



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

03062
14

2ej

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

UACPyP del CCH

FIERRO Y ESTRÉS OXIDATIVO
EN *Trypanosoma cruzi*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA

LIBB. LAURA DEL CARMEN VARGAS PARADA

México, D.F.

FALLA DE ORIGEN

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Quiero dedicar esta tesis a mis papás: Roberto y Gladys por haberme siempre enseñado que no hay límites para el pensamiento. Por todo su apoyo y amor, gracias.

Para Efra

AGRADECIMIENTOS

La formación académica de un individuo es fruto del esfuerzo de muchas personas. A lo largo de estos años han habido profesores y amigos que de una u otra manera han tenido enorme influencia en mi desarrollo. A todos ellos muchas gracias.

A mi querida JEFA por todos estos años de apoyo y amistad. Hace siete años llegué a su grupo por primera vez. A mi primer laboratorio. Hoy tengo el orgullo de salir de él siguiendo mi propio camino hacia un futuro en la investigación. Por todo eso y mucho más, muchas gracias Julieta.

Este trabajo se llevó a cabo parte en el laboratorio de la Dra. Julieta Rubio en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y parte en el laboratorio del Dr. John Kelly en la London School of Hygiene and Tropical Medicine. Agradezco a John y todo su equipo el apoyo durante mi estancia en Londres.

A Chesco, porque juntos imaginamos e inventamos un mundo completo. Por todo lo que me has enseñado y por las muchas discusiones que aún habrá. A Lui.

A mi comité tutorial, Dr. Edmundo Chávez, Dr. Lino Díaz de León, Dr. Roberto Hernández y Dra. Julieta Rubio. A todos ustedes gracias por sus valiosos comentarios y críticas.

A mis revisores de tesis Dr. Rafael Bojalil, Dr. Lino Díaz de León, Dra. Carmen Gómez, Dr. Roberto Hernández y muy especialmente al Dr. Juan Pedro Laclette por todo su apoyo y ayuda durante la elaboración de esta tesis.

Finalmente quiero agradecer a todas aquellas personas sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible. Al Sr. de la Mora, Lucy, Don Pepe, Alfonso, Don Erasto, mil gracias.

Esta tesis se llevó a cabo con apoyo de la Dirección General para Asuntos del Personal Académico, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y del Consejo Británico.

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIACIONES	1
RESUMEN	3
I. INTRODUCCIÓN	4
LA ENFERMEDAD.....	8
EL PARÁSITO	10
EL VECTOR.....	11
EL ESTRES OXIDATIVO Y LOS PRINCIPIOS DE PROTECCION.....	14
T. CRUZI Y EL ESTRES OXIDATIVO	18
LA TRANSFERRINA Y SU RECEPTOR.....	19
MECANISMOS DE DETOXIFICACION EN T. CRUZI	20
SUPEROXIDO DISMUTASA Y T. CRUZI.....	21
II. OBJETIVOS.....	22
OBJETIVOS PARTICULARES	23
III. MATERIALES Y METODOS	24
PARÁSITOS	24
ANÁLISIS DE LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE CÉLULAS CRECIDAS BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FIERRO.....	24
EXTRACCIÓN DE DNA.....	25
EXTRACCIÓN DE RNA.....	25
DIGESTIÓN Y RESTRICCIÓN DEL DNA.....	25
ANÁLISIS TIPO SOUTHERN	26
ANÁLISIS TIPO NORTHERN	26
SONDA PARA LA PUT.....	26
<i>Purificación del producto del PCR.....</i>	27
<i>Marcaje de la sonda PUT</i>	27

SONDA PARA LA FE-SOD	27
TAMIZAJE DE LA BIBLIOTECA GENÓMICA DE T. CRUZI	28
EXPERIMENTOS DE SENSIBILIDAD A DROGAS	28
IV. RESULTADOS	30
PATRONES PROTEICOS DE T. cruzi EN RESPUESTA A LA CONCENTRACIÓN DE FIERRO EN EL MEDIO	30
REGULACIÓN DE LA FE-SOD	30
<i>Exposición a peróxido de hidrógeno</i>	31
<i>Exposición a generadores de superóxido</i>	33
<i>Exposición a compuestos de importancia médica</i>	36
ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT	36
GENE DE LA PROTEINA QUE UNE TRANSFERRINA (PUT)	40
V. DISCUSIÓN	45
GEN DE LA PUT	46
REGULACIÓN DE LA FE-SOD	47
VI. REFERENCIAS	49

LISTA DE ABREVIACIONES

DNA	ácido deoxiribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
DNA _r	DNA ribosomal
SOD	superóxido dismutasa
Fe-SOD	superóxido dismutasa de hierro
Mn-SOD	superóxido dismutasa de manganeso
Cu/Zn-SOD	superóxido dismutasa de cobre-zinc
CAT	catalasa
GSH-Px	glutación peroxidasa
GSH	glutación
PUT	proteína que une transferrina
BV	benzil viológeno
MV	metil viológeno
NIF	nifurtimox
NFZ	nitrofurazón
PBS	amortiguador salino de fosfatos
SDS	sodio dodecil sulfato
TE	amoriguador de tris-EDTA
TBE	amoriguador de tris-boratos-EDTA
TEMED	diamino N,N,N',N'-tetrametileno
EDTA	diamino etileno ácido tetra acético
dNTP	nucleótidos 5'-trifosfato monodeóxidos
DMF	dimetilformamida
GTC	tiocianato de guanidina
EtBr	Bromuro de etidio

*Beyond the horizon of the place
we lived when we were young
in a world of magnets and miracles
our thoughts strayed constantly
and without boundary*

D. Gilmour and Samson, 1994

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fué estudiar algunos de los mecanismos utilizados por el *Trypanosoma cruzi* para defenderse del daño causado por el estrés oxidativo. Se ha descrito que las proteínas quelantes de hierro son importantes en la prevención del daño causado por oxidantes en las células. El *T. cruzi* posee una proteína que une transferrina del huésped (PUT) y se ha propuesto que participa en la captación del hierro, esencial para su crecimiento y diferenciación. Inicialmente se trató de aislar su gene mediante la reacción de la polimerasa en cadena, y utilizando dos iniciadores basados en la secuencia amino y carboxilo terminal de una proteína homóloga del *Trypanosoma brucei brucei*. Con estos iniciadores se logró amplificar selectivamente al gene correspondiente del genoma de *T. brucei*. Este fragmento (1kb) se utilizó como sonda para tamizar una librería de cósmidos representativa del DNA genómico de *T. cruzi*. Después de varios intentos encontramos que la sonda no poseía la especificidad necesaria. Se discuten varias alternativas para lograr la clonación del gene, así como los motivos por los cuales la sonda de *T. brucei* no funcionó.

Como segunda línea de trabajo, analizamos la expresión del gene de la superóxido dismutasa de hierro de *T. cruzi* (Fe-SOD) bajo el efecto de diferentes inductores de estrés oxidativo. Cabe mencionar que el gene que codifica para la Fe-SOD fue recientemente clonado a partir de una biblioteca genómica de *T. cruzi*. Se determinó el efecto de diversos compuestos productores de radicales libres, en la viabilidad de *T. cruzi*. Posteriormente se analizó la expresión de RNAm bajo esas mismas condiciones. El RNAm de la Fe-SOD aumenta cuando las células están expuestas a generadores de superóxido mientras que el efecto contrario se observa en la presencia de peróxido de hidrógeno. El nifurtimox y nitrofurazone conocidas por su habilidad para producir superóxido y peróxido de hidrógeno, aumentaron la concentración de RNAm de la Fe-SOD lo que apoya la idea de que estas drogas al ser metabolizadas producen importantes cantidades de radicales superóxido. Se discute también el futuro de las técnicas de biología molecular y su aplicación en el estudio de la respuesta al estrés oxidativo en el parásito.

I. INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis Americana, también conocida como Enfermedad de Chagas, es un serio problema de salud que afecta exclusivamente al continente Americano. Se estima que 18 millones de personas se encuentran infectadas y que otros 100 millones están en riesgo de contraer la enfermedad¹ (Fig 1).

La Tripanosomiasis se presenta a lo largo de la América Latina aunque las manifestaciones clínicas y las características epidemiológicas de la enfermedad varían de una zona endémica a otra. Se encuentran varios modos de transmisión, distintas patologías y prevalencias, así como variaciones en los parásitos (agentes causales), vectores (organismos transmisores) y animales reservorios (intermediarios). Como en muchas otras enfermedades parasitarias, la enfermedad de Chagas se encuentra estrechamente ligada a las condiciones sociales y económicas. Las paupérrimas condiciones de vivienda (usualmente casas de paja, madera y palma) (Fig 2), la frecuente migración de personas y la rápida urbanización en las periferias de las grandes ciudades favorecen la presencia de los vectores (chinches triatóminas) y por consiguiente, de la enfermedad que éstos transmiten.

En la República Mexicana, la situación no ha sido estudiada suficientemente como para establecer la magnitud del problema aunque existen algunas estimaciones. En dos terceras partes del país se han localizado vectores infectados con el parásito^{2,3,4} y se han detectado casos humanos (por comprobación parasitológica) en los estados de Oaxaca, Chiapas, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Zacatecas, Yucatán, Veracruz, Edo. de México y Sonora^{2,4} (Fig 3). En 1988 se realizó un análisis de la información epidemiológica existente en el país calculándose una prevalencia de poco menos del 6%⁵, lo que resulta consistente con las frecuencias de infección reportadas para otros países de Latinoamérica, las cuales son generalmente del 2 al 8%⁶.

La Enfermedad debe su nombre al médico brasileño Carlos Chagas (Fig 4) quien en 1909 identificó al transmisor, un artrópodo hematófago, que infesta las viviendas y produce picaduras en el hombre. Al examinar el contenido intestinal del insecto, encontró gran cantidad de flagelados móviles. Chagas bautizó a esto flagelado con el nombre de *Trypanosoma cruzi*, en honor de su maestro y mentor Oswaldo Cruz, quien participó en la



Figura 1. Zonas afectadas por la Enfermedad de Chagas



Figura 2. Las condiciones socioeconómicas y de vivienda favorecen la transmisión de la enfermedad. (Tomado de Salazar PM *et al*, 1988)

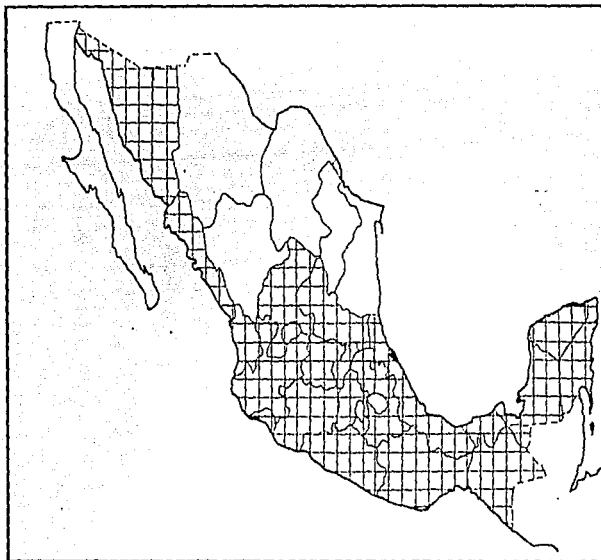


Figura 3. Zonas afectadas por la Enfermedad de Chagas en México.



Figura 4. Doctor Carlos Chagas

identificación del parásito.

Posteriormente al observar la sangre periférica de un enfermo, Chagas descubrió flagelados idénticos a los observados en el insecto. Este es el primer caso donde se descubrió al parásito antes de conocerse la enfermedad. Mas adelante Gaspar Vianna completó los estudios parasitológicos y describió las lesiones histopatológicas fundamentales.

LA ENFERMEDAD

La Tripanosomiasis Americana es una enfermedad crónica causada por el parásito flagelado *Trypanosoma cruzi* (Fig 5). El parásito se transmite normalmente a los humanos y demás mamíferos por chinches triatominas. En la enfermedad de Chagas, los parásitos no son inoculados directamente a través de las estructuras bucales del insecto, como ocurre en el caso de la Tripanosomiasis Africana, sino que son depositados en la piel del huésped junto con las heces fecales de la chinche al defecar ésta mientras se alimenta (Fig 6).

Posteriormente los tripanosomas penetran la piel al contaminarse la herida con las heces cuando el huésped se rasca o cuando previamente existen abrasiones en la piel. Asimismo, el parásito puede penetrar al cuerpo a través del tejido mucoso o la conjuntiva de los ojos. La enfermedad también se transmite congénitamente, por el transplante de órganos infectados, o por la transfusión de sangre contaminada. Este último modo de transmisión es la segunda causa de infección en zonas endémicas, después de la natural por el vector¹.

La enfermedad se caracteriza por tres fases principales: una fase aguda de corta duración y una fase crónica prolongada, separadas entre sí por una fase clínicamente asintomática llamada fase indeterminada⁷. Diversos órganos son afectados y la enfermedad puede ser fatal tanto en la fase crónica como en la aguda. La fase aguda es asintomática o inaparente en la mayoría de los casos, aunque puede causar la muerte de aproximadamente el 10% de los individuos afectados. Cuando existen síntomas, éstos son los característicos de una infección generalizada como fiebre, inflamación de hígado y bazo, edema y nódulos linfáticos pronunciados. Es también común que se forme una lesión en la región de la picadura, conocida como chagoma. La mayoría de los casos agudos se transforman en un período de entre dos a tres meses a un estado sub-agudo y de éste, a

un estado crónico asintomático, comúnmente llamado fase indeterminada. En la fase crónica ocurren anomalías electrocardiográficas, aperistalsis, aumento del tamaño del corazón y dilatación de otras vísceras como el esófago y cólon (megaesófago y megacólon)⁸.

