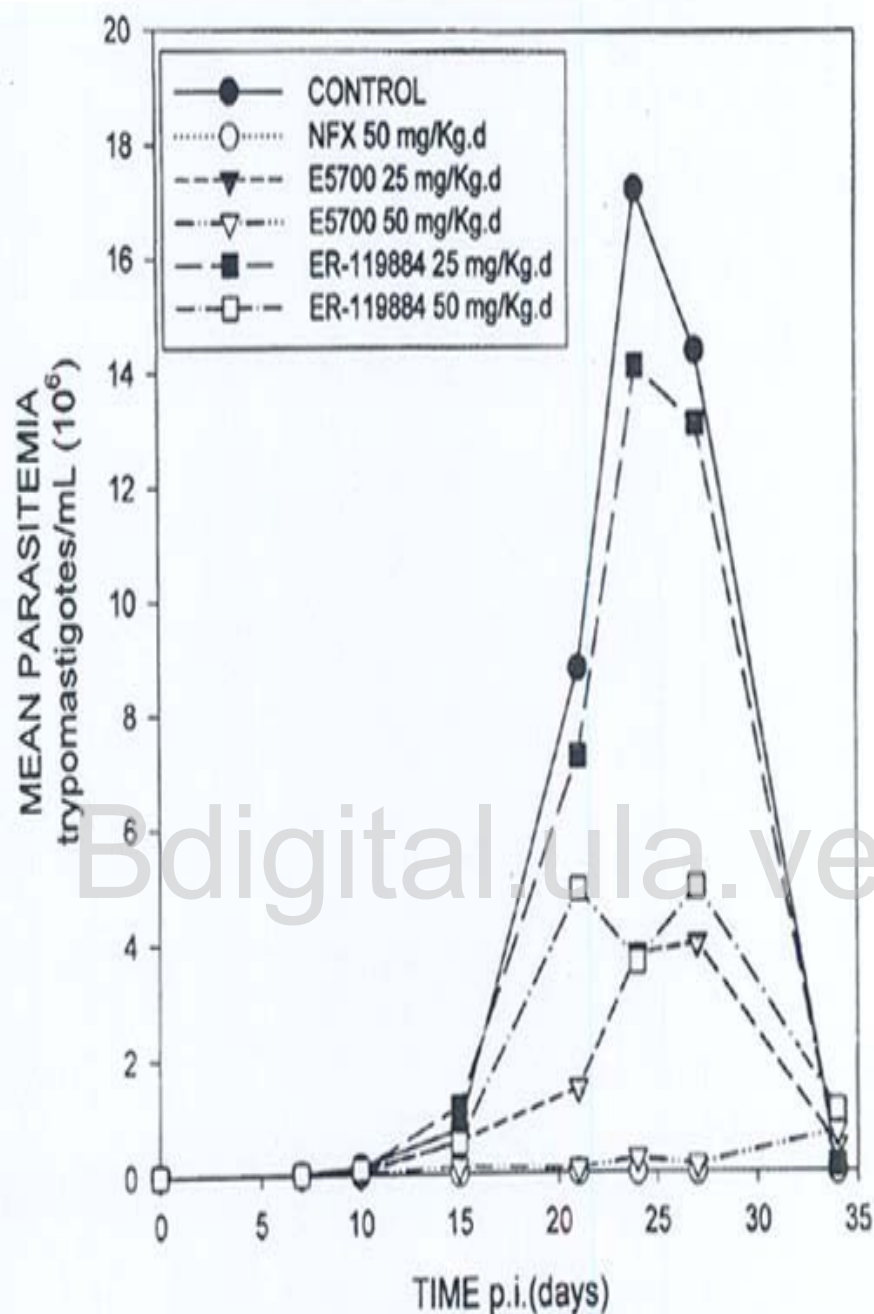


Figura 4.8.7. Efecto de E5700, ER-119884 y nifurimox sobre la parasitemia en modelo murino en fase aguda de la enfermedad de Chagas. Ratones NMRI-IVIC fueron inoculados con 10^5 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Y y un tratamiento oral de 24 horas posterior. Todas las drogas fueron dadas oralmente, a las dosis indicadas, por 30 días consecutivos. Para detalles, ver materiales y métodos.

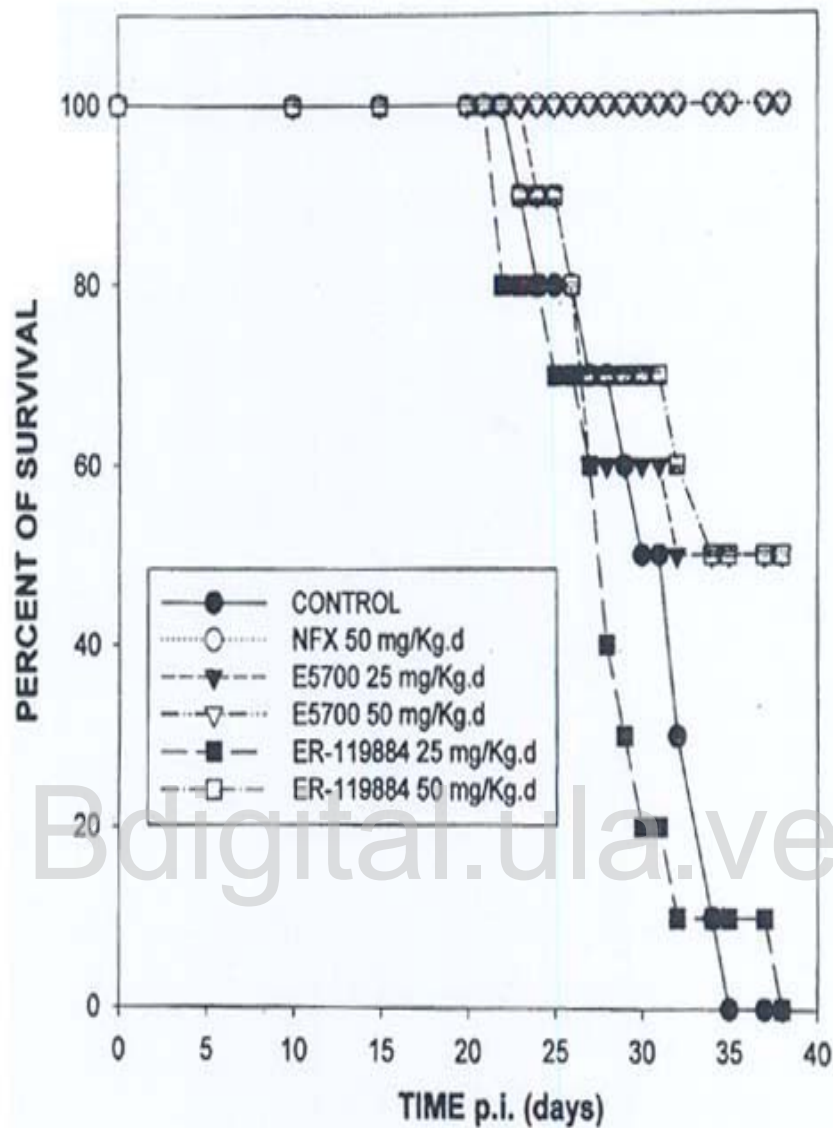


Figura 4.8.8. Efecto de E5700, ER-119884 y nifurtimox sobre la sobre vivencia en un modelo murino en fase aguda de la enfermedad de Chagas. Ratones NMRI-IVIC fueron inoculados con 10^5 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Y y un tratamiento oral de 24 horas después. Todas las drogas fueron dadas oralmente, a las dosis indicadas, por 30 días consecutivos. Los análisis estadísticos usando Logrank (Mantel-Cox), indica que los ensayos tienen diferencias muy significativas ($p < 0.0001$) de sobrevivencia entre los animales controles (no tratados) y los que recibieron E5700 o nifurtimox a 50 mg/Kg.d, con una significancia ($p = 0.04$) diferente con las que recibieron E5700 a 25 mg/Kg.d o ER-119884 a 50 mg/Kg.d, pero ninguna significancia ($p > 0.4$) con las tratadas con ER-119884 a 25 mg/Kg.d. Para mas detalles ver materiales y métodos.

Tabla 4.8.1. actividad inhibitoria de E5700 y ER-119884 sobre la escualeno sintetasa (SQS) de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*^a.

IC ₅₀ (-PPI/+20 μ M PPI, nM)		
COMPOUND	GLYCOSOMAL SQS	MICROSOMAL/ MITOCHONDRIAL SQS
E5700	5.4/0.42	15/0.49
ER-119884	7.2/0.63	5.5/0.99

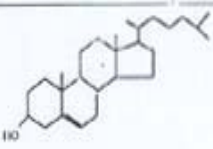
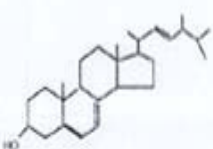
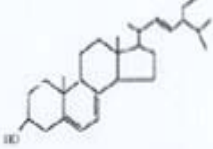
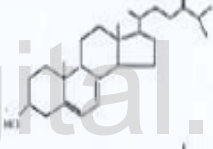
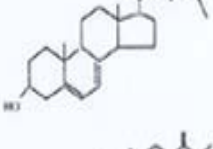
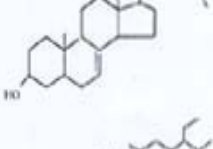
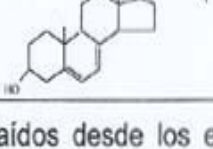
^a Glicosomas altamente purificados y vesículas microsomales/mitocondriales fueron obtenidos desde un homogenato celular preparado por abrasión con carburo de silicio, seguido de una centrifugación e isopícnica (Concepción y col., 1998). La SQS fue ensayada como fue descrita por Tait (1992), en la presencia de 0.1% de Triton X-100, 20 μ M de FPP y 1 mM de NADPH.

Tabla 4.8.2. Constantes de inhibición para E5700 y ER-119884 sobre la escualeno sintetasa (SQS) de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*^a.

Ki (-PPI/+20 μ M PPI, nM)			
COMPOUND	GLYCOSOMAL SQS	MICROSOMAL/ MITOCHONDRIAL SQS	INHIBITION TYPE
E5700	0.75/0.1	0.4/0.1	non-competitive
ER119884	1.48/0.8	1.4/0.7	mixed

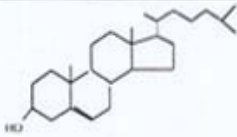
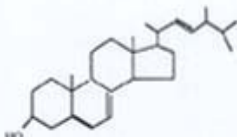
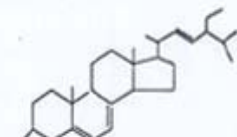
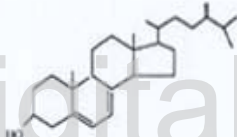
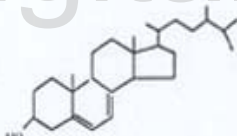
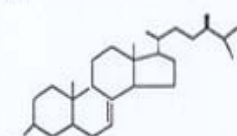
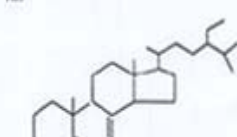
^a Glicosomas altamente purificados y vesículas microsomaes/mitocondriales fueron obtenidos desde un homogenato celular preparado por abrasión con carburo de silicio, seguido de una centrifugación e isopícnica (Concepción y col., 1998). La SQS fue ensayada como fue descrita por Tait (1992), en la presencia de 0.1% de Triton X-100.

Tabla 4.8.3. Esteroles libres y precursores presentes en los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (stock EP) crecidos en la presencia o ausencia de E5700^a.

NAME	STRUCTURE	RETENTION TIME (min)	CONTROL	E5700 10 nM	E5700 20 nM
EXOGENOUS:					
CHOLESTEROL					
ENDOGENOUS:					
24-METHYL-5,7,22-CHOLEST-1,14,19-TRIEN-3β-OH (ERGOSTEROL)					
					
					
					
					
					

^a Los esteroides fueron extraídos desde los epimastigotes de *T. cruzi* cultivados en medio LIT en la presencia o ausencia de E5700 por 120 horas; la droga fue añadida a una densidad de 5×10^4 epimastigotes ml^{-1} . Los esteroides fueron separados de los lípidos polares por una columna de cromatografía de ácido silícico y analizados por un sistema de cromatografía cuantitativa de capilaridad gas-líquido y espectrofotometría de masa. Los resultados son expresados como masa porcentual.

Tabla 4.8.4. Esteroles libres y precursores presentes en los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (stock EP) crecidos en la presencia o ausencia de ER-119884^a.

NAME	STRUCTURE	RETENTION TIME (min)	CONTROL	ER-119884 10 nM	ER-119884 30 nM
EXOGENOUS:					
CHOLESTEROL					
ENDOGENOUS:					
24-METHYL-5,7,22-CHOLESTA-TRIN-3β-OL (ERGOSTEROL)					
					
					
					
					
					

^a Los esteróles fueron extraídos desde los epimastigotes de *T. cruzi* cultivados en medio LIT en la presencia o ausencia de ER-119884 por 120 horas; la droga fue añadida a una densidad de 5×10^4 epimastigotes ml^{-1} . Los esteróles fueron separados de los lípidos polares por una columna de cromatografía de ácido silícico y analizados por un sistema de cromatografía cuantitativa de capilaridad gas-líquido y espectrofotometría de masa. Los resultados son expresados como masa porcentual.

4.9. $\Delta^{24(25)}$ esterol metil transferasa (24-25-SMT) en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y promastigotes de *Leishmania mexicana*: Localización Subcelular y Propiedades Cinéticas.

La (S)-adenosil-L-metionina esterol metil transferasa (EC 2.1.1.41 [SMT]) metila el carbono 24. Esta es una de las reacciones más importantes en la ruta biosintética del ergosterol, por cuanto la misma se da solamente en los organismos que requieren de este rol para la funcionalidad de su membrana. La SMT cataliza este importante paso, y como lo indica su nombre el donador del grupo metilo es el S-adenosil-L-metionina (AdoMet), el cual no está presente en mamíferos. Este compuesto es el donador de grupos metilo más eficiente para la síntesis del ergosterol y fue la primera demostración de que un átomo de carbono podía actuar como aceptor de un grupo metilo (Park y Casey, 1995).

El mecanismo por el cual procede esta reacción es por el doble enlace 24,25 en la cadena lateral del este rol sustrato. Debido a la carga positiva sobre el átomo de azufre del AdoMet, el grupo metilo es añadido electrofílicamente a la posición C24, generándose así un centro electrofílico (carbocatión) en la posición C25. Esta carga parcial positiva es saturada por la migración de un hidruro del C24 a C25, generándose ahora el carbocatión en el C24. La carga positiva es compensada con la pérdida de un protón del metilo entrante y la formación del doble enlace 24,28 (metileno).

Los esteroides que funcionan como sustratos óptimos en la ruta de biosíntesis del ergosterol, dependen del organismo en cuestión. En hongos y tripanosomatídeos el mejor sustrato es el lanosterol, formándose el 24metilendihidrolanosterol. En levaduras, donde ocurre primero las demetilaciones, el sustrato es el zimosterol (colesta-8,24-dien-3 β -ol) y el producto es el fecosterol (ergosta-8,24(28)-dien-3 β -ol) (Urbina y col., 1995).

La ubicación subcelular de esta enzima ha estado sujeta a controversia en los años setenta, sin embargo en levaduras la enzima fue localizada en la fracción microsomal (McCammon y col., 1984; Ator y col., 1989) y en plantas en la fracción microsomal (Nes y col., 1991), también en mamíferos esta enzima fue localizada en microsomas (Chesterton ChJ, 1968).

En este trabajo nosotros determinamos la ubicación subcelular de la SMT en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y además determinamos algunas constantes cinéticas tales como: K_m , V_{max} y K_i .

La actividad de la SMT fue medida de forma similar (Ator y col., 11989). El ensayo estándar contiene: Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5; $KHCO_3$ 30 mM, $MgCl_2$ 5 mM, [metil- C^{14}] SAM (3×10^6 dpm/ μ mol) 50 μ M, lanosterol o demosterol (como sustrato) 200 μ M y las muestras fueron solubilizadas con Tween 80, 0.1 %. Los sustratos fueron preparados como una suspensión acuosa con el detergente no iónico Tritón WR-1339. El volumen final de la reacción fue de 1 ml y se inicia con la adición del SAM, la cual se incubaba a 28°C con agitación por 60 minutos. La reacción se detiene con 1 ml de KOH, 20% en etanol, agregándose además 6 nmoles de [$^3H(N)$]colesterol (2.5×10^6 dpm/ μ mol) en etanol, como estándar interno para cuantificar la eficiencia de extracción de los esteroides. Las muestras fueron extraídas 2x con 2 ml de hexano. El pool de las fases orgánicas se lavan con 1 ml de agua y al final, el solvente se deja evaporar y el residuo se disuelve en 3 ml de líquido de centelleo (Acuasol). La radioactividad presente se cuantifica para los dos isótopos 3H y ^{14}C . La recuperación del [3H]-colesterol se calcula para cada muestra y se usa para normalizar los cpm de los productos marcados con ^{14}C para un 100% de eficiencia de extracción.

Preliminarmente, en las fracciones microsomal y glicosomal, se determinaron los tiempos óptimos para los ensayos, así como la actividad en función de la cantidad de enzima. En tal sentido, se encontró un tiempo de 60 min y una dependencia lineal con la cantidad de proteína (100 μ g) en los ensayos. Después de estos resultados se determinaron los K_m y V_{max} , variando uno de los sustratos y manteniendo otro a concentraciones saturantes, además se determinaron constantes de inhibición (K_i) haciendo preincubaciones de 10 min con el inhibidor azasterol (0.3 a 30 μ M) y como control se utilizaron ensayos con dimetilsulfoxido (DMSO) sólo a la concentración obtenida en presencia de las drogas.