A diferencia de otras tripanosomiasis, la enfermedad de Chagas no responde bien a la quimioterapia. Las drogas de las que se dispone actualmente como el nifurtimox, nitrofurazone y benznidazol, son sólo efectivas durante la fase aguda y tienen efectos secundarios de importancia. Todas estas drogas están basadas en el anillo imidazol. Otros miembros de este grupo han resultado efectivos en el tratamiento contra protozoarios, hongos y bacterias. Sin embargo, preocupa el hecho de que algunos de los miembros del grupo poseen grupos nitro (NO_2) los cuales posiblemente son cancerígenos. Aún se desconoce el mecanismo de acción de estas drogas aunque hay algunas sugerencias de que éstas pueden inducir la generación de radicales libres⁹.

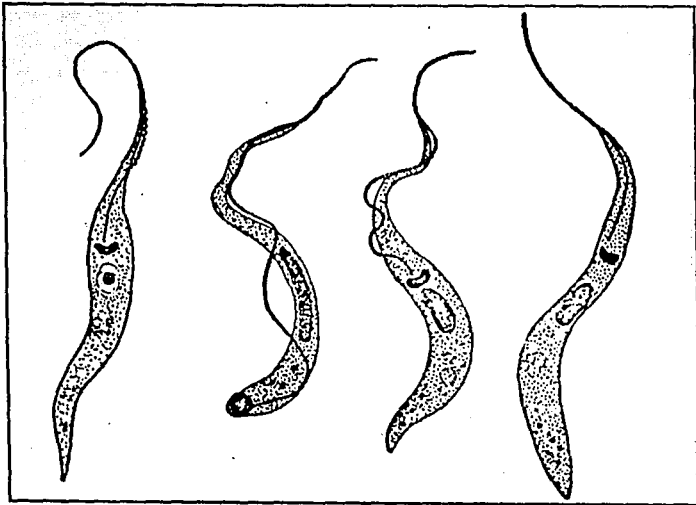


Figura 5. Formas móviles de *Trypanosoma cruzi* que se observan en cultivo.



Figura 6. La chinche defeca mientras se alimenta. Es en las heces fecales donde se encuentran los tripomastigotes infectivos

.EL PARÁSITO

Como se mencionó previamente, la enfermedad de Chagas es causada por el parásito flagelado *Trypanosoma cruzi* (Fig 5), el cual pertenece al Phylum de los Sarcomastigophora. Este parásito posee un organelo característico, el cinetoplasto, una mitocondria atípica que contiene una red de moléculas circulares de DNA concatenadas y que sitúan a dicho organismo en el orden de los Kinetoplastida^{7,10}.

El parásito posee un complejo ciclo de vida que alterna entre un transmisor hematófago invertebrado (insecto triatómimo) y un huésped vertebrado. Como reservorios se pueden mencionar muchos tipos de animales salvajes (como el armadillo y la rata) y domésticos (como el perro y el cerdo).

El *T. cruzi* presenta cuatro formas morfológicas diferentes tanto fisiológica como bioquímicamente. Dos de estas formas habitan en el hospedero vertebrado: El amastigote (AM) y el tripomastigote procíclico (TP) (Fig. 7). El AM tiene forma esferoide y el flagelo es prácticamente imperceptible, es intracelular y se desarrolla en diferentes tipos de tejidos, encontrándose más frecuentemente en células del sistema retículo-endotelial del bazo, hígado y linfa, así como en células de músculo cardíaco, estriado y liso. Los AM se multiplican por fisión binaria y eventualmente rompen la célula invadida para colonizar células adyacentes y/o transformarse en tripomastigotes procíclicos. El TP posee un flagelo moderadamente largo, es extracelular y se encuentra circulando en la sangre; es incapaz de dividirse^{7,11}.

La chinche triatómina al alimentarse de la sangre del huésped ingiere a los TP que circulan en la sangre. Los parásitos pasan a través del tubo digestivo del insecto hasta llegar a la porción posterior del intestino medio, donde se convierten en epimastigotes (EP) (Fig 8). Los EP son la forma replicativa del insecto, multiplicándose por fisión longitudinal. Después de 8 a 10 días de haber sido infectada la chinche, los EP se transforman en tripomastigotes metacíclicos (TM) en el recto del insecto (Fig 7 y 8). Estos últimos son expulsados en las heces y la orina del insecto hematófago cuando se alimenta del huésped^{7,11} (Fig 8).

El huésped vertebrado se infecta si existen lesiones de la capa queratínica de la epidermis (o las genera al rascarse) ó por contaminación de las mucosas, permitiendo así la entrada de los TM al torrente sanguíneo. Una vez en sangre, los TM penetran a las células, donde se diferencian al estadio de AM reiniciándose el ciclo (Fig 7).

EL VECTOR

Los Triatóminos son insectos del orden Hemiptera, familia Reduviidae. Los reduvidos se distinguen de otros miembros del orden por la presencia de una proboscis con tres segmentaciones que se recoge debajo de la cabeza durante el reposo (Fig 8).

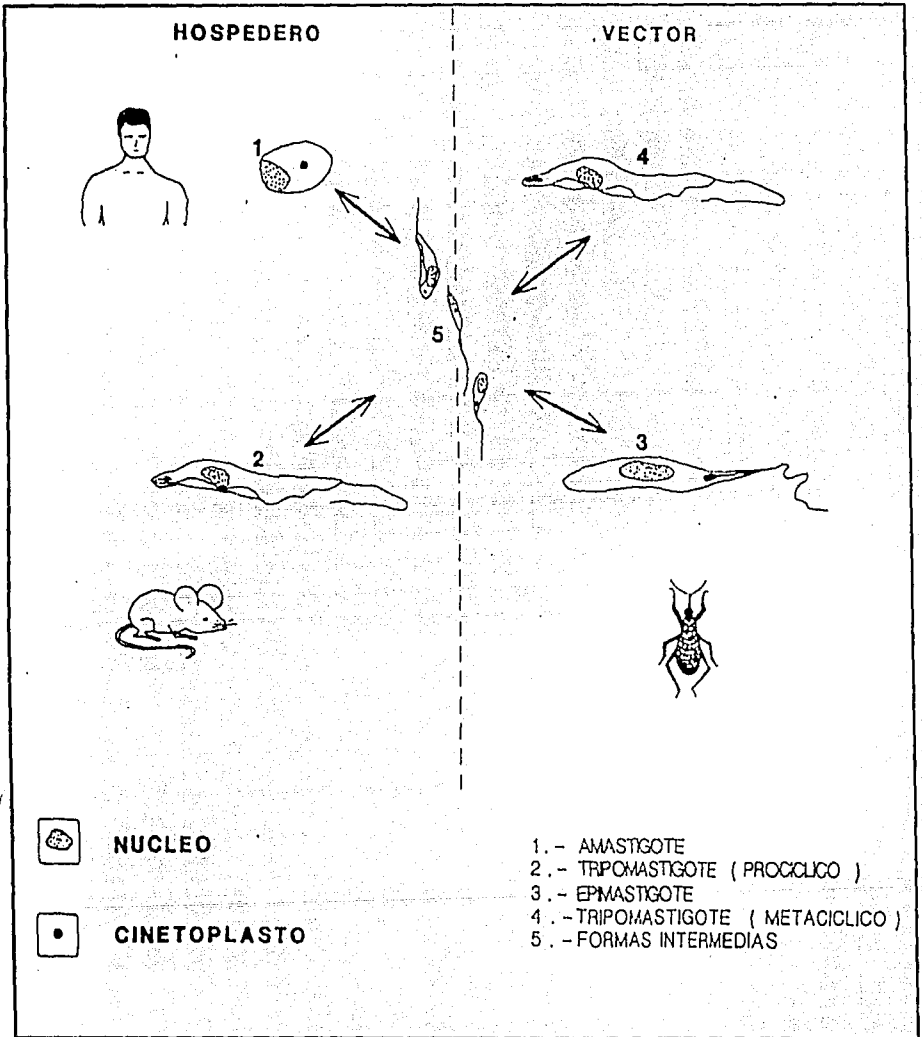


Figura 7. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

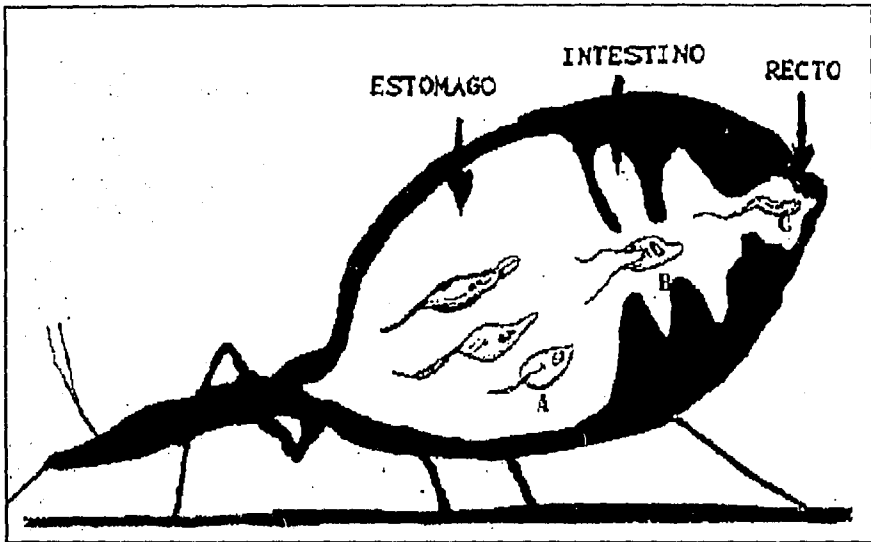


Figura 8. Los tripomastigotes procíclicos son ingeridos por el insecto vector y se transformándose pocas horas después en epimastigotes en el estómago del vector. **A.** Los epimastigotes se multiplican en el intestino por fisión binaria. **B.** Posteriormente se diferencian a tripomastigotes metacíclicos (TM) en el recto. **C.** Los TM son liberados junto con las heces fecales mientras el vector se alimenta de su huésped.

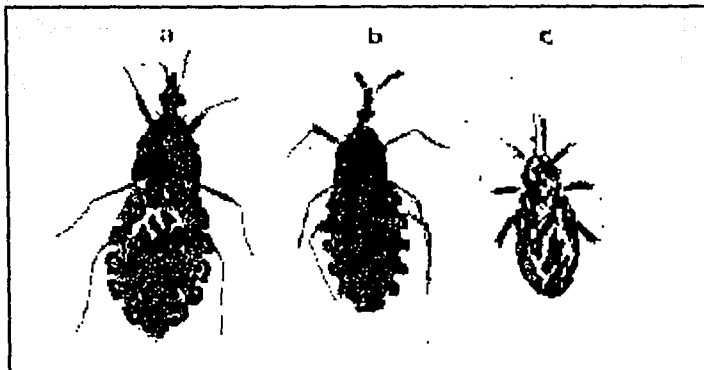


Figura 9. Diferentes especies de triatominos vectores de *Trypanosoma cruzi*.
a. *Pastronygylus megistus* **b.** *Triatoma infestans* **c.** *Rhodnius prolixus*

Las chinches tienen un tamaño muy variado que va desde 5 hasta 45 mm y su color desde amarillo pálido hasta negro, de acuerdo con la especie (Fig 9). Los tres géneros más importantes en la distribución de la enfermedad de Chagas son *Rhodnius*, *Triatoma* y *Pastrongylus*. El género *Pastrongylus* tiene una cabeza corta y robusta con las antenas insertadas inmediatamente enfrente de los ojos (Fig 9a). En los *Triatoma*, el largo de la cabeza es intermedio y las antenas se insertan cerca de los ojos (Fig 9b). El género *Rhodnius* se distingue por una larga cabeza con antenas insertadas al frente (Fig 9c). La principal característica biológica de los *Triatomíneos* es el ser hematófagos obligados, tanto en sus estados larvarios (ninfas) como en el adulto. Todas las especies son vectores potenciales de *T. cruzi* aunque son seis las especies con significancia epidemiológica: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *Pastrongylus megistus* y *Rhodnius prolixus*.

EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LOS PRINCIPIOS DE PROTECCION

Muchos compuestos que causan daño celular letal son primero metabolizados a especies electrofílicas o radicales libres. Un radical libre se define como "cualquier especie que contenga uno o más electrones desapareados"¹². Los radicales libres dañan seriamente a los lípidos y a los ácidos nucleicos (Fig 10).

Una fuente alternativa de radicales es el oxígeno molecular (O_2) cuando se reduce. La reducción del oxígeno con un electrón es una reacción que puede ser catalizada por diversas enzimas incluyendo la NADPH-citocromo P-450 reductasa, la xantino oxidasa y por hemoproteínas (como la hemoglobina y los citocromos)¹³. Como producto se forma el anión superóxido O_2^- , el cual es altamente reactivo y está sujeto a diversas reacciones metabólicas y químicas incluyendo la dismutación a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (catalizada por la superóxido dismutasa), y la protonación formando el radical hidroperóxido ($HOO\cdot$). Esta especie también se forma como producto del transporte de electrones en la mitocondria, el ciclo redox y la autooxidación de moléculas endógenas.

La reducción del oxígeno molecular por dos electrones resulta en la formación de peróxido de hidrógeno, el cual es rápidamente detoxificado por la glutatión peroxidasa y por la catalasa, para dar como productos agua y oxígeno. El peróxido de hidrógeno que

Figura 10. Algunos de los mecanismos por los cuales el estrés oxidativo causa daño al DNA y a los lípidos.

ESTRÉS OXIDATIVO

Liberación de iones cobre o fierro dentro de la célula.

Generación de OH^\cdot cerca del DNA al reaccionar el H_2O_2 con metales de transición que ya se encontraban unidos a DNA.

Cortes al DNA
Modificación de bases
Fragmentación de deoxirribosas.