Los epimastigotes rotos por abrasión fueron fraccionados por centrifugación diferencial y por ultracentrifugación isopícnica en un gradiente lineal de sacarosa (Concepción y col., 1998). Los resultados de estos fraccionamientos son presentados en las Fig. 17 y 18 (dos experimentos independientes fueron realizados con resultados iguales). En la Fig. 17 se

puede observar que el grueso de la SMT está asociado con la fracción granular pequeña, al igual que las enzimas marcadoras del glicosoma (HK y PEPCK). Los resultados del gradiente de sacarosa (centrifugación isopícnica) (Fig. 18) indican que la mayoría de la banda con actividad SMT está a la misma densidad que los marcadores glicosomales a una densidad de 1.239 cm^{-3} y un componente menor en una banda que corresponde a microsomas (glucosa-6-fosfatasa). Ninguna actividad fue asociada con marcadores mitocondriales, succinato deshidrogenasa. Tomando en cuenta la latencia de los marcadores de los glicosomas (92% para los experimentos mostrados en la Fig. 17), el 65% de la actividad SMT estaría asociada a los glicosomas y el resto 35% con la fracción microsomal. La SMT parece ser una enzima asociada a membrana y muy posiblemente sea una proteína integral de membrana, ya que en los experimentos de separación de fases con Tritón X-114 a 30°C , toda la enzima está presente en la fase rica en detergente. Para demostrar que la enzima SMT no es soluble, nosotros permeabilizamos epimastigotes de *T. cruzi* con concentraciones crecientes de digitonina, siguiendo la liberación de la SMT y enzimas marcadoras de glicosoma y mitocondria (malato deshidrogenasa [MDH], marcador dual) y de retículo endoplásmico (glucosa-6-fosfatasa [G-6-fosfatasaD como una función de la concentración del detergente. Como puede verse en la Fig. 19, no hubo liberación de la SMT desde células intactas en función de la concentración del detergente, lo cual era de esperar si se trata de una enzima integral de membrana, mientras que para la MDH se observó una curva bifásica debido a su doble localización subcelular (glicosoma y mitocondria), también hubo liberación de la G-6-P a concentraciones mayores del detergente. Este resultado demuestra claramente que la SMT en *T. cruzi* es una proteína integral de membrana *in vivo*.

Tabla 4.9.1. Constantes cinéticas de la (S)-adenosil-L-metionina: $\Delta^{24,25}$ esterol metil transferasa de glicosomas y microsomas de *Leishmania mexicana*.

Glicosomas			Microsomas		
	$K_m(\mu M)$	V_m (pM)	$k_i(\mu M)$ azasterol	$K_m(\mu M)$	V_m (pM)
AdeMet	40	125	1	33	119
Demosterol	37	83	0.15	45	78

Una investigación cinética de la actividad SMT asociada con los glicosomas altamente purificados (obtenidos por centrifugación diferencial y por dos gradientes lineales de sacarosa sucesivamente), como ha sido descrita en materiales y métodos de la publicación 5. También se hicieron cinéticas con la fracción microsomal (sedimento de la centrifugación diferencial a $105.000 \times 9 \times 2$ horas). Antes de realizar las cinéticas, hicimos algunos experimentos preliminares (no mostrados), donde demostramos que la actividad de la enzima SMT fue lineal con respecto a las proteínas totales del glicosoma y microsomas al menos hasta 0.6 mg/ml ; y en los experimentos subsiguientes, usamos una concentración de 0.1 mg/ml de proteína glicosomal o microsomal.

La enzima parcialmente purificada fue caracterizada desde el punto de vista cinético, usando demosterol (colesta-5,24-dien-3 β -01) como sustrato y colocando las concentraciones de cosustrato constante (S-adenosil-metionina, AdoMet) $100 \mu M$, para diferentes concentraciones del inhibidor de la SMT 22,26-azasterol (Fig. 20). Los valores calculados de $V_{m,app}$ y $K_{m,app}$ fueron $6.7 \text{ nmoles/min.mg proteína}$ y $17.2 \mu M$, respectivamente. El efecto de la inhibición fue puramente competitivo, con un $K_{ij} = 30 \text{ nM}$ (Fig. 20). Cuando el análisis fue realizado usando el sustrato AdoMet variable (colocando las concentraciones de demosterol fijas a $100 \mu M$), los valores correspondientes para la $V_{m,app}$ y $K_{m,app}$ fueron $5 \text{ nmoles/min.mg proteína}$ y $33.3 \mu M$ respectivamente. En este caso el inhibidor se comportó como puramente no-competitivo con un $K_{is} = 140 \text{ nM}$ (Fig. 21). Estos valores de constantes cinéticas están de acuerdo con los órdenes de magnitud reportados para la enzima SMT en *S. cerevisiae* (Nes y col., 1997; Venkatramesh y col., 1996).

Estudios similares han sido hechos en promastigotes de *Leishmania mexicana*, incluyendo la enzima marcadora piruvato fosfato dikinasa, una enzima dependiente de pirofosfato descrita recientemente en tripanosomatídeos con una localización exclusivamente glicosomal (Bringaud y col., 1998). Los resultados de las Figuras 22 y 23, claramente indican que la SMT es también una enzima glibosomal en *Leishmania*. Los resultados cinéticos ($K_{m,app}$, $V_{m,app}$ y K_{ij}) fueron muy similares a los encontrados para la enzima SMT en epimastigotes de *T. cruzi* (Fig. 24 y 25; Tabla 4).

En conclusión, este es el primer reporte sobre localización subcelular y de las propiedades cinéticas de la enzima SMT en organismos kinetoplastídeos. Además, estos resultados son consistentes con una enzima SMT integral de membrana en glicosomas y microsomas de acuerdo a los resultados obtenidos con Tritón X-114 y digitonina (Nes y col., 1997; Venkatramesh y col., 1996).

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

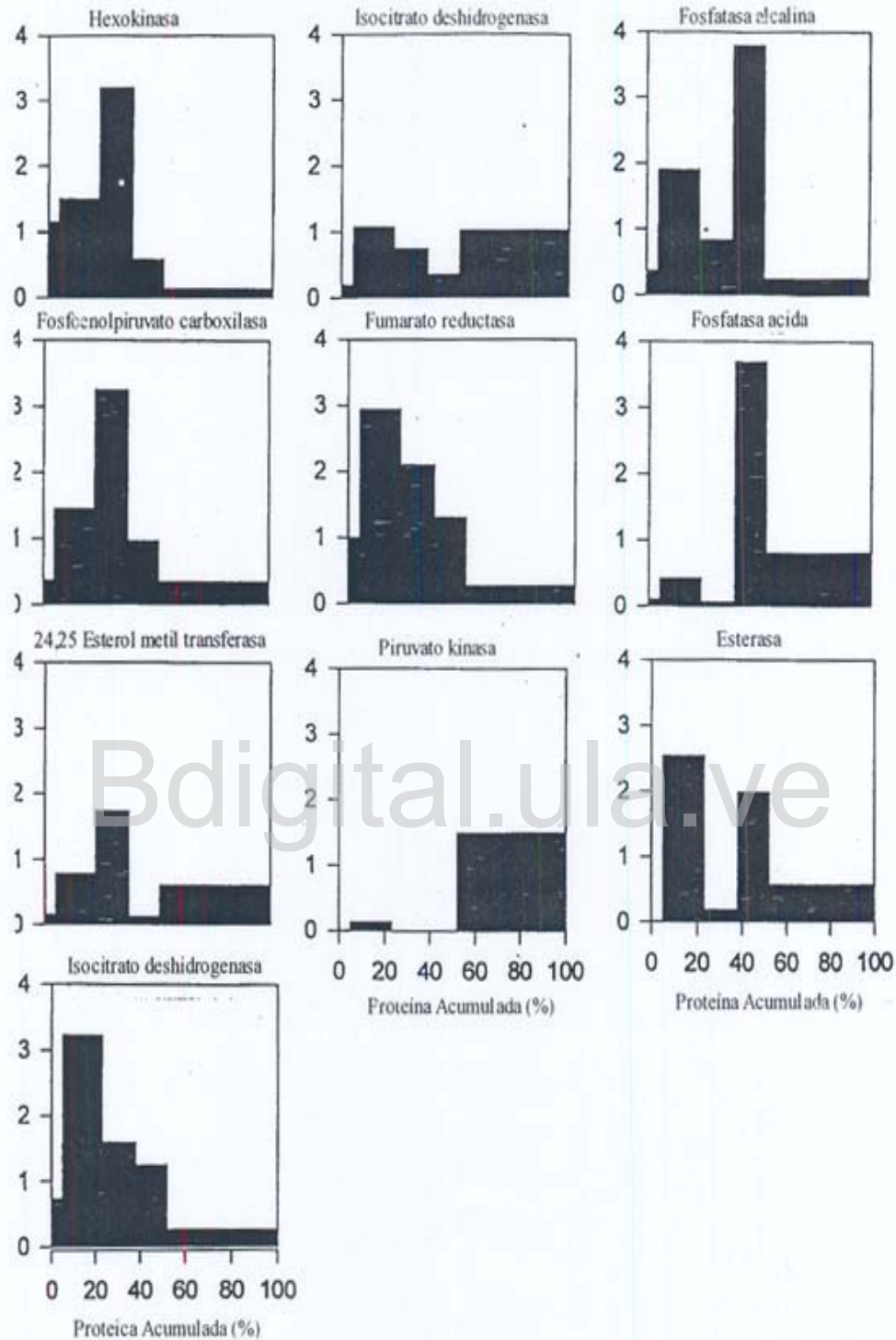


Figura 4.9.1. Centrifugación diferencial de epimastigotes de *T. cruzi*. Ubicación subcelular de la (S)-adenosil-L-metionina esterol metil transferasa

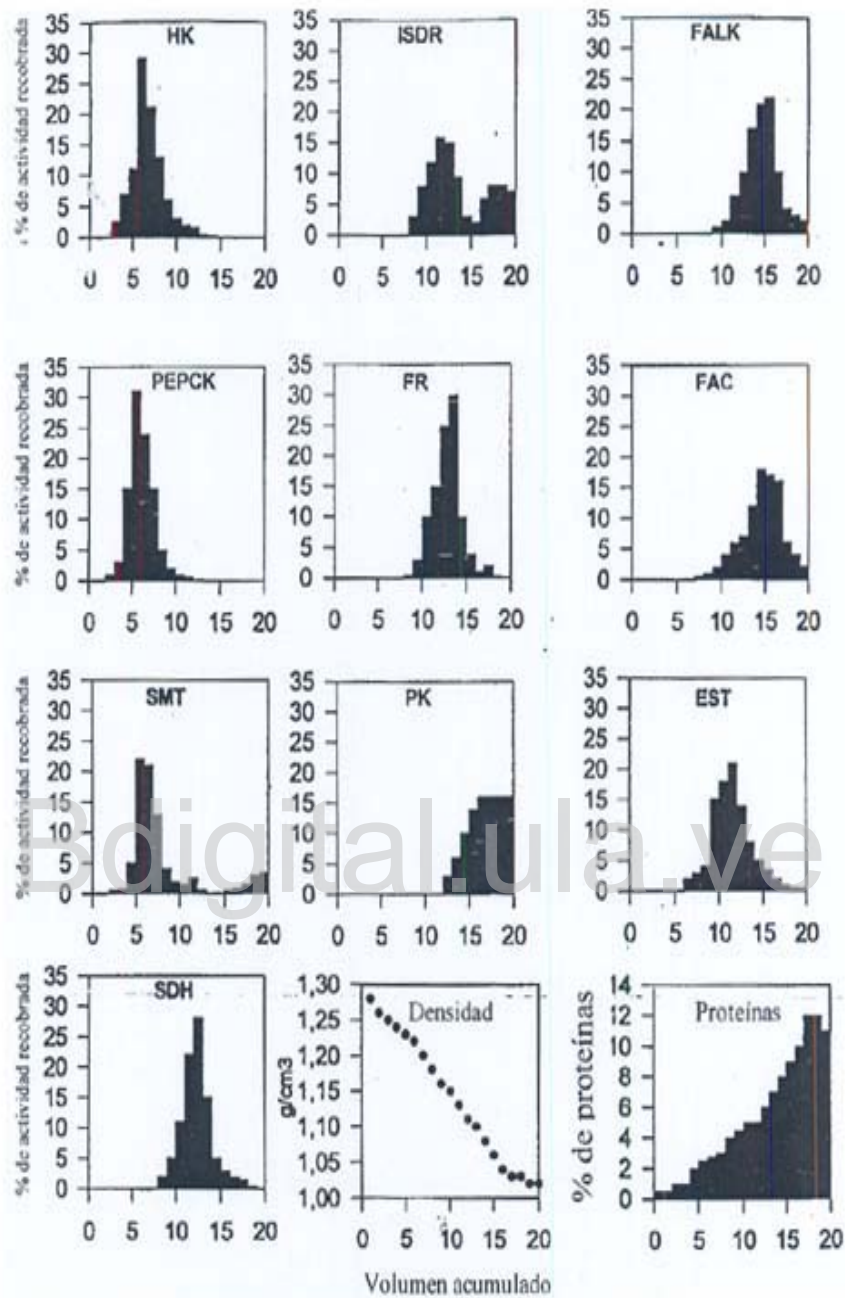


Figura 4.9.2. Centrifugación isopícnica de una fracción post-nuclear de epimastigotes de *T. cruzi*. Ubicación subcelular de la (S)-adenosil-L-metionina esteroil metil transferasa (SMT), Hexokinasa (HK), Fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK), succinato deshidrogenasa (SDH), Isocitrato deshidrogenasa (ISDH), Fumarato reductasa (FR), Piruvato kinasa (PK), Fosfatasa alcalina (FALK), Fosfatasa ácida (FAC), y Esterasa (EST).

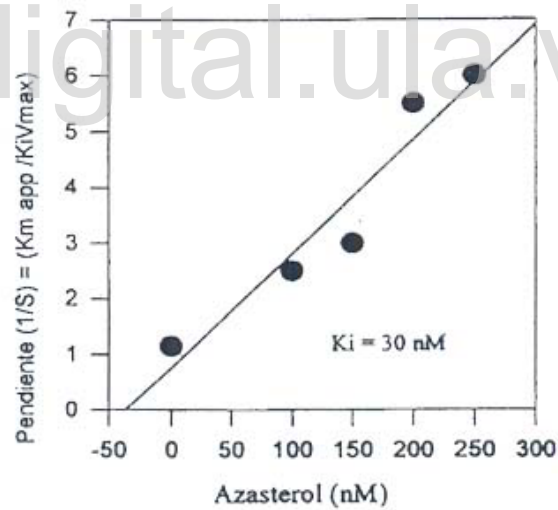
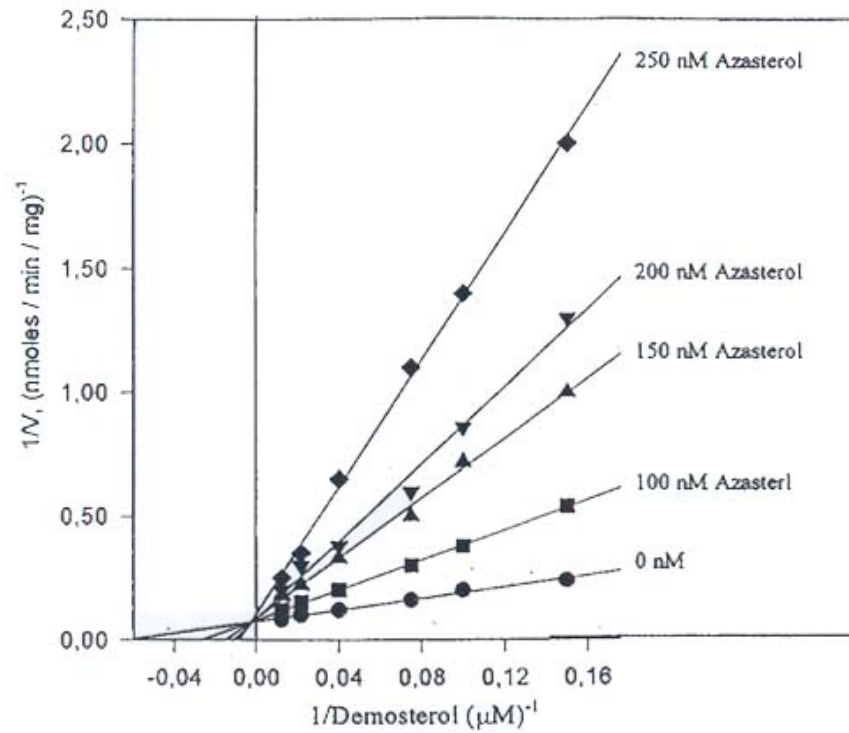


Figura 4.9.3. Cinética de inhibición (S)-adenosil-L-metionina esterol meti transferasa de glicosomas de *T. cruzi*. La concentración de AdoMet fue de 50 μM .

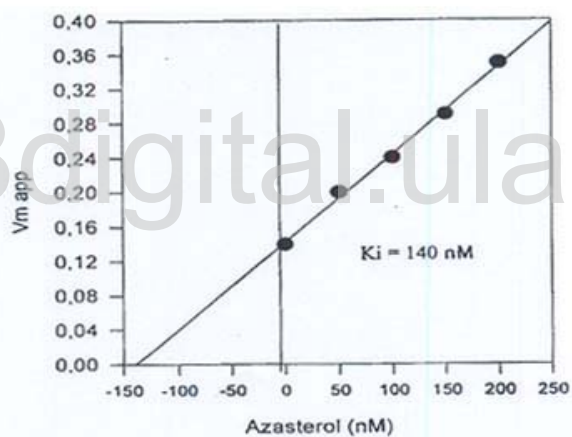
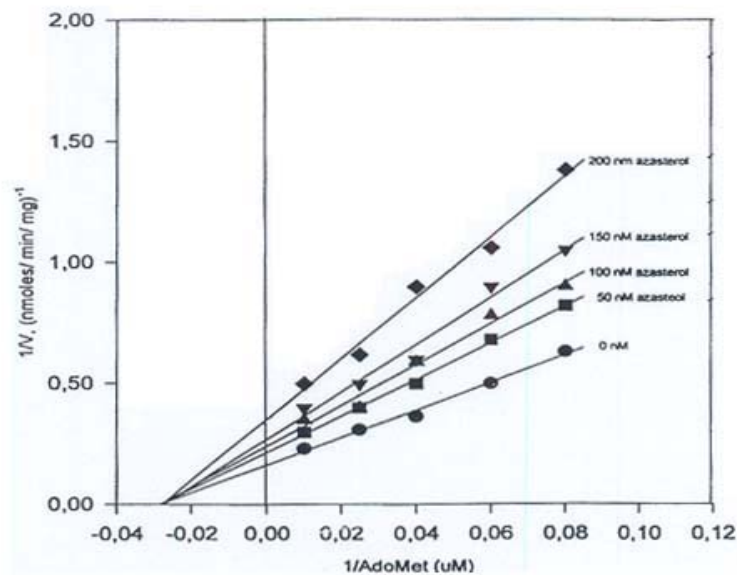


Figura 4.9.4. Cinética de inhibición de la (S)-adenosil-L-metionina esterol metil transferasa de glicosomas de *T. cruzi*. La concentración de demosterol fue de $80 \mu\text{M}$.

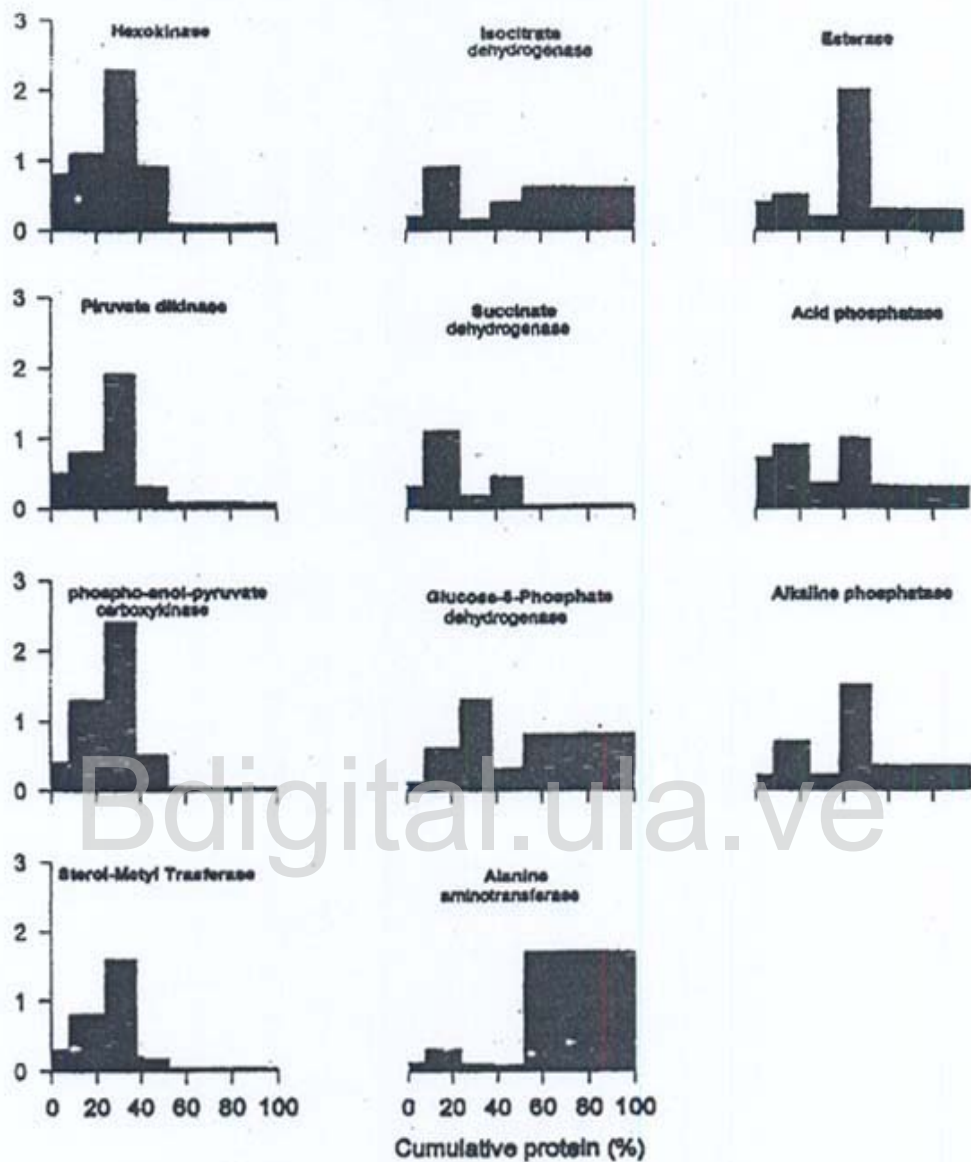


Figura 4.9.5. Centrifugación deisferencial de promastigotes de *L. mexicana*. Ubicación subcelular de la (S)-adenosil-L-metionina esterol metil trasferasa.

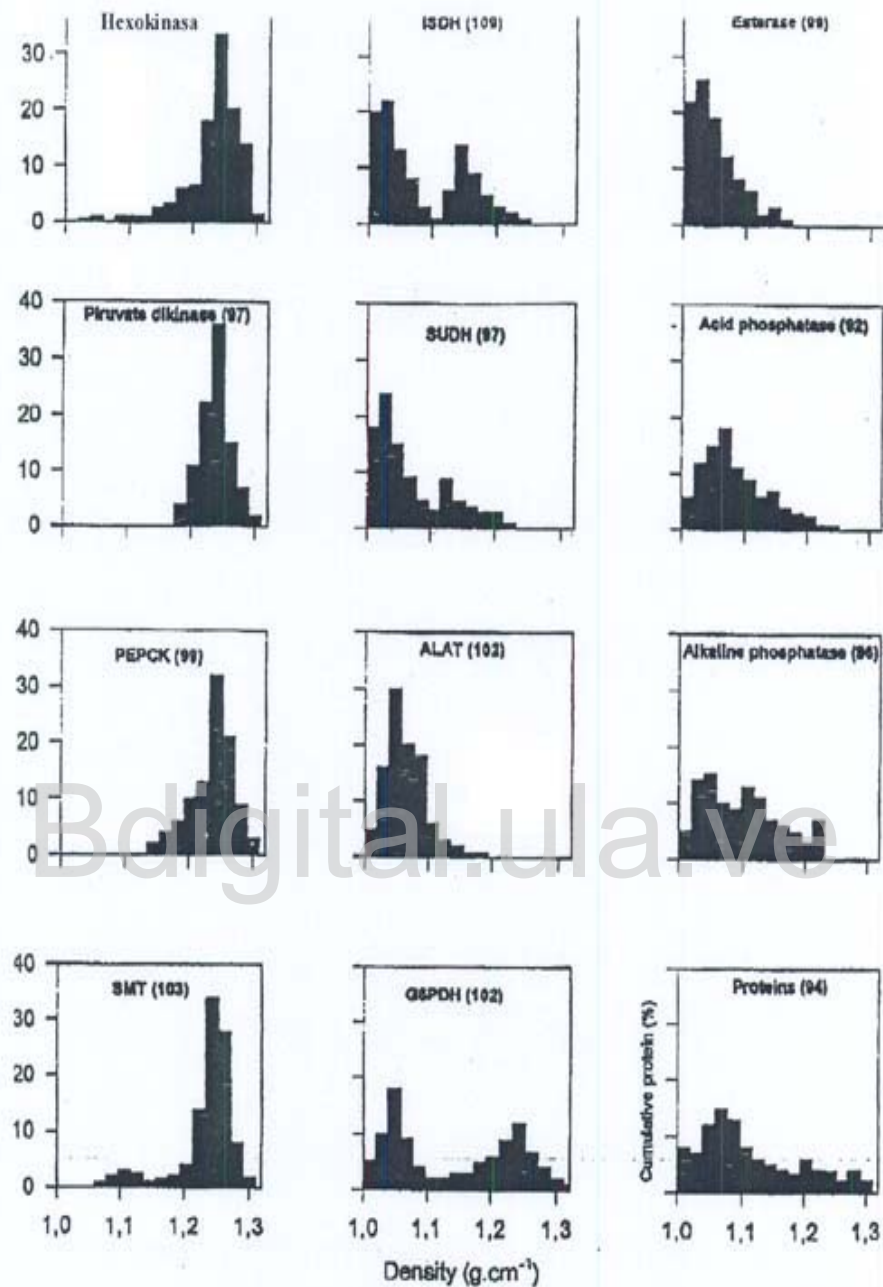
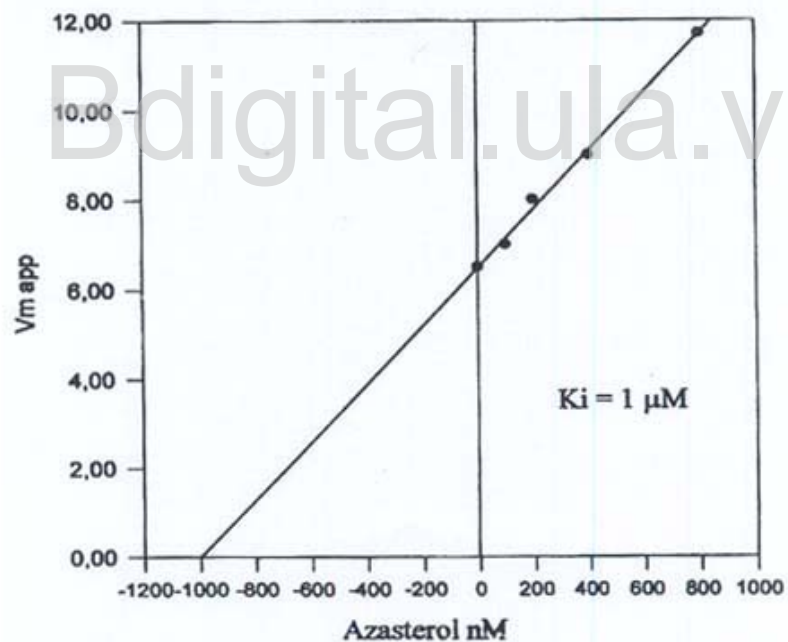
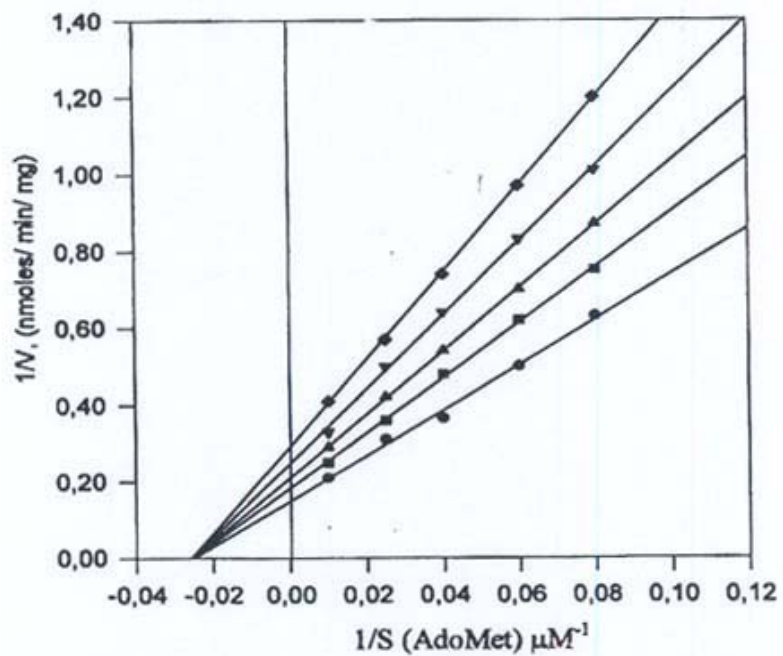
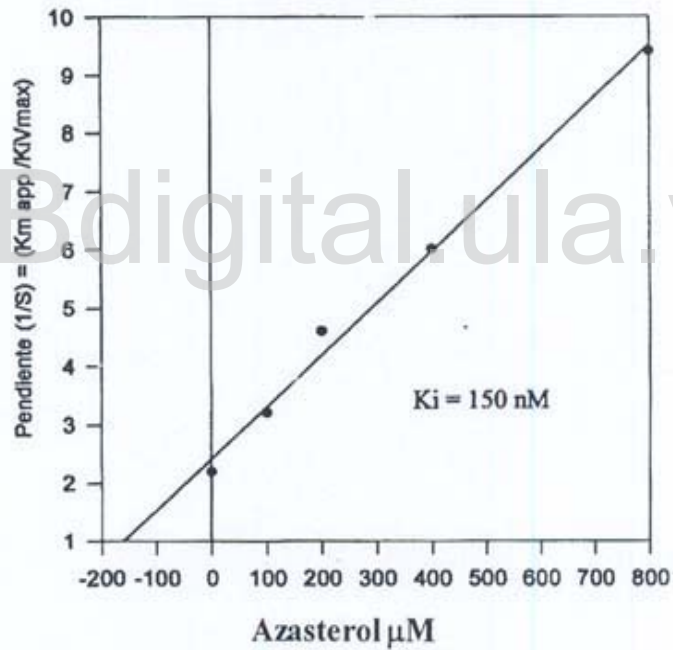
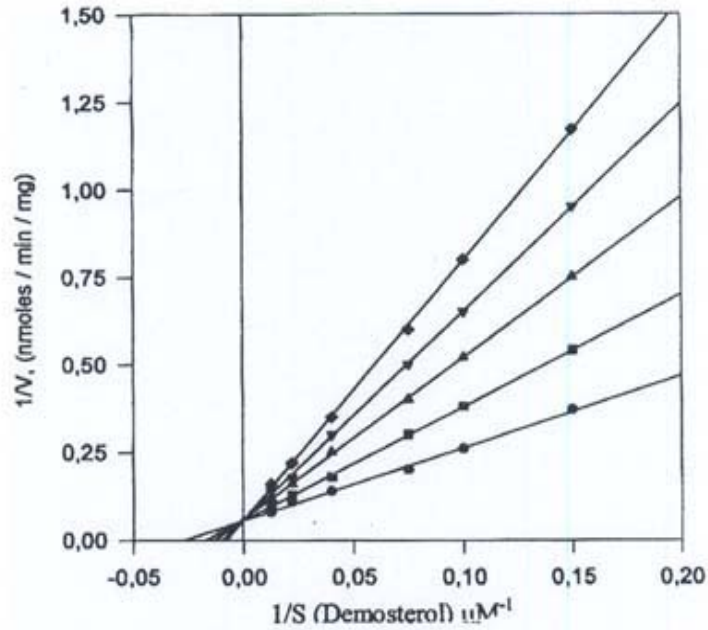


Figura 4.9.6. Centrifugación isopícnica de una fracción post-nuclear de promastigotes de *L. mexicana*. Ubicación subcelular de la (S)-adenosil-L-metionina esterol metil transferasa (SMT), Hexokinasa (HK), Fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK), Succinato deshidrogenasa (SDH), Isocitrato deshidrogenasa (ISDH), Alanina aminotransferasa (ALAT), Piruvato kinasa (PK), Fosfatasa alcalina (FALK), Fosfatasa ácida (FAC), Esterasa (EST), Glucosa-6-fosfatasa deshidrogenasa (G6PDH).



4.9.7. Cinética de inhibición (S)-adenosil-L-metionina esterolmetil transferasa de glicosoma de *L. mexicana*. La concentración de demosterol fue de $100 \mu\text{M}$.



4.9.8. Cinética de inhibición (S)-adenosil-L-metionina esterolmetil transferasa de glicosoma de *L. mexicana*. La concentración de AdoMet fue de 50 μM .

5. GLICOSOMAS (PEROXISOMAS): MODELO DE LA COMPARTIMENTALIZACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO (GLICOLISIS) y DE RUTAS DE BIOSÍNTESIS.

El género *Trypanosoma* y *Leishmania* son un grupo de parásitos protozoarios de gran importancia médica y veterinaria, siendo algunos de ellos patógenos para el humano. Estos parásitos compartimentalizan enzimas claves en una organela perteneciente a la familia de los microcuerpos denominada glicosomas, siendo esto una especialidad única de los kinetoplastidos. El glicosoma en conjunto podría ser valido como un blanco quimioterapéutico, debido a que en esta organela se llevan a cabo rutas importantes de oxidación de la glucosa (glucólisis, pentosas fosfatos) y ácidos grasos (β -oxidación); y rutas de biosíntesis fundamentales para la sobrevivencia de los parásitos, tales como: éter lípidos, purinas, pirimidinas, isoprenoides y muy probablemente de esteroides (Concepción y col., 1998; Michels y col., 2000; Parson y col., 2001; Urbina y col., 2002; Hannaert y col., 2003).

A través de experimentos de "knock-out" para algunas proteínas involucradas en la maquinaria de importación (PEX) de proteínas a los glicosomas en *T. brucei* y *Leishmania*, han mostrado que todas esas mutaciones son nulas, es decir que los mutantes para los genes PEX, no son viables para ninguno de los de tripanosomatidos (Flaspohler y col., 1997; Lorenz y col., 1998). Estos datos son contundentes con la naturaleza esencial de la compartimentalización de enzimas en los glicosomas para la supervivencia de estos parásitos. Además, se ha podido evidenciar por genética reversa, por ejemplo con RNAi para algunas enzimas glucolíticas en *T. brucei* (PK) que la glucosa es la fuente esencial de energía y carbono para sustentar el crecimiento de los parásitos (Coustou y col., 2003). Desdichadamente esta tecnología no ha podido ser aplicada a *Leishmania pp* (Robinson y Beverley, 2003) y *T. cruzi* (Ngo y col., 1998), ya que los RNAi no han mostrado ser operativos en estos parásitos. Sin embargo, para el estudio del metabolismo de carbohidratos, las formas procíclicas de *T. brucei* podrían constituir un buen modelo de referencia general, que permitirá hacer comparaciones de estas células con las de otros tripanosomatidos.

Hasta los actuales momentos se ha propuesto que en el glicosoma hay un balance neto de energía y redox igual a cero (Oppenheimer, 1987; Hannaert y col., 2003), es decir que en esta organela se genera únicamente el ATP y NAD⁺ suficiente como para que pueda haber glicólisis. Con esta conclusión es obviamente inevitable hacerse las siguientes preguntas: (1) ¿Cómo se puede mantener el balance de energía y redox dentro del glicosoma, considerando los posibles puntos de bifurcación de la glucosa y en especial del PEP, pues la glucosa-6-fosfato puede ser sustrato de la glicólisis y de la vía de las pentosas fosfato y el PEP sustrato en el citosol de ambas piruvato kinasa (PK) y fosfoeno/piruvato mutasa (PEPM); y dentro del glicosoma de la fosfoeno/piruvato carboxikinasa (PEPCK), piruvatofosfato dikinasa (PPOK)? (2) Considerando la pregunta anterior, ¿puede mantenerse un balance de energía en el glicosoma sin una PGKA o C funcionalmente activa? (3) La mayoría de las rutas de biosíntesis (mencionadas anteriormente) en el glicosoma producen PPi y es sabido que este metabolito libre y en ciertas cantidades es tóxico para la célula. ¿Tiene el glicosoma enzimas capaces de eliminar eficientemente el PPi libre y obtener energía de a partir de éste? (4) ¿Puede el PPi ejercer algún efecto regulatorio sobre algunas enzimas claves (PEPCK, HK, PFK, PGKA o C) para regular el flujo metabólico? (5) ¿Cómo pueden llevarse a cabo en los glicosomas las diversas rutas de biosíntesis (especialmente isoprenoides [Fig. 9]), a expensas de la glicólisis, si todas ellas demandan grandes cantidades de ATP y NADPH?; asumiendo que la membrana de los glicosomas es impermeable a los sustratos ATP, NAD⁺, NADP⁺ y otros compuestos fosforilados (intermediarios de la glicólisis). (6) ¿Es la glucosa la principal fuente de energía y carbono para sustentar el crecimiento de *T. cruzi* o son los aminoácidos los que juegan un papel igualo más importante que la glucosa?