Unión de iones al DNA

ESTRÉS OXIDATIVO

Liberación del Ca^{+2} mitocondrial.
Inactivación de la unión del Ca^{+2} al retículo endoplásmico.

Fragmentación del DNA. (No hay modificación de bases).

Incremento en el Ca^{+2} intracelular libre.

Activación de endonucleasas

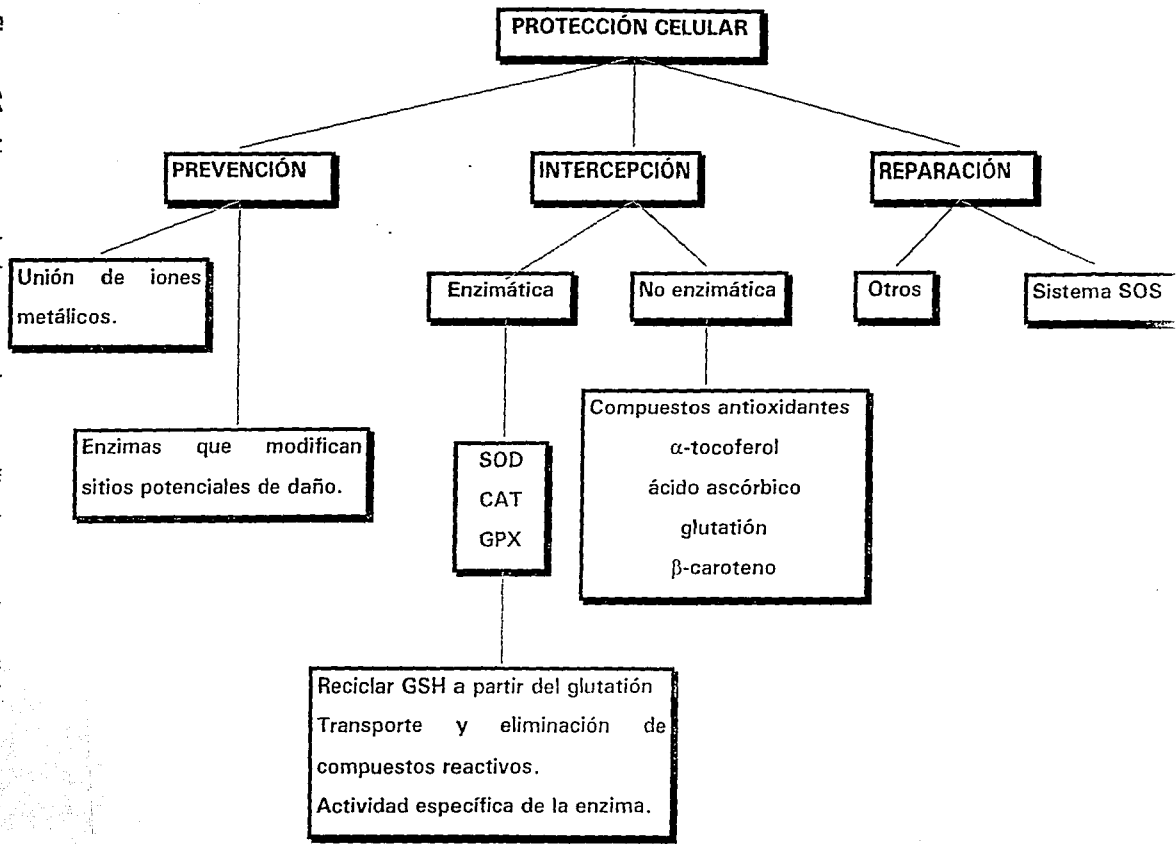
escapa del proceso de detoxificación puede producir radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), que participan en reacciones en cadena generando más especies reactivas de oxígeno incluyendo oxígeno singulete, $^1\text{O}_2$.

Un antioxidante es cualquier sustancia que en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, detiene o inhibe su oxidación. El estrés oxidativo se define como un desbalance en favor de los prooxidantes contra los antioxidantes, que potencialmente ocasiona daño¹⁴.

Las células poseen mecanismos de defensa en contra de los oxidantes, sin los cuales la supervivencia en condiciones aeróbicas sería prácticamente imposible. La protección celular se basa en la combinación de tres mecanismos principales: prevención, intercepción y reparación (Fig 11). La prevención es la primera línea de defensa contra las especies reactivas del oxígeno. Incluye la unión de iones metálicos, en particular hierro y cobre, con el fin de evitar la peroxidación de los lípidos y la fragmentación del DNA. Entre las proteínas que son utilizadas con este propósito se encuentran la transferrina, la ferritina, así como otras hemoproteínas, proteínas ferrosulfatadas y porfirinas (Fig 11a).

La intercepción puede ser enzimática o no enzimática. En el último grupo se encuentran compuestos antioxidantes de bajo peso molecular tales como el α -tocoferol, el ácido ascórbico, glutatión y el β -caroteno. Las principales enzimas antioxidantes son: la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Fig 11b). Estas enzimas han evolucionado específicamente para atacar al anión superóxido, y a los peróxidos tanto de hidrógeno como orgánicos. Algunas de ellas reparan el daño causado al DNA. La superóxido dismutasa (SOD)^{15,16} convierte al anión superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2)^{15,16,17}. Todas las superóxido dismutasas tienen por lo menos un metal de transición (Fe, Mn ó Cu) en su sitio activo. La disminución del anión superóxido por las SOD es un importante mecanismo fisiológico antioxidante en los organismos aeróbicos¹⁸. Sin embargo, también se ha demostrado que un exceso de actividad de las SOD en relación con las enzimas removedoras de peróxido de hidrógeno, puede ser dañino¹⁹. Las catalasas promueven la dismutación del peróxido de hidrógeno, formando agua y oxígeno molecular. La glutatión peroxidasa (GSH-Px) cataliza la reducción de hidrógeno e hidroperóxidos, usando al glutatión (GSH) como donador de electrones. El

Figura 11. Algunos de los mecanismos utilizados por las células para contender con el estrés oxidativo.



GSH en sí mismo es un antioxidante clave²⁰. Los niveles basales de las enzimas antioxidantes se mantienen estrictamente aunque las células deben contar con mecanismos que les permitan regular la actividad de estas enzimas cuando hay un incremento repentino de metabolitos de oxígeno. Poco se sabe sobre la expresión constitutiva de estas enzimas.

Una vez que ha ocurrido daño a las células, estas dependen de mecanismos de reparación para sobrevivir. Existen múltiples sistemas enzimáticos encargados de reparar el DNA así como enzimas lipo y proteolíticas capaces de restituir y restaurar²¹ tanto lípidos como proteínas (Fig 11c).

T. CRUZI Y EL ESTRES OXIDATIVO

Los tripanosomatídeos están expuestos continuamente a condiciones oxidantes. Primero, tienen que contender con la producción natural de radicales libres producto de su propio metabolismo. Segundo, como organismos invasores encuentran condiciones desfavorables en el huésped, que utiliza la producción de moléculas oxidantes como defensa. Finalmente, *T. cruzi* como casi cualquier célula requiere de hierro para sobrevivir.

El hierro es un elemento esencial para el metabolismo celular y los microorganismos han desarrollado diversos mecanismos que les permiten obtener del huésped el hierro necesario para su supervivencia. Este elemento desempeña funciones importantes en procesos como la cadena respiratoria²², la activación de oxígeno molecular, nitrógeno e hidrógeno²³, así como la síntesis de DNA²³. También participa en la descomposición de derivados tóxicos de oxígeno, tales como peróxido y superóxido²³ generando radicales libres.

Los metales de transición juegan un importante papel en el efecto tóxico del peróxido de hidrógeno. Una característica importante de la química de los metales de transición es su número variable de oxidación. El poseer números de oxidación que difieren por uno permiten a las sales de los metales de transición participar en reacciones de transferencia de un solo electrón, facilitando así reacciones de radicales libres. El hierro y el cobre en particular, reaccionan con el peróxido de hidrógeno para formar radicales hidroxilo (OH·) a través de la llamada reacción de Fenton²⁴. Estas moléculas son uno de los radicales más reactivos y dañinos producidos. Los iones de hierro también son dañinos

para lípidos por radicales libres²⁵. Las células controlan el hierro usando proteínas para su transporte (como la transferrina) y almacenamiento (como la ferritina y la hemosiderina), minimizando la concentración de hierro y cobre libre^{26,27}. Mantener en forma de complejos a los metales de transición es considerado como un mecanismo de defensa^{17,28}. Sin embargo las especies reactivas de oxígeno son capaces de liberar al hierro. El peróxido de hidrógeno también puede degradar proteínas heme para liberar el hierro de su sitio activo²⁸.

LA TRANSFERRINA Y SU RECEPTOR

La transferrina es una glicoproteína de 80 kDa especializada en el transporte de hierro dentro del organismo. Esta constituida por una cadena polipeptídica, con dos sitios específicos que unen, cada uno un átomo de hierro²³. El receptor humano para transferrina es una glicoproteína integral de la membrana que consiste de dos subunidades, presumiblemente idénticas, de 95 kDa unidas entre sí por puentes disulfuro²⁹. El número de receptores de transferrina en la superficie celular está estrechamente ligado al estado proliferativo celular así como a los requerimientos de hierro por la célula. Las células en proliferación expresan al receptor mientras que las células completamente diferenciadas que no se dividen no lo expresan^{30,31}.

La adquisición de hierro por la célula se inicia cuando la transferrina se une al receptor para transferrina en la superficie celular. El complejo receptor-transferrina es incorporado a vesículas endocíticas denominadas endosomas. El medio interno del endosoma se acidifica por la acción de ATPasas membranales del endosoma, que bombean protones al interior liberando al hierro de la transferrina.

El papel de la transferrina en el crecimiento aún no se comprende aunque se ha demostrado que muchas de las características de las señales intracelulares y respuestas asociadas con el crecimiento (como alcalinización del citosol³², aumento en la concentración de calcio citosólico libre³² y cambios en la proporción NAD⁺/NADH³³) están relacionadas con la activación de la NADH-oxidoreductasa de cianuro férrico^{34,35,36,37}. Los inhibidores de crecimiento también inhiben al ciclo redox celular³⁸ mientras que los promotores de crecimiento estimulan a la NADH-oxidoreductasa de cianuro^{39,40}. Finalmente, la transferrina estimula directamente al ciclo redox^{34,35} mientras

que algunos anticuerpos contra el receptor de transferrina lo inhiben⁴¹. Es así como la variación en la habilidad de la célula para donar electrones a aceptores extracelulares puede tener un papel fundamental en la regulación del crecimiento celular. *In vivo* el aceptor fisiológico de electrones es la transferrina. La habilidad de la transferrina para aceptar electrones de la célula a su vez regula el número de receptores de transferrina. Ensayos inmunológicos han permitido identificar un receptor para transferrina en promastigotes de *Leishmania*. Este receptor es una glicoproteína membranar de 70 kDa⁴². En *T. brucei* se identificó una proteína que se une a la transferrina de 42 kDa⁴³ la cual es codificada por un gen asociado a los sitios de expresión⁴⁴.

El *T. cruzi*, posee una proteína que une transferrina (PUT)⁴⁵, lo que hace suponer que el parásito obtiene su transferrina a partir de las pozas de transferrina del huésped. Por medio de Westernblots utilizando anticuerpos anti-receptor de transferrina humana, se detectó una proteína en la superficie membranar de aproximadamente 200kDa⁴⁵. Es interesante que en este trabajo sólo se detectaron PUTs en células AM y no en tripomastigotes lo cual es consistente con el hecho de que dichos receptores están estrechamente ligados al crecimiento celular. Nada se sabe sobre el gen que codifica a esta proteína ni sobre cómo es regulada para responder a los cambios medio-ambientales.

MECANISMOS DE DETOXIFICACION EN T. CRUZI

Al igual que el resto de los tripanosomatídeos, *T. cruzi* difiere de otros organismos en que no contiene catalasa⁴⁶ ni glutatión peroxidasa⁴⁷. En su lugar aparentemente utilizan un ciclo redox basado en el tripanotión (ver abajo) para eliminar al peróxido de hidrógeno. Este sistema es análogo al del ciclo basado en el GSH que se encuentra presente en la mayoría de los organismos⁴⁸.

Un cofactor GSH-espermidina denominado tripanotión ha sido descrito en los tripanosomatídeos⁴⁹. Se piensa que el tripanotión es esencial en estos organismos para mantener el correcto balance intracelular de tío/diazufre a través de un intercambio no enzimático así como en la defensa contra el estrés oxidativo. La síntesis del tripanotión es catalizada por una enzima única de los tripanosomatídeos, la tripanotión sintetasa⁴⁸. La tripanotión reductasa ha sido purificada⁵⁰ y su gen clonado⁵¹ en *T. cruzi*.

Se propone que la tripanotión, la tripanotión peroxidasa y la tripanotión reductasa

protegen contra los radicales libres formados como producto del metabolismo de oxígeno. La tripanotión peroxidasa participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno así como de otros peróxidos, y es posteriormente reducida por la tripanotión reductasa para completar el ciclo. Algunos autores han postulado que *T. brucei* tiene actividad de tripanotión peroxidasa⁵² mientras que en otros reportes se sugiere su ausencia⁵³. La presencia de esta enzima en *T. cruzi* aún no ha sido investigada.

Otros mecanismos enzimáticos de defensa incluyen la producción de superóxido dismutasa y el recientemente descubierto sistema protector del ascorbato. La vitamina C ha demostrado ser un eficiente protector contra los radicales libres. Participa en reacciones no enzimáticas y/o enzimáticas capaces de reciclar la forma reducida del ácido ascórbico a partir de su forma oxidada (ácido dehidrascórbico, DHAA). Se ha demostrado la presencia de ascorbato y la actividad de reductasa del DHAA en *T. cruzi*⁵⁴. La presencia de la actividad de peroxidasa de ascorbato y del GSH además de la actividad de reductasa del DHAA sugieren la existencia de un ciclo enzimático de vitamina C cuya función sería reciclar ácido ascórbico para la remoción de especies reactivas de oxígeno ya sea de manera no enzimática (H_2O_2 , OH^\cdot) ó por medio de la peroxidasa de ascorbato (H_2O_2).

SUPEROXIDO DISMUTASA Y *T. CRUZI*

La superóxido dismutasa juega un papel central en la manera en que el parásito responde a los cambios en la concentración de oxidantes en el ambiente. *T. cruzi* contiene una superóxido dismutasa dependiente de hierro (Fe-SOD) en el citoplasma y una SOD dependiente de manganeso (Mn-SOD) en la mitocondria⁵⁵. La Fe-SOD esta relacionada muy de cerca con la Fe-SOD bacteriana. Consiste de dos subunidades con un peso molecular combinado de aproximadamente 43 kDa y una secuencia similar de aminoácidos⁵⁵. Se sabe poco de la regulación y expresión de esta enzima, sin embargo, en 1994 Ismail et al publicaron la secuencia de la Fe-SOD en *L.D. chagasi*⁵⁶. Utilizando la secuencia publicada se diseñaron primers degenerados con los cuales fue posible aislar el gen homólogo en *T. cruzi*⁵⁷ siendo este caracterizado actualmente. Queda aún por dilucidarse cómo se regula esta proteína y el papel que desempeña en la protección contra oxidantes.

II. OBJETIVOS

Ante diversos tipos de infecciones, el ser humano presenta una hipoferrremia que lo protege al reducir la cantidad de hierro disponible para los microorganismos invasores^{26,58,59}. La hipoferrremia ocurre por un mecanismo todavía no comprendido que no sólo suprime el retorno del hierro de los compartimentos reticuloendoteliales, sino que incluso aumenta el flujo de hierro extracelular hacia estos mismos sitios de almacenamiento⁵⁸. Al carecer de una propia fuente de hierro, los microorganismos dependen del huésped para la adquisición del metal. La habilidad de estos organismos para competir exitosamente con su huésped por el hierro es un importante determinante de su virulencia⁶⁰. *T. cruzi* requiere tanto fuentes de hierro hemo como no hemo para su óptimo crecimiento⁶¹. Existe evidencia en estudios *in vivo*, *in vitro* y clínicos de que un exceso de hierro en el huésped puede favorecer la virulencia de los microorganismos⁶². Con *T. cruzi*, por ejemplo, los niveles de hierro en el huésped tienen efecto en el desarrollo final de la infección por este parásito. Experimentalmente se encontró que un exceso de hierro en las pozas intracelulares del ratón como resultado de una dieta rica en dicho metal, incrementa la infección y la virulencia del parásito. Finalmente, una dieta deficiente en hierro protege a los animales susceptibles reduciendo la morbilidad y mortalidad de la infección⁶³.

Con el fin de comprender cómo afecta la concentración de hierro al *T. cruzi*, nuestro grupo estudió el crecimiento y diferenciación de *T. cruzi* en distintas concentraciones del metal⁶⁴. Al aumentar la concentración de hierro en el medio de cultivo, los parásitos crecen y se diferencian a mayor velocidad. Lo contrario se observó cuando el medio se depletó de hierro. Mantener varias semanas al *T. cruzi* en un medio deficiente en hierro provoca muerte celular. Esto es consistente con lo reportado en la literatura respecto a que el hierro es vital para *T. cruzi*⁶¹. También encontramos que manteniendo al *T. cruzi* en altas concentraciones de hierro pierde la capacidad para responder a cambios en la concentración de hierro del medio. ¿Cómo afecta la concentración de hierro el crecimiento y la diferenciación del parásito? ¿Cómo evitan el daño por radicales libres (estrés oxidativo) las células expuestas a altas concentraciones de hierro? ¿Cómo regula el parásito la obtención del hierro? ¿Cómo se adapta el *T. cruzi* a concentraciones variables de hierro en el medio? Estas son algunas de las preguntas que derivaron de este primer trabajo.

Para comprender los mecanismos celulares que participan en la obtención, metabolismo, almacenamiento y protección del hierro se requiere identificar primero a las proteínas participantes. Una vez identificadas se podrá analizar su regulación y expresión bajo diferentes condiciones. Se decidió estudiar dos proteínas relacionadas con la protección de la célula contra el estrés oxidativo por hierro. La primera es la proteína que se une a la transferrina (PUT), la cual (como se mencionó arriba), ha sido identificada en el *T. cruzi* por medios inmunológicos⁴⁵. Esta proteína es importante para la captación de hierro del medio y para regular su toxicidad. La segunda proteína es la superóxido dismutasa, recientemente clonada en *T. cruzi*⁵⁷. Esta proteína está directamente involucrada en la protección del parásito contra un exceso de radicales libres (en cuya formación participa el hierro). Finalmente, se continuó con la caracterización bioquímica de la respuesta del parásito a las variaciones en la concentración de hierro del medio de cultivo.

El objetivo del presente trabajo de tesis es estudiar algunas de las proteínas involucradas en el metabolismo del hierro y en la respuesta a estrés oxidativo en *Trypanosoma cruzi*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Clonación del gen de la PUT en *T. cruzi* a partir de una biblioteca genómica de *T. cruzi*.
2. Caracterización de la SOD de hierro en *T. cruzi*, analizando su expresión en términos de cantidad de mRNA, cuando las células se encuentran expuestas a diferentes inductores de estrés oxidativo.

III. MATERIALES Y METODOS

PARÁSITOS

Los epimastigotes de *T. cruzi* (MHOM/BR/78/Sylvio-X10.6) se cultivaron a 28°C en medio líquido RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 0.5% HEPES, 0.03M hemina, 10% suero fetal bovino (inactivado por calor), 2mM glutamato de sodio, 2 mM piruvato de sodio y antibióticos (penicilina y estreptomocina para dar una concentración final de 250 U/ml y 250mg/ml respectivamente)⁶⁵. Alternativamente, las células epimastigotes de *T. cruzi* se cultivaron en medio LIT como ha sido descrito previamente⁶⁴.

Las células de *T. brucei gambiense* (clón S427) fueron donadas amablemente por Emma Akuffo (Escuela de Medicina Tropical, Londres). Las células se aislaron de ratas infectadas. La sangre se obtuvo por punción cardiaca de ratas previamente anestesiadas; se centrifuga (39,000 g's, 10 min) y el sobrenadante se pasa a través de una columna de DEAE 52 equilibrada en PBS con 1% de glucosa. Las células se concentran por centrifugación y se resuspenden en RPMI.

ANÁLISIS DE LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE CÉLULAS CRECIDAS BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FIERRO.

Se siembran los epimastigotes en medio LIT suplementado con diferentes concentraciones de hierro, como se describió previamente⁶⁴. Brevemente, 5×10^6 células/ml se siembran en medio LIT normal o control (25mg/ml (3.8×10^{-5} M) hemina), LIT suplementado con doble concentración de hemina (50mg/ml hemina), LIT sin hemina y LIT suplementado con el quelante de hierro, hematoporfirina (3.8×10^{-5} M). Se dejaron crecer las células por nueve días y se colectan por centrifugación. El pellet se lava dos veces en PBS frío, pH 7.2 (70mM NaCl, 8mM Na_2HPO_4 , 2mM NaH_2PO_4) y se resuspende en agua a 4°C. Se toma una alícuota para determinar la concentración de proteína⁶⁶ mientras que otras alícuotas de cada muestra (aprox 5mg) se solubilizan para analizarlas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), hirviendo (97°C, 5 min) en cocktail electroforético (62mM Tris-HCl, pH6.8; 2% SDS (w/v); 7.5% glicerol (w/v); 5% 2-mercaptoetanol (v/v) y 0.02% azul de bromofenol (w/v)). Las muestras se separan en geles de poliacrilamida al

11 % utilizando la minicámara BioRad siguiendo el método de Laemmli⁶⁷. Las proteínas se tiñen con azul de Coomassie usando marcadores de peso molecular BioRad (fosforilasa b (97,400Da); BSA (66,200Da); ovalbúmina (45,000Da); anhidrasa carbónica (31,000Da); inhibidor de tripsina (21,500Da) y lisozima (14,400Da)).

EXTRACCIÓN DE DNA

Se aisló DNA genómico de células de *T. cruzi* y de *T. brucei* utilizando el método de la proteinasa K/SDS⁶⁸. Brevemente, las células son colectadas por centrifugación y lavadas en PBS. El pellet es lisado por tratamiento de álcali-SDS, y resuspendido en buffer de extracción de DNA (50mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% SDS, 50mM Tris-HCl, pH 8.0). Se agrega Proteinasa K (Sigma) a una concentración final de 100 mg/ml y se deja reaccionar a 37°C por 3-24 hrs. El RNA contaminante se eliminó utilizando ribonucleasa pancreática bovina previamente tratada con calor. El DNA se separó de las proteínas y desechos celulares por triple extracción con fenol-cloroformo, una extracción de cloroformo y finalmente el DNA se precipita de la fase acuosa con la adición de 2 volúmenes de etanol. Para constatar la eficiencia de la purificación, se toma una alícuota del DNA disuelto en buffer TE (25mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA) y se corre por electroforesis en gel de agarosa a 70V. Se incluyeron marcadores de tamaño. El gel se tiñe con bromuro de etidio (EtBr)(1mg/ml) y se fotografió bajo luz UV.

EXTRACCIÓN DE RNA

Las células cultivadas en presencia de diferentes drogas inductoras de radicales libres, se colectaron por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS y se lisaron por adición de GTC 4M, 0.5% N-lauril sarcosina, 25 mM citrato de sodio pH 7.0. El RNA se colecta por centrifugación en un gradiente de cloruro de cesio 5.7M. Posteriormente, el RNA se precipita dos veces con etanol y se guarda en agua estéril a -20°C. El RNA resultante se cuantifica corriendo una muestra en un gel de agarosa 1.2% teñido con bromuro de etidio (0.5 mg/ml)⁶⁹.

DIGESTIÓN Y RESTRICCIÓN DEL DNA

El DNA genómico de *T. brucei* y *T. cruzi* (~5mg) se digirió con las endonucleasas de restricción *Hind* III y *Pst* I siguiendo los procedimientos normales⁶⁸, las digestiones se

corrieron en un gel de agarosa 0.7% y se fotografiaron bajo luz ultravioleta.

ANÁLISIS TIPO SOUTHERN

Después de fraccionar al DNA utilizando enzimas de restricción, éste se corrió en un gel de agarosa, se transfirió a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham) utilizando el método de Southern⁷⁰ y se unió covalentemente a ella por exposición a luz ultravioleta por 20 seg usando un Stratagene UV Stratalinker 1800. La membrana se hibridizó entonces con la sonda de la PUT en 5xSSC con 40% de formamida, a 37°C. Los filtros fueron expuestos para autoradiografía por periodos de tiempo variables a -70°C utilizando film Kodak X-Omat.

ANÁLISIS TIPO NORTHERN

Alícuotas de RNA (~16mg) se tratan con glioxal y DMSO como desnaturalizantes y posteriormente se fraccionan utilizando geles de agarosa 1.2-1.4% preparados con buffer de fosfatos 10 mM con cambios de corriente cada 30 minutos. El RNA se transfiere a membranas de nylon Hybond-N utilizando las condiciones estándar⁶⁸. El RNA se une covalentemente tal y como se describió en el análisis de Southern. La hibridización con las sondas Fe-SOD y C se llevó a cabo bajo condiciones de estringencia (en 6xSSC con 40% formamida, a 42°C) por 24 hrs. La autoradiografía se realizó como se describe para el Southern blot. La medición de los fragmentos de RNA se llevó a cabo comparándolos con otros marcadores de RNA de transcritos con tamaño conocido, así como con marcadores de RNA⁵⁷.

SONDA PARA LA PUT

El gen de la PUT se amplificó directamente del DNA genómico de *T. brucei* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados como iniciadores es: 5' TTAG A T T T C A G G A T C G T C T C O_H y 5' T A T G A A A A T G A A A G G A A T G C O_H. La amplificación se llevó a cabo usando DNA de *T. cruzi*, 10pmolas de los oligonucleótidos iniciadores y 5 unidades de Taq polimerasa en un volúmen total de 20 ml incluyendo 10% dimetilsulfóxido. Las condiciones utilizadas fueron 96°C/45s, 50°C/60s y 72°C/60s durante 35 ciclos. El tamaño del producto resultante se

calculó corriendo una alícuota de la mezcla del PCR en un gel de agarosa 0.8% junto con marcadores de peso. Posteriormente se fotografió bajo luz UV después de teñirse con EtBr.

• **Purificación del producto del PCR**

El producto de la PCR se purificó cortando la banda de 1 kb con un escalpelo y electroeluyéndola en un buffer de TBE 0.2x (89mM tris-borate, 2mM EDTA, pH 8.0). El material electroeluido se congeló y secó en vacío. El producto seco se resuspendió en buffer TE diluido (1/10TE buffer) y el DNA se extrajo por precipitación con fenol. La muestra se pasó por una columna de Sephadex G-50 (Sigma) y el producto eluido se utilizó como sonda para detectar el gen de la PUT.

• **Marcaje de la sonda PUT**

El fragmento de 1 kb se marcó radioactivamente por el método de random priming⁶⁸. Brevemente, 50 ng de DNA se desnaturalizan hirviendo durante 5 min y se dejan reasociar con los iniciadores al azar (una mezcla de secuencias de hexámeros). Las cadenas se extienden utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I en presencia de [³²P]-dCTP (Amersham). Este procedimiento provee una sonda marcada con alta especificidad. Los productos de la reacción son purificados pasándolos por una columna de 1 ml empacada previamente con Sephadex G-50 (Sigma) y equilibrada con buffer TE. Sólo los productos marcados de gran tamaño son colectados en la base de la columna; los mononucleótidos y pequeños polinucleótidos son retenidos.