Nosotros proponemos un modelo que trata de responder parte de las interrogantes arriba mencionadas (Fig. 26). La primera consideración es que los glicosomas (peroxisomas) son una organela para realizar biosíntesis y por tal razón es necesario que haya ATP y NADPH disponible intraglicosomal. El ATP y el NADP⁺ pueden provenir desde ruta(s) que hay en la organela (glicólisis y pentosas fosfato) o bien por que hay algún transportador de ATP a nivel de la membrana del glicosoma. La membrana del glicosoma aparentemente es impermeable a compuestos como el ATP y NADPH, ya que enzimas como la

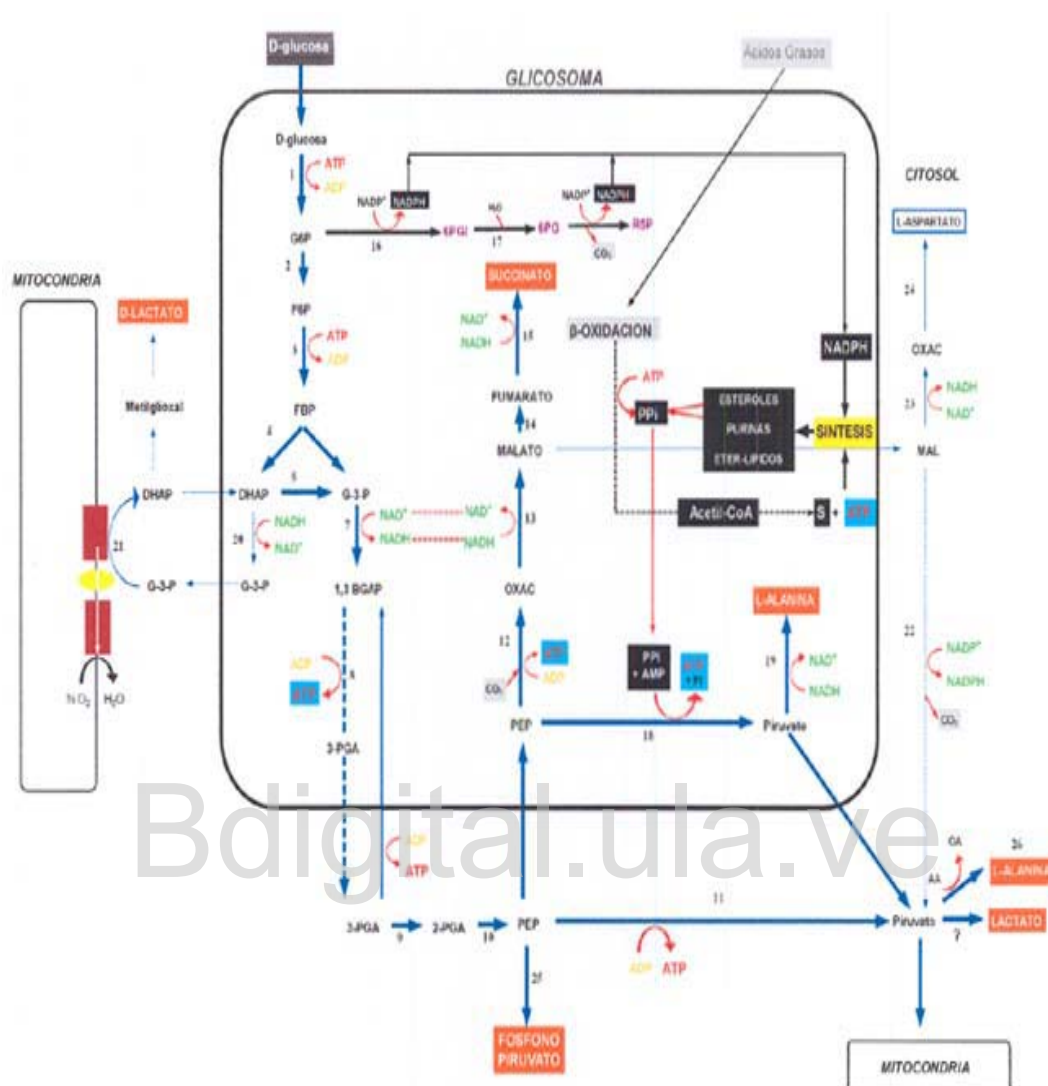


Figura 5.1. Compartimentalización de metabolismo energético y rutas de síntesis en los glicosomas de *T. cruzi*. Enzimas: 1, hexokinasa; 2, fosfoglucosa isomerasa; 3, fosfofrutokinasa; 4, aldolasa; 5, triosafosfato isomerasa; 7, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; 8, fosfoglicerato quinasa; 9, fosfoglicerato mutasa; 10, enolasa; 11, piruvato quinasa; 12, fosfoenolpiruvato carboxikinasa; 13, L-malato deshidrogenasa; 14, fumarasa; 15, fumarato reductasa; 16, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 17, gluconato-6-fosfato deshidrogenasa; 18, piruvato fosfato dikinasa; 19, alanina deshidrogenasa; 20, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; 21, glicerol-3-fosfato oxidasa; 22, enzima malica; 23, L-malato deshidrogenasa; 24, aspartato-amino transferasa; 25, fosfonopiruvato mutasa; 26, alanina-amino transferasa.

HK y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (y muchas otras) presentan alta latencia en glicosomas purificados o incluso cuando la membrana plasmática de los parásitos es permeabilizada con digitonina, manteniendo intacta la membrana del glicosoma. Estas evidencias, en conjunto con el hecho de que existan enzimas auxiliares (PEPCK, MDH, F, FMR y GPDH) en los glicosomas para mantener una glicólisis activa, estarían en favor de la hipótesis de que la membrana es impermeable a estos compuestos. Entonces sí la membrana del glicosoma es impermeable a NADPH y A TP, no es suficiente con la enzima PEPCK para producir A TP en el glicosoma, ya que aún entrando al glicosoma todo el PEP generado por la enolasa en el citosol, sólo sería suficiente para fosforilar los primeros pasos de la glicólisis y no habría A TP extra para que puedan operar las rutas de biosíntesis. Sin embargo, si todo el 1,3-bifosfoglicerato pasa a través de la PGKA o C, se podría regenerar todo el A TP gastado al inicio de la glicólisis y el PEP que entre al glicosoma sería utilizado para producir A TP a nivel de PEPCK o PPDK; el A TP extra podría ser utilizado por las rutas de biosíntesis presentes en los glicosomas. En este caso la PGKB en el citosol tendría un papel marginal en la glicólisis y más bien estaría jugando un papel fundamental en una posible gluconeogénesis, ya que en este paso se evitaría consumir A TP dentro del glicosoma. Igualmente, el hecho de que todo el 1,3-bifosfoglicerato pase a través de la PGKA o C, permite contestar parte de las preguntas, por ejemplo, si una parte de la glucosa-6-fosfato es destinada a la ruta de las pentosas fosfato o si una parte del PEP es utilizado por la PK o por la PEPK, no se crearía ningún desequilibrio en los niveles de A TP para realizar glicólisis y biosíntesis.

El balance redox puede mantenerse dentro del glicosoma, únicamente entrando el 50% del PEP producido por la enolasa, considerando que se consumen dos moles de NAD^+ por mol de glucosa a nivel de la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa y se producen dos moles de NAD^+ por mol de PEP que entra al glicosoma a nivel de las enzimas malato deshidrogenasa y fumarato reductasa. Si parte del PEP que entra al glicosoma fuese utilizado por la PPDK se produciría A TP y piruvato. El piruvato podría ser utilizado por la alanina deshidrogenasa glicosomal y de esa manera se regenera parte del NAD^+ y si además está funcionando la glicerol fosfato deshidrogenasa acoplada al sistema glicerol fosfato oxidasa se estaría regenerando más NAD^+ , el cual

podría ser utilizado por algunas enzimas de la ruta de esteroides. Asimismo, este sistema también permite eliminar y al mismo tiempo aprovechar el PPI generado por las rutas de biosíntesis (éter lípidos, purinas, pirimidinas, isoprenoides) y por la (3-oxidación (durante la activación de los ácidos grasos) para producir ATP dentro del glicosoma, regenerando parte del ATP invertido en la biosíntesis.

Nosotros tenemos algunas evidencias de que el PPI a ciertas concentraciones fisiológicas puede inhibir algunas enzimas del glicosoma (HK, PGKs, PEPCK) y en el citosol (enolasa y PK). Estos resultados son muy importantes, ya que niveles altos de PPI intraglicosomal, significarían una disminución en el flujo glicolítico y el PEP que entre al glicosoma sería utilizado por la PPOK, enzima que estaría haciendo el papel de pirofosfatasa inorgánica. Cuando los niveles de PPI en el citosol son altos (liberado desde los acidocalcisomas), la actividad de la PK podría verse afectada (inhibida en el orden de μM), lo cual permitiría direccionar todo el PEP hacia el glicosoma. Esto permitiría que pueda haber mayor biosíntesis en el glicosoma, puesto que todo el PEP estaría disponible en el glicosoma.

En las formas epimastigotes de *T. cruzi*, promastigotes de *Leishmania mexicana* y procíclicos de *T. brucei* ocurre una fermentación aeróbica de la glucosa, excretando al medio principalmente durante la primera fase del crecimiento ácidos y aminoácidos provenientes de la glucosa: succinato, acetato y alanina. Hasta hace cuatro años se pensaba que el succinato era producido a nivel del ciclo de Krebs, el cual provenía del malato desde el glicosoma y entraba a la mitocondria haciendo un ciclo inverso hasta la succinato deshidrogenasa, no obstante ya se sabe que el succinato es producido en los glicosomas por la fumarato reductasa soluble dependiente de NADH (FRO), de hecho se ha demostrado que el 60% de la glucosa (marcada radiactivamente) consumida, es excretada como succinato vía FRD glicosomal por los procíclicos de *T. brucei* (Besterio y col., 2002). Este un fenómeno conocido como fermentación succínica permite direccionar el PEP en varios compartimientos garantizando un balance redox, como por ejemplo en *Ascaris suum* (Kiyoshi y col., 2001). También se ha demostrado por marcaje de la glucosa que el acetato es producido en la mitocondria, es decir el piruvato es convertido a acetil-CoA y este a su vez en acetato por la acetato: succinato-

CoA mitocondrial y por consiguiente generando ATP por la succinil-CoA sintetasa mitocondrial (Van Hellmond y col., 1998). La alanina podría ser producida por la alanina deshidrogenasa glicosómica, a partir del piruvato formado por la acción de la PPDK y excretada posteriormente al medio de cultivo, de hecho está bien documentado que la excreción de este aminoácido ocurre hasta que la glucosa se agota en el medio de cultivo (Cazzulo y col., 1988).

Recientemente se ha demostrado por RNAi que la PK en los procíclicos de *T. brucei* es absolutamente necesaria para la viabilidad celular, lo cual indicaría que el ATP producido a nivel de esta enzima y el piruvato, son necesarios para que los parásitos puedan sostener un crecimiento. En contraste se ha observado que el ATP glicosomal producido por las enzimas PPDK y PEPCK, no es esencial para la viabilidad de los trypanosomas procíclicos (Coustou y col., 2003). Usando β -mercaptopicolinico, un inhibidor específico de la PEPCK en epimastigotes de *T. cruzi*, se encontró que el consumo de glucosa no disminuyó y la viabilidad de los parásitos no fue afectada (Urbina y col., 1994). Estos resultados estarían apoyando nuestra hipótesis de que el ATP glicosomal se produce principalmente a nivel de la PGKA o C. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que en los glicosomas haya un intercambio reducido de intermediarios glicolíticos con otros compartimientos subcelulares y que ellos puedan ser (AMP, ADP y ATP) y NAD⁺/NADH (Michels y col., 2000; Urbina y col., 1994). En nuestro laboratorio trabajando con glicosomas aislados y con células permeabilizadas con digitonina para medir el consumo de glucosa en los epimastigotes de *T. cruzi*, hemos observado que el consumo de ese azúcar depende absolutamente de la presencia de ADP extra glicosomal o celular. Estos resultados podrían estar apoyando la posibilidad de un intercambio de nucleótidos entre los glicosomas y otros compartimientos subcelulares.

Urbina (1994), ha encontrado que los epimastigotes de *T. cruzi* pueden crecer entre dos y tres veces más en número de células después que la glucosa ha sido agotada y observó una excreción de amonio y un incremento concomitante en la actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺, enzima indicadora del consumo de aminoácidos. Urbina (1994), propone que estos resultados estarían indicando que la principal fuente de energía y

carbonos para sustentar el crecimiento de estos parásitos son los aminoácidos y que además, las forma predominantemente encontradas en el hospedador vertebrado, los amastigotes, los cuales están principalmente en el citosol de las células, donde los aminoácidos están más disponibles que la glucosa. Sin embargo, no es fácil explicar cómo pueden haber rutas de biosíntesis en los parásitos, si no hay glucosa-6-fosfato para alimentar a la ruta de las pentosas fosfato y producir NADPH, bien sea en el citosol o en los glicosomas, ya que como se mencionó antes aloja importantes rutas de biosíntesis (a menos que haya una transhidrogenasa capaz de transformar NADH/NADPH, sin embargo, nosotros no hemos podido determinar ninguna actividad en los glicosomas). Una posibilidad es que se produzca piruvato a partir de la oxidación de los aminoácidos y a través de la enzima málica (citósólica), el piruvato es catalizado a malato (Urbina, 1994). El malato entra al glicosoma y a través de la malato deshidrogenasa y de la PEPCK se produce PEP, ya partir del PEP se puede hacer gluconeogénesis (con una PK inhibida, es decir regulada) y por lo tanto glucosa-6-fosfato. Sin embargo, no hay manera específica de explicar de dónde saldría el NADH y el A TP necesario para convertir el malato en PEP, a menos que haya un intercambio de estos compuestos con otros compartimientos, bien sea por un sistema específico de transporte o que la membrana del glicosoma sea permeable a ellos. No obstante, una posibilidad podría ser el sistema lanzadera de la dihidroxiacetona fosfato glicerol-3-fosfato por medio de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y del sistema glicerol fosfato oxidasa (mitocondria), que permita regenerar el NAD^+ utilizado por la malato deshidrogenasa (Concepción y col., 2001). Parte del glicerol-3-fosfato producido podría convertirse en glicerol por medio de la glicerol kinasa y regenerar el A TP gastado en la PEPCK.

En contraposición de un metabolismo basado únicamente en aminoácidos para *T. cruzi* como fuente de energía y carbono, podría ser la biosíntesis de esteroides y fosfolípidos, ya que recientemente se ha demostrado que un 92% de estas biosíntesis están basadas en acetato proveniente de piruvato glicolítico o del acetyl-CoA de (3-oxidación y sólo un 8% desde el metabolismo de aminoácidos (leucina); mientras que para la mayoría de las especies de *Leishmania spp* entre 60-70% de la síntesis de novo de esteroides y fosfolípidos provienen de la leucina (Ginger y col., 2000).

El uso de diversas fuentes de energía y carbono por *T. cruzi*, indican que este parásito tiene un metabolismo robusto y flexible, tanto en catabolismo como anabolismo, lo que le permite colonizar ambientes variables en recursos durante el ciclo de vida (Fig. 1). La robustez del metabolismo oxidativo, biosíntesis y la gran variedad de cepas geográficas, convierten a este parásito en un blanco difícil de combatir con drogas y de ahí las diversas resistencias a diferentes fármacos, razón por la cual hasta los actuales momentos no hay drogas efectivas y disponibles para combatir la enfermedad de Chagas.

El glicosoma en conjunto (rutas de oxidación de la glucosa, ácidos grasos y biosíntesis de éter lípidos, purinas, pirimidinas e isoprenoides), convierten a esta organela desde el punto de vista racional en un blanco terapéutico posible y válido para combatir la enfermedad de Chagas. Posiblemente a través de la combinación de al menos dos drogas que actúen en enzimas claves en dos rutas distintas (glicólisis [HK] y esteroides [SQS]), ya que estas rutas están interconectadas, tal como hemos explicado, la glicólisis aportaría la energía (ATP) para la biosíntesis de esteroides, los cuales son un requerimiento absolutamente necesario para la supervivencia del parásito. La combinación de dos drogas como estamos sugiriendo crearía un efecto domino sobre otras rutas de síntesis importantes en el glicosoma y por ende pondría al parásito en una situación difícil escapar.

La enfermedad Chagas, es una **enfermedad de pobres y de poblaciones olvidadas** por las grandes industrias farmacéuticas. Es muy posible que por causas del olvido, esta enfermedad pueda llegar a **democratizarse**, es decir extenderse en grandes centros urbanos de los países endémicos y del primer mundo, debido a las migraciones (transfusiones de sangre) y a la posibilidad de colonización por parte del vector invertebrado a países no endémicos, gracias al incremento en las temperaturas, como un producto del calentamiento global, debido a contaminaciones indiscriminadas y crecientes por exceso de la industrialización en los países del primer mundo.

Millones de personas enfermas de Chagas en nuestro continente tienen una profunda esperanza en no seguir siendo olvidados y poder ser tomadas en cuenta por la comunidad científica y para que los gobiernos hagan verdaderas políticas de estado, destinando recursos para combatir una indiscutible vergüenza del siglo XXI en nuestro continente. Mis esfuerzos, sentimientos,

amor, vigilia y esperanza por una pronta cura radical para millones de seres humanos desarmados frente a uno de los mayores asesinos en la vida cotidiana de las poblaciones Latino Americanas, y espero que desde nuestra labor detectivesca logremos aportar pistas que sirvan para desenmascarar y combatir a tan vil parásito.

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

6. CONCLUSIONES

6.1. Los epimastigotes de *T. cruzi* tiene 80% de la PGK en el citósol y 20 % en los glicosomas. Dos isoenzimas de 56 y 48 kDa, respectivamente son las responsables para la actividad PGK en el glicosoma, mientras que la actividad en el r-itosol puede ser atribuída a una sola PGK de 48 kDa. Estas isoenzimas fueron llamadas PGKA, e y B, respectivamente. Sin embargo, en *T. cruzi*, la PGKA. aparentemente no es una enzima menor a diferencia de su contraparte en *T. brucei*. Mientras que la PGKC es una proteína soluble de la matriz del glicosoma, la PGKA parece estar asociada a la superficie interna de la membrana del glicosoma. A pesar de la asociación de esta enzima con la membrana del glicosoma, la secuencia del gen no reveló ninguna secuencia obvia por la cual esta enzima pueda estar unida a la membrana. Nosotros creemos que la PGKA por tener una extensión en su secuencia. N-terminal de 80 aminoácidos, no presente en otras PGK de otros organismos podría tener alguna función regulatoria del flujo glicolítico, a través de una interacción con otras proteínas de la membrana del glicosoma. El hecho de que la PGK se exprese constitutivamente en *T. cruzi*, le permitiría a este parásito tener otra kinasa disponible en los glicosoma capaz de generar A TP necesario para fosforilar los primeros pasos de la glicólisis, cuando parts del PEP no reentre a los glicosomas (PEP que se desvíe a través de la piruvato kinasa o de la fosfoeno/piruvato mutasa).

6.2. La hexokinasa de *T. cruzi* tiene un 67% de identidad con su contraparte de *T. brucei*, pero muy baja similitud con las secuencias de otras hexokinasas disponibles, incluyendo las de humanos. Esta contiene una secuencia señal N-terminal del tipo (PTS2) y tiene un punto isoeléctrico básico (pI = 9.67), típico de las proteínas importadas a los glicosomas. El polipéptido tiene una masa de aproximadamente 50 kDa similar a las hexokinasas de no vertebrados y a la hexokinasa de vertebrados (isoenzima IV). La enzima natural fue purificada a homogeneidad y parece existir en varios estados de agregación, la forma predominante aparentemente es un tetrámero. La hexokinasa natural y la recombinante, no presentaron actividad con fructosa, ni tampoco hubo inhibición por su producto glucosa 6-fosfato. En contraste hubo inhibición del

tipo mixto con pirofosfato inorgánico. Los resultados obtenidos para esta enzima (K_m , K_i y peso molecular) permiten concluir que *T. cruzi* tiene una glucokinasa en vez de una hexokinasa clásica. Además, esta enzima presentó una cinética no clásica de tipo histerético, es decir una fase de retardo, donde su actividad incrementaba con la dilución de la enzima. Esta propiedad nueva para esta enzima podría implicar un verdadero estado de regulación del flujo de glucosa en los glicosomas de los epimastigotes de *T. cruzi*.

6.3. La enzima piruvato fosfato dikinasa (PPDK) en epimastigotes de *T. cruzi* está localizada principalmente en la matriz de los glicosomas en forma soluble. Nosotros tratamos de averiguar la dirección de la reacción de esta enzima dentro del glicosoma; en la bibliografía hay suficientes evidencias de que esta enzima es exergónica con un $\Delta G'^0$ (-5.2 Kcal/mol a pH neutro y fuerza iónica fisiológica). Además, ninguna pirofosfatasa pudo detectarse en los glicosomas purificados; por consiguiente es muy probable que la PPDK trabaje en la dirección de producción de piruvato. Asimismo, averiguamos el posible origen del PPI en los glicosomas (asumiendo que la membrana de esta organela es impermeable al PPI); varias rutas de biosíntesis (éter lípidos, esteroides y purinas salvajes), se sabe que producen PPI y las cuales están presentes en los glicosomas. Además, en el presente trabajo se evidenció la presencia de p-oxidación dependiente de $NADP^+$ del palmitoil-CoA en los glicosomas y también esta ruta produce PPI, cuando los ácidos grasos son activados. Asimismo encontramos en los glicosomas varias actividades enzimáticas que consumen piruvato, en particular alanina deshidrogenasa y piruvato carboxilasa. Por consiguiente la PPDK es una enzima central en el metabolismo de los glicosomas de *T. cruzi*, ya que sería un enlace entre glicólisis, oxidación de ácidos grasos y las rutas de biosíntesis que producen PPI. La PPDK parece reemplazar a la pirofosfatasa en su papel termodinámico clásico de desplazar el equilibrio hacia la formación de piruvato.

6.4. La α -glicerolfosfato deshidrogenasa se ha considerada como ausente en *Trypanosoma cruzi* en contradicción con todos los otros tripanosomatídeos estudiados. En este trabajo encontramos que esta enzima está exclusivamente localizada en los glicosomas con niveles variables a lo largo de la curva de

crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi*, lo que estaría de acuerdo con una enzima involucrada en mantener el balance redox intraglicosomal en conjunto con la malato deshidrogenasa. Con anticuerpos contra la GPDH de *T. brucei* se demostró que esta enzima está presente esencialmente en una forma inactiva al comienzo de la curva de crecimiento de los epimastigotes. La GPDH aparentemente está unida a una glicerolfosfato oxidasa sensible al ácido salicilhidroxámico, un sistema de reoxidación que puede jugar un papel esencial en el balance redox en los glicosomas.

6.5 La HMG-CoA reductasa fue localizada principalmente como una enzima soluble en los glicosomas (80%), mientras que un pequeño porcentaje (20%) en el citosol y microsomas de los epimastigotes de *T. cruzi*. Estudios de cinética en el estado estacionario de la enzima asociada a los glicosomas indican un comportamiento cinético clásico del tipo Michaelis-Menten, la lovastatina un análogo en el estado de transición tiene un comportamiento de inhibición competitiva con respecto a la HMG-CoA y no competitivo para NADPH. Esta es la primera demostración de una HMG-CoA reductasa soluble en eucariotas y también es el primer reporte de la presencia de una enzima de la ruta de biosíntesis de isoprenoides en los glicosomas de los tripanosomatídeos.

6.6. La escualeno sintetasa (SQS) cataliza el primer paso comprometido en la biosíntesis de esteroides y en la actualidad está bajo intensos estudios como un posible blanco terapéutico para disminuir el colesterol en los humanos, pero no había sido investigada como un blanco quimioterapéutico anti-parásitos. La SQS en los epimastigotes de *T. cruzi* y los promastigotes de *Leishmania mexicana* tiene una localización dual entre glicosomas y vesículas de mitocondria/microsomas, como una enzima unida a membranas. Los estudios cinéticos de la SQS de *T. cruzi* mostraron parámetros (K_m y V_m) muy similares a los reportados para la SQS de mamíferos. El BPO-OH fue un potente inhibidor no competitivo para la SQS de *T. cruzi* y *Leishmania mexicana*, con un K_i en el orden nM. El BPO-OH indujo una respuesta dosis-dependiente en la reducción de la proliferación de los estados extracelulares de estos parásitos, con concentraciones mínimas inhibitorias en el orden de 20-30 μ M. La

inhibición del crecimiento y la lisis celular inducida por esta droga en ambos parásitos estuvo asociada con una completa supresión del escualeno endógeno y esteroides, consistente con un bloqueo en la biosíntesis de novo de esteroides a nivel de la SQS. El BPO-OH fue también capaz de erradicar los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* de los cultivos de células Vero, sin tener ningún efecto deletéreo visible sobre las células hospedadoras. En conjunto, estos resultados soportan la idea de que se podrían desarrollar inhibidores selectivos contra la SQS como agentes anti-tripanosomatídeos.

6.7. Nosotros investigamos las bases moleculares de la actividad del 4-fenoxifenoxietiltiocianato (WC-9) contra *Trypanosoma cruzi*. Los resultados obtenidos indican que el mecanismo primario del efecto antiproliferativo del W-9 contra este parásito, fue la privación de esteroides endógenos esenciales por un bloqueo específico de su biosíntesis de novo a nivel de la SQS. Esta es la primera explicación a nivel molecular del mecanismo de acción de derivados del 4fenoxifenoxi contra este protozoo y esto sugiere que éste y compuestos relacionados podrían representar una nueva clase de inhibidores contra la SQS con potencial actividad anti parásitos.

6.8. Los compuestos E5700 y ER-119884 son inhibidores basados en quinuclidinas y desarrollados como agentes para actuar sobre la SQS de mamíferos y disminuir el colesterol y triglicéridos. Estos compuestos fueron potentes inhibidores no competitivos o inhibidores de tipo mixto contra la SQS de *T. cruzi* con valores en rangos nanomolar/subnanomolar en ausencia/presencia de 20 μ M de pirofosfato inorgánico. Estas drogas tuvieron efectos antiproliferativos contra las formas extracelular e intracelular tripomastigotes y amastigotes respectivamente, con ningún efecto sobre las células hospedadoras. Todos los esteroides desaparecen en las células tratadas en la MIC. Estudios *in vivo* indican que la E5700 fue capaz de suministrar una protección total a la muerte e inhibe completamente el desarrollo de la parasitemia cuando es suministrado en dosis de 50 mg/Kg.d por 30 días, mientras que ER-119884 da una protección parcial únicamente. Este es el primer reporte de un inhibidor activo vía oral contra la SQS, capaz de

proporcionar una protección completa contra la fase aguda fulminante de la enfermedad de Chagas.

6.9. La enzima SMT en *T. cruzi* y *Leishmania mexicana* presentó una localización subcelular principalmente en los glicosomas y un pequeño porcentaje de 15-20% en vesículas de microsomas/mitocondria. La SMT de los glicosomas fue caracterizada cinéticamente, utilizando como sustrato el desmosterol (cholesta5,24-dien-3 β -ol) y el AdoMet y tuvo un comportamiento cinético típico de Michaelis-Menten. El 22,26-azasterol tuvo un efecto puramente no competitivo con respecto al desmosterol y no competitivo para el AdoMet. Resultados similares fueron obtenidos para la SMT de glicosomas de *Leishmania mexicana*. Este es el primer reporte sobre la localización subcelular y propiedades cinéticas de la SMT en un organismo kinetoplastidae.

6.10. Nosotros pensamos que en los glicosomas al igual que en los peroxisomas de los mamíferos, la ruta de isoprenoides y esteroides en su mayor parte está localizada en esta organela. Además, esta organela tiene otras rutas de oxidación (PPP, NADPH; β -oxidación, Acetil-CoA; Glicólisis, ATP), que suministran los sustratos necesarios para que pueda estar presente la ruta de biosíntesis de esteroides en los glicosomas. Asimismo, análisis de secuencias de algunas enzimas de la biosíntesis de isoprenoides presentaron posibles secuencias señales de importación N-terminal del tipo PTS2 y C-terminal del tipo PTS1. Estas secuencias señales de importación son típicas de proteínas que se ubican en los glicosomas de los tripanosomatídeos y en los peroxisomas de otros organismos.

6.11. De acuerdo a la alta similitud de las rutas de síntesis y de oxidación presentes en los glicosomas y peroxisomas, además de utilizar las mismas secuencias señales y maquinaria de importación (PEX), nosotros proponemos que los glicosomas son un peroxisoma y que su principal diferencia sólo radica en la presencia de las enzimas glicolíticas, enzimas auxiliares para que ocurra glicólisis (PEPCK, MDH, Fumarasa, FRD, GPDH, ALAT) , ausencia de una

catalasa y pirofosfatasa (aunque la PPDK podría cumplir las funciones de la PPasa).

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aboushadi N, Shackelford JE, Jessani N, Gentile A, Krisans SK.** (2000). Characterization of peroxisomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in UT2 cells: sterol biosynthesis, phosphorylation, degradation, and statin inhibition. *Biochemistry*. 39(1):237-47.
- Achterberg V, Gercken G.** (1987). Metabolism of ether lysophospholipids in *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 26:277-87.
- Adjé CA, Oppendoes FR, Michels PAM.** (1997). Organization, sequence and stage-specific expression of the phosphoglycerate kinase genes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*. 90:155-68.
- Affrachino JI, De Tarlovsky MNS, Stoppani AOM.** (1985). Respiratory control in mitochondria from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 16:289-298.
- Agnew WS, Popják G.** (1978). Squalene synthase. Stoichiometry and kinetic of presqualene pyrophosphate and squalene synthase. *J Biol Chem*. 253:4566-4573.
- Albertini M, Rehling P, Erdmann R, Girzalsky W, Kiel JAKW, Veenhuis M, Kunau WH.** (1997). Pex14, a peroxisomal membrane protein binding both receptor of the two PTS-dependent import pathways. *Cell*. 89:83-92.
- Alberts AS, Deng T, Un A, Meinkoth JL, Schonthal A, Mumby MC, Karin M, Feramisco JR.** (1993). Protein phosphatase 2A potentiates activity of promoters containing AP-1-binding elements. *Mol Cell Biol*. 13:2104-12.
- Amery L, Fransen M, De Nys K, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP.** (2000). Mitochondrial and peroxisomal targeting of 2-methylacyl-CoA racemase in humans. *J Lipid Res*. Nov;41(11):1752-9.
- Amin D, Cornell SA, Perrone MH, Silder GE.** (1996). 1-Hydroxy-3-(methylpentylamino)-propylidene-1, 1-bisphosphonic acid as a potent inhibitor of squalene synthase. *Arzneimittelforschung*. 46(8):759-762.
- Appelkvist EL, Aberg F, Guan Z, Parmryd I, Dallner G.** (1994). Regulation of coenzyme Q biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 15:s37-46.
- Araujo FG, Un T, Remington JS.** (1992). Synergistic combination of azithromycin and sulfadiazine for treatment of toxoplasmosis in mice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Jan;11(1):71-73.

- Aronov AM, Suresh S, Buckner FS, Van Voorhis WC, Verlinde CI, Oppendoes FR, Hol WG, Gelb MH.** (1999). Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:4273-4278.
- Ashmarina LI, Pshezhetsky AV, Branda SS, Isaya G, Mitchell GA.** (1999). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase: targeting and processing in peroxisomes and mitochondria. *J Lipid Res*. 40(1.):70-5.
- Ator MA, Schmidt SJ, Adams JI, Dolle RE.** (1989). Mechanism and inhibition of Δ^{24} - Sterol Methyltransferase from *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Biochem*.28:9633-40.
- Avila JI, Avila A, Munoz E.** (1981). Effect of allopurinol on different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*. 30:769-74.
- Avila JI, Avila A.** (1981). *Trypanosoma cruzi*: allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas disease. *Exp Parasitol*. 51 :204-8.
- Avilan I, Garcia P.** (1994). Hysteresis of cytosolic NAOP-malic enzyme 11 from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 65(2):225-232.
- Ayte J, Gil-Gomez G, Hegardt FG.** (1990). Nucleotide sequence of a rat liver cDNA encoding the cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase. *Nucleic Acids Res*. 18:3642.
- Bakker BM, Mensonides FIC, Teusink B, Van Hoek P, Michels PAM, Westerhoff HV.** (2000). Compartmentation protect trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:2087-2092.
- Bakker BM, Michels PAM, Oppendoes FR, Westerhoff HV.** (1999). What controls glycolytic in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? *J Biol Chem*. 274:14551-14559.
- Bakker .BM, Westerhoff HV, Michels PAM.** (1995). Regulation and control of compartmentalized glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *J Bioenerg Biomembr*. 27:513-525.
- Bammert GF, Fostel JM.** (2000). Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of drug treatments and genetic alterations. *Antimicrob Agents Chemother*. 44: 1255-1265.
- Barreto MP.** (1979). Epidemiología, in *Trypasnosoma cruzi* doenca de Chagas. Z Brener & Z Andrade (eds). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.

Barrett MP. (1997). The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitol Today*. 13:11-6.

Barrett-Bee K, and Ryder NS. (1992). In *Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy* (Sutcliffe J, and Georgopapadakou NH, Eds), pp. 410-436, Chapman and Hall, New York and London.

Basson ME, Thorsness M, Rine J. (1986). *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(15):5563-7.

Beach DH, Goad LJ, Holz GG Jr. (1986). Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun*. 136:851-6.

Berens RL, Deusch-King LC, Marr JJ. (1980). *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*: hexokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase and pentose phosphate shunt activity. *Exp Parasitol*. 49:1-8.

Berens RL, Marr JJ, Steele da Cruz FS, Nelson DJ. (1982). Effect of allopurinol on *Trypanosoma cruzi*: metabolism and biological activity in intracellular and bloodstream forms. *Antimicrob Agents Chemother*. 22:657-61.

Bergman J, Junghahn I, Brachwitz H, Langen P. (1994). Multiple effects of antitumor alkyl-lysophospholipid analogs on the cytosolic free Ca^{2+} concentration in a normal and a breast cancer cell line. *Anticancer Res*. 14(4A):1549-1556.

Bergstrom JD, Dufresne C, Bilis GF, Nallin-Omstead M, Byrne K. (1995). Discovery, synthesis and mechanism of action of the zaragozic acids: potent inhibitors of squalene synthase. *Ann Rev Microbiol*. 49:607-639.

Berman JD, Holz GG, Beach DH. (1984). Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes in culture. *Mol Biochem Parasitol*. 12: 1-13.

Bernads A, Van der Ploeg LHT, Frash ACC, Borst P, Boothroyd JC, Coleman S, Cross GAM. (1981). Activation of trypanosome surface glycoprotein genes involved a duplicative transposition leading to an altered 3' end. *Cell*. 27:497-505.

Besteiro, S., Biteau, N., Coustou, V., Baltz, T., Canioni, P., Bringaud, F. (2002). Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and

unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase. J Biol Chem. 277, 38001-12.

Beytia E, Qureshi AA, Porter JW. (1973). Squalene synthase 111. Mechanism of the reaction. J Biol Chem. 248: 1856-1867.

Biardi L, Krisans SK. (1996). Compartmentalization of cholesterol biosynthesis. Conversion of mevalonate to farnesyl diphosphate occurs in the peroxisomes. J Biol Chem. 271:1784-8.

Biardi L, Sreedhar A, Zokaei A, Vartak NB, Bozeat RL, Shackelford JE, Keller GA, Krisans SK. (1994). Mevalonate kinase is predominantly localized in peroxisomes and is defective in patients with peroxisome deficiency disorders. J Biol Chem. 269:1197-1205.

Blagg BS, Jarstfer MB, Rogers DH, Poulter CD. (2002). Recombinant squalene synthase. A mechanism for the rearrangement of presqualene diphosphate to squalene. J Am Chem Soc 124:8846-8853.

Blattner J, Dorsam H, Clayton CE (1995). Function of N-terminal import signals in trypanosome microbodies. FEBS Lett. 360:310-314.

Blattner J, Helfert S, Michels P, Clayton C. (1998). Compartmentation of phosphoglycerate Kinase in *Trypanosoma brucei* plays a critical role in parasite energy metabolism. Proc Natl Acad Sci USA. 95:11596-600.

Bloch KE. (1983). Sterol structure and membrane function. CRC Crit Rev Biochem. 12:47-92.

Blum JJ. (1993). Intermediary metabolism of *Leishmania*. Parasitol Today. 9:118-122.

Bond CS, Zhang y, Berriman M, Cunningham ML, Fairlamb AH, Hunter WN. (1999). Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. Structure Fold Des. 7: 81-9.

Bontempi E, Martinez J, Cazzulo JJ. (1989). Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 33(1):43-47.

Borden KL, Freemont PS. (1996). The ring finger domain: a recent example of a sequence-structure family. Curr Opin Struct Biol. 6:39b-401.

Bourass J, Loiseau PM, Bories C, Letourneux y. (1996). Antileishmanial activity of rac-1-dodecyl-2-octanamido-2-deoxy-glycerophosphocholine a new dialkylglycerophosphocholine, in vitro. *Ann Trop Med Parasitol.* 90:559-561.

Brachwitz H, Vollgraf C. (1995). Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. *Pharmacol Ther.* 66:39-82.

Brener Z, Cancado JR, Galvao LM, da Luz ZM, Filardi Lde S, Pereira ME, Santos LM, Cancado CB. (1993). An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 88:149-53.