SONDA PARA LA FE-SOD .

El gen de la Fe-SOD se amplificó directamente de DNA genómico de *L. d. chagasi* por PCR usando como iniciadores los oligonucleótidos 5'-GGGGAATTCTCAAAGTTGT CGTTCCAC_{OH} y 5'-GGGGGATCCAAGCA CCATCAGGG GTATGTGACG_{OH}. El fragmento resultante mostró un tamaño de 500 bp cuando se corrió en electroforésis en un gel de agarosa al 0.8%⁵⁷. Este producto de 500bp se utilizó como sonda para detectar la presencia de transcritos de RNA de la superóxido dismutasa de fierro en células de *T. cruzi* expuestas a diferentes inductores de estrés oxidativo (sonda Fe-SOD). Como sonda control se utilizó un fragmento de DNA Xba I procedente de DNA genómico de *T. cruzi*, el

cual hibridiza con un transcrito de 0.8 kb (sonda C). Ambos, la sonda Fe-SOD y el DNA control se marcaron utilizando el método de random priming bajo las mismas condiciones descritas arriba para la sonda de la PUT.

TAMIZAJE DE LA BIBLIOTECA GENÓMICA DE *T. CRUZI*

Se utilizó una biblioteca de cósmidos de *T. cruzi* para el tamizaje⁷¹. La biblioteca se plateó en filtros de nylon sobre platos de agar conteniendo ampicilina. Las células se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias que poseían el cósmido recombinante fueron reconocidas por su fenotipo resistente a la penicilina. Se prepararon filtros replica de las colonias resistentes a la ampicilina⁶⁸. Ambos filtros, el master y el replica se incubaron a 37°C por 2-3 hrs. Después de la incubación el filtro master se guardó a 4°C. El filtro replica se procesó para hibridización por Southern blot utilizando como sonda el fragmento de la PUT (ver arriba). La selección de las colonias positivas se logró alineando el film de rayos X con el film master.

Las colonias positivas del primer tamizaje se utilizaron para inocular nuevos cultivos. Estos cultivos se crecieron por la noche a 37°C bajo agitación. Las células se diluyeron hasta obtener aproximadamente 300 colonias que se platearon en platos de agar conteniendo ampicilina. Las colonias se crecieron durante la noche a 37°C. Utilizando platos multipozos (Dynatech laboratories, 96 pozos) se pusieron 200 µl de medio NZCYM suplementado con ampicilina (50 mg/ml) y se sembró una colonia (tomada del plato de agar) por pozo. Este procedimiento se repitió para cada colonia positiva. Los platos se dejaron a 37°C durante la noche y las colonias se pasaron a membranas de nylon Hybond. Estas membranas se procesaron para análisis tipo Southern utilizando la sonda para PUT como se describió en el tamizaje primario.

EXPERIMENTOS DE SENSIBILIDAD A DROGAS

Se llevaron a cabo experimentos utilizando los siguientes compuestos: peróxido de hidrógeno (Sigma), metil viológeno (paraquat, Sigma), benzil viológeno (BDH Chemicals Ltd), nifurtimox (Bayer) y nitrofurazone (Aldrich). Se estudió el efecto inhibitorio de cada uno de estos fármacos, en el crecimiento en las células de *T. cruzi*. La mayoría de los experimentos se llevaron a cabo en volúmenes de 2ml de medio utilizando los platos

multipozos Nunclon (24 pozos). Se sembraron células a una concentración de 10^7 células/ml en pozos con diferentes concentraciones de la droga incubándose durante diferentes tiempos. La densidad celular se determinó contando las células con un hemocitómetro (Weber-Scientific International Ltd) y la viabilidad se confirmó por exclusión del azul de tripan al 0.2% en PBS. El porcentaje de viabilidad se calculó como el número de organismos vivos entre el total⁷². Una vez que se estableció para cada droga su dosis media letal (concentración a la cual el 50% de las células son lisadas), se sembraron cultivos de 50 ml con células de la fase mid-log (1×10^7 células/ml). Los cultivos se dejaron crecer durante la noche a la concentración de droga especificada en cada figura. Para análisis posterior se extrajo el RNA total de estos cultivos. Se utilizó sulfato de hierro (II) heptahidratado (Aldrich) a una concentración final de 10 mM y sulfato de cobre (II) (Aldrich) a una concentración final de 1 mM en los experimentos con MV y BV.

IV. RESULTADOS

The more I look
the more I find
as I close on in
I get so blind

P.Gabriel,1991

PATRONES PROTEICOS DE *T. cruzi* EN RESPUESTA A LA CONCENTRACIÓN DE FIERRO EN EL MEDIO.

Se observaron cambios en los patrones de bandeado de las proteínas de células de *T. cruzi* mantenidas en diferentes concentraciones de hierro. El efecto más notable se observa cuando el parásito se crece en presencia del quelante de hierro hematoporfirina para eliminar todo el hierro libre (Fig 12,HPR). Algunas bandas de bajo peso molecular disminuyen mientras que se ve un importante incremento en bandas de mediano y alto peso molecular, como las de 23-26, 28, 41 y 47-52 kDa. En el caso de los cultivos crecidos sin hemina (Fig 12,SH), la banda de 26 kDa desaparece mientras que las proteínas de 28 y 43 kDa se incrementan. En los cultivos con mayor concentración de hemina que el control, sólo se observan muy tenues diferencias. Es muy posible que en las células que no reciben un adecuado suplemento de hierro se desencadena una respuesta tipo estrés en la cual se sintetizan o sobreexpresan proteínas involucradas en el metabolismo de hierro, especialmente aquellas que participan en su obtención. Con el fin de analizar este fenómeno se procedió a identificar y caracterizar proteínas relacionadas con el metabolismo y procesamiento del hierro, entre ellas la proteína que une transferrina.

REGULACIÓN DE LA FE-SOD

Para estudiar el efecto que tienen diferentes inductores de estrés oxidativo sobre la expresión de la superóxido dismutasa de hierro (Fe-SOD) de *T. cruzi*, se determinó la sensibilidad de las células a cada uno de estos inductores. La sensibilidad de las células se mide como cambios en la viabilidad celular cuando los inductores de estrés oxidativo se adicional al medio de cultivo.

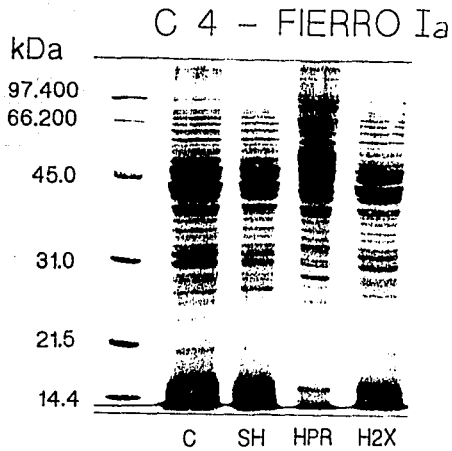


Figura 12 . Gel de poliacrilamida-SDS al 11% teñido con azul de Coomassie. Cada carril representa 5 mg de proteína. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular en kDa. C, proteínas provenientes de un cultivo control; SH, proteínas provenientes de un cultivo sin hemina; HPR, proteínas provenientes de un cultivo con el quelante de hierro hematoporfirina; H2X, proteínas provenientes de un cultivo con doble concentración de hemina.

• **Exposición a peróxido de hidrógeno.**

El peróxido de hidrógeno se produce como parte de la actividad de la SOD. Se estudió el efecto que tienen diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno en la viabilidad de células *T. cruzi* mantenidas en cultivo *in vitro* durante diferentes periodos de tiempo. Los resultados mostraron que el peróxido de hidrógeno es altamente tóxico para los tripanosomas. Concentraciones iniciales de 200mM tienen efecto observable en la motilidad de las células. Concentraciones de 400mM causan un 50% de lisis celular durante los primeros 15min de exposición (Fig 13). Cuando las células se exponen a

concentraciones iniciales de 800 μM por 15 minutos, el 95% de los parásitos se lisan. Estos resultados son consistentes con aquellos publicados para *T. brucei*⁵³. La toxicidad al peróxido de hidrógeno parece depender de la densidad celular, siendo más sensibles los cultivos con baja densidad celular (datos no mostrados).

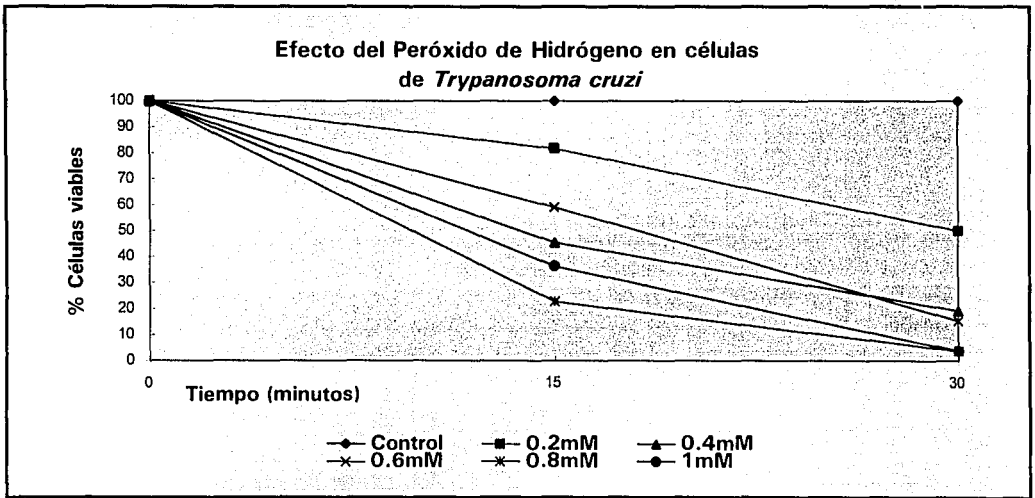


Figura 13. Efecto del peróxido de hidrógeno en células de *T. cruzi*. Células a una concentración de 1×10^7 células/ml fueron resuspendidas en RPMI y crecidas a 28°C en la presencia de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1mM de peróxido de hidrógeno. Las células motiles intactas, se contaron en un hemocitómetro después de 0, 5, 15 y 30 minutos. El promedio (n=3) se expresó en términos de porcentajes de la cuenta inicial.

• **Exposición a generadores de superóxido**

Tanto el metil viológeno (MV, también llamado paraquat) como el benzil viológeno (BV) son comúnmente utilizados en el estudio de enzimas de oxidoreducción, debido a que sus especies oxidadas con doble carga, MV^{2+} y BV^{2+} , son reducidas fácilmente a radicales libres estables de una sola carga, MV^+ y BV^+ . El MV es un compuesto redox conocido por su habilidad para producir radicales superóxidos. En experimentos iniciales donde se trataron células con concentraciones micromolares de MV se encontró que no había efecto observable de la droga sobre las células de *cruxi*, aún después de una prolongada exposición. Los cultivos se monitorearon microscópicamente por más de una semana y las células continuaron móviles y creciendo después de este tiempo.

Se ha propuesto que se requiere un metal cofactor para que el MV sea capaz de dañar a las células^{73,74}. Esto se basa en el hecho de que en sistemas generadores de superóxido y peróxido de hidrógeno se pueden formar radicales hidroxilo cuando ciertos iones metálicos se encuentran presentes^{28,75}. En base a lo anterior se decidió agregar a las concentraciones iniciales de MV, sulfato de cobre (II) a una concentración de 1mM. Puesto que no se observó ninguna diferencia significativa entre los cultivos suplementados con el sulfato de cobre y los cultivos que no lo tenían, se incrementó la concentración de la droga.

Se utilizaron concentraciones de 0, 6, 8 y 50 mM de MV, monitoreando al microscopio las células. Otro grupo de células se expusieron a las mismas concentraciones de MV al cual se le agregó además 1mM de sulfato de cobre. Después de 24 horas las células se contaron con un hemocitómetro.

Esta vez fue posible observar una importante disminución en la viabilidad de las células expuestas al metil vilógeno suplementado con el cobre. Como se muestra en la figura 14, la exposición durante toda la noche a concentraciones de 6mM MV+Cu, produce la lisis de casi el 70% de las células de *T. cruzi*. Concentraciones mayores de 6mM+Cu no producen una diferencia significativa en la viabilidad de *T. cruzi*, lo que podría deberse a que se alcanza una saturación donde la célula ya no puede interiorizar mas droga. Las células tratadas sólo con MV mantuvieron entre un 85-95% de células viables (Fig 14). En contraste, el efecto del benzil viológeno mostró importantes diferencias. Concentraciones de BV tan bajas como 500mM causaron alrededor de un 70%

de lisis celular después de 24 horas de exposición mientras que el cobre por sí sólo no tuvo efecto significativo sobre el parásito (Fig 15).

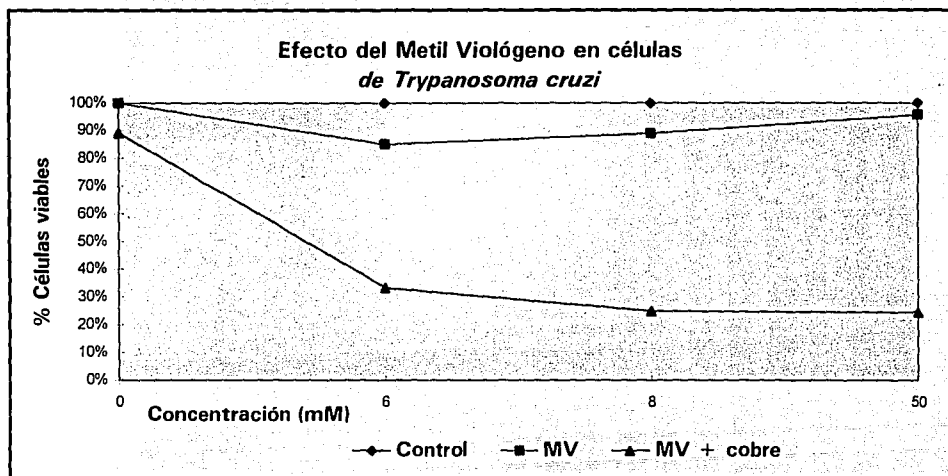


Figura 14. Efecto del MV sobre las células de *T. cruzi*. Se crecieron células de *T. cruzi* por 24 horas en presencia de 0, 6, 8 y 50mM de MV, con o sin $1\mu\text{M}$ de sulfato de cobre (II). Las células se contaron como se describe en la sección de materiales y métodos. Cada punto se respresentó como el promedio de tres experimentos ($n = 3$).

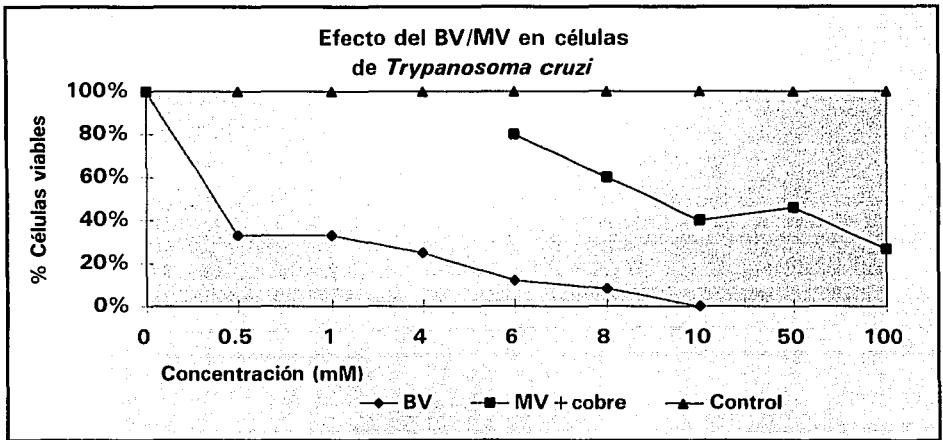


Figura 15. Efecto del BV y del MV en células de *T. cruzi*. Se crecieron células de *T. cruzi* por 24 horas en la presencia de 0, 0.5, 1, 4, 8 y 10mM BV ó en 0, 6, 8, 10, 50 y 100mM MV más 1 μ M de sulfato de cobre (II). Se contaron a las células intactas y cada punto se representó como el promedio de tres experimentos (n = 3).

Una posible explicación de las diferencias observadas entre ambos compuestos (MV y BV) es la habilidad de cada uno para atravesar la membrana celular. Se han descrito tres tipos de permeabilidad en una pareja mediadora redox: permeables, no permeables y semipermeables. Esta clasificación dependiendo de si ambos, ninguno o un miembro de la pareja redox puede cruzar la membrana. Con esta definición, el BV ha sido clasificado como mediador semipermeable, mientras que el MV es un mediador no permeable⁷⁶. Sin embargo, la permeabilidad de los pares redox de MV y BV aún no ha sido estudiada en células como el *T. cruzi*.

• **Exposición a compuestos de importancia médica.**

Dos de las drogas más comúnmente utilizadas en el tratamiento de la Enfermedad de Chagas son el Nifurtímox (5-nitrofurano, abreviado como NIF), y su derivado el Nitrofurazón (NFZ). Se ha propuesto que el NIF es capaz de producir peróxido de hidrógeno y radicales superóxido, y que la acción de estas especies reactivas de oxígeno ocasionan los efectos citotóxicos observados en células de *T. cruzi* tratadas con NIF⁷⁷. En el caso del NFZ su mecanismo de acción aún no se comprende del todo. Ambos compuestos fueron probados con el fin de determinar su efecto sobre la viabilidad celular del *T. cruzi*. Como se observa en la Figura 16, el NIF alteró la viabilidad celular mucho más rápidamente que su contraparte el NFZ. Casi el 50% de las células se lisan después de 24 horas de exposición a concentraciones finales de NIF 5 mM, mientras que para el NFZ un efecto equivalente sólo se observó cuando las células se trataron con concentraciones de 20 mM o mayores. También se realizaron controles usando dimetilformamida (DMF, 75 mM) ya que ambos compuestos (NIF y NFZ) se encuentran disueltos en este solvente (Fig 16).

ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT.

Una vez determinadas las dosis medias letales, se decidió analizar si existe una relación entre la expresión del gen de la Fe-SOD y la presencia de diferentes tipos de inductores de estrés oxidativo. Inicialmente se purificó el RNA total siguiendo procedimientos convencionales y se comprobó su integridad por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% (Fig. 17). Las tres bandas de RNA ribosomal indican que el grado de

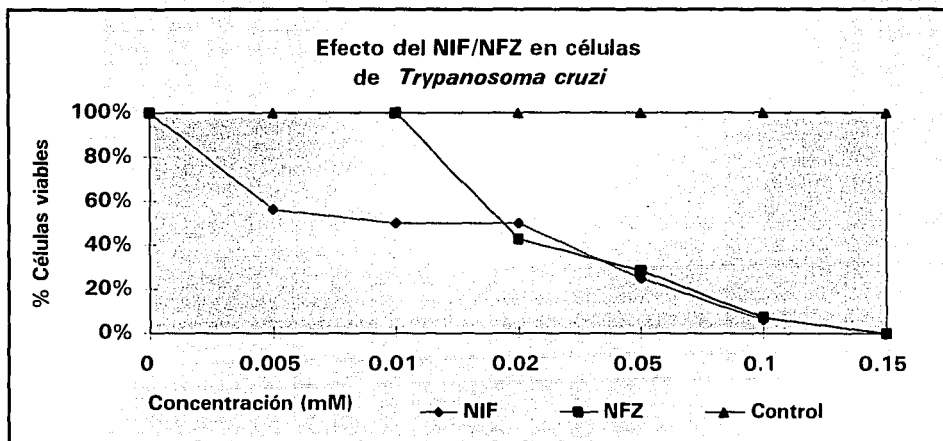


Figura 16. Efecto del NIF y del NFZ en células de *T. cruzi*. Se crecieron células de *T. cruzi* por 24 horas en presencia de 0, 0.005, 0.010, 0.020, 0.050 y 0.100 mM de NIF ó en 0, 0.010, 0.020, 0.050, 0.100 y 0.150 mM NFZ. El DMF se utilizó a una concentración final de 75mM. La viabilidad de las células se determinó por conteo de las células vivas en un hemocitómetro. Cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes (n = 3).

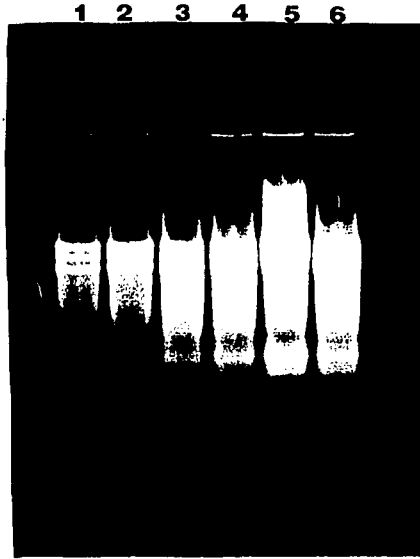


Figura 17. Extracción del RNA. Gel de agarosa conteniendo 1 a 2 mg de RNA total aislado a partir de 1.Células control (no tratadas); 2.Células tratadas con NIF(5mM); 3.Células tratadas con NFZ(10mM); 4.Células tratadas con BV(500mM); 5. Células tratadas con MV(6mM) y 6.Células tratadas con peróxido de hidrógeno (5mM). Las células se crecieron bajo las condiciones descritas en material y métodos durante 24 horas y el RNA se extrajo inmediatamente después mediante el método del tiocianato de guanidato. El gel se tiñó con 1mg/ml de EtBr y se fotografió bajo luz UV. Las especies mayores de RNA ribosomal se indican con una flecha. El RNA mensajero puede visualizarse como un barrido heterogeneo.

degradación es mínimo. El RNA mensajero migra como un barrido difuso. Posteriormente, el RNA fué transferido a papel de nitrocelulosa para realizar ensayos de Northern blot usando como sonda el fragmento de 500 bp del gen de la Fe-SOD (sonda Fe-SOD).

Como se muestra en la Figura 18, es posible detectar una transcrito principal cuyo tamaño es de entre 1.2 a 1.4 kb. Otros resultados, obtenidos por mapeos de restricción⁵⁷, permiten sugerir la presencia de más de un gen para la Fe-SOD en el genoma de *T. cruzi*. En este trabajo en particular, el Northern blot indica únicamente la presencia de un transcrito.

Los niveles de RNA mensajero se incrementaron en los cultivos de *T. cruzi* expuestos al NIF y al NFZ en comparación con los cultivos control (Fig 18, carriles 2 y 3). Puesto que se ha demostrado que el NIF es capaz de producir tanto radicales superóxido como peróxido de hidrógeno^{78,79} es posible que el oxidante principal al cual las células están respondiendo aumentando la expresión de Fe-SOD es el radical superóxido y no el peróxido de hidrógeno. Cabe hacer notar que el superóxido es un sustrato para la Fe-SOD, un aumento en el sustrato podría tener un efecto positivo en la actividad de la enzima y muy posiblemente también en su expresión. El efecto contrario se esperaría para las células tratadas con peróxido de hidrógeno. Esto último debido a que el peróxido de hidrógeno es el producto de la actividad de la SOD. Un aumento en la concentración del producto regularía negativamente la actividad enzimática y posiblemente también la expresión, como se observa en la figura 18. Es interesante observar que cuando se agrega sulfato de hierro (II) al peróxido de hidrógeno, la producción de RNA no disminuye. Al respecto, hay evidencia clara de que el peróxido de hidrógeno en presencia de un metal de transición se transforma a radicales hidroxilo^{12,73,74}. Esto podría explicar porqué la enzima no es regulada negativamente.

Finalmente, el MV y el BV, productores de superóxido, incrementan el RNA de la Fe-SOD cuando se comparan con los cultivos control (Fig 18). Lo anterior es consistente con el hecho de que el superóxido es sustrato de la enzima y puede entonces actuar como un inductor positivo en la expresión de la Fe-SOD.

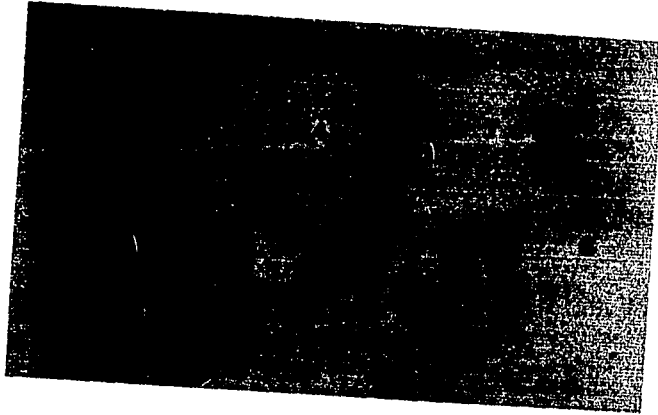


Figura 18. Expresión de la Fe-SOD en células de *T. cruzi* expuestas a diferentes inductores de estrés oxidativo. Autoradiografía de un northern blot hibridizado con un fragmento de 500 pares de bases amplificado por PCR y que contiene al gen de la Fe-SOD de *L. d. chagasi* (sonda Fe-SOD). El RNA se obtuvo de las siguientes condiciones: 1.Células control (no tratadas); 2.Células tratadas con NIF(5mM); 3.Células tratadas con NFZ(10mM); 4.Células tratadas con BV(500mM); 5.Células tratadas con MV(6mM); 6.Células tratadas con peróxido de hidrógeno (5mM) y 7.Células tratadas con peróxido de hidrógeno (5mM) suplementadas con sulfato de hierro (II)10mM. Cada carril contiene aprox 10mg RNA autoradiografiado por 24 horas.

GENE DE LA PROTEINA QUE UNE TRANSFERRINA (PUT)

El gen de la PUT no ha sido descrito en *T. cruzi*, por lo tanto los primeros experimentos estuvieron dirigidos a la construcción de una sonda adecuada para detectar este gen. Basándonos en la secuencia publicada del gen de la PUT en *T. brucei* 43, se diseñaron dos oligonucleótidos no degenerados que hibridizaran a los extremos 5' y 3' de la región codificadora del gen (Fig 19). Para amplificar por PCR la región codificadora para la PUT de *T. brucei* y *T. cruzi*, se aisló DNA genómico de ambas especies. La pureza del DNA se verificó en un gel de agarosa al 0.8% (Fig 20). Posteriormente se tomaron alícuotas de ambas muestras de DNA y se realizó la PCR usando los anteriores iniciadores.

En las reacciones donde se utilizó DNA de *T. brucei* como templado, se obtuvo un producto con el tamaño esperado de 1kb (Fig 21). Desafortunadamente, no se observó ningún producto de PCR en las reacciones donde se usó DNA de *T. cruzi* como templado (Fig 21).

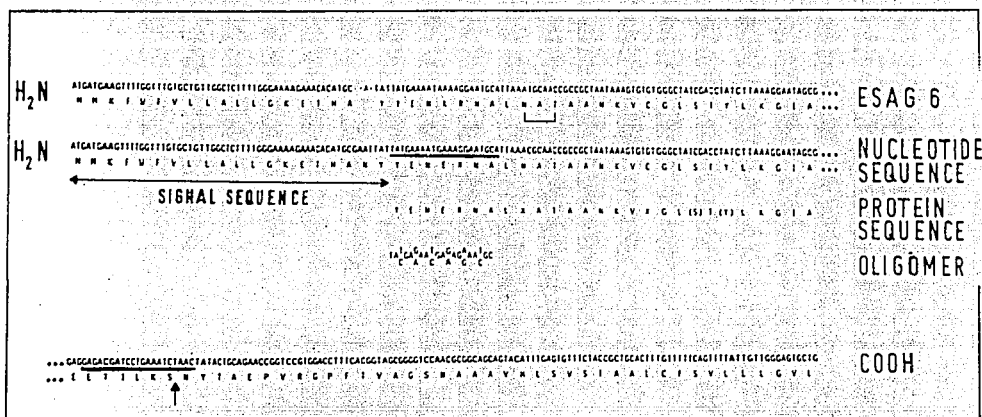


Figura 19. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos predichas para la proteína unidora de transferrina de *T. brucei* (tbp)⁴³. La posición de los primers diseñados para este trabajo se encuentran subrayadas marcando las secuencias nucleotídicas. Los primers 1 y 2 se utilizaron para amplificar un producto de PCR de 1 kb PCR, el cual se utilizó para el tamizaje de la biblioteca de cósmidos de *T. cruzi*.

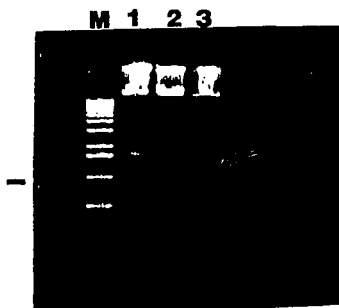


Figura 20. DNA genómico purificado a partir de células de *T. cruzi* y *T. brucei*. Los gels se tiñeron con EtBr y fotografiaron bajo luz UV. M. marcador de peso. La barra corresponde a 1 kb. 1. DNA de *T. cruzi* 2. DNA de *T. cruzi* 3. DNA de *T. brucei*.

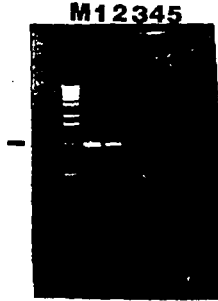


Figura 21. Reaccion en cadena de la polimerasa (PCR). M. Marcador de peso (1xHind III). La banda indica 1kb. 1. DNA (diluído 1/10) de *T. brucei*. 2. DNA (diluído 1/100) de *T. brucei*. 3. DNA (diluído 1/1000) de *T. brucei*. 4. DNA (diluído 1/100) de *T. cruzi*. 5. DNA (diluído 1/1000) de *T. cruzi*.

Para verificar la identidad del producto de 1kb amplificado de *T. brucei*, éste se utilizó como sonda en un análisis de Southern. Para ello, se digirió el DNA de *T. brucei* y *T. cruzi* con *Hind* III y *Pst* I (Fig 22) y se hibridó con la sonda PUT. El patrón de hibridación del DNA de *T. brucei*, fue consistente con los datos previamente reportados: bandas de 1.2, 2.5 y 5 kb con *Hind*III⁴⁴ (Fig 23, carril 1). En el caso de *T. cruzi*, se identificó una banda de 11.6 kb en la digestión con *Hind* III y dos bandas tenues de 1.7 y 2.6 kb en la digestión con *Pst* I (Fig 23, carriles 3 y 4). En el análisis por Southern blot, también se puede apreciar que el gen de la PUT se encuentra en varias copias en *T. brucei* (Fig 23, carriles 1 y 2).

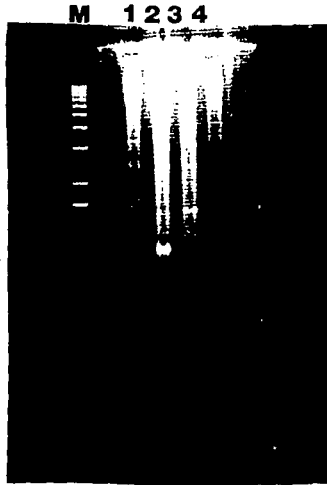


Figura 22. Digestión por restricción con endonucleasas. Gel de agarosa al 0.7%, teñido con EtBr y fotografiado bajo luz UV. 1. DNA de *T. brucei* x *Hind*III. 2. DNA de *T. brucei* x *Pst*I. 3. DNA de *T. cruzi* x *Hind*III. 4. DNA de *T. cruzi* x *Pst*I.

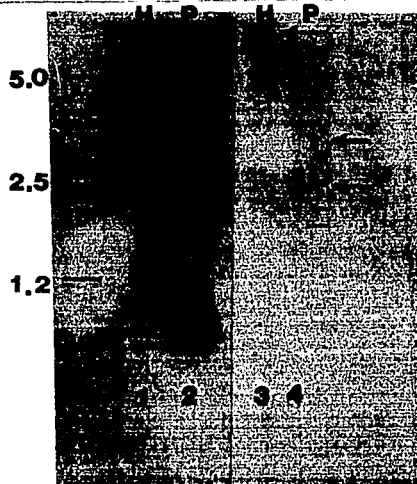


Figura 23. Análisis por Southern Blot. Autorradiografía de un Southern blot hibridizado con la sonda de la PUT. El tamaño está dado en kilobases. 1. DNA de *T. brucei* digerido con *Hind* III. 2. DNA de *T. brucei* x *Pst*I. 3. DNA de *T. cruzi* x *Hind* III. 4. DNA *T. cruzi* x *Pst* I.

Con el producto de la PCR de 1kb se procedió a realizar un tamizaje de una biblioteca de cósmidos de *T. cruzi* construida en pcosTL⁶⁹. La hibridización se llevó a cabo bajo condiciones de baja astringencia para facilitar el reconocimiento de genes homólogos no idénticos. Por medio de autoradiografía fue posible identificar tres colonias positivas (datos no mostrados). Estas colonias fueron sometidas a un segundo tamizaje en el que se encontraron muchos problemas aparentemente debidos a la falta de especificidad de la sonda. Aún incrementando la astringencia del tamizaje no fue posible obtener una hibridización específica (Fig 24). Después de varios intentos fallidos quedó claro que esta sonda no sería útil para detectar el gen de la proteína unidora de transferrina en *T. cruzi*.

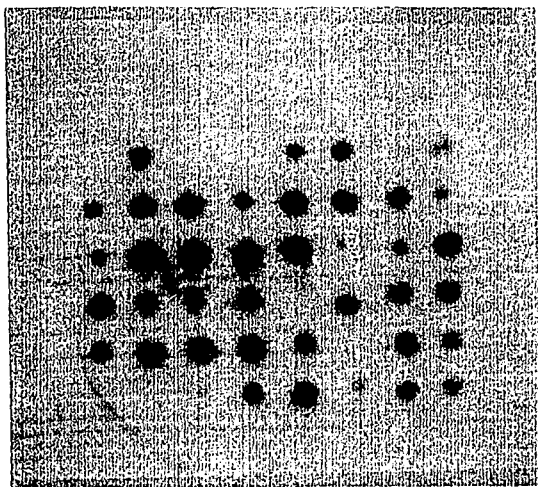


Figura 24. Tamizaje de la biblioteca de cósmidos. Se seleccionaron colonias positivas del primer tamizaje. Estas fueron re-probadas con la sonda de la PUT (segundo tamizaje). La autoradiografía muestra un patrón de hibridación no específica.

V. DISCUSIÓN

The time is gone the song is over
thought I'd something more to say
D.Gilmour, 1972

En las células eucariontes, la mayor parte del oxígeno se reduce a agua por acción de la citocromo oxidasa mitocondrial. El oxígeno restante, al reducirse parcialmente produce radicales como el anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los metales de transición como el hierro y el cobre se combinan con el peróxido de hidrógeno para producir radicales oxidrilo ($OH\cdot$).

Los organismos poseen diversos mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que les permiten sobrevivir en condiciones aeróbicas. Por ejemplo, existen proteínas que unen metales para prevenir la formación de oxidrilos (como las metaloproteínas, ferritina, transferina); enzimas que metabolizan a los radicales (superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT), peroxidasas (PX)); enzimas que reparan el daño causado al DNA y a los lípidos (proteínas SOS). Además las células poseen una amplia gama de antioxidantes (GSH, ascorbato, tripanotión).

En *Trypanosoma cruzi* no ha sido posible detectar enzimas removedoras de peróxido como CAT y GSH-Px, por lo que se le considera un organismo con una capacidad limitada para responder al estrés por ciertos oxidantes. La sensibilidad del parásito hacia drogas como el nifurtimox, las cuales generan iones superóxido y peróxido de hidrógeno (a través de una nitroreductasa intracelular) (Docampo, 1984) parecen confirmar esta hipótesis. Sin embargo otros estudios muestran que el parásito posee mecanismos alternos para metabolizar el peróxido, como es el caso del recientemente descrito sistema del ascorbato⁵⁴.

En este trabajo estudiamos el efecto de diferentes inductores de estrés oxidativo en la viabilidad de *T. cruzi* así como en la expresión de la superóxido dismutasa de hierro. Nuestro interés en esta proteína se debe a que la Fe-SOD participa en la protección contra el daño por radicales libres. Por otro lado intentamos clonar el gen de la proteína que une transferrina (PUT) con el fin de estudiar más a fondo el metabolismo de hierro en el parásito. El hierro no sólo es vital para las células, sino que también juega un papel

fundamental en la generación de radicales libres en la célula. El metabolismo de hierro y el estrés oxidativo se encuentran estrechamente ligados en la fisiología celular.

GEN DE LA PUT

Se tamizó una biblioteca de cósmidos de *T. cruzi* utilizando como sonda al gen del receptor para transferrina de su pariente cercano, el trypanosomatideo *T. brucei*. Aunque *T. brucei* y *T. cruzi* pertenecen al mismo género, ni el PCR ni el tamizaje de la librería cósmida permitieron detectar secuencias homólogas en *cruzi*. Entre las explicaciones para la falta de especificidad de la sonda utilizada se pueden mencionar:

1. La PUT de *T. brucei* pertenece a una familia multigénica y por lo tanto se encuentra presente en más de una copia. En contraste, es muy posible que en el caso de *T. cruzi* el gen se encuentre representado sólo por una o pocas copias, disminuyendo las posibilidades de detectarlo.

2. El gen de *T. cruzi* en sí mismo es divergente del de *T. brucei*. Diferentes fuentes han apuntado importantes diferencias evolutivas entre ambos parásitos⁸⁰. *T. brucei* posee un receptor de 42 kDa para el factor de crecimiento transferrina⁴³ el cual fue aislado por medios inmunológicos⁴⁴. La secuencia de este receptor, muestra identidad con las proteínas ESAG (Expression Site Associated Gene, Gen Asociado a Sitios de Expresión) 6 y 7. Sin embargo, en este artículo no se establece si la PUT esta codificada por pESAG 6, 7 o ambas⁸¹. Recientemente se demostró que la PUT en *T. brucei* esta conformada tanto por el gen ESAG 6 como por el ESAG 7⁸². También se demostró que el ESAG 6 y el 7 se parecen a algunos de los genes VSG (Variable Site gene, Gen de Sitio Variable) y que es posible que la misma pESAG-7/6 haya derivado de una VSG a través de una selección por sitios de afinidad hacia transferrina⁸³. Los genes de VSG son características de los trypanosomas africanos y no se han encontrado genes análogos en *T. cruzi*.

Una estrategia alternativa en la búsqueda del gen sería el diseñar los iniciadores degenerados basandose en secuencias conservadas de las PUT de diferentes organismos. Este procedimiento se ha utilizado exitosamente para el aislamiento de muchos otros genes.

REGULACIÓN DE LA FE-SOD

Cuando las células de *T. cruzi* son expuestas a peróxido de hidrógeno la concentración de RNAm de la Fe-SOD parece disminuir. Esto resulta consistente con el hecho de que el peróxido de hidrógeno es el producto final de la actividad de la SOD y que cuando este producto se acumula en la célula inhibe de alguna manera la expresión del gen de la enzima (regulación negativa).

En contraste, los generadores del superóxido (substrato de la enzima) incrementan los niveles de RNAm de la SOD. El MV y el BV se utilizaron como generadores de radicales superóxido mostrando diferencias en su actividad siendo este último más tóxico para las células. El BV afectar la viabilidad de las células aún en bajas concentraciones, mientras que el MV sólo fue activo en concentraciones milimolares y en presencia de un metal cofactor. Estos resultados son también consistentes con lo esperado ya que un incremento de superóxido debería incrementar la actividad de la superóxido dismutasa que convierte al superóxido en peróxido de hidrógeno.

Tanto el nifurtimox como el nitrofurazón son drogas conocidas por su capacidad para producir superóxido y peróxido de hidrógeno. Ambas drogas aumentan la concentración del RNAm de la Fe-SOD lo que hace pensar que al ser metabolizadas producen cantidades importantes de radicales superóxido. Este resultado es interesante ya que se desconocen los efectos del NIF y del NFZ en la actividad y expresión de la SOD. Aumentar la actividad de la SOD llevaría a un incremento en la concentración interna de peróxido de hidrógeno, el cual es metabolizado muy pobremente por *T. cruzi*⁸⁴. En base a los resultados obtenidos resulta interesante examinar si la sobreexpresión de la SOD en células de *T. cruzi* transformadas resulta en un incremento en la susceptibilidad al NIF y NFZ debido a un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno.

Por lo expuesto anteriormente, este trabajo es un primer intento por caracterizar la actividad de la Fe-SOD del *T. cruzi* para comprender cómo se regula su actividad según las condiciones de su medio ambiente. Expresado de manera mas general: estudiar la respuesta del parásito al estrés oxidativo.

Con las técnicas de biología molecular es ahora posible no solo clonar y secuenciar a los genes involucrados en el metabolismo de hierro y en la respuesta al estrés oxidativo,

también se puede estudiar el efecto in vivo. Es posible impedir la expresión, eliminar genes o sobreexpresarlos en *T. cruzi*⁹⁵ con la ayuda de vehiculos moleculares. Estos métodos permitirán el estudio mas detallado de su regulación y de la función de sus productos.

El gen de la Fe-SOD puede expresarse en algún vector como el pTEX⁹⁵ para transfectar células de *T. cruzi*, con el fin de sobreexpresarlo. Una vez que se obtengan las células transfectadas, se puede establecer cual es el papel del gen transfectado en la respuesta a cada uno de los inductores de estrés oxidativo probados en este trabajo.

La investigación en el campo de los radicales libres ha llevado a un mejor entendimiento de su generación en varios sistemas biológicos, ya sea como resultado del metabolismo natural de la célula (fisiológico), o como resultado del efecto de ciertas drogas. Esto es especialmente importante en el caso de las enfermedades parasitarias^{12,17,20}, por la urgente necesidad de disponer de drogas eficaces basadas en un conocimiento de la fisiología y bioquímica del parásito.

Las enzimas y rutas metabólicas en que difieren el huésped y sus parásitos pueden explotarse para el diseño de drogas. En este sentido, agentes inductores de la SOD podrían tener consecuencias letales para el parásito. Un potente sinergismo ocurriría entre drogas generadoras de radicales y compuestos que aumenten la actividad de las enzimas que producen peróxidos y superóxidos. El campo de la generación de radicales libres en relación con enfermedades parasitarias comienza a desarrollarse y su potencial es enorme.

- ¹ World Health Organisation. 1991. Control of Chagas Disease. Technical report. Series no 811, Geneva
- ² Velasco O y Guzmán C. 1986. Importancia de la Enfermedad de Chagas en México. Rev Lat-amer. Microbiol. 28:275-283
- ³ Tay, J, 1980. La enfermedad de Chagas en la Republica Mexicana. Rev Salud Pub Mex. 22 No4:409-50
- ⁴ Salazar, PM, Tay, J, Ontiveros, A, Jiménez, J, de Haro, I, Bucio, MI, Ruiz, AL, 1983. Enfermedad de Chagas en México. Rev Fac Med Mex. 26:11-51
- ⁵ Salazar, PM, de Haro, I, Uribarren, T, 1988. Chagas Disease in Mexico. Parasitol Today. 4 No12:348-352
- ⁶ Schofield, CJ, 1985. Control of Chagas' Disease Vectors. Br Med Bull. 41:187-94
- ⁷ Manson-Bahr PEC and Bell Dr. 1991. American Trypanosomiasis, p.74-86. En: "Manson's Tropical Diseases", 19th ed. Balliere Tindall.
- ⁸ Nogueira, N, 1986. American Trypanosomiasis: Antigens and Host-Parasite Interactions, p.91-110. En: Pearson, TW y Decker, M(ed.), "Parasite Antigens Toward New Strategies for Vaccines". Inc New York and Basel:
- ⁹ Morello A. 1988. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxification mechanisms in Trypanosoma cruzi. Comp Biochem Physiol. 90C:1-12
- ¹⁰ Schmidt GD y Roberts LS. 1989. Order Kinetoplastida: Trypanosomes and their Kin, p.55-80. En: "Foundations of Parasitology", 4rd ed. Times Mirror/Mosby
- ¹¹ Brener Z. 1973. The biology of Trypanosoma cruzi. Ann Rev Microbiol. 27:347-382.
- ¹² Halliwell B y Gutteridge JMC. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. Methods Enzymol. 186:1-85
- ¹³ Pryor WA. 1986. Oxy-radicals and related species: Their formation, lifetimes and reactions. Ann Rev Physiol. 48:657-667
- ¹⁴ Halliwell B y Gutteridge JMC. 1989. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. En: "Free Radicals in Biology and Medicine", 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.
- ¹⁵ McCord JM y Fridovich I. 1969. Superoxide Dismutase. J Biol Chem. 244:6049-6055
- ¹⁶ Fridovich I. 1989. Superoxide Dismutase. J Biol Chem. 264: 7761-7764
- ¹⁷ Halliwell B y Gutteridge JMC. 1986. Oxygen-free radicals and iron in relation to biology and medicine. Some problems and concepts. Arch Biochem Biophys. 246:501-508
- ¹⁸ Imlay JA y Fridovich I. 1991. Assay of metabolic superoxide production in E. scherichia coli. J Biol Chem. 266:6957:6965
- ¹⁹ Amstad D et al. 1991. The balance between Cu/Zn superoxide dismutase and catalase affects de sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. Biochem. 30: 9305-9313
- ²⁰ Callahan HL et al. 1993. Oxidants and anti-oxidants in Trypanosomiasis and Leishmaniasis, p. 81-110. En: Ol Aruoma (ed.), "Free Radicals in Tropical Diseases". Harwood Academic Publishers University of London, King's College, UK.
- ²¹ Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem. 215: 213-219

- ²² Barnes, R, Connely, JL, Jones, OT, 1972. The utilization of iron and its complexes by mammalian mitochondria. *Biochem J*, 128: 1043-1055
- ²³ Aisen, P y Listowsky, I, 1980. Iron Transport and Storage Proteins. *Ann Rev Biochem*, 49: 357-93
- ²⁴ Halliwell B y Gutteridge JMC. 1992. Biologically-relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 307:108-112
- ²⁵ Halliwell B y Gutteridge JMC. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 208:1-8
- ²⁶ Weinberg ED. 1978. Iron and Infection. *Microbiol Rev*. 42:45-66
- ²⁷ Weinberg ED. 1990. Cellular iron metabolism in health and disease. *Drug Met Rev* 22:531-579
- ²⁸ Puppo A y Halliwell B. 1988. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *Biochem J*. 249: 185-190
- ²⁹ Kuhn, LC et al. 1984. Gene Transfer, Expression and Molecular cloning of the human transferrin receptor gene. *Cell*. 37:95-103
- ³⁰ Trowbridge, IS et al. 1984. *Biochem. Pharmacol.* 6:925-932
- ³¹ Sutherland R et al. 1981. *PNAS*. 78:4512-4519
- ³² Hesketh, TR et al. 1985. *Nature*. 317:481-484
- ³³ Jacobson, EL y Jacobson, MK. 1976. *Arch. Biochem. Biophys.* 175:627-634
- ³⁴ Sun, IL et al. 1987. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145:467-473
- ³⁵ Sun, IL et al. 1988. *Biochem. Biophys. Acta.* 938:17-23
- ³⁶ Low, H et al. 1985. *Biochem. Biophys. Acta.* 844:142-148
- ³⁷ Navas, P et al. 1986. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135:110-115
- ³⁸ Sun, IL et al. 1987. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145:976-982
- ³⁹ Sun, IL et al. 1985. *Exp. Cell. Res.* 156:528-536
- ⁴⁰ Díaz-Gil, JJ et al. 1986. *Biochem J*. 235:49-55
- ⁴¹ Low, H et al. 1986. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139: 1117-1123
- ⁴² Voyiatzaki CS y Soteriadou KP. 1992. Identification and isolation of the Leishmania Transferrin Receptor. *J Biol Chem*. 267:912-917
- ⁴³ Schell D et al. 1991. A transferrin-binding protein of *Trypanosoma brucei* is encoded by one of the genes in the variant surface glycoprotein gene expression site. *EMBO J* 10:1061-1066
- ⁴⁴ Schell D et al. 1991. Transferrin is a bloodfactor of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Res*. 77:558-560
- ⁴⁵ Lima MF y Villalta F. 1990. *Trypanosoma cruzi* receptors for human transferrin and their role. *MBP* 38:245-252
- ⁴⁶ Channon JY y Blackwell JM. 1985. Study of the sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes to hydrogen peroxide. *Parasitol*. 91:197-206
- ⁴⁷ Carnieri EGS et al. 1993. Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. *MBP* 61:79-86
- ⁴⁸ Fairlamb AH et al. 1989. Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. *Parasitol*. 99s:S93-S112
- ⁴⁹ Fairlamb AH y Cerami A. 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Ann Rev Microbiol* 46: 695-729

- ⁵⁰ **Krauth-Siegel RL et al.** 1987. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterisation of the crystalline enzyme. *Eur J Biochem* 164:123-128
- ⁵¹ **Sullivan FX y Walsh CT.** 1991. Cloning, sequencing, overproduction and purification of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *MBP* 44:145-148
- ⁵² **Henderson GB et al.** 1987. Trypanothione dependent peroxide metabolism in *Chritidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*. *MBP* 24:39-45
- ⁵³ **Penketh PG y Klein RA.** 1986. Hydrogen peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *MBP* 20: 111-121
- ⁵⁴ **Clark D et al.** 1994. Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. *MBP* 66:143-145
- ⁵⁵ **Le Trant et al.** 1983. Iron containing SOD from *Chritidia fasciculata*. *J Biol Chem.* 258:125-130.
- ⁵⁶ **Ismail SO et al.** 1994. Molecular cloning, characterisation and expression in *Escherichia coli* of iron superoxide dismutase cDNA from *Leishmania donovani* chagasi. *Infect Immun* 62: 657-664
- ⁵⁷ **Temperton N.** 1994. Unpublished data.
- ⁵⁸ **Beisel, WR.,** 1976. Trace elements in infectious processes. *Med Clin North Am*, 60: 831-849
- ⁵⁹ **Murray, MJ, Murray, AB, Murray, MB, Murray, CJ.,** 1978. The adverse effect of iron depletion on the course of certain infections. *Br Med J.* 2:1113-1115
- ⁶⁰ **Payne, SM.** 1993. Iron acquisition in microbial pathogenesis. *Trends in Microbiol.* 1:66-69
- ⁶¹ **Loo VG y Lalonde RG.** 1984. Role of iron in intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 45:726-730
- ⁶² **Weinberg, ED,** 1984. Iron withholding: A defense against infection and neoplasia. *Physiol Rev*, 64 : 65-102
- ⁶³ **Lalonde RG y Holbein BE.** 1984. Role of iron in *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Clin Invest.* 73: 470-476
- ⁶⁴ **Vargas-Parada LC.** 1992. Efecto del fierro en la diferenciación y crecimiento de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura. UACPyP CCH. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ⁶⁵ **Miles MA.** 1993. Culturing and Biological Cloning of *Trypanosoma cruzi*. Chapter 2 En: John E. Hyde (ed.). "Methods in Molecular Biology" Vol 20: Protocols in Molecular Parasitology. Humana Press Inc.
- ⁶⁶ **Bradford**
- ⁶⁷ **Laemmli**
- ⁶⁸ **Sambrook et al.** 1989. "Molecular Cloning: A laboratory manual". 2nd ed. Edited by Chris Nolan. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ⁶⁹ **Kelly JM et al.** 1993. Isolation of DNA and RNA from *Leishmania*. Chapter 10 p.123-131 En: John E Hyde (ed.) "Methods in Molecular Biology" Vol 21 Protocols in Molecular Parasitology Humana Press Inc.
- ⁷⁰ **Southern EM.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98: 503-517

- ⁷¹ Kelly JM. 1994. An approach to functional complementation by introduction of large DNA fragments into *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* using a cosmid shuttle vector. MBP 65:51-62
- ⁷² Deane y Moriearty. 1984. Cell differentiation in Trypanosomatids. p. 19. En: Carlos M Morel (ed.), "Genes and Antigens of Parasites: A laboratory manual". 2nd Ed. UNDP/WORLD BANK/WHO
- ⁷³ R Kohen y R Shalhoub. 1994. Prevention and induction of oxidative damage in *Escherichia coli* cells by cationized proteins. Free radical biology and medicine. 16: 571-580
- ⁷⁴ Korbashi P et al. 1986. Iron mediates paraquat toxicity in *Escherichia coli*. J Biol Chem 261: 12472-12476
- ⁷⁵ Aruoma OI et al. 1991. Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. Biochem J. 273:601-604
- ⁷⁶ Jones RW et al. 1976. A study of the permeability of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* to reduced and oxidised benzyl viologen and methyl viologen cations: Complications in the use of viologens as redox mediators for membrane-bound enzymes. Biochem Soc Trans 4:671-673
- ⁷⁷ Docampo R et al. 1981. Mechanisms of nifutimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. Biochem Pharmacol 30:1947-1951
- ⁷⁸ Aldunate y A Morello. 1993. Free radicals in the mode of action of antiparasitic drugs, p. 137-165 En: OI Aruoma (ed.), "Free Radicals in Tropical Diseases". Harwood Academic Publishers University of London, King's College, UK.
- ⁷⁹ Docampo R y Stoppani AOM. 1979. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. Arch. Biochem. Biophys 197:317-321
- ⁸⁰ Hernandez R et al. 1993. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: A review. Biol Res 26:109-114
- ⁸¹ Pays, E et al. 1989. The genes and transcripts of an antigen gene expression site from *Trypanosoma brucei*. Cell 57:835-845
- ⁸² Salmon D et al. 1994. A novel heterodimeric transferrin receptor encoded by a pair of VSG expression site-associated genes in *T. brucei*. Cell 78: 75-86
- ⁸³ Hobbs MR y Boothroyd JC. 1990. An expression-site-associated gene family of trypanosomes is expressed *in vivo* and shows homology to a variant surface glycoprotein gene. MBP 43:1-16
- ⁸⁴ Boveris A y Stoppani AOM 1977. Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*. Experientia 33:1306-1307
- ⁸⁵ Kelly, JM et al. 1993. Phenotype of recombinant *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* which overexpress trypanothione reductase. Eur J Biochem 218: 29-37

*In my rear view mirror
the sun is going down
sinking behind bridges in the road
and I think of all the good things
that we have left undone*

D. Gilmour, 1983