Brener z. (1961). [The therapeutic activity of furaltadone, furazolidone and furadantine in experimental infection of the mouse by *Trypanosoma cruzi*]. *Hospital (Rio J).* Dec;60:947-51.

Bringaud F, Baltz D, Baltz T. (1998). Functional and molecular characterization of a glycosomal PPI-dependent enzyme in trypanosomatids: pyruvate, phosphate dikinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 7963-7968.

Brown DA, London E. (2000). Structure and Function of Sphingolipid and Cholesterol-rich Membrane Raft. *J Biol Chem.* 275:17221-17224.

Brown GR, Foubister AJ, Freeman S, Harrison PJ, Johnson MC, Mallion KB, McCormick J, McTaggart F, Reid AC, Smith GJ, Taylor MJ. (1996). Synthesis and activity of a novel series of 3-biarylquinuclidine squalene synthase inhibitors. *J Med Chem.* 39:2971-2979.

Cáceres AJ, Portillo R, Acosta H, Rosales D, Quiñones W, Avilan L, Salazar L, Dubourdieu M, Michels P, Concepción JL. (2003). Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 126:251-262.

Campetella O, Henriksson J, Aslund L, Frasch AC, Pettersson U, Cazzulo JJ. (1992). The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 50:225-34.

Cancado EL, Leitao RM, Carrilho FJ, Laudanna AA. (1998). Unexpected clinical remission of cholestasis after rifampicin therapy in patients with normal or slightly increased levels of gamma-glutamyl transpeptidase. *Am J Gastroenterol* 93(9):1510-1507.

- Cardenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T.** (1998). Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta.* 1401 :242-64.
- Cazzulo JJ, Araujo S, Franke de Cazzulo BM, Cannata JJB.** (1988). On the production of glycerol and L-alanine during the aerobic fermentation of glucose by trypanosomatid. *FEMS Microbiol Lett.* 51 :187-192.
- Chang CC, South S, Warren D, Jones J, Moser HW, Gould SJ.** (1999). Metabolic control of peroxisome abundance. *J Cell Sci.* 112: 1579-1590.
- Chesterton Ch J.** (1968). Distribution of cholesterol precursors and others lipids among Rat Liver Intracellular Structures. *J Biol Chem.* 243:1147. .
- Chudzik DM, Michels PAM, de Walque S, Hol WG.** (2000). Structure of type 2 peroxisomal targeting signal in two trypanosomatid aldolases. *J Mol Biol.* 300:697707.
- Cinque GM, Szajnman SH, Zhong L, Docampo R, Schvartzapel AJ, RodriguezJB, Gros EG.** (1998). Structure-activity relationship of new growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. *J Med Chem.* 41: 1540-1554.
- Clemons KV, Hanson LH, Stevens DA.** (1993). Activities of the triazole D0870 in vitro and against murine blastomycosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:1177-9.
- Cohen LH, Valentijn AR, Roodenburg L, Van Leeuwen RE, Huisman RH, Lutz RJ, Van. der Marel GA, Van Boom JH.** (1995). Different analogues of farnesyl pyrophosphate inhibit squalene synthase and protein: farnesyltransferase to different extents. *Biochem Pharmacol.* 49(6):839-845.
- Concepción JL, Acosta H, Quiñones W, Dubourdieu M.** (2001). A a-glycerophosphate dehydrogenase is present in *Trypanosoma cruzi* glycosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96:697-701.
- Concepción JL, Chataing B, Dubourdieu M.** (1999). Purification and properties of phosphoglucose isomerase of *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry Physiology Part B.* 122:211-222.
- Concepcion JL, Gonzalez-Pacanowska D, Urbina JA.** (1998): 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: subcellular localization and kinetic properties. *Arch Biochem Biophys.* 352:114-20.
- Concepción, J.L., Adjé, C., Quiñones, W., Chevalier, N., Dubourdieu, M., Michels, P.A.M.** (2001). The expression and intracellular distribution of

phosphoglycerate kinase isoenzymes in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 181 : 111-121.

Contreras LM, Vivas J, Urbina JA. (1997). Altered lipid composition and enzyme activities of plasma membranes from *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* epimastigotes grown in the presence of sterol biosynthesis inhibitors. Biochem Pharmacol. 53:697-704.

Coppens 1, Bastin P, Levade T, Courtoy GJ. (1995). Activity, pharmacological inhibition and biological regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 69:29-40.

Cornell R, Grove GL, Rothblat GH, Horwitz, AF. (1977). Lipid requirement for cell cycling. The effect of selective inhibition of lipid synthesis. Exp Cell Res. 109:299-307.

Cotrim PC, Garrity LK, Beverley SM. (1999). Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in *Leishmania* by overexpression/selection. J Biol Chem. 274:37723-37730.

Coustou, V., Besteiro, S., Biran, M., Diolez, P., Bouchaud, V., Voisin, P., Michels, P.A., Canioni, P., Baltz, T., Bringaud, F. (2003). ATP generation in the *Trypanosoma brucei* procyclic form: cytosolic substrate level is essential, but not oxidative phosphorylation. J. Biol. Chem. 278:49625-49635.

Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. (1987). The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. Biochem Pharmacol. 36:2633-2636.

Croft SL, Neal RA, Thornton EA, Herrmann DB. (1993). Antileishmanial activity of the ether phospholipid ilmofosine. Trans R Soc Trop Med Hyg. 87:217-9.

Croft SL, Snowdon D, yardley V. (1996). The activity of four anti-cancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. J Antimicrob Chemother. 38:1041-1047.

Croft, SL, Urbina JA, Brun R. (1997). Chemotherapy of human leishmaniasis and trypanosomiasis, p. 245-257. In G. Hide, J. C. Mottram, G. H. Coombs, and P. H. Holmes (ed.), Trypanomiasis and leishmaniasis. CAB International, London, England.

Cronin CN, Tipton KF. (1985). Purification and regulatory properties of phosphofructokinase from *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei*. Biochem J. 227:113-124.

Dacks JB, Doolittle WF. (2001). Reconstructing/deconstructing the earliest eukaryotes: how comparative genomics can help. Cell. 107: 1317-1331.

de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM. (1996). Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. Lancet. 348:1407-13.

De Backer MD, Ilyna T, Ma XJ, Vandoninck S, Luyten WHML, Vanden Bosche H. (2001). Genetic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using DNA micro-array. Antimicrob Agents Chemother. 45:1660-1670.

De Souza W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Curr Pharm Des. 8 :269-285.

De Walque S, Kiel JA, Veenhuis M, Opperdoes FR, Michels PAM. (1999). Cloning and analysis of the PTS1 receptor in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 104: 106-119.

De Wit S, O'Doherty E, Smith RP, Yates R, Clumeck N. (1995). Pharmacokinetics of two multiple dosing regimens of 00870 in HIV positive patients: A phase I study. *ICAAC Abstracts* 35: F97.

Devarenne TP, Shin DH, Back K, Yin S, Chappell J. (1998).. Molecular characterization of tobacco squalene synthase and regulation of response to fungal elicitor. Arch Biochem Biophys. 349:205-215.

Docampo R, Moreno SN, Turrens JF, Katzin AM, Gonzalez-Cappa SM, Stoppani AO. (1981). Biochemical and ultrastructural alterations produced by miconazole and econazole in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 3: 16980.

Docampo R, Moreno SN. (1986). Free radical metabolism of antiparasitic agents. Fed Proc. Sep; 45:2471-6.

Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SN. (1995). Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. Biochem J. 310:1005-1012.

Docampo R. (1990). Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Chem BiolInteract. 73:1-27.

Dodt G, Goulg SL. (1996). Multiple PEX genes are required for proper subcellular distribution and stability of Pex5p, the PST1 receptor: evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor. *J Cell Biol.* 135:1763-774.

Drew ME, Morris JC, Wang Z, Well L, Sanchez M, Landfear SM, Englund PT. (2003). The adenosine analog tubercidin inhibits glycolysis in *Trypanosoma brucei* as revealed by an RNA interference library. *J Biol Chem.* 278:46596-46600.

Duffieux F, Van Roy J, Michels PAM, Oppendoes FR. (2000). Molecular characterization of the first two enzymes of the pentose-phosphate pathway of *Trypanosoma brucei*: Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconolactonase. *J Biol Chem.* 275:27559-27565.

Dyer JM, McNew JA, Goodman JM. (1996). The sorting sequence of the peroxisomal integral membrane protein PMP47 is contained within a short hydrophilic loop. *J Cell Biol.* 133:269-280.

Elgersma y, Elgersma-Hooisma M, Wenzel T, McCaffery JM, Farquhar MG, Subramani S. (1998). A mobile receptor for peroxisomal proteins import in *Pichia pastoris*. *J Cell Biol.* 140:807-820.

Elgersma y, Tabak HF. (1996). Proteins involved in peroxisome biogenesis and functioning. *Biochim Biophys Acta Rev Biomembr.* 1286:269-83.

Endo A. (1991). HMG-CoA reductase inhibitors. *J lipid Res.* 33:1569-1581.

Engel JC, Doyle PS, Dvorac JA. (1990). Isolate-dependent differences in the oxidative metabolism of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 39:69-76.

Engel JC, Doyle PS, Hsieh 1, McKerrow JH. (1998). Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med.* 188:725-734..

Engel JC, Doyle PS, McKerrow JH. (1999). Trypanocidal effect of cysteine protease inhibitors in vitro and in vivo in experimental Chagas disease. *Medicina (B Aires).* 59 Suppl 2:171-175.

Engel JC, Doyle PS, Palmer J, Hsieh 1, Bainton DF, McKerrow JH. (1998). Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci.* 111 :597-606..

Engfelt WH, Shackelford JE, Aboushadi N, Jessani N, Masuda K, Paton VG, Keller GA, Krisans SK. (1997). Characterization of UT2 cells. The induction of peroxisomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem.* 272(39):24579-24587.

Enjuto M, Balcells L, Campos N, Caelles C, Arro M, Boronat A. (1994). *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(3):927-831.

Fairlamb AH (1999). Future prospects for the chemotherapy of Chagas' disease. *Medicina (B Aires).* 2:179-87.

Fairlamb AH, Cerami A. (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol.* 46:695-729.

Felix CR, Caldas RA, Ceron CR, Roitman L. (1978). Cyanide sensitive and insensitive respiration of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol.* 72:89-91.

Ferguson MA. (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci.* 112:2799-2809.

Filardi LS, Brener Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 81 (5):755-559.

Filppula SA, Yagi AI, Kilpeläinen SH, Novikov D, FiuPatrick DR, Vihinen M, Valle D, Hiltunen JK. (1998). Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase from rat liver. Molecular characterization. *J Biol Chem.* 273(1):349-55.

Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, Wesolowski G, Russell RG, Rodan GA, Reszka AA. (1999). Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 133-138.

Flaspohler JA, Rickoll WL, Beverley SM, Parson M. (1997). Functional identification of a *Leishmania* gene related to the peroxin 2 gene reveals common ancestry of glycosomal and peroxisomes. *Mol Cell Biol.* 17: 1 093-11 01.

Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, Garin C, Iso la E, Brenner RR, Rasmussen L. (1990). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth and sterol biosynthesis by lovastatin. *Biochem Biophys Res Commun.* 166:1441-5.

Fragata Filho, A. A., E. Boainain, and L. B. M. Mainfrino. (1993). Itraconazole in treatment of chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 88 (Suppl. 1):243

Franke de Cazzulo BM, Martinez J, North MJ, Coombs GH, Cazzulo JJ. (1994). Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 124:81-6.

Fukao T, Song XQ, yamaguchi S, Orii T, Wanders RJ, Poll-The BT, Hashimoto T. (1995). Mitochondrial acetoacetyl-coenzyme A thiolase gene: a novel 68-bp deletion . involving 3' splice site of intron 7, causing exon 8 skipping in a Caucasian patient with beta-ketothiolase deficiency. *Hum Mutat.* 5(1):94-46.

Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J, Subramani S. (1989). Conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol.* 108: 1657 -64.

Haase R, Wieder T, Geilen CC, Reutter W. (1991). The phospholipid analogue hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in Madin-Darby canine kidney cells. *FEBS Lett.* 288: 129-132.

Hajra AK, Das AK. (1996). Lipid biosynthesis in peroxisomes. *Ann Ny Acad Sci.* 804:129-141.

Halevy S, Sarel S. (1965). Isolation of Ergosterol from the Trypanosomatid *Leptomonas culicidarum*. *J Protozool.* 12:293-296.

Hannaert V, Blaauw M, Kohl L, Allert S, Oppendoes FR, Michels PA. (1992). Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. *Biochem Parasitol.* 55(1-2):115-126.

Hannaert V, Bringaud F, Oppendoes FR, Michels PAM. (2003). Evolution of energy metabolism and its compartmentation in kinetoplastids. *Kinetoplas Biol Disease.* 2: 1-30

Hannaert V, Michels PAM. (1994). Structure, function, and biogenesis of glycosomes in Kinetoplastidae. *J Bioenerg Biomembr.* 26:205-212.

Hannaert V, Oppendoes FR, Michels PA. (1998). Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastida. *Mol Evol.* 47(6):728-738.

Harlow E, Lane D. (1988). Antibodies: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hart DT, Lauwers WJ, Willemsen G, Vanden Bossche H, Oppendoes FR. (1989). Perturbation of sterol biosynthesis by itraconazole and ketoconazole in *Leishmania mexicana* infected macrophages Mol Biochem Parasitol. 33:123-134.

Hart DT, Misset O, Edwards SW, Oppendoes FR. (1984). Comparison of the glycosomes (microbodies) isolated from *Trypanosoma brucei* blood stream form and cultures procyclic trypomastigotes. Mol Biochem Parasitol. 12:25-35.

Hart DT, Oppendoes FR. (1984). The occurrence of glycosomes (microbodies) in the promastigotes stage of four major *Leishmania* species. Mol Biochem Parasitol. 13:159-172.

Harth G, Andrews N, Milis AA, Engel JC, Smith R, McKerrow JH. (1993). Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 58:17-24.

Hashimoto y, Ozaki J, Koue T, Odani A, yasuhara M, Hori R. (1994). Simulation for the analysis of distorted pharmacodynamic data. Pharm Res. 11 (4):545-548.

Hausler T, Stierhof yD, Wirtz E, Clayton C. (1996). Import of a DHRF hybrid protein into glycosomes in vivo is not inhibited by the fclate-analogue aminopterin. J Cell Biol. 132:311-324.

Heinonen JK, Lahti RJ. (1981). A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. Anal Biochem. 113(2):313-317.

Heise N, Oppendoes FR. (1997). The dihydroxyacetonephosphate pathway for biosynthesis of ether lipids in *Leishmania mexicana* promastigotes. Mol Biochem Parasitol. 89:61-72.

Heise N, Oppendoes FR. (1999). Purification, localization and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 99:21-32.

Heise N, Oppendoes FR. (2000). Localisation of a 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase in the mitochondrial matrix of *Trypanosoma brucei*. Z Naturforsch.55:473-477.

- Henderson M, Flashpohler JA, Lemley KR, Rickoll WL, Parson M.** (2000). Isolation and characterization of *Leishmania* mutants defective in glycosomal protein import. *Mol Biochem Parasitol.* 106:225-237.
- Henze K, Horner DS, Suguri S, Moore DV, Sanchez LB, Muller M.** (2001). Unique phylogenetic relationship of glucokinase and glucosephosphate isomerase of the amitochondriate eukaryotes *Giardia intestinalis*, *Spironucleus barkeri* and *Trichomonas vaginalis*. *Gene.* 281 :123-31.
- Hettema EH, Girzalsky w, Van den Berg M, Erdmann R, Distel B.** (2000). *Saccharomyces cerevisiae* Pex3p and Pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane protein. *EMBO J.* 19:223-233.
- Hettema EH, Tabak HF.** (2000). Transport of fatty acid and metabolite across the peroxisomal membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1008: 1-13.
- Hovik R, Brodal B, Bartlett K, Osmundsen H.** (1991). Metabolism of acetyl-CoA by isolated peroxisomal fractions: formation of acetate and acetoacetyl-CoA. *J Lipid Res.* 32(6):993-9.
- Ashmarina LI, Robert MF, Elsliger MA, Mitchell GA.** (1996). Characterization of the hydroxymethylglutaryl-CoA lyase precursor, a protein targeted to peroxisomes and mitochondria. *Biochem J.* 315 (pt 1):71-5.
- Huhse B, Rehling P, Albertini M, Blank L, Meller K, Kunau WH.** (1999). Pex17p of *Saccharomyces cerevisiae* is a novel peroxin and component of the peroxisomal protein translocation machinery. *J Cell Biol.* 140:49-60.
- Hwang Hy, Ullman B.** (1997). Genetic analysis of purine metabolism in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 272:19488-19496.
- Jardin A, Bergeson SE, Shih S, Carter N, Lucas RW, Merling G, Myler PJ, Stuart K, Ullman B.** (1999). Xanthine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*. Molecular cloning, biochemical characterization, and genetic analysis. *J Biol Chem.* 274:34403-34410.
- Jardin A, Liu W, Zhelezanova E, Ullman B.** (2000). Peroxisomal targeting signal1 receptor protein PEX5 from *Leishmania donovani*. Molecular, biochemical, and immunocytochemical characterization. *J Biol Chem.* 275:13637-13644.

- Jarstfer MBD, Zhang DL, Poulter CD.** (2002). Recombinant squalene synthase. Synthesis of non-head-to-tail isoprenoids in the absence of NADP. *J Am Chem Soc.* 124:8834-8845.
- Karpichev IV, Small GM.** (2000). Evidence for a novel pathway for the targeting of a *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal protein belonging to the isomerase/hydratase family. *J Cell Sci.* 133:533-544.
- Keller GA, Pazirandeh M, Krisans S.** (1986). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase localization in rat liver peroxisomes and microsomes of control and cholestyramine-treated animals: quantitative biochemical and immunoelectron microscopical analyses *J Cell Biol.* 103:875-886.
- Kiyoshi K, Hiroko M, Fumiko S, Hideto M.** (2001). Parasite mitochondria as a target for chemotherapy. *J Healt Sci.* 47:219-239.
- Köhler P, Bachmann R.** (1980). Mechanism of respiration and phosphorylation in *Ascaris* muscle mitochondria. *Mol Biochem Biophys.* 1 :75-90.
- Koller W.** (1992). Antifungal Agents with Target Sites in Sterol Functions and Biosynthesis. Cap. 7. In *Target Sites of Fungicide Action*. Koller w (Ed). CRC Press. 119-206.
- Konstantinov SM, Kaminsky R, Brun R, Berger MR, Zillmann U.** (1997). Efficacy of anticancer alkylphosphocholines in *Trypanosoma brucei* subspecies. *Acta Trop.* 64:145-154.
- Korn ED, Von Brand T, Tobie EJ.** (1969). The Sterols of *Sacharomyces cerevisiae* and *Crithidia fasciculata*. *Comp Biochem Physiol.* 30:601-610.
- Kovacs WJ, Faust PL, Keller GA, Krisans SK.** (2001). Purification of brain peroxisomes and localization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Eur J Biochem.* 268(18):4850-4859.
- Kovacs WJ, Olivier LM, Krisans SK.** (2002). Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. *Prog Lipid Res.* 41 (5):369-391.
- Krisans SK, Ericsson J, Edwards PA, Keller GA.** (1994). Farnesyl-diphosphate synthase is localized in peroxisomes. *J Biol Chem.* 269(19):14165-9.
- Krisans SK.** (1988). Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. *Ann N y Acad Sci.* 804:142-164.
- Kroschewski H, Ortner S, Steipe B, Scheiner O, Wiedermann G, Duchene M.** (2000). Differences in substrate specificity and kinetic properties of the

recombinant hexokinases HXK1 and HXK2 from *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol. 105:71-80.

Kuhlencord A, Maniera T, Eibl H, Unger C. (1992). Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. Antimicrob Agents Chemother. 36: 1630-1634.

Kusel JP, Weber MM. (1965). Coenzyme Q₉ (ubiquinone 45) and Ergosterol in *Crithidia fasciculata*. Biochim Biophys Acta. 98:632-639.

Labriola C, Sousa M, Cazzulo JJ. (1993). Purification of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* by affinity chromatography. Biol Res. 26:101-107.

Lametschwandtner G, Brocard C, Fransen M, Van Veldhoven P, Berger J, Harting A. (1998). The difference in recognitions of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5 to the cognate signal and to residues adjacent to it. J Cell Biol Chem. 273:33635-33643.

Larralde G, Vivas J, Urbina JA. (1988). Concentration and time dependence of the effects of ketoconazole on growth and sterol synthesis by *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes. Acta Cient Venez. 39:140-146.

Laughlin M, Pai S, Menon S, Nomeir A, Colucci R, Affrime M, Kosoglou T. (1997). SCH 56592: rising multiple-dose safety, tolerance, and pharmacokinetic evaluation in healthy volunteers. ICAAC Abstracts 37: A87.

Lazardi K, Urbina JA, de Souza W. (1991). Ultrastructural alterations induced by ICI 195,739, a bis-triazole derivative with strong antiproliferative action against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Antimicrob Agents Chemother. 35:736-40.

Lazarow PB, Fujiki Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. Annu Rev Cell Biol. 1:489-530.

Le Fichoux Y, Rousseau D, Ferrua B, Ruetz S, Jélieux A, Grousseau D, Kubar J. (1998). Short- and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against established *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice. Antimicrob Agents Chemother. 42:654-658.

Learned RM, Fink GR. (1989). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Arabidopsis thaliana* is structurally distinct from the yeast and animal enzymes Proc Natl Acad Sci USA. 86:2779-2783.

- Licata AA.** (1997). Bisphosphonate therapy. *Am J Med Sci.* 313:17-22.
- Liendo A, Iazardi K, Urbina JA.** (1998). In-vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole 00870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*. *J Antimicrob Chemother.* 41: 197-205.
- Liendo A, Visual G, Piras MM, Piras R, Urbina JA.** (1999). Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigote. *Mol. Biochem. Parasitol.* 0:1-11.
- Lira R, Contreras LM, Rita RM, Urbina JA.** (2001) Mechanism of action of antiproliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vivo activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *Antimicrob Chemother.* 47(5):537-546..
- López C', Chebali N, Hannaer V, Rigden DJ, Michels PAM, Ramirez JL.** (2002). *Leishmania donovani* phosphofructokinase. Gene characterization, biochemical properties and structure-modeling studies. *Eur J Biochem.* 269: 113124.
- Lorenz P, Maier AG, Baumgart E, Erdmann R, Clayton C.** (1998). Elongation and clustering of glycosomes in *Trypanosoma brucei* overexpressing the glycosomal Pex11. *EMBO J.* 17:3542-3555.
- Lu HG, Zhong L, Chang KP, Docampo R.** (1997). Intracellular Ca²⁺ pool content and signaling expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Biol Chem.* 272:9464-7943.
- Lyr H, Seyd W.** (1978). Inhibition of chitin synthetase of *Mucor rouxii* in vitro by fungicides and other compounds. *Z Allg Mikrobiol.* 18(10):721-729.
- Lyr H.** (1995). *Modern Selective Fungicides*, 2nd ed., Gustav Fisher Verlag, Jena.
- Maldonado RA, Molina J, Payares G, Urbina JA.** (1993). Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 1353-9.
- Maldonado, R.A., Fairlamb, A.H.** (2001). Cloning of a pyruvate phosphate dikinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 112: 183-191.
- Mannaerts GP, Van Veldhoven PP.** (1996). Functions and organization of peroxisomal beta-oxidation. *Ann Ny Acad Sci.* 804:99-115.

- Marr JJ, Berens RL, Nelson DJ.** (1978). Antitrypanosomal effect of allopurinol: conversion in vivo to aminopyrazolopyrimidine nucleotides by *Trypanosoma curzi*. Science. 201: 1 018-20.
- Martin MB, Arnold W, Heath HT 3rd, Urbina JA, Oldfield E.** (1999). Nitrogen-containing bisphosphonates as carbocation transition state analogs for isoprenoid biosynthesis. Biochem Biophys Res Commun. 263:754-758.
- McCabe R.** (1988). Failure of ketoconazole to cure chronic murine Chagas' disease. J Infect Dis. 158:1408-9.
- McCammon MT, Hartmann M-A, Bottema CDK, frarks LW.** (1984). Sterol Methylation in *Sacharomyces cerevisiae*. J Bact. 157:475-483.
- McCammon MT, McNew JA, Willy PJ, Goodman JM.** (1994). An internal region of the peroxisomal membrane protein PM47 is essential for sorting to peroxisomes. J Cell Biol. 124:915-925.
- McGrath ME, Eakin AE, Engel JC, McKerrow JH, Craik CS, Fletterick RJ.** (1995). The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. J Mol Biol. 247(2):251-259.
- Mckoy G, Badal M, Prescott Q, Lux H, Hart DT.** (1997). Characterization of PGK genes in *Leishmania major*: evidence for the absence of a third PGK gene or isoenzyme. Mol Biochem Parasitol. 90:169-81.
- McTaggart F, Brown GR, Davidson RG, Freeman S, Holdgate GA, Mallion KB, Mirrlees DJ, Smith GJ, Ward WHJ.** (1996). Inhibition of squalene synthase of rat. liver by novel 3' substituted quinuclidines. Biochem Pharmacol 51 :1477-1487.
- Meirelles MN, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM, Murta AC, Scharfstein J.** (1992). Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. Mol Biochem Parasitol. 52: 175-84.
- Mercer EI.** (1993). Inhibitors of sterol biosynthesis and their applications. Prog Lipid Res. 32:357-416.
- Michels PA, Marchand M, Kohl L, Allert S, Wierenga RK, Oppendoes FR.** (1991). The cytosolic and glycosomal isoenzymes of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei* have a distant evolutionary. Eur J Biochem. 198(2):421-428.

- Michels PAM, Hannaert V, Bringaud F.** (2000). Metabolic aspect of glycosome in Trypanosomatidae-new data and views. *Parasitol Today*. 16:482-489.
- Michels PAM, Hannaert V.** (1994). The evolution of kinetoplastid glycosomes. *J Bioenerng Biomembr*. 26:213-20.
- Misset O, Octaaf JM, Oppendoes FR.** (1986). Glycolytic enzymes of *trypanosoma brucei*. Simultaneous purification, intraglycosomal concentrations and physical properties. *Eur J Biochem*. 157:441-53.
- Mochizuki V, Hori SH.** (1977). Purification and properties of hexokinase from starfish, *Asterias amurensis*. *J Biochem*. 81 :1849-1855.
- Montalvetti A, Bailey BN, Martin MB, Severin GW, Oldfield E, Docampo R.** (2001). Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. 276(36):33930-33937.
- Mookhtiar KA, Kalinowski SS, Zhang D, Poulter CD .**(1994). Yeast squalene synthase. A mechanism for addition of substrates and activation by NADPH. *J Biol Chem*.269(15):11201-207.
- Mookhtiar KA, Kalinowski SS, Zhang D, Poulter CD.** (1994). Yeast squalene synthase. A mechanism for addition of substrates and activation by NADPH. *J Biol Chem*.269:11201-11207.
- Moreira AA, de Souza HB, Amato Neto V, Matsubara L, Pinto PL, Tolezano JE, Nunes EV, Okumura M.** (1992). Evaluation of the therapeutic activity of itraconazole in chronic infections, experimental and human, by *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 34:177-80.
- Moreno B, Urbina JA, Oldfield E, Bailey BN, Rodrigues CO, Docampo R.** (2000). ³¹ P NMR spectroscopy of *Trypanosoma brucei*, *trypanosoma cruzi*, and *leishmania major*. Evidence for high levels of condensed inorganic phosphates. *J Biol Chem*. 275:28356-28362.
- Moreno SN, Zhong L.** (1996). Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Biochem J*. 313: 655-659.
- Morris JC, Wang Z, Drew ME, Englund PT.** (2002). Glycolysis modulates trypanosome. glycoprotein expression as revealed by an RNAi library. *EMBO J*. 21 :4429-4438.

Moyerson J, Choe J, Kumar A, Voncken FGJ, Hol WGJ, Michels PAM. (2003). Characterization of *Trypanosoma brucei* PEX14 and its role in the import of glycosomal matrix proteins. *Eur J Biochem.* 270:2059~2067.

Nes WD, Guo D, Zhou W. (1997). Substrate-based inhibitors of the (S)-adenosyl-methionine: $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyl transferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys.* 342:68-81.

Nes WD, Janssen GG, Bergenstrahle A. (1991). Structural Requirements for Transformation of Substrates by the (S)-Adenosyl-L-methionine: $\sim 24(25)$ -Sterol Methyl Transferase. *J Biol Chem.* 266:15202-15212.

Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(25):14687-14692.

Nicolay, K., Veenhuis, M., Douma, A.C., Harder, W. (1987). A 31-P NMR study of the internal pH of yeast peroxisomes. *Arch. Microbiol.* 147:37-41.

Nomeir A, Kumari P, Hilbert MJ, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Menzel Jr J, Moss Jr E, Hare R, Miller GH, Caven MN, Un CC. (1995). Comparative pharmacokinetics of a new triazole antifungal agent, SCH 56592, in mice, rats, rabbits, dogs and cynomolgus monkeys. *ICAAC Abstracts* 35: F68.

Nwagwu M, Oppendoerfer FR. (1982). Regulation of glycolysis in *Trypanosoma brucei*: hexokinase and phosphofructokinase activity. *Acta Trop.* 39:61-72.

Oatey PB, Lumb MJ, Danpure CJ. (1996). Molecular basis of the variable mitochondrial and peroxisomal localization of alanine-glyoxylate aminotransferase. *Eur. J. Biochem.* 24:374-385.

Okada T, Haze K, Nadanaka S, Yoshida H, Seidah NG, Hirano Y, Sato R, Negishi M, Mori K. (2003). A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. *J Biol Chem.* 278(33):31024-31032.

Olivier LM, Chambliss KL, Gibson KM, Krisan SK. (1999). Characterization of phosphomevalonate kinase: chromosomal localization, regulation, and subcellular targeting. *J Lipid Res.* 40:672-6729.

Olivier LM, Kovacs W, Masuda K, Keller GA, Krisans SK. (2000). Identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. AA-CoA thiolase, hmg-coa synthase, MPPD, and FPP synthase. *J Lipid Res.* 41:1921-1935.

Opperdoes FR, Baudhuim P, Coppens 1, De Roe C, Edwards S, Weijer. P, Misset O. (1984). Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. J Cell Biol. 98:1178-84.

Opperdoes FR, Baudhuin P, Coppens 1, De Roe C, Edwards SW, Weijers PJ, Misset O. (1984). Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. Cell Biol. 98(4): 1178-1184.

Opperdoes FR, Borst P. (1977). Localization of nine glycolytic enzyme in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. FEBS Lett. 80:360-4.

Opperdoes FR. (1984). Localization of the initial steps in alkoxyphospholipid biosynthesis in glycosomes (microbodies) of *Trypanosoma brucei*. FEBS lett. 169:35-39.

Opperdoes FR. (1987). Compartmentation of carbohydrate metabolism. in trypanosomes. Annu Rev Microbiol. Bringaud, F 41: 127-151.

Osinga KA, Swinkels BW, Gibson WC, Borst P, Veeneman GH, Van Boom JH, Michels PA, Opperdoes FR. (1985). Topogenesis of microbody enzymes: a sequence comparison of the genes for the glycosomal (microbody) and cytosolic phosphoglycerate kinases of *Trypanosoma brucei*. EMBO J. 4(13B):3811-3817.

Osinga KA, Swinkels BW, Gibson WC, Borst P, Veeneman GH, Van Boom JH, Michels PAM, Opperdoes FR. (1985). Topogenesis of microbody enzymes: a sequence comparison of the genes for the glycosomal (microbody) and cytosolic phosphoglycerate kinases of *Trypanosoma brucei*. EMBO J. 4:3811-7.

Pandit J, Danley DE, Schulte GK, Mazzalupo S, Pauly T A, Hayward CM, Hamanaka ES, Thompson JF, Harwood HJ. (2000). Crystal structure of human squalene synthase. A key enzyme in cholesterol biosynthesis. J Biol Chem. 275:30610-30617.

Park IW, Casey WM. (1995). Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast Annu Rev Microbiol. 49:95-116.

Parks IW, Rodriguez RJ, Iow C. (1986). An Essential Fungal Growth Factor Derived from Ergosterol: A New End Product of Sterol Biosynthesis in Fungi. *Lipids*. 21 :89-91.

Parsons M, Furuya T, Kessler P. (2001). Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol Biochem Parasitol*. 115:19-28.

Paton VG, Shackelford JE, Krisans SK. (1997). Cloning and subcellular localization of hamster and rat isopentenyl diphosphate dimethylallyl diphosphate isomerase. A PTS1 motif targets the enzyme to peroxisomes. *J Biol Chem*. 272:18945-50.

Peña-Dias J, Montalveti A, Camacho A, Ruiz-Perez IM, Gonzales-Pacanoswska D. (1997). A soluble 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. 324:619-626.

Peña-Dias J, Montalveti A, Flores CI, Constan A, Guerrero H, De Souza W, Gancedo C, Ruiz-Perez IM, Gonzales-Pacanoswska D. (2003). Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the Trypanosomatidae. *Mol Biol Cell*.

Pesti M, Campbell JM, Peberdi JF. (1981). Alteration of Ergosterol Content and Chitin Synthase Activity in *Candida albicans*. *Curr Microbiol*. 5: 187-190.

Peterson GC, Sommer JM, Klosterman S, Wang CC, Parson M. (1997). *Trypanosoma brucei*: identification of an internal region of phosphoglycerate kinase required for targeting to glycosomal microbodies. *Exp Parasitol*. 85: 16-23.

Pinto WJ, Iozano R, Sekula BC, Ness WR. (1983). Stereochemically Distinct Roles for Sterol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Comm*. 112:47-54.

Pinto WJ, Ness WR. (1983). Stereochemical Specificity for Sterols In *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 258:4472-4476.

Poulter CD. (1990). Biosynthesis of non-head-to tail terpenes Formation of 1'-1 and 1'-3 linkages. *Acc Chem Res*. 23:70-77.

Quiñones W, Urbina JA, Dubourdieu M and Concapción. JL. (2004). The glycosome membrane of *Trypanosoma' cruzi* epimastigotes: protein and lipid composition. *Exp parasitol*. (enviada a publicar).

Quintas LE M, de Castro SL, JA. Urbina JA, Borba-Santos CN, Pinto R.

- Siqueira-Batista N, Miranda Filho.** (1996). Tratamento da doença de Chagas, p. 125-170. In R. Siqueira-Batista, A. D. Correa, and D. W. Higgins (ed.), *Molestia de Chagas*. Editora Cultura Medica, Rio de Janeiro, Brazil.
- Racagni GE, Machado de Domenech EE.** (1983). Characterization of *Trypanosoma cruzi* hexokinase. *Mol Biochem Parasitol.* 9:181-8.
- Radisky ES, Poulter CD.** (2000). Squalene synthase: steady-state, pre-steady state and isotope-trapping studies. *Biochemistry.* 39:1748-1760.
- Rahier A, Taton M, Benveniste P.** (1990). In *Biochemistry of Cell Walls And Membranes in Fungi* (Kuhn PJ, Trinci APJ, Jung MJ, Goosey MW and Copping LG., eds), pp. 205-221, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.
- Reeves RE, Menzies RA, Hsu DS.** (1968). The pyruvate-phosphate dikinase reaction. The fate of phosphate and the equilibrium. *J. Biol. Chem.* 243:5486-5491.
- Rilling HC.** (1985). The mechanism of the condensation reactions of cholesterol biosynthesis. Fourth Morton lecture. *Biochem Soc Trans.* 13(6):997 - 1003.
- Robinson KA, Beverley SM.** (2003). Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite leishmania. *Mol Biochem Parasitol.* 128(2):217-228.
- Rodan GA, Martin T J.** (2000). Therapeutic approaches to bone diseases. *Science.* 289(5484):1508-1514.
- Rodriguez CO, Scott DA, Bailey BN, De Souza W, Benchimol M, Moreno B, Urbina JA, Oldfield E, Moreno SN.** (2000). Vacuolar proto:ol pyrophosphatase activity and pyrophosphate (PPI) in *Toxoplasma gondii* as possible chemotherapeutic targets. *Biochem J.* 349:737-745.
- Rodriguez RJ, Low C, Bottema CDK, Parks LW.** (1985). Multiple Functions for Sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 837:336-343.
- Rodriguez RJ, Taylor FR, Parks LW.** (1982). A Requirement for Ergosterol to Permit Growth of yeast Sterol Auxotrophs on Cholestanol. *Biochem Biophys Res Comm.* 106:435-441.
- Rogers MJ, Watts DJ, Russell RG.** (1997). Overview of bisphosphonates. *Cancer.* 80(8 Suppl):1652-1660.

Rotilman J, Simoni RD. (1992). Distinct sterol and nonsterol signals for the regulated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem.* 267:4223-4235.

Ruiz FA, Rodríguez CO, Docampo R. (2001). Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 276:26114-26121.

Ryder NS, Mieth H. (1992). Allylamine antifungal drugs. *Curr Top Med Mycol.* 4: 158-88.

Sacksteder KA, Jones JM, South ST, Li X, Liu y, Gould SJ. (2000). PEX19 bind multiple peroxisomal membrana proteins, is predominatly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrana synthesis. *J Cell Biol.* 148:931-944.

Sanchez-Moreno M, Fernandez-Becerra MC, Castilla-Calvete JJ, Osuna A. (1995). Metabolic studies by H RMN of different forms of *Trypanosoma cruzi* as obtained by "in vitro" culture. *FEMS Lett.* 133:119-125.

Sanchez-Moreno M, Opperdoes FR. (1992). Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas sp.* Isolated from *Euphorbia characias*. *54:185-200.*

Santa-Rita RM, Santos Barbosa H, Meirelles MN, de Castro SL. (2000). Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma crozi*. *Acta Trop. Mar.* 75:219-228.

Sasiak K, Rilling HC. (1988). Purification to homogeneity and some properties of squalene synthetase. *Arch Biochem Biophys.* 260(2):622-627.

Schofield CJ. (1992). The control of Chagas disease in America. Conference. XXVIII Brazilian Congress on Tropical Medicine, Belém, Brazil, February.

Scott DA, de Souza W, Benchimol M, Zhong I, lu HG, Moreno SN, Docampo R. (1998). Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 273:22151-22158.

Semer R, Gelerinter E. (1979). *Chem Phys. Lipid.* 23:201-212.

Shapiro DJ, Rodwell VW. (1971). Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthesis. *J Biol Chem.* 246(10):3210-3216.

Shimizu S, Nakano M. (2003). Structural characterization of triacylglycerol in several oils containing gamma-linolenic acid. *Biosci Biotechnol Biochem.* Jan 67(1):60-67.

Simons K, Ikonen E. (1997). Functional lipid rafts in cell membranes. *Nature*. 387:569-571.

Smedley Maclean 1, Thomas EM. (1920). The Nature of Yeast Fat. *Biochem J*. 14:484-493.

Smith FR, Kom ED. (1968). Dehydrostigmasterol and Ergosterol: the Major Sterol of an amoeba. *J Lipd Res*. 9:405-408.

Snyder WB, Koller A, Choy AJ, Johnson MA, Cregg JM, Rangell I, Keller GA, **Subramani S.** (1999). Pex17p is required for import of both peroxisome membrane and luminal proteins and interacts with Pex19p and the peroxisome targeting signal-receptor docking complex in *Pichia pastoris*. *Mol Biol Cell*. 10:4005-4019.

Soares M, Ribeiro R. (1999). Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas disease. *Mem Inst Osw Cruz*. 94:257-262.

Soltis DA, McMahon G, Caplan SI, Dudas DA, Chamberlin HA, Vattay A, Dottavio D, Rucker ML, Engstrom RG, Cornell-Kennon SA. (1995). Expression, purification, and characterization of the human squalene synthase: use of yeast and baculoviral systems. *Arch Biochem Biophys*. 316(2):713-723.

Sommer JM, Cheng Q-L, Keller G-A, Wang CC. (1992). In vivo import of firefly luciferase into the glycosomes of *Trypanosoma brucei* and mutational analysis of the C-terminal targeting signal. *Mol Biol Cell*. 3:749-59.

Sommer JM, Wang CC. (1994). Targeting proteins to the glycosomes of African trypanosomes. *Annu Rev Microbiol*. 48: 105-138.

Song XQ, Fukao T, Yamaguchi S, Miyazawa S, Hashimoto T, Orie T. (1994). Molecular cloning and nucleotide sequence of complementary DNA for human hepatic cytosolic acetoacetyl-coenzyme A thiolase. *Biochem Biophys Res Commun*. 201 :478-85.

Soukupova M, Sprenger C, Gorgas K, Kunau WH, Dodt G. (1999). Identification and characterization of the human peroxin PEX13. *Eur J Cell Biol*. 78:357-374.

South ST, Gould SJ. (1999). Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J Cell Biol*. 144:255-266.

Stamellos KD, Shackelford JE, Tanaka RD, Krisans SK. (1992). Mevalonate kinase is localized in rat liver peroxisomes. *J Biol Chem*. 267(8):5560-8.

- Stechmann A, Cavalier-Smith T.** (2002). Rooting the eukaryote tree by using a derived gene fusion Science 297:89-91.
- Stoppani AOM, Docampo R, Bosion JF, Frasch ACC.** (1980). Effect of inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation on *Trypanosoma cruzi* and growth. Mol Biochem Parasitol. 2:3-21.
- Stoppani AOM.** (1999).The chemotherapy of Chagas disease. Medicina (B Aires). 59 Suppl2:147-65.
- Subramani S, Koller A, Snyder WB.** (2000). Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. Annu Rev Biochem. 69:399-418.
- Sundar S, Makharia A, More DK, Agrawal G, Voss A, Fischer C, Bachmann P, Murray HW.** (2000). Short-course of oral miltefosine for treatment of visceral leishmaniasis. Clin Infect Dis. 31:1110-1113.
- Suresh S, Turley S, Opperdoes FR, Michels PAM, Hol WG.** (2000). A potential target enzyme for trypanocidal drugs revealed by the crystal structure of NADdependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania mexicana*. Struc Fold Des. 8:541-552.
- Swinkels BW, Gould SJ, Bodnar AG, Rachubinski RA, Subramani S.** (1991). A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. EMBO J. 10:3255-62.
- Swinkels BW, Loiseau A, Opperdoes FR, Borst P.** (1992). A phosphoglycerate kinase - related gene conserved between *T. trypanosoma brucei* and *Crithidia fasciculata*. Mol Biochem Parasitol. 50:69-78.
- Szkopinska A, Swiezewska E, Skoneczny M.** (2001). A novel family of longer chain length dolichols present in oleate-induced yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimie. 83:427-32.
- Tarnet MC.** (1889). Bacterial Triterpenoids. CR Acad Sci. 108:98-100.
- Taylor MB, Gutteridge WE.** (1987). *Trypanosoma cruzi*: subcellular distribution of glycolytic and some related enzymes of epimastigotes. Exp Parasitol. 63(1):84-97.
- Taylor MB, Gutteridge WE.** (1987). *Trypanosoma cruzi*: subcellular distribution of glycolytic and some related enzymes of epimastigotes. Exp Parasitol. 63:84-97.
- Teusik B, Walsh MC, Van Dam K, Westerhoff HV.** (1998). The danger of metabolic pathways with turbo designs. Trends Biochem Sci. 23:152-169.

- Thompson JF, Danley DE, Mazzalupo S, Milos PM, Lira ME, Harwood HJ.** (1998). Truncation of human squalene synthase yields active, crystallizable protein. *Arch Biochem Biophys.* 350:283-290.
- Thompson SL, Krisans SK.** (1990). Rat liver peroxisomes catalyze the initial step in cholesterol synthesis. The condensation of acetyl-CoA unit into acetoacetylCoA. *J Biol Chem.* 265:5731-2635.
- Tielens AG, Van Hellemond JJ.** (1998). Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. *Parasitol Today.* 14:265-271.
- Tielens AGM, van den Heulev JM, van Mazjik HJ, Wilson JE, Shoemaker CB.** (1994). The 50-kDa glucose 6-phosphate-sensitive hexokinase of *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem.* 269:24736-24741.
- Titirensko VI, Chang H, Rachubinski RA.** (2000). Fusion of small peroxisomal vesicles in vitro reconstructs an early step in the in vivo multistep peroxisome assembly pathway of yarrowia lipolytica. *J Cell Biol.* 148:29-44.
- Travis AJ, Sui D, Riedel KD, Hofmann NR, Moss SB, Wilson JE, Kopf GS.** (1999). A novel NH₂-terminal, nonhydrophobic motif targets a male germ cell-specific hexokinase to the endoplasmic reticulum and plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 274:34467-34475.
- Turco SJ, Descoteaux A.** (1992). The lipophosphoglycan of Leishmania parasites. *Annu Rev Microbiol.* 46:65-94.
- Urbina JA, Concepcion JL, Montalvetti A, Rodriguez JB, Docampo R.** (2003). Mechanism of action of 4-phenoxyphenoxyethyl thiocyanate (WC-9) against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Antimicrob. Agents ChemotlJer.* 47:2047-2050.
- Urbina JA, Concepcion JL, Rangel S, Visbal G, Lira R.** (2002). Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Tripanosoma cruzi* and *Leismania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 125:35-45.
- Urbina JA, Crespo A.** (1984). Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes. 1. Hexokinase and phosphofructokinase. *Mol Biochem Parasitol.* 11:225-39.
- Urbina JA, Docampo R.** (2003). Specific Chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology.* 19:495-501.
- Urbina JA, Lazardi K, Aguirre T, Piras MM, Piras R.** (1988). Antiproliferative synergism of the allylamine SF 86-327 and ketoconazole on epimastigotes and

amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Antimicrob Agents Chemother. 32: 1237-42.

Urbina JA, Lazardi K, Aguirre T, Piras MM, Piras R. (1991). Antiproliferative effects and mechanism of action of ICI 195,739, a novel bis-triazole derivative, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Antimicrob Agents Chemother. 35:730-735.

Urbina JA, Lazardi K, Marchan E, Visbal G, Aguirre T, Piras MM, Piras R, Maldonado RA, Payares G, de Souza W. (1993). Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. Antimicrob Agents Chemother. 37:580-91.

Urbina JA, Lira R, Visbal G, Bartroli J. (2000). In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Antimicrob Agents Chemother. 44:2498-2502.

Urbina JA, Machin I, Jurado L. (1993). The limitations of paradigms: studies on the intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. Sol Res. 26:81-8.

Urbina JA, Moreno S, Vierkötter S, Oldfield E, Payares G, Sanoja C, Sailey SN, Yan W, Scott DA, Moreno SN, Docampo R. (1999). *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth in vitro and in vivo is blocked by pyrophosphate analogs. J Biol Chem. 274:33609-33615.

Urbina JA, Osorno CE, Rojas A. (1990). Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Trypanosoma cruzi (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by 3-mercaptopicolinic acid: *in vitro* and *in vivo* studies. Arch Biochem Biophys. 282:9199.

Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Piras R, Perez N, Wincker P, Loebenberg D. (1998). Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. Antimicrob Agents Chemother. 2:1771-1777.

Urbina JA, Payares G, Molina J, Sanoja C, Liendo A, Lazardi K, Piras MM, Piras R, Perez N, Wincker P, Ryley JF. (1996). Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using 00870. Science. 273:969-71.

- Urbina JA, Vivas J, Lazardi K, Molina J, Payares G, Piras MM, Piras R.** (1996). Antiproliferative effects of delta 24(25) sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Chemotherapy*. 42:294-307.
- Urbina JA, Vivas J, Visbal G, Contreras LM.** (1995). Modification of the sterol composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by delta 24(25)-sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Mol Biochem Parasitol*. 73:199-210.
- Urbina JA.** (1997). Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology*. 114 Suppl: S91-9.
- Urbina JA.** (1999). Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *J Mol Med*. 77:332-338.
- Urbina JA.** (1999). Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94 Suppl 1: 349-55.
- Urbina JA.** (2001). Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr Opin Infect Dis*. 14:733-741.
- Urbina JA.** (2002). Chemotherapy of Chagas Disease. *Curr Pharm Design*. 8:287-295.
- Urbina JA.** (2003). Rational approaches to specific chemotherapy of Chagas disease. *World Class Parasites: Volume 7. American Trypanosomiasis*, p. 127-135. In K. M. Tyler and M. A. Miles (ed.), 2nd ed. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Urbina, JA.** (1994). Intermediary Metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 10:107-110.
- Van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Lowik C, Papapoulos S.** (1999). Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochem Biophys Res Commun*. 264:108-111.
- Van der Ploeg LHT, Bernads A, Rijsewijk FAM, Borst P.** (1982). Characterization of the DNA duplication-transposition that controls the expression of two genes for variant surface glycoproteins in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res*. 10:593-609.
- Van Hellemond JJ, Oppendoorn FR, Tielens AG.** (1998). Trypanosomatidae produce acetate via a mitochondrial acetate:succinate CoA transferase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(6):3036-41.

Van Roermund CW, Veldhoven PP. (1995). Functions and organization of peroxisome in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *EMBO J.* 14:3480-3486.

Van Roermund CW, Tabak HF, Van den Berg M, Wanders RJ, Hettema EH. (2000). Pex11 p plays a primary role in medium-chain fatty acid oxidation, a process that affects peroxisome number and size in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 150:489-498.

Vanden Bossche H, Willemsens G, Cools W, Lawers W, LeJeune L. (1978). Biochemical effects of miconazole on fungi. Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Chem Biol Interact.* 21 :59-67.

Vanden Bossche H, Willemsens G, Cools W, Marichal, P, Lauwers W. (1990). Importance and Role of Sterol in Fungal Membranes in Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi. *Biochem Soc Trans.* 11 :665-667.

Vanden Bossche, H. (1995). Chemotherapy of human fungal infections, p. 431-484. In H. Lyr (ed.), *Modern selective fungicides. Properties, applications, mechanism of action.* Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany.

Venkatraman M, Jia Z, Nes WD. (1996). Mechanism and structural requirements for transformation of substrates by the (S)-adenosyl-L-methionine: $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyl transferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1299:313-324.

Vercesi AE, Docampo R. (1994). $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J.* 304:227-233.

Vercesi AE, Docampo R. (1996). Sodium-proton exchange stimulates Ca^{2+} release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J.* 315:265-270.

Verleur N, Hettema EH, Van Roermund CW, Tabak HF, Wanders RJ. (1997). Transport of activated fatty acids by the peroxisomal ATP-binding-cassette transporter Pxa2 in a semi-intact yeast cell system. *Eur J Biochem.* 249 :657-661.

Verlinde CLMJ, Hannaert V, Blonski C, Wilson M, Perie JJ, Fothergill-Gilmore LA. (2001). Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Updates.* 4:50-65.

Vikerman K. (1994). The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol.* 24: 1317-1331.

- Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E.** (1994). Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with longterm follow-up. *Am Heart J.* 127(1):151-62.
- Vivas J, Urbina JA, DeSouza W.** (1996). Ultrastructural alterations in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* induced by A²⁴(25) sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Intern. J. Antimicrob. Agents.* 7:235-240
- Vladusic EA, Pignataro OP, Bussmann LE, Charreau EH.** (1995). Regulation of Cholesterol ester cycle and progesterone synthesis by juvenile hormone in MA-10 Leydig tumor cells. *J Steroid Biochem. Mol Biol.* 52:83-90.
- Vladusic EA, Pignataro OP, Bussmann LE, Stoka AM, Rodriguez JB, Gros EG, Charreau EH.** (1994). Effect of juvenile hormone on mammalian steroidogenesis. *J Steroid Biochem. Mol Biol.* 50:181-187.
- Vogler WR, Shoji M, Hayzer DJ, Xie VP, Renshaw M.** (1996). The effect of edelfosine on CTP:cholinephosphate cytidylyltransferase activity in leukemic cell lines. *Leuk Res.* 20:947-951.
- Ward WHJ, Holdgate GA, Freeman S, McTaggart F, Girdwood PA, Davison RG, Mallion KB, Brown GR, Eakin MA.** (1996). Inhibition of squalene synthase in vitro by 3-(biphenyl-4-yl)-quinuclidine. *Biochem Pharmacol.* 51: 1489-1501.
- Watson PA, Hill PE, Subramani S.** (1995). Import of stably folded protein into peroxisomes. *Mol Biol Cell.* 6:675-683.
- Watson NS, Procopiou PA.** (1996). Squalene synthase inhibitors : their potential as hypocholesterolemic agents. *Prog Med Chem.* 33:331-378.
- Werner J, Kovacs LM, Krisan SK.** (2002). Central role of peroxisome in isoprenoid biosynthesis. *Progr Lipid Res.* 41 :369-391.
- Wieder T, Haase A, Geilen CC, Ofanos CE** (1995). The effect of two synthetic phospholipids on cell proliferation and phosphatidylcholine biosynthesis in MadinDarby canine kidney cells. *Lipids.* 30:389-393.
- Wiemer EAC.** (1996). Identification of 2-enoyl coenzyme A hydratase and NADP⁺-dependent 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity in glycosomes of procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 82: 107-111.
- Wilkinson SR, Meyer DJ, Taylor MC, Bromley EV, Miles Ma, Kelly JM.** (2002). The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPX is a glycosomal peroxidase

and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. J Biol Chem. 277:17062-17071.

Wilson JE. (1995). Hexokinases. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 126:65-198.

Wilson M, Sanejouand yH, Perie J, Hannaert V, Oppendoes F. (2002). Sequencing, modeling and selective inhibition of *Trypanosoma brucei* hexokinase. Chem Biol 2002; in press.

Wood HG, O'Brien W, Michael G. (1985). Properties of carboxytransphosphorylase; pyruvate phosphate dikinase; pyrophosphate phosphofructokinase and pyrophosphate-acetatekinase and their roles in the metabolism of inorganic pyrophosphate. Advances Enzymol. 45:85-155.

Yamaguchi H. (1991). Antifungal agents-recent trends in development and progress in research of action mechanism. Nippon Rinsho. 49(9):2176-85.

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

8. LISTA DE PUBLICACIONES.

8.1. Concepción JI, Adjé CA, Quiñones W, Chevalier N, Dubourdieu M, Michel PAM. The expression and intracellular distribution of phosphoglycerate kinase isoenzymes in *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology. (2001), 118:11-121.

8.2. Cáceres AJ, Portillo R, Acosta H, Rosales D, Quiñones W, Avilan L, Salazar L, Dubourdieu M, Michels PAM, Concepción JL. Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical parasitology. (2003), 126:251-262.

8.3. Acosta H, Dubourdieu M, Cáceres A, Bringaud F, Concepción JL. Pyruvate Phosphate Dikinase and Pyrophosphate Metabolism in the Glycosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. (2004), Comparative Biochemical Physiology. (aceptado para publicar).

8.4. Concepción JL, Acosta H, Quiñones H, Dubourdieu M. A α -glycerophosphate Dehydrogenase is Present in *Trypanosoma cruzi* Glycosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz. (2001), 96(5):697-701.

8.5. Concepción JL, Pacanowska D, and Urbina JA. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA Reductase in *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: Subcellular Localization and Kinetic Properties. Archives of Biochemistry and Biophysics. (1998), 352:114-120.

8.6. Urbina JA, Concepción JL, Rancel S, Visbal G, Lira R. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. Molecular and Biochemical Parasitology. (2002), 125:35-45.

8.7. Urbina JA, Concepción JL, Montalvetti A, Rodríguez JB, Docampo R. Mechanism of Action of 4-Phenoxyphenoxyethyl Thiocyanate (WC-9) against *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. (2003), 47:2047-2050.

8.8. Ubina JA, Concepción JL, Caldera A, Payares G, Sanuja C, Otomo T, and Hiyoshi. *In vitro* and *in vivo* activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. (2004), en prensa.

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento