

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO



CREER...CREAR...CRECER

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FCO-QCAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR

“Mecanismos de transducción de señales en *Trypanosoma cruzi*: señal de calcio en formas epimastigote”

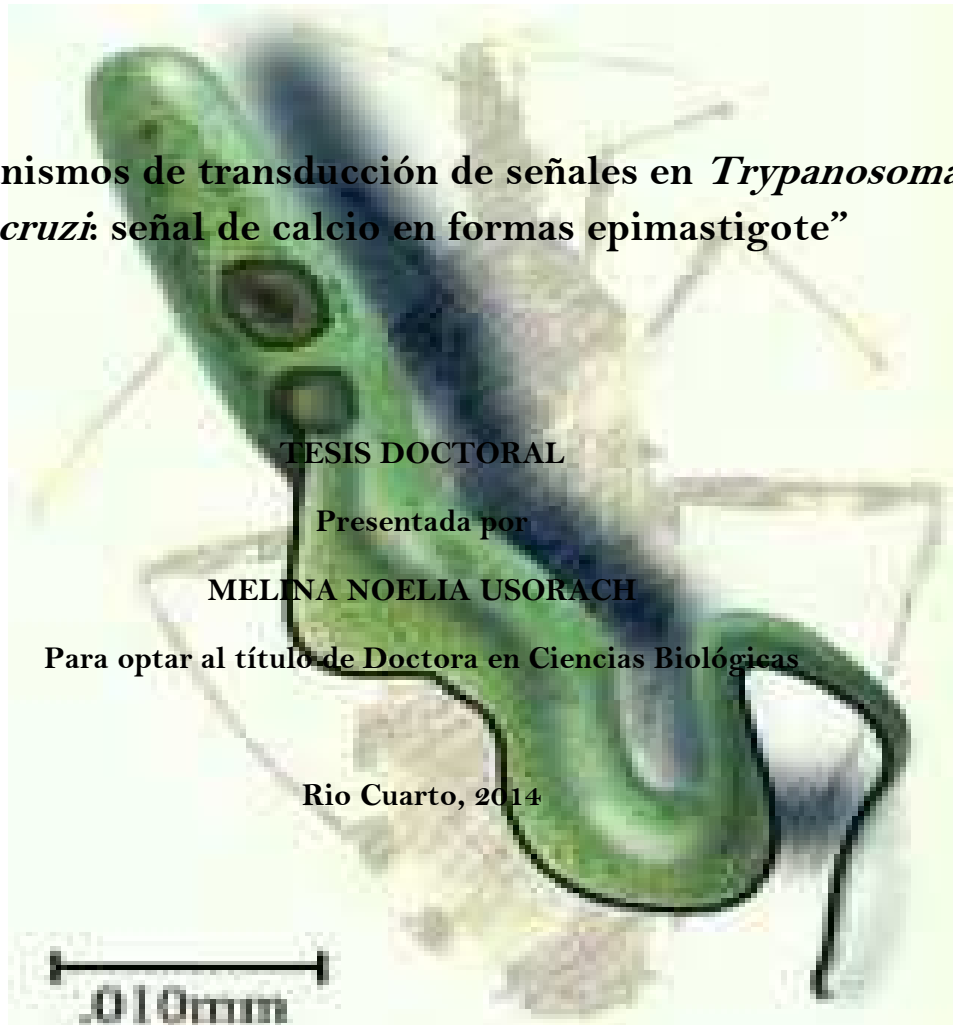
TESIS DOCTORAL

Presentada por

MELINA NOELIA USORACH

Para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas

Río Cuarto, 2014



Trabajo presentado por la Microbióloga Melina Noelia Usorach para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Directora de Tesis

Dra. Estela E. Machado

Co-Directora de Tesis

Dra. Graciela Racagni.....

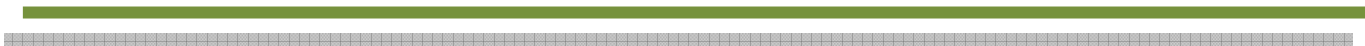
Miembros del Jurado

Dra. Mirtha Biscoglio.....

Dra. Juana Chessa.....

Dra. Graciela Elso.....

AGRADECIMIENTOS



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de la autora y su directora de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos difíciles.

Primero y antes que nada, dar gracias a **Dios**, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Agradecer hoy y siempre a mi familia porque a pesar de no estar presentes físicamente, se que procuran mi bienestar. A mis padres Esteban y Raquel, mis hermanas Anahí y Silvina, mi hermano Javier porque el ánimo, apoyo y alegría que me brindaron fueron la fortaleza necesaria para seguir adelante.

A Silvio, mi esposo, por ser la persona que ha compartido el mayor tiempo a mi lado, siendo muy grato estar en su compañía. Porque muchas veces colaboró con la realización de la tesis, dejando de lado sus cosas para ayudarme.

A mis retoños, Santiago y Francisco, que los amo con el alma. Gracias por entender a mamá, porque muchas veces los postergué para dedicarme a esta tesis.

Mi más sincero agradecimiento a FONCyT, a CONICET, a mi directora de tesis, Dra. Estela Machado y a mi co-directora de tesis, Dra Graciela Racagni a quienes debo el realizar el doctorado en una Universidad tan prestigiosa como lo es la Universidad Nacional de Río Cuarto.

A Teté y Kelly no sólo por ofrecerme sus valiosos conocimientos y experiencia profesional, sino también por animarme y alentarme en cada una de las partes de la investigación.

A las Dras. Mirtha Biscoglio, Juana Chessa y Graciela Elso por aceptar ser parte del jurado de tesis y por sus valiosos aportes a este trabajo.

A Miguel Bueno y Mariela Woelke y a todo el personal del Depto. de Biología Molecular ya que dentro de los ámbitos que a cada uno le competen han colaborado conmigo sin ponerme ningún impedimento, al contrario, me han brindado siempre una sonrisa.

Un agradecimiento especial al Dr. Sergio Bonansea por la colaboración, paciencia, apoyo brindados desde siempre y sobre todo por esa gran amistad que me brindó y me brinda, por escucharme y aconsejarme siempre.

A las Dras. Celeste Gesumaría, Marina Gimenez y Verónica Meringer, por brindarme su ayuda cuando más la necesitaba, por ser personas con la que puedo contar siempre, por el cariño que me brindan y los ánimos que me dieron; por compartir conmigo muchos momentos tanto alegres como tristes, por tener siempre tendidas sus manos, por escucharme, en fin, por darme cariño y amistad desde el día en que me conocieron.

A la Dra. Ana Laura Villasuso, por la colaboración brindada durante toda la tesis y sobre todo en la última etapa. Por los tiempos compartidos dentro y fuera del ámbito de trabajo.

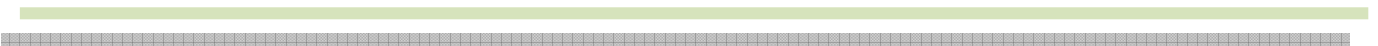
A Mica, mi tesinista, me encantó compartir tiempo con ella ya que es una excelente compañera y amiga.

A Mati porque a pesar de ser poco el tiempo que nos conocemos ha demostrado ser una gran persona y sobre todo un gran amigo, con el que sé que podré contar siempre.

A Javi y a Pauli, mi hermano y mi cuñada y además compañeros de laboratorio, por brindarme su apoyo, ánimo y colaboración en todo momento.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

ÍNDICE



ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT	4
1- INTRODUCCIÓN	6
1.1- GENERALIDADES.....	6
1.2- MORFOLOGIA DEL <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	7
1.2.1- CICLO DE VIDA DEL <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	11
1.3- TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	13
2-MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.1- ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	19
2.2- CULTIVO DE LOS PARASITOS	19
2.3- COSECHA DE LOS PARASITOS	19
2.4- RECUENTO DE PARASITOS	20
2.5- OBTENCION DE MEMBRANAS.....	20
2.5.1-DETERMINACION DE PROTEINAS.....	20
2.6- DETERMINACION DE LA INCORPORACION Y LIBERACION DE CALCIO DESDE FRACCIONES MICROSOMALES.....	21
2.7- MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y CONFOCAL	21
2.8- PURIFICACION POR HEPARINA-SEFAROSA DEL POSIBLE RECEPTOR A IP ₃ /R _{YR}	22
2.9- ENSAYO DE REACTIVIDAD CRUZADA Y WESTERN BLOT	22
2.10- MEDIDAS DE ALCALINIZACION EN VESICULAS ACIDICAS.....	23
2.10.1- DETERMINACIONES ESPECTROFLUOROMETRICAS.....	23
2.11.- MEDIDA DE LOS NIVELES DE CALCIO INTRACELULAR	24
2.11.1- CARGADO DEL FLUOROFORO FURA -2/AM.....	24
2.11.2- MEDIDAS DE FLUORESCENCIA DEL INDICADOR FURA -2	24
2.12- MEDIDAS DE ACIDIFICACION EN EL CITOPLASMA.....	25
2.13- DETERMINACION DE FORMAS INTERMEDIAS ENTRE EPIMASTIGOTES Y TRIPOMASTIGOTES	25
2.14- AISLAMIENTO DE LOS ACIDOCLACISOMAS.....	26
2.15- ANALISIS ESTADISTICOS.....	27

2.16-DROGAS Y REACTIVOS.....	27
2.17-PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.	27
2.17.1-DIGITONINA	27
2.17.2-EGTA.....	27
2.17.3-HEMINA	27
2.17.4-MEDIO DE GRACE'S	27
2.17.5-GRACE'S MODIFICADO	28
2.17.6-REACTIVO DE BRADFORD.....	28
2.17.7-RESUSPENSIÓN DEL FURA-2/AM.....	28
2.17.8-SOLUCIÓN SULFONÍTRICA	28
2.17.9-SOLUCIONES AMORTIGUADORAS	28
2.18-EFFECTORES UTILIZADOS.	28
2.18.1-2-APB (2-AMINOETOXIDIFENIL BORATO).....	28
2.18.2-BAPTA.....	29
2.18.3-CAFEÍNA	29
2.18.4-EIPA (S-[N-ETIL-N-ISOPROPIL-AMILORIDA]).....	29
2.18.5-MANITOL	29
2.18.6-NACl	29
2.18.7-PMA (FORBOL 12-MIRISTATO 13-ACETATO).....	29
2.18.8-RIANODINA	29
3-RESULTADOS	30
3.1- CAPITULO 1: CANALES DE CALCIO PERTENECIENTES A LA SUPERFAMILIA DE RECEPTORES A IP ₃ /RYR.....	30
3.1.1- INTRODUCCION CAPITULO 1	30
3.1.2- RESULTADOS CAPITULO 1	30
3.1.2.1- EFECTO DEL IP ₃ Y LA RIANODINA SOBRE LA MOVILIZACION DE CALCIO INTRACELULAR	30
3.1.2.2- PRESENCIA DE UNA REGION GENOMICA EN <i>T. CRUZI</i> CAPAZ DE CODIFICAR UNA PROTEINA CON CARACTERISTICAS A LOS RECEPTORES DE IP ₃ /RYR	32
3.1.2.2.1- Dominios conservados de la proteína EAN89926 de <i>T. cruzi</i>	33
3.1.2.2.2- Purificación del receptor para IP ₃ /RyR	35
3.1.2.2.3 Inmunodetección del Receptor para IP ₃ /RyR en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	36
3.2- CAPITULO 2 (PARTE A): FUNCIONALIDAD DEL INTERCAMBIADOR Na ⁺ /H ⁺ EN RELACIÓN CON LA SEÑAL DE CALCIO	39
3.2.1- INTRODUCCION CAPITULO 2 (PARTE A):.....	39

3.2.2- RESULTADOS CAPITULO 2 (PARTE A):	40
3.2.2.1- EL ESTRES OSMOTICO PROVOCO ALCALINIZACION DE LOS ACIDOCLACISOMAS Y ACIDIFICACION CITOPLASMATICA, VIA UN INTERCAMBIADOR Na^+/H^+	40
3.2.2.2- EFECTO DE LA HIPEROSMOLARIDAD SOBRE LA LIBERACION DE Ca^{2+} DESDE RESERVORIOS INTRACELULARES	41
3.2.2.3- EL ESTRÉS OSMOTICO INCREMENTA EL NUMERO DE FORMAS INTERMEDIAS ENTRE EPIMASTIGOTES Y TRIPOMASTIGOTES	43
3.3- CAPITULO 2 (PARTE B): REGULACIÓN DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ POR ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS QUINASAS	47
3.3.1- INTRODUCCION CAPITULO 2 (PARTE B)	47
3.3.2- RESULTADOS CAPITULO 2 (PARTE B)	48
3.3.2.1- REGULACION DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ POR PROTEINA QUINASA C (PKC) BAJO CONDICIONES DE HIPEROSMOLARIDAD	48
3.3.2.2- REGULACION DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ POR PROTEINA QUINASA A (PKA) BAJO CONDICIONES DE HIPEROSMOLARIDAD	50
3.3.2.3- LAS FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS ESTAN INVOLUCRADAS EN EL PROCESO DE OSMORREGULACION	53
3.4- CAPITULO 3: LOCALIZACION SUBCELULAR DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+	55
3.4.1- INTRODUCCION CAPITULO 3	55
3.4.2- RESULTADOS CAPITULO 3	55
3.4.2.1- INMUNODETECCION DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ EN EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	55
3.4.2.2- PRESENCIA DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ EN ACIDOCALCISOMAS AISLADOS	56
4- DISCUSIÓN	57
5- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

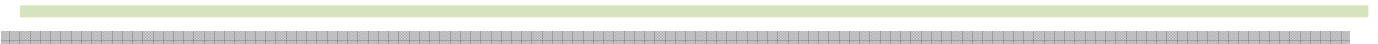
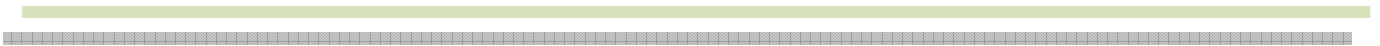


FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DEL NÚMERO ESTIMADO DE INMIGRANTES EN PAÍSES NO ENDÉMICOS CON INFECCIÓN POR <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	6
FIGURA 2. PRINCIPALES MORFOLOGÍAS DE LOS TRIPANOSOMÁTIDOS,	7
FIGURA 3. DIFERENTES FORMAS DE <i>T. CRUZI</i> PRESENTES EN MUESTRAS DE SANGRE, CULTIVOS E INTESTINO DEL INSECTO.....	8 ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FIGURA 4. ESTRUCTURAS SUBCELULARES PRESENTES EN EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	9
FIGURA 5. CICLO DE VIDA DEL AGENTE ETIOLÓGICO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	12
FIGURA 6: REPRESENTACION ESQUEMATICA DE UN ACIDOCALCISOMA	16
FIGURA 7. EFECTO DEL IP ₃ SOBRE LA SEÑAL DE CALCIO EN FRACCIÓN DE MEMBRANAS DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	31
FIGURA 8 EFECTO DE RYR SOBRE LA SEÑAL DE CALCIO EN FRACCIÓN DE MEMBRANAS DE EPIMASTIGOTES DE EL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO INDUJO LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR <i>T. CRUZI</i>	32 ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FIGURA 9 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE EAN89926 OBTENIDA EN EL GENOMA DE <i>T. CRUZI</i> QUE CODIFICARÍA PARA UN POSIBLE CANAL DE Ca ²⁺ SEMEJANTE A LA SUPERFAMILIA DE RECEPTOR DE IP ₃ /RYR	33
FIGURA 10 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL RECEPTOR DE IP ₃ TIPO II, RIANODINA TIPO I Y DE LA PROTEÍNA HOMÓLOGA HALLADA EN EL GENOMA DE <i>T. CRUZI</i>	35
FIGURA 11 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE <i>T. CRUZI</i> CON CARACTERÍSTICAS POSIBLEMENTE SEMEJANTES A LOS RECEPTORES DE IP ₃ /RYR	36
FIGURA 12 INMUNOREACTIVIDAD CRUZADA ENTRE LA PROTEÍNA HIPOTÉTICA DE <i>T. CRUZI</i> PURIFICADA CON HEPARINA-SEFAROSA Y EL ANTICUERPO ANTI-RcRYR TIPO I DE HUMANO.....	36
FIGURA 13 RcIP ₃ EN FORMAS EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	37
FIGURA 14 RcRYR EN FORMAS EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	38
FIGURA 15 ALCALINIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS ACÍDICAS PROVOCADO POR ESTRÉS HIPEROSMÓTICO	40
FIGURA 16 CAMBIOS EN EL PH INTRACELULAR PROVOCADO POR ESTRÉS HIPEROSMÓTICO (MANITOL 1 M).....	41
FIGURA 17 EL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO INDUJO LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR VÍA UN INTERCAMBIADOR Na ⁺ /H ⁺	41
FIGURA 18 EL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO INDUJO LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR.....	42
FIGURA 19. ALCALINIZACIÓN DE LOS ACIDOCALCISOMAS AISLADOS PROVOCADO POR ESTRÉS HIPEROSMÓTICO	42
FIGURA 20 EFECTO DEL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE FORMAS EPIMASTIGOTE.	43

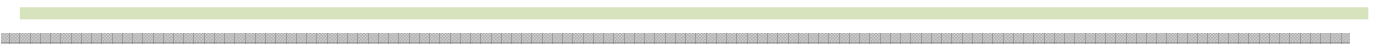
FIGURA 21 EFECTO DEL INHIBIDOR DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ (EIPA) SOBRE EL CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTES Y FI.....	44
FIGURA 22 DIFERENTES ESTADÍOS DE <i>T. CRUZI</i> EN CULTIVO.....	44
FIGURA 23 EFECTO DEL EIPA SOBRE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS INDUCIDOS POR EL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.	45
FIGURA 24 EFECTO DEL EIPA SOBRE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS INDUCIDOS POR EL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.	46
FIGURA 25 ANÁLISIS DE SECUENCIA DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ DE <i>T. CRUZI</i> : SITIOS DE FOSFORILACIÓN POR PKC.....	48
FIGURA 26 ALCALINIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS ACÍDICAS PROVOCADO POR ESTRÉS HIPEROSMÓTICO	49
FIGURA 27 PMA AUMENTÓ LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR INDUCIDA POR EL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.	49
FIGURA 28 CHELERITRINA Y EIPA DISMINUYERON LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR INDUCIDA POR EL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.	50
FIGURA 29 ANÁLISIS DE SECUENCIA DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ DE <i>T. CRUZI</i> : SITIOS DE FOSFORILACIÓN POR PKA.....	51
FIGURA 30. ALCALINIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS ACÍDICAS PROVOCADO POR ESTRÉS HIPEROSMÓTICO	51
FIGURA 31 ALCALINIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS ACÍDICAS PROVOCADA POR ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.	52
FIGURA 32 DBAMPC AUMENTÓ LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR INDUCIDA POR EL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.	52
FIGURA 33 ALCALINIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS ACÍDICAS PROVOCADO POR ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.	53
FIGURA 34. LY294002 DISMINUYÓ LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR INDUCIDA POR EL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.	54
FIGURA. 35 INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ EN FORMAS EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	56
FIGURA 36 RECONOCIMIENTO DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ POR EL ANTICUERPO PRIMARIO ANTI- Na^+/H^+ EN ACIDOCALCISOMAS AISLADOS DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	57
FIGURA. 37 ESQUEMA PROPUESTO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR ESTRÉS HIPEROSMÓTICO EN EPIMASTIGOTES	67

ÍNDICE DE TABLAS



**TABLA I: COMPARACIÓN DE LAS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL RECEPTOR DE IP₃ TIPO II,
RIANODINA TIPO I Y DE LA PROTEÍNA HOMÓLOGA HALLADA EN EL GENOMA DE *T. CRUZI*..... 34**

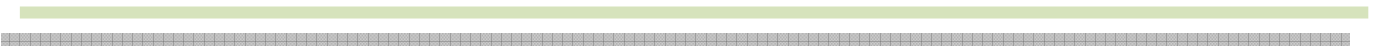
ABREVIATURAS



Abreviaturas

AO	Naranja de acridina
Ca ²⁺ _o	Calcio extracelular
[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio intracelular
Ca ²⁺ -ATPasa	Calcio-Adenosina trifosfato fosfatasa
Cch	Carbacol
DAG	Diacilglicerol
EIPA	S-N-etil-N-isopropil-amilorida
H ⁺ -ATPasa	Protón-Adenosinatrifosfato fosfatasa
H ⁺ -PPasa	Protón-pirofosfatasa
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
KRT	Krebs Ringer Tris
Na ⁺ _o	Sodio extracelular
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PMA	Fórbol 12 miristato 13-acetato
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PI-PLC	Fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PKC	Proteína quinasa dependiente de fosfolípidos y calcio
PLC	Fosfolipasa C
Proteína G	Proteína unidora de nucleótidos de guanina
RcIP ₃	Receptor de IP ₃
RcRyR	Receptor de rianodina
RyR	Rianodina

RESUMEN



Resumen

El ión calcio (Ca^{2+}) desempeña un papel fundamental en el metabolismo y la fisiología de las células; controla procesos que dependen de la amplitud, la frecuencia y la localización subcelular de las señales de Ca^{2+} citosólico. La activación de la vía de los fosfoinosítidos, en eucariotas superiores, eleva la concentración citoplasmática de IP_3 , el cual libera calcio desde el sistema de Retículo Endoplásmico. El mecanismo por el cual el Ca^{2+} es liberado desde reservorios intracelulares en eucariotas inferiores es un tema controvertido y poco conocido, por ello en el presente trabajo se dilucidó como los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* pueden liberar calcio desde los reservorios intracelulares. Se demostró así, un receptor sensible a IP_3 y rianodina (RyR) localizado en microsomas del parásito. Al respecto, se purificó la proteína hipotética de *T. cruzi* (RcIP₃) siendo esta capaz de interactuar con anticuerpos policlonales anti- RcIP₃ y anti- RcRyR, sugiriendo la presencia de una posible proteína de ~330 kDa que posee características híbridas de los RcIP₃/RyR. Hasta el momento no se había determinado la localización subcelular del receptor de IP_3 /RyR en formas epimastigote de *T. cruzi*, en este trabajo mostramos que la reacción positiva del anticuerpo anti-RcIP₃ tipo II de humano y los epimastigotes fue visualizada en estructuras internas del parásito, sugiriendo una localización intracelular del receptor a IP_3 /RyR a semejanza de lo que ocurre en mamíferos.

Además, en este trabajo se muestra la participación del intercambiador Na^+/H^+ en respuesta a la hiperosmolaridad originado por manitol 0,5 M, determinado mediante la alcalinización de las vacuolas ácidas y su inhibición parcial por EIPA. De este modo, en formas epimastigote la relación entre la vía del inositol fosfato y la señal de calcio no está restringida sólo a la acción del IP_3 como un segundo mensajero. Además, los tratamientos con alta osmolaridad condujeron también a la liberación de calcio desde los acidocalcisomas como consecuencia de la activación conjunta de los intercambiadores $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ y Na^+/H^+ y liberación del ión vía un canal de Ca^{2+} sensible a IP_3 . Por otro lado, nos propusimos determinar la localización subcelular de dicho transportador en *T. cruzi*. La reacción positiva del anticuerpo anti- Na^+/H^+ y los epimastigotes fue visualizada en estructuras internas del parásito, mostrando que el intercambiador Na^+/H^+ está localizado en los acidocalcisomas.

Es bien conocido, que en diferentes tipos celulares, los intercambiadores Na^+/H^+ son regulados vía fosforilación por proteína quinasa C (PKC) y median la respuesta a muchas de las señales que intervienen en el control de la proliferación celular, la diferenciación, el volumen y los cambios de osmolaridad. En este trabajo, se

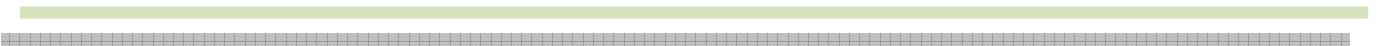
muestra el papel de PKC en el estadio de epimastigote en similitud a lo que ocurre en el intestino del insecto vector. Así, la activación de PKC por PMA indujo una alcalinización vacuolar en el parásito. La reversión del efecto del PMA por el inhibidor de intercambiador Na^+/H^+ sugiere la participación de dicho transportador en el proceso de alcalinización vacuolar bajo estas condiciones.

Por otro lado, el análisis de la secuencia de TcNHE reveló sitios consensos para la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA). La adenil ciclasa que genera AMPc, la PKA y varias fosfodiesterasas que lo degradan, fueron informadas como enzimas activas en epimastigotes. Nuestros resultados sugieren un compromiso de PKA en la regulación del intercambiador Na^+/H^+ en condiciones de estrés hiperosmótico, ya que la presencia de 8-bromo AMPc, análogo no hidrolizable de PKA, incrementó significativamente la alcalinización organelar inducida por manitol.

De modo que, es posible considerar que previamente a la activación de la PLC se produciría la del intercambiador Na^+/H^+ , mediado por PKA, con la subsiguiente liberación de Ca^{2+} . Estos hechos sugieren que la activación de la PLC es consecuencia del Ca^{2+} que proviene de estas vesículas ácidas.

En base a los antecedentes de nuestro laboratorio y a los resultados en el presente trabajo inferimos que en el recto del triatomino los epimastigotes sufren shock hiperosmótico cuyos efectos en la membrana celular estarían a nivel de la activación de varias enzimas de señalización y consecuente formación de segundos mensajeros. El estrés hiperosmótico dispararía señales que conducen a los epimastigotes a cambios indicativos de la inducción de la metaciclo génesis, diferenciación de epi a tripomastigote. Si bien, las actividades enzimáticas mencionadas son estimuladas por la alta osmolaridad; no significa que sean las vías ejecutoras de la diferenciación del parásito pero si las responsables, en parte, de los cambios estructurales y bioquímicos que conducen a la diferenciación, por lo menos, al estadio intermedio.

ABSTRACT



Abstract

Calcium ion (Ca^{2+}) plays a key role in the metabolism and physiology of cells; it controls processes that depend on the amplitude, frequency and subcellular localization of cytosolic Ca^{2+} signals. The activation of phosphoinositide pathway in higher eukaryotes rises the cytoplasmic concentration IP_3 , which releases calcium from the endoplasmic reticulum system. The mechanism by which Ca^{2+} is released from intracellular stores in lower eukaryotes is controversial and little known. Topic therefore in this work how epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* can release calcium from intracellular stores was elucidated. Thus was demonstrated a sensitive IP_3 and ryanodine receptor (RyR) located in microsomes parasite. In this regard, the hypothetical protein of *T. cruzi* (Rc IP_3) was purified being capable of interacting with polyclonal antibody anti-RcRyR and polyclonal antibody anti-Rc IP_3 , suggesting the possible presence of a ~ 330 kDa protein hybrid having characteristics of Rc IP_3 /RyR. So far, it had not been determined the subcellular localization of IP_3 /RyR receptor in epimastigote forms of *T. cruzi*, so in this work, we show that the positive reaction of the anti-Rc IP_3 type II human and epimastigotes was visualized in internal structures parasite, suggesting an intracellular location IP_3 /RyR receptor similar to what happens in mammals.

Furthermore, in this work, the participation of the Na^+/H^+ in response to hyperosmolarity originated by 0.5 M mannitol and determined by alkalization of acidic vacuoles and partial inhibition by EIPA was shown. Thus, in epimastigote forms the relation between the via of inositol phosphate and calcium signal is not restricted only to the action of IP_3 as a second messenger. In addition, treatments with high osmolarity also led to the release of calcium from acidocalcisomas following the joint activation of $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ and Na^+/H^+ exchangers and ion release via a Ca^{2+} channel sensitive IP_3 . Moreover, we determined the subcellular localization of Na^+/H^+ exchanger in *T. cruzi*. The positive reaction of the anti- Na^+/H^+ and epimastigotes was visualized in internal structures of the parasite, showing that the Na^+/H^+ is located in the acidocalcisomas.

It is well known that in different cell types, the Na^+/H^+ exchangers are regulated via phosphorylation by protein kinase C (PKC) and they mediate the response to many of the signals involved in the control of cell proliferation, differentiation, volume and osmolarity changes. In this work, the role of PKC in the stadium epimastigote in similarity to what occurs in the gut of the insect vector is

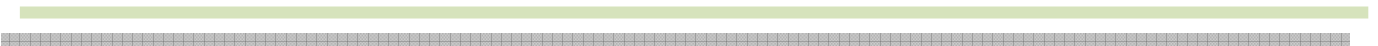
shown. Thus, the activation of PKC by PMA induced a vacuolar alkalization in the parasite. The reversal of the effect of PMA by the inhibitor of the Na^+/H^+ suggests the involvement of the transporter in the vacuolar alkalization process under these conditions.

What is more, the sequence analysis revealed TcNHE consensus sites for the protein kinase A dependent on the cAMP (PKA). The adenylyl cyclase that generates cAMP, PKA and several phosphodiesterases that also degrade cAMP, were reported as active enzymes in epimastigotes. Our results suggest a compromise of PKA in the regulation of the Na^+/H^+ in hyperosmotic stress conditions, since the presence of 8-bromo cAMP, non-hydrolyzable analog of PKA, increased significantly the organelar alkalization induced by mannitol.

So, it is possible to consider that prior to the activation of PLC the activation of Na^+/H^+ exchanger would be produced, mediated by PKA, with the subsequent release of Ca^{2+} . These facts suggest that activation of PLC is a consequence of Ca^{2+} which comes from these acidic vesicles.

Based on the history of our laboratory and the results in this present work, we infer that in the rectum of triatomine, the epimastigotes suffer from hyperosmotic shock. Their effects on the cell membrane would be at the level of activation of several enzymes consistent and signaling formation of second messengers. Hyperosmotic stress would trigger signals leading the epimastigotes to indicative changes in the induction of metacyclogenesis, epi to trypomastigote differentiation. Although the enzymatic activities mentioned are stimulated by high osmolarity; this does not mean that they are the implementing pathways of the differentiation of the parasite but they are responsible, in part, of the structural and biochemical changes that lead to the differentiation, at least, of the intermediate stage.

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

La enfermedad de Chagas (Chagas, 1909), también conocida como Tripanosomiasis Americana, es una infección parasitaria, crónica y sistémica causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos triatomínicos, comúnmente llamados “vinchuca”. Esta enfermedad todavía presenta un problema creciente en la salud pública global y afecta alrededor de 8 millones de personas en América Latina, de los cuales el 30-40% padece de cardiomiopatías y megasíndromes digestivos (Andrade y col.; 2014). En las tres décadas pasadas, el control y dirección de la enfermedad de Chagas ha mejorado debido a los controles a gran escala del vector y a la selección de los donantes de sangre, reduciendo así la incidencia y la prevalencia (Rassi Jr y col., 2010). Esta enfermedad es considerada endémica en 21 países de América Central y del Sur (www.who.int/ctd/chagas/disease.htm) pero también es un problema de salud emergente en áreas no endémicas (**Fig. 1**), debido al gran crecimiento de los movimientos demográficos (Rassi Jr y col., 2010).



Fig. 1: Distribución mundial del número estimado de inmigrantes en países no endémicos con infección por *Trypanosoma cruzi* (Rassi Jr y col., 2010).

Esta patología presenta un alto impacto económico y social, y afecta a grupos sociales precarios como consecuencia de su mala calidad de vida. La importancia del Mal de Chagas radica en el hecho que desde el contagio, generalmente en la infancia,

hasta la aparición de los síntomas transcurren entre 20 y 30 años, y el individuo es afectado en plena etapa reproductiva. La enfermedad de Chagas presenta una patogenia compleja, la cual involucra dos estados sintomáticos: agudo y crónico, y uno asintomático: intermedio o latente. La fase aguda es un período corto (8 semanas) que comienza con la entrada del parásito al huésped y puede presentar una lesión inflamatoria, Chagoma o síndrome de Romania, si la entrada se produce cercana al ojo. Luego de una fase de latencia (entre 10-30 años), el individuo entra en una fase crónica. A este nivel, se ocasionan daños irreversibles en tejidos y órganos. El tratamiento con las drogas actuales, nifurtimox o benznidazole, es posible en la fase aguda e intermedia de la afección, y solamente atacan a parásitos circulantes presentando efectos colaterales adversos. De modo que, son necesarias nuevas drogas capaces de permitir una completa eliminación del microorganismo disminuyendo los efectos colaterales. Así, el estudio y comprensión de la bioquímica del *T. cruzi* y su ciclo de vida facilitaría el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas con blanco a esta enfermedad.

1.2 Morfología de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado unicelular, el cual representa uno de los eucariotas inferiores más primitivos. El parásito presenta un ciclo de vida complejo y presenta tres estadios distinguibles (**Fig. 2**) según las características del flagelo y la posición del cinetoplasto respecto al núcleo celular (Docampo y col., 2005).

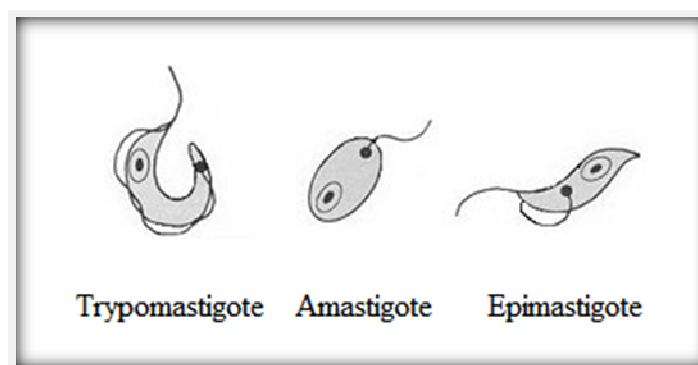


Fig. 2. Principales morfologías de los tripanosomátidos. Los diferentes estadios celulares del parásito son distinguibles por la forma celular, la presencia y el anclaje del flagelo y la posición del cuerpo basal, el cinetoplasto y el núcleo (Docampo y col., 2005).

Amastigote, forma replicativa intracelular en el vertebrado; epimastigote, forma replicativa que habita en el intestino medio del triatomino; y tripomastigote, forma

infectante que se encuentra tanto en el torrente sanguíneo del vertebrado (tripomastigote sanguíneo) como en la ampolla rectal del insecto vector (tripomastigote metacíclico).

Además de estos tres estadios principales, se pueden observar varias formas intermedias (**Fig. 3**) descritas por diferentes autores (Chagas, 1909; Kollien y Schaub, 1998; de Souza, 1999).

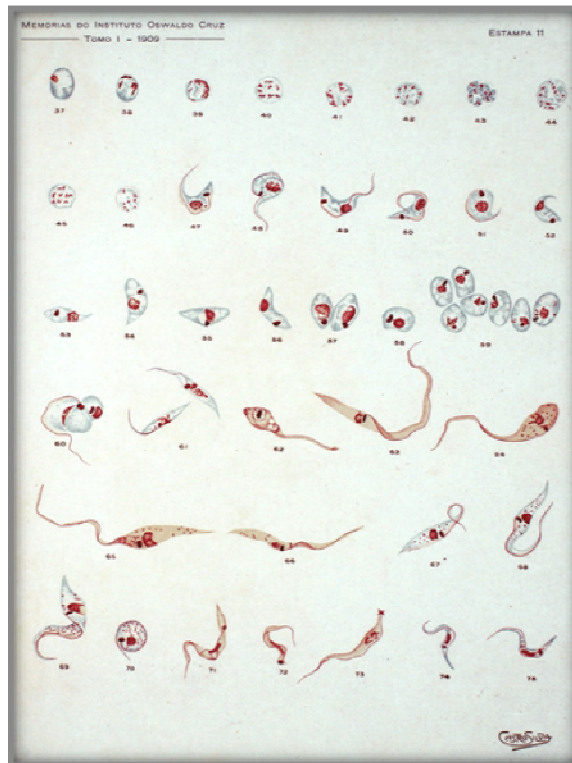


Fig. 3. Diferentes formas de *T. cruzi* presentes en muestras de sangre, cultivos e intestino del insecto. Dibujos esquemáticos tomados del trabajo original de Chagas (1909), las muestras fueron teñidas con Giemsa.

T. cruzi es similar a cualquier célula eucariota, pero presenta algunas características de los tripanosomátidos. Posee una única mitocondria, llamada mitocondrión, que recorre todo su cuerpo, con una región especializada donde alberga una porción de DNA extranuclear (20 % DNA total celular), y más la doble membrana mitocondrial que la envuelve constituyen el cinetoplasto. Posee un flagelo que nace del cuerpo basal situado cerca de la envoltura mitocondrial del cinetoplasto, constituyendo el órgano de locomoción del parásito (**Fig. 4**).

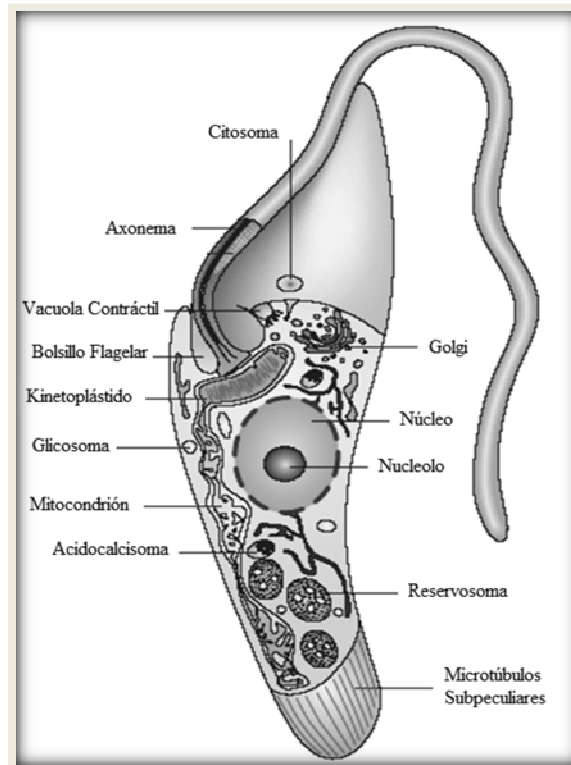


Fig. 4. Estructuras subcelulares presentes en epimastigotes de *T. cruzi*. Dibujo esquemático de un epimastigote basado en la información obtenida por microscopía electrónica. (Docampo y col., 2005).

En los tripanosomátidos existen otras organelas denominadas acidocalcisomas (Docampo y col., 2005), ellas tienen una única membrana que las rodea y presentan una naturaleza ácida y electrodensa, alto contenido de polifosfatos (PolyPs), Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ y Zn^{2+} , además contienen pequeñas cantidades de Cl^- , K^+ y S (Patel y Docampo, 2010). Los acidocalcisomas son similares a otras organelas descritas en diferentes microorganismos como “gránulos voluminosos” o “cuerpos de polifosfato” (Docampo, 1999). Éstos fueron los primeros descritos casi 100 años atrás (Meyer, 1904) y se conocían por ser ácidos y contener grandes cantidades de calcio (Kornberg, 1995). Sin embargo, la presencia de bombas de calcio e intercambiadores en sus membranas y su posible función, fueron solamente investigadas en tripanosomátidos y apicomplexos (Docampo, 1999). Los acidocalcisomas pueden ser visualizados fácilmente como vacuolas redondeadas tanto en tripanosomátidos vivos o en permeabilizados usando colorantes que se acumulan dentro de estos compartimentos ácidos como el Naranja de Acridina (Vercesi y col., 1994; Docampo y col., 1995) o como gránulos citoplasmáticos en preparaciones teñidas con Giemsa (Chagas, 1909, de Souza, 1999). El cloruro de cicloprodigiosina, un pigmento fluorescente, también es capaz de

acumularse dentro de los acidocalcisomas *in vivo* según Kim y col., (1999). Por lo general, los acidocalcisomas son estructuras esféricas con un diámetro promedio de 200 ± 90 nm y la membrana que los rodea tiene 8 nm de espesor; se observan en toda la célula aunque se localizan más en forma periférica. En epimastigotes, se concentran en la región media del cuerpo celular aunque algunos pueden observarse en asociación con el flagelo. En tripomastigotes se localizan preferentemente en la región anterior del parásito (de Souza y col., 2000). El número de acidocalcisomas varía de especie a especie, incluso se encuentran variaciones entre los diferentes estadios de una misma especie. Las formas amastigotes son las que poseen el mayor número de acidocalcisomas, comparado con epimastigotes y tripomastigotes (Miranda y col., 2000). El escaso contenido en azufre sugiere que existiría bajo contenido proteico en los acidocalcisomas (Scott y col., 1997; Miranda y col., 2000). Estudios realizados por Urbina y col., 1999, muestran que el fósforo está presente en forma de pirofosfato (PPi) y polifosfatos de cadena corta.

Mediante el uso de la inmunquímica diferentes autores pudieron demostrar la presencia de enzimas en la membrana de los acidocalcisomas de los tripanosomátidos: a) una H^+ -ATPasa vacuolar (Benchimol y col., 1998; Moreno y col., 1998), b) una Ca^{2+} ATPasa vacuolar, que fue clonada, secuenciada y expresada. Los anticuerpos generados contra la proteína marcaron la membrana del acidocalcisoma así como la membrana plasmática de *T. cruzi* (Lu y col., 1998), (c) una H^+ -PPasa vacuolar identificada y localizada en la membrana de los acidocalcisomas y en la membrana plasmática de tripanosomátidos y apicomplexos, usando anticuerpos que reconocen la enzima encontrada en plantas (Scott y col., 1998, Luo y col., 1999, Rodrigues y col., 1999 y 2000) (d) intercambiadores Na^+/H^+ y Ca^{2+}/nH^+ en la membrana de los acidocalcisomas (Vercesi y col., 1996, Vercesi y col., 1997). La regulación de Ca^{2+} en protozoos difiere en varios aspectos de los procesos que ocurren en otras células eucariotas, suministrando grandes oportunidades para blancos de nuevas terapias (Moreno y Docampo, 2003). Así, el descubrimiento de nuevas enzimas en los acidocalcisomas, que están ausentes en las células mamíferas, conducen al hallazgo de compuestos (bisfosfonatos) que propusieron curas radicales, en animales modelos, de enfermedades causadas por varios parásitos (Docampo y Moreno, 2008).

En base a lo expuesto es posible que los acidocalcisomas estén involucrados en varios procesos biológicos: a) La primera posibilidad es que participen en la

acumulación de Ca^{2+} para ser utilizado en ciertos momentos del ciclo de vida. Así, los amastigotes se alojan en el citoplasma de la célula hospedadora donde la concentración de Ca^{2+} está en el rango de $0.1 \mu\text{M}$, en contraste con los tripomastigotes que se albergan en un medioambiente de 1 mM de Ca^{2+} aproximadamente. Como a éste segundo mensajero se lo involucra en varios procesos de señalización, los amastigotes debieron desarrollar una forma especial de acumular Ca^{2+} debido a que el mismo no está disponible en el medioambiente en el que se desarrollan los parásitos. De este modo se explicaría el gran número de acidocalcisomas presente en amastigotes (Lu y col., 1998). b) Una segunda función podría ser que los acidocalcisomas actúen como reservorios energéticos, ya que contienen grandes cantidades de pirofosfato inorgánico (Urbina y col., 1999). Estudios bioquímicos sobre esta área darían información sobre la bioenergética de los protozoos, abriendo perspectivas para el desarrollo de nuevas drogas antiparasitarias. c) La presencia de una H^+ -ATPasa en la membrana, indicaría una participación en la regulación del pH citoplasmático (de Souza y col., 2000). d) Por último los acidocalcisomas poseen un importante papel en osmorregulación, ya que estos compartimentos almacenan compuestos de fósforos (Pi , PPi and polyp) y cationes (calcio, magnesio, sodio, potasio, cinc e hierro) que les permite reducir el efecto osmótico en el citosol (Docampo y col.; 2013).

1.2.1 Ciclo de vida del *Trypanosma cruzi*

En su ciclo de vida, *T. cruzi* alterna entre dos huéspedes: un hospedador definitivo (vertebrado), tales como humanos, mamíferos silvestres y domésticos; y un huésped intermediario (invertebrado), que es un insecto vector hematófago de la subfamilia *Triatominae*, donde el más frecuente en la Argentina es el *Triatoma infestans*, comúnmente llamado “vinchuca”. La vía de transmisión más común es a través de estos insectos. Sin embargo, existen otras formas de propagación; a través de la vía transplacentaria, por hemotransfusión, por leche materna, por contaminación accidental en el laboratorio o por manejo de animales contaminados (**Fig. 5**).

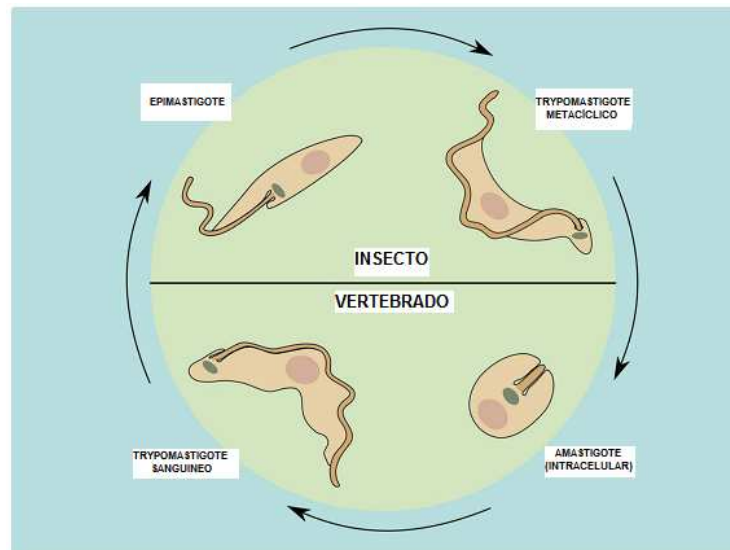


Fig.5. Ciclo de vida del Agente Etiológico *Trypanosoma cruzi*. Los tripomastigotes en la célula huésped escapan a la vacuola parasitófora y son liberados en el citoplasma transformándose en amastigotes para comenzar la replicación. Cuando la célula se llena de amastigotes, ellos se transforman en tripomastigotes e infectan nuevas células invadiendo tejidos adyacentes, extendiéndose a diferentes sitios por vía linfática y sanguínea, principalmente en las células musculares (cardíacas, pulmonares y esqueléticas) y ganglionares donde sufren nuevos ciclos de multiplicación intracelular (Rassi Jr y col., 2010).

El ciclo de biológico de *T. cruzi* comienza cuando un vector ingiere sangre contaminada con tripomastigotes sanguíneos. Luego de algunas horas, en el estómago del insecto ocurre la primera transformación del parásito desde su forma tripomastigote a epimastigote. La segunda transformación se produce a los 15-30 días en el recto del triatomino y es la diferenciación de epimastigote a tripomastigote metacíclico, proceso conocido como metaciclogénesis.

El estado nutricional del vector afecta a la metaciclogénesis. Los triatominos pueden sobrevivir varios meses sin alimento antes de morir, sin embargo la falta de nutrientes no sólo afecta la densidad parasitaria en el vector sino también actúa sobre los diferentes estados del desarrollo de *T. cruzi* reduciendo el número y la proporción de tripomastigotes y epimastigotes. Sin embargo, los esferomastigotes y las formas de gota incrementan, indicando que éstas se desarrollan frente a situaciones de estrés (Kollien y Schaub, 2000).

Como la metaciclogénesis es un evento crítico en el ciclo de vida del parásito, la misma ha sido objeto de muchas investigaciones utilizando cultivos *in vitro*. Hay que destacar que en todas ellas se ha considerado sólo una ruta, el origen de

tripomastigotes a partir de epimastigotes. Otra es de esferomastigotes a tripomastigotes, lo cual ocurre regularmente en el vector (Kollien y Schaub, 2000).

Los factores que desencadenan la diferenciación en el parásito aún no se conocen con exactitud. La ingestión de sangre por el insecto produce cambios, especialmente en el recto. Durante la alimentación se liberan hormonas diuréticas que inducen el paso de iones y agua desde los túbulos de Malpighi hacia el recto. Consecuentemente, el pH levemente ácido del contenido rectal se alcaliniza por influencia de la orina. También se incrementa la osmolaridad entre 600 y 1000 mOsm y se modifica el contenido de iones del recto donde predominan iones tales como sulfatos y fosfatos; la orina es principalmente una solución de NaCl amortiguada con carbonatos. Estos cambios modifican la proporción de las diferentes formas de los parásitos; pocas horas después de la alimentación se observa un incremento en la proporción de formas delgadas, intermedias entre epimastigotes y tripomastigotes, indicando la inducción de la metaciclogénesis por la orina (Schaub y Löscher, 1988; Kollien y Schaub, 1998). Una vez que este proceso se ha llevado a cabo, los tripomastigotes metacíclicos son eliminados con las heces. La transmisión ocurre cuando la materia fecal contaminada toma contacto en forma inadvertida con la mucosa de los ojos, nariz o boca del hospedador mamífero, a través de las cuales el parásito puede ingresar fácilmente y llegar al torrente sanguíneo (Diotaiuti y col., 1995). Una vez allí, los tripomastigotes son capaces de invadir una variedad de tipos celulares para transformarse a formas amastigotes replicativas los cuales residen en lisosomas/fagosomas. Luego de múltiples ciclos de replicación por fisión binaria, el amastigote aflagelado se diferencia a tripomastigote flagelado el cual emerge de la célula hospedadora y circula por el torrente sanguíneo. Posteriormente, los tripomastigotes pueden invadir a otras células y de esta manera se disemina la infección a través de todo el cuerpo. Alternativamente, los tripomastigotes circulantes pueden ser ingeridos por un insecto vector y de esta manera comenzar un nuevo ciclo (Rassi Jr y col. 2010).

1.3 Transducción de señales

Los factores que desencadenan la diferenciación en *T. cruzi* aún no se conocen con exactitud. Muchos factores se han descritos como relevantes para el desarrollo de este proceso: el pH (Jiménez-Ortiz y col., 1987), diferentes condiciones de los medios

de cultivo (Osuna-Carrillo y col., 1979), edad del cultivo (Osuna y col., 1990), efecto de la orina del insecto vector (Schaub y Löscher, 1988), extractos de intestino de vinchuca (Isola y col., 1986), péptido 1-40 (Fraidenaich y col., 1993). A pesar de la acción inherente a cada uno de ellos, en nuestro laboratorio se demostró que todos estos factores presentan una característica en común, producen un cambio en la osmolaridad (Santander, 2004). Este hecho se asemeja a la situación que enfrentan los epimastigotes que deben diferenciarse a tripomastigotes metacíclicos en el recto del insecto.

La capacidad de sobrevivir a medios externos tan variados está dada por la diversidad en las vías de transducción de señales en el parásito. Existen evidencias para la presencia de las subunidades α , α_i y β de las proteínas G (Eisenschlos y col., 1986; Coso y col., 1992). Las proteínas G estarían involucradas en la activación de las vías de transducción de señales descritas hasta el momento en el protozoario: AMPc e inositol fosfato. Ulloa y col., (1988) informaron actividades adenilato ciclasa y fosfodiesterasa en epimastigotes, componentes claves de la vía del AMPc. En tripanosomátidos, el AMPc está involucrado en el control del crecimiento y diferenciación como en los procesos de osmoregulación (Ouaissi y col., 1992; Fraidenaich y col., 1993; Flawiá y col., 1997; Rohloff y col., 2004). Además, se informó un papel para el AMPc en los procesos de diferenciación de *T. cruzi* incluyendo activación de la adenilato ciclasa y la proteína quinasa A (PKA) como regulador de los estados de diferenciación (Ulloa y col., 1988; Fraidenaich y col., 1993).

En nuestro laboratorio se informó la presencia del ciclo del inositol fosfato, puesto de manifiesto a través de la determinación de las actividades fosfoinosítido quinasas (Racagni y Machado de Domenech, 1991; Racagni y col., 1992). El agregado de agonistas de tipo colinérgico, carbacol, a una suspensión de epimastigotes indujo variaciones en el número de recambio de fosfatidilinositol fosfato (PIP), fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) y ácido fosfatídico (PA) (Machado de Domenech y col., 1992). La fosfolipasa C (PLC), componente clave del ciclo, genera dos segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG) e inositol trisfosfato (IP₃). Docampo y Pignataro, (1991) informaron un incremento en la concentración de DAG luego de la activación con Ca²⁺ en epimastigotes permeabilizados con digitonina. Además, Garrido y col., (1996, a y b) demostraron por primera vez incrementos en los niveles de IP₃ en epimastigotes intactos luego de la estimulación con carbacol y péptido 1-40. De este modo, se confirmó la activación de una PLC específica para fosfoinosítidos (PI-PLC),

sugerida anteriormente. El gen de una *TcPI-PLC* fue clonado, secuenciado y expresado en *Escherichia coli*. La expresión de este gen varía según los estadios del parásito. Mientras que en epimastigotes y amastigotes se expresa en altos niveles, en tripomastigotes sólo es inducida durante la diferenciación hacia la forma intracelular, o sea amastigote (Furuya y col., 2000).

La vía del IP_3/Ca^{2+} es un sistema de señales versátiles que ha sido adaptado para controlar procesos tan diversos como fertilización, proliferación, contracción, metabolismo celular, secreción de fluidos y la información en células neuronales (Berridge, 2009). Es bien conocido, en eucariotas superiores, que el IP_3 producido por la activación de PLC difunde hacia el citosol y libera Ca^{2+} desde reservorios intracelulares. Generalmente, los incrementos de calcio citosólico pueden provenir tanto del espacio extracelular (canales específicos) y/o reservorios de calcio intracelular (Berridge, 1993 y 1996; Meldolesi y Pozzan, 1998). En el primer caso se efectúa a través de diferentes canales presentes en la membrana citoplasmática, algunos de los cuales son controlados por receptores (canales de Ca^{2+} operados por receptores), otros por el potencial a través de la membrana plasmática (canales de Ca^{2+} gatillados por voltaje) y por el contenido de Ca^{2+} intracelular en reservorios (canales de Ca^{2+} operados por reservorios), mientras que otros parecen ser canales no selectivos a este catión. En el segundo caso, la liberación del ión desde reservorios intracelulares en células de mamíferos se efectúa a través de canales específicos ubicados en la membrana del retículo endoplásmico (RE) y del sarcoplásmico (RS). Estos canales pertenecen a dos familias molecularmente distintas identificadas por su sensibilidad al segundo mensajero IP_3 ($RcIP_3$) o a la rianodina ($RcRyR$), un alcaloide de origen vegetal.

En epimastigotes de *T. cruzi*, diversas señales externas desencadenan la movilización de calcio intracelular; estímulos como: homogenato de intestino de vinchuca (Lammel y col., 1996), nicotina (Bollo y col., 2001), carbacol (Marchesini y col., 2002), péptido derivado de la α -globina de pollo (Santander y col., 2002) provocan una liberación de calcio sólo proveniente de reservorios intracelulares. El Ca^{2+} intracelular cumple un importante papel funcional en numerosos procesos celulares. En este sentido, Moreno y col., (1994) demostraron la importancia del ión en mecanismos de invasión por parte de los tripomastigotes a la célula hospedadora mamífera. Además, Lammel y col. (1996) informaron la participación del ión en el

proceso de diferenciación del parásito. De modo que, el entendimiento de los mecanismos que regulan los incrementos de Ca^{2+} citosólicos podrían ser útiles para el diseño de nuevas drogas con fines terapéuticos.

Las organelas que contienen calcio de rápido intercambio en *T. cruzi* son: el retículo endoplásmico (RE), con características similares a las de eucariontes superiores (Oz y col., 1992) y los acidocalcisomas (Docampo y col., 1995) involucrados en la homeostasis de diferentes elementos, tales como el Ca^{2+} y el H^+ . Estas vacuolas (Fig. 6, Moreno y Docampo, 2008) poseen sistemas de transporte constituidos por bombas e intercambiadores involucrados en la homeostasis de diferentes elementos, tales como el Ca^{2+} y el H^+ .

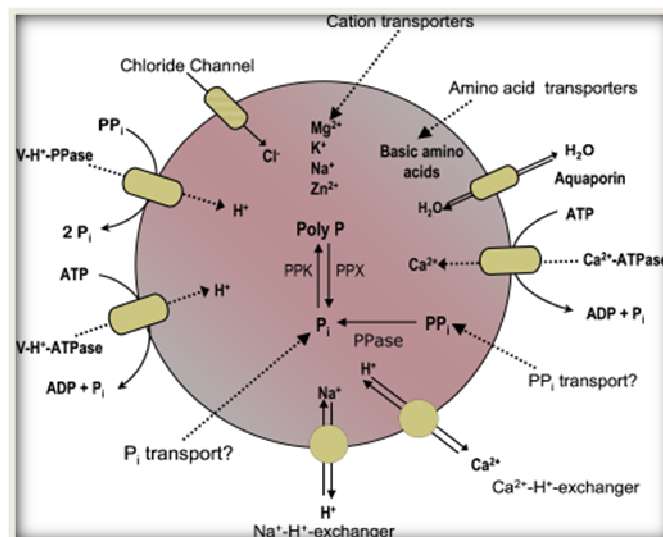


Fig. 6. Representación esquemática de un acidocalcisoma. Un gradiente de H^+ es establecido por una H^+ ATPasa vacuolar ($\text{V-H}^+\text{-ATPase}$) y por una H^+ pirofosfatasa vacuolar ($\text{V-H}^+\text{-PPase}$). El transporte de Ca^{2+} es conducido por una $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$. Otros transportes incluyen a los intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$, canales de Cl^- y una acuaporina. Además están presentes transportadores para aminoácidos básicos, fosfatos (P_i), pirofosfato (PP_i), y cationes. La lumen organelar es rico en PP_i y polifosfato (poli P) y enzimas involucradas en su metabolismo como poli P quinasa (PPK), exopolifosfatasa (PPX) y pirofosfatasa (PPase) (Moreno y col. 2008).

La entrada de Ca^{2+} a estas organelas ocurre por un intercambio con H^+ , llevado a cabo por una $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ vacuolar sensible al vanadato (Docampo y col., 1995; Scott y col., 2000). El gradiente de H^+ está establecido por una $\text{H}^+\text{-ATPase}$ vacuolar sensible a bafilomicina A1 (Docampo y col., 1995) y por una $\text{H}^+\text{-pirofosfatasa}$ vacuolar (PPase) sensible a aminometilen-fosfonato (AMDP) (Scott y col., 2000). El transporte de Cl^- a través de un canal de Cl^- , está asociado con la función de la $\text{H}^+\text{-ATPase}$

vacuolar. La liberación de Ca^{2+} es producida por intercambio con H^+ por intermedio del intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ (Docampo y col., 1995). Al igual que en *Trypanosoma brucei*, nuestro laboratorio demostró la actividad de un intercambiador Na^+/H^+ sensible a EIPA, en estas organelas, el cual favorecería la liberación de Ca^{2+} desde estos reservorios (Bollo y col., 2006). Además, los mismos autores demostraron que la alcalinización de los compartimentos ácidos del parásito inducido por monensina, ionóforo Na^+/H^+ y su efecto sobre la señal de calcio indican una relación entre el proceso de alcalinización de las vacuolas y la liberación de Ca^{2+} . Por otra parte, el efecto de monensina sobre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue independiente del calcio extracelular, hecho que descarta la entrada del ión desde el medio exterior y por lo tanto refuerza su liberación desde reservorios intracelulares.

Como se mencionó anteriormente, dos tipos de canales capaces de liberar Ca^{2+} desde retículo sarco-endoplásmico se identificaron en células eucariotas superiores: el receptor a IP_3 y el receptor a rianodina, los cuales son estructuralmente similares y están relacionados evolutivamente (Sorrentino y col., 2000). En organismos unicelulares, existe información que relaciona al IP_3 con la liberación de calcio intracelular en varios sistemas unicelulares. El tratamiento de vesículas de membrana de *Candida albicans* (Calvert y Sanders, 1995) o *Plasmodium chabaudi* (Passos y Garcia, 1998) con IP_3 resultó en la liberación de Ca^{2+} , efecto bloqueado por heparina, antagonista del receptor de IP_3 . Este segundo mensajero también indujo liberación de Ca^{2+} en microsomas de *Euglena gracilis* de una manera dosis dependiente (Masuda y col., 1997). En *Dyctyostelium discoideum*, Flaadt y col., (1993) encontraron que IP_3 libera Ca^{2+} desde reservorios no ácidos; mientras que Rooney y col., (1994) observaron que el metabolito es incapaz de movilizar al ión. En nuestro laboratorio se informó que la estimulación de epimastigotes de *T. cruzi* con carbacol resultó en incrementos en los niveles de IP_3 y en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Marchesini y col., 2002), más aun, Yoshida y col., (2000) mostraron que el tratamiento de los parásitos con drogas que bloquean al receptor de IP_3 , tales como heparina y caféina, afectan la liberación de calcio desde reservorios intracelulares. Sin embargo, el agregado de IP_3 exógeno a diferentes formas del parásito pre-tratadas con digitonina, no indujo aumento del calcio intracelular (Moreno y col., 1992). En conjunto, estos estudios muestran un papel potencial del IP_3 en los eventos de señalización que median la liberación de Ca^{2+} en organismos eucarióticos inferiores.

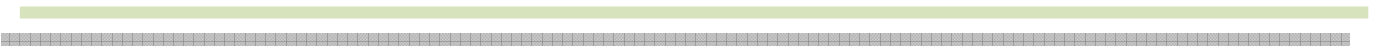
Resultados preliminares de nuestro laboratorio demuestran la presencia de una proteína de ~330 kDa, purificada con heparina-sefarosa e inmunodetectada con el anticuerpo (Ac.) anti-RcIP₃ tipo II de humanos, con características semejantes a la superfamilia de receptores a IP₃/RyR en formas epimastigotes de *T. cruzi*. Este hecho se correlacionó con la existencia de una región genómica en *T. cruzi* (Tc00.1047053509461.90), con alta homología a la de los receptores de IP₃ y RyR, capaz de codificar un polipéptido de tamaño semejante a la proteína hallada. Además, el análisis de la secuencia proteica deducida demostró la presencia de dominios conservados, RYDR_ITPR (posible sitio de unión a IP₃) y dominio Ion_Trans (canal iónico con selectividad al ion a transportar), compartidos tanto por los RcIP₃ y RcRyR. Si bien los receptores de IP₃ y RyR existen como dos entidades separadas en células de mamíferos, es probable que los tripanosomátidos posean canales de liberación de calcio intracelular con propiedades híbridas de ambos receptores, tal como ocurre en *Toxoplasma gondii* (Lovett y col., 2002).

De lo expuesto, se evidencia la importancia de la señal de Ca²⁺ en la progresión del ciclo de vida de *T. cruzi*. A pesar de los avances recientes respecto a diferentes componentes involucrados en este proceso de señalización, poco es lo que se conoce acerca del mecanismo por el cual el Ca²⁺ es liberado desde reservorios intracelulares en este tipo de organismo. Por lo tanto, la importancia de la vía de señalización de los inositoles fosfatos como uno de los sistemas de transducción más antiguo que utiliza el parásito para responder a diferentes estímulos, y la del Ca²⁺ como segundo mensajero multifuncional fundamentaron la siguiente propuesta: “*Estudiar el compromiso y la participación de las moléculas responsables de los incrementos de calcio citoplasmático provenientes de reservorios internos en formas epimastigote de T. cruzi*”.

Objetivos particulares

- 1) Conocer el compromiso del IP₃ y la rianodina en la liberación de Ca²⁺ desde reservorios intracelulares
- 2) Estudiar la funcionalidad del intercambiador Na⁺/H⁺ en relación con la señal de calcio y la regulación por activación de proteínas quinasas
- 3) Determinar la localización subcelular del intercambiador Na⁺/H⁺ en formas epimastigotes

MATERIALES Y MÉTODOS



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1- Organismos y condiciones de cultivo

Se utilizaron formas epimastigotes de *Trypanosma cruzi* cepa Tulahuen. Las células se cultivaron a 28°C en medio monofásico líquido de Warren (1960) modificado. El mismo contiene (por cada 1.000 ml. de solución) infusión cerebro corazón 33 gr., triptosa 3 gr., Na₂PO₄H₂O 4 gr., KCl 0,4 gr. y glucosa monohidratada 0,33 gr. El medio se esterilizó en autoclave (10 min. a 1 atm. de presión), luego se agregó hemina al 0,1% (esterilizada por filtración) y suero fetal bovino (SFB) al 10% (previamente esterilizado por filtración e inactivado durante 1 hora a 56 °C). El pH final osciló entre 7,2-7,4.

2.2- Cultivo de los parásitos

Como el cultivo de los epimastigotes requiere de varios repiques antes de obtener el definitivo, los parásitos se cultivaron respetando las siguientes etapas:

1) Tubos de conservación: Las células de origen, inóculo inicial de 0,5 ml de $4,0 \times 10^7$ células/ml provenientes de otro tubo de conservación se dejaron crecer en 25 ml de medio. Estas células se repicaron cada 15 días. Los parásitos se utilizaron como fuente de inóculo para otro cultivo concentrado denominado semilla, después de los 7 días de crecimiento aproximadamente.

2) Semilla: Se obtuvo por repique de 7 ml de inóculo de un tubo de conservación ($4,0 \times 10^7$ células/ml) en 25 ml de medio de cultivo durante 6 o 7 días.

3) Cultivo: Para 50 ml de medio se utilizó un inóculo de 1 ml obtenido de una semilla de 5-9 días ($8-10 \times 10^7$ células/ml). El rendimiento de los cultivos cosechados el día 6 fue aproximadamente de 250 mg de células ($6-9 \times 10^7$ células/ml).

2.3- Cosecha de los parásitos

Los epimastigotes crecidos hasta la mitad de la fase exponencial (5-6 días de crecimiento) se cosecharon y se lavaron dos veces con solución amortiguadora Tris-HCl 25 mM pH 7.2 conteniendo MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.6 mM, KCl 4.8 mM, NaCl 120 mM y glucosa 100 mM (KRT), mediante centrifugaciones a 4500 *xg* durante 10 minutos. a 4°C.

2.4- Recuento de parásitos

Para determinar el número de células presentes en el cultivo se utilizó un microscopio óptico de epifluorescencia Axiolab (Zeiss®). La concentración celular de los parásitos se determinó mediante el recuento de los mismos en la cámara de Neubauer a partir de una dilución 1:100 de la alícuota original.

2.5- Obtención de membranas

Los parásitos fueron resuspendidos en buffer de homogenización (Hepes 50 mM pH 7,4, sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM y KCl 5 mM) con inhibidores de proteasas: Leupetina y Aprotinina (1µg/ml), PMSF (1mM). La ruptura de los parásitos se llevó a cabo mediante tres ciclos de congelamiento y descongelamiento con N₂ líquido. Luego se homogeneizó con homogenizador con pistón de teflón y el homogenato total posterior a la ruptura de los parásitos se centrifugó a 100 *xg* durante 15 minutos. El precipitado fue lavado una vez con buffer de homogenización y se obtuvo un precipitado enriquecido en células rotas. Los sobrenadantes se centrifugaron a 1000 *xg* 15 minutos y en el precipitado se obtuvo la muestra enriquecida en membrana flagelar. El sobrenadante se centrifugó a 27.000 *xg* durante 15 minutos. (Fracción enriquecida en mitocondrias y otras organelas). Posteriormente, se obtuvo la fracción microsomal por centrifugación a 105.000 *xg* durante 45 minutos. El sobrenadante final constituye la fracción soluble o citosólica. Todas las centrifugaciones se realizaron a 4 °C. Los precipitados fueron resuspendidos en Hepes 50mM. A las fracciones microsomales obtenidas se les determinó el contenido proteico para su posterior utilización.

2.5.1- Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se efectuó de acuerdo al método de Bradford (1976). Para ello se realizó una dilución 1/50 de la fracción de membranas obtenidas. Luego se tomó una alícuota de 5 µl, se adicionó 50 µl de NaOH 1M y se completó el volumen a 100 µl con agua bidestilada. Posteriormente, se agregó 1 ml de reactivo de Bradford y la reacción se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Genesis™ (Spectronic® Milton Roy Company). Como testigo se utilizó albúmina sérica bovina con las siguientes concentraciones: 1 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml y 10 mg/ml.

2.6- Determinación de la incorporación y liberación de Ca²⁺ desde fracciones microsomales

Las determinaciones del Ca²⁺ libre en el medio de incubación fueron determinadas por el empleo del indicador fluorescente Fura-2 ácido en un espectrofluorómetro Fluoromax-Spex 3 (Horiba Jovin Yvon™). En una primera etapa se procedió a la desesterificación química del Fura-2/AM. Brevemente, se resuspendieron 50 µgr de Fura-2/AM en 50 µl de DMSO y se agregaron 50 µl de Metanol y 25 µl de KOH 2 M/H₂O. Luego se incubó la mezcla de reacción durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad y posteriormente se ajustó a pH 7 con HCl 1 M. La concertación final del Fura-2 desesterificado (Fura-2/Ac) obtenida fue de 294 µM.

Para las determinaciones de la incorporación y liberación de Ca²⁺ se empleó una fracción de membranas (105.000 xg) obtenida en el Ítem 5. Para ello, las fracciones (124 µgr/ml de proteínas) se resuspendieron en solución amortiguadora C: Tris-HCl 4 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM, sacarosa 250 mM, pH 7,2 (Buffer C) y se cargaron en cubetas termostáticamente controladas a 28 °C. Posteriormente se agregó: azida sódica 3 mM (para prevenir la toma de Ca²⁺ mitocondrial), CaCl₂ 5 µM y 5 µM de Fura-2/Ac. Posterior a la incubación durante 10 minutos, la toma de Ca²⁺ dependiente de ATP fue inducida por el agregado de ATP-Tris 2 mM y monitoreada por la disminución en la fluorescencia del Fura-2/Ac (λ_{ex} = 340 y 380 nm, λ_{em} = 500 nm). Luego de que el proceso de incorporación de Ca²⁺ a los microsomas alcanzó el equilibrio, indicado por la ausencia de cambios en la fluorescencia, se procedió al tratamiento con los diferentes efectores indicados en cada caso para estimular la liberación de Ca²⁺ desde las vesículas. Los resultados son expresados como cambios de fluorescencia de la relación 340/380 del Fura-2/Ac.

2.7- Microscopia de epifluorescencia y confocal

Los parásitos a la mitad del a fase exponencial de crecimiento se cosecharon y lavaron dos veces en amortiguador KRT. Posteriormente, 10 µl de muestra equivalente a ~ 4x10⁶ cel/ml se depositaron en portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Luego, se fijaron los preparados con metanol a -20 °C durante 6 minutos. Las muestras se lavaron con PBS y se incubaron con PBS-albúmina durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con las siguientes combinaciones de anticuerpos primarios disueltos en PBS 1% v/v durante 90 min: a)

anti-RcIP₃ Tipo II de humano (Santa Cruz sc-7278) y anti-TcBIP (Donado por el Dr. Roberto Docampo), b) anti-RcRyR (Santa Cruz sc-8170) y anti-TcBIP en relación 1:100 disuelto en PBS 1% v/v durante 90 minutos y c) anti-Na⁺/H⁺ y anti-VH⁺PPasa (Donado por el Dr. Roberto Docampo). Luego se lavaron tres veces con PBS durante 5 minutos y se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG de cabra marcado con el fluoróforo Isocianato de fluoresceína (FITC) y con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con Rodamina en relación 1:200 disuelto en PBS 1% v/v durante 60 minutos en oscuridad. Por último, se lavó tres veces con PBS y tres veces con agua durante 5 y 1 minutos., respectivamente. Posteriormente, se agregó FluorSave antes de observar al microscopio para mantener la fluorescencia en el preparado. Las células se observaron en un microscopio de epifluorescencia Axiolab (Zeiss®) y/o por microscopía confocal (Nikon Eclipse C1si espectral, Excitación con la línea 488 del láser Argón para FITC y el láser He-Ne (543) para Rodamina. Se observaron a través de filtros BP 515/30 y LP 650 respectivamente). La superposición de las imágenes se realizó con el software Image J.

2.8- Purificación por heparina-sefarosa del posible receptor a IP₃/RyR

La fracción microsomal, la fracción enriquecida en mitocondrias y las membranas de cerebro de rata (control positivo, RcIP₃) se sometieron a la purificación del posible receptor de IP₃. 200 mgr de sefarosa activada con bromuro de cianógeno (Sigma) se lavó 5 veces con NaHCO₃ 0,1 M y se resuspendió en la misma solución (Vf 1 ml). Posteriormente, se tomó 0,2 ml de la resina y se agregó una solución de glicina 0,05 M (Gly). El resto de la resina se incubó con heparina-Na (1500 UI) durante toda la noche en agitación suave a 4 °C. Luego, la resina se lavó 5 veces con solución Gly y una vez con solución amortiguadora Tris-Salino (TBS). A continuación, se procedió a la incubación de la resina (1 mgr proteína/40 mgr resina) durante 5 horas a temperatura ambiente con: a) membranas de cerebro de rata, b) fracción microsomal y c) fracción enriquecida en mitocondrias en NaHCO₃ (0,1 M) y resina no preincubada con heparina-Na y tratada con solución Gly. Por último, las resinas fueron recuperadas por centrifugación a 10.000 rpm durante 2 minutos y sometidas a electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida.

2.9- Ensayo de reactividad cruzada y Western blot

Los ensayos de reactividad cruzada entre el receptor de IP₃ purificado a partir de la fracción microsomal de formas epimastigotes (Bonansea, Tesis Doctoral 2007) se

llevó a cabo por la técnica de western blot. Para ello, se realizó una corrida electroforética desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 7,5 % de las proteínas purificadas con heparina-sefarosa (RcIP₃). Previo a la siembra en el gel, las muestras se calentaron a 100 °C durante 5 min en presencia de 15% de 2-mercaptoetanol. A continuación, se sembró el gel y se procedió a la corrida electroforética a 100 V constante (MiniProtean II, BioRad®). Se utilizó el marcador de PM de amplio rango "RPN 800", 10.000-250.000 dalton, (Amersham® Biosciences). Posteriormente, se visualizó la banda proteica por tinción con Coomassie Brilliant Blue R250 al 1,5% P/V en H₂O: metanol: ac. acético (50:40:10) y posterior decoloración con H₂O: metanol: ac. acético (50:40:10). Luego, se transfirió a membrana de nitrocelulosa a 350 mA constante durante 75 min en el equipo de transferencia MiniProtean II (BioRad®). Posteriormente, las membranas se bloquearon con 5% de agente de bloqueo en solución amortiguadora Tris-salino con 0,1% v/v Tritón X-100 (TBS-T) y luego se incubaron con el anticuerpo anti-RcRyR Tipo I de humano (Santa Cruz, sc-8170) dilución 1:500 en TBS-T durante 2 hs a temperatura ambiente. A continuación se lavó 3 veces con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS y se revelaron por quimioluminiscencia (ECL Western blotting detection reagents and análisis system, RPN2106, Amersham® Biosciences) según las instrucciones del fabricante con exposición en film Kodak durante 5 a 30 min.

2.10. Medidas de alcalinización en vesículas acídicas

La alcalinización en vesículas acídicas de epimastigotes intactos se llevaron a cabo por mediciones en la fluorescencia del colorante Naranja de Acridina (AO) según Palmgren 1991). Los parásitos en la mitad de la fase logarítmica de crecimiento se cosecharon y lavaron dos veces con solución amortiguadora KRT-glucosa (glucosa 1,8 %, p/v) por centrifugación a 4.500 *xg* durante 10 minutos en centrífuga refrigerada Beckman Allegra. Luego fueron resuspendidos en solución amortiguadora KRT-glucosa, pH 7,2 a una concentración de 2×10^8 células/ml. Posteriormente se realizaron las determinaciones espectrofluorométricas según se detalla en el siguiente ítem.

2.10.1. Determinaciones espectrofluorométricas

Para las mediciones espectrofluorométricas 5×10^7 células/ml en un volumen final de 1,5 ml fueron cargadas en cubetas termostalizadas controladas a 28 °C.

Posteriormente se incubaron con 10 μM de AO durante 15 minutos previos al agregado de los diferentes efectores. Los experimentos se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro Fluoromax-Spex 3 (Horiba Jovin Yvon™) a longitudes de onda de excitación y de emisión de 493 y 530 nm, respectivamente. Los gráficos obtenidos fueron analizados utilizando el software Microcal™ Origin™ versión 7.5 y CorelDRAW X4 respectivamente.

2.11. Medida de los niveles de calcio intracelular

La concentración de Ca^{2+} intracelular libre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se determinó usando el indicador fluorescente para Ca^{2+} , Fura-2/AM. Se realizó básicamente según el método de Philosoph y Zilberstein, (1989).

2.11.1. Cargado del fluoróforo Fura-2/AM

Los parásitos en la mitad de la fase logarítmica de crecimiento se cosecharon y lavaron dos veces con solución amortiguadora KRT. Luego se resuspendieron a una concentración final de 1×10^9 cél/ml en solución amortiguadora KRT/Glucosa/sulfinpirazona (KRT/G/S), glucosa 1,8%, p/v; sulfinpirazona 200 μM , pH 7,35. La sulfinpirazona inhibe del sistema de transporte de membrana de ácidos orgánicos que evita la excreción del Fura 2 hacia el medio externo sin producir efectos secundarios en la viabilidad celular, homeostasis y señal de calcio y despolarización de membrana. Las suspensiones celulares se cargaron con Fura-2 acetoximetilester (Fura-2/AM) a una concentración final de 4 μM y se incubaron 20 minutos a 28 °C en un baño de agua con agitación y en oscuridad. Luego las células se diluyeron con KRT/G/S a una concentración final de 2×10^8 cél/ml y se dejaron incubando durante 40 minutos más, para lograr la correcta desestirificación del colorante mediante esterasas presentes en los parásitos. La concentración de dimetil sulfoxido (DMSO), utilizado para resuspender el Fura-2/AM, fue de 0,4% en el medio de incubación. Posteriormente las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora KRT/G/S fría y se realizaron las mediciones correspondientes.

2.11.2. Medida de fluorescencia del indicador Fura-2

Para las determinaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se cargaron 5×10^7 células/ml en cubetas termostáticamente controladas a 28 °C, a las cuales se le agregaron los correspondientes efectores. Los experimentos se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro Fluoromax-Spex 3 (Horiba Jovin Yvon™). La fluorescencia se

registró a una longitud de onda de excitación y de emisión de 340/380 nm y 500 nm, respectivamente. La autofluorescencia celular se registró en paralelo con células sin el fluoróforo. Los gráficos obtenidos fueron analizados utilizando los software Microcal™ Origin™ versión 7.5 y CorelDRAW X4 respectivamente.

2.12- Medidas de acidificación en el citoplasma

La acidificación citoplasmática de epimastigotes intactos fue determinada por cambios en la fluorescencia del BCECF, indicador de pH. Los parásitos en la mitad de la fase logarítmica de crecimiento se cosecharon y lavaron dos veces con solución amortiguadora KRT-glucosa (glucosa 1,8 %, p/v) por centrifugación a 4500 *xg* durante 10 minutos en centrífuga refrigerada Beckman Allegra. Luego fueron resuspendidos en solución amortiguadora KRT-glucosa-sulfinpirazona (glucosa 1,8 % p/v-sulfinpirazona 200 μ M) pH 7,2 a una concentración de 1×10^9 células/ml. Posteriormente el cultivo se dividió en dos y se lo colocó en baño de agua a 28 °C para estabilizar las células durante 20 minutos. Después a uno de los tubos se le agregó 9 μ M de BCECF y se lo incubó en oscuridad a 28 °C durante 20 minutos. Luego se diluyeron las células con amortiguador KRT-glucosa-sulfinpirazona a una concentración de 2×10^8 células/ml y se incubaron 40 minutos más a 28 °C. A continuación se lavaron dos veces con solución amortiguadora KRT-glucosa-sulfinpirazona y se resuspendieron en la misma solución a una concentración de 2×10^8 células/ml. Para las mediciones espectrofluorométricas 5×10^7 células/ml en un volumen final de 1,5 ml fueron cargadas en cubetas termostalizadas controladas a 28 °C y se les agregaron los diferentes efectores. Los experimentos se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro Fluoromax 3 a longitudes de onda de excitación de 500 nm y 440 nm y longitud de onda de emisión de 530 nm.

Los gráficos obtenidos fueron analizados utilizando el software Microcal™ Origin™ versión 7.5.

2.13- Determinación de formas intermedias entre epimastigotes y tripomastigotes

Los epimastigotes crecidos en medio de Warren Modificado a 28 °C, durante 13 días, en presencia y/o ausencia de estrés hipeosmótico (manitol 0,5M) se cosecharon y resuspendieron en solución amortiguadora KRT estéril (5×10^7 cel/ml). En periodos

de 24 horas se tomaron alícuotas de cada condición y se procedió al recuento de los mismos (Item 2.4).

En otra serie de experimentos, los epimastigotes crecidos en medio de Warren Modificado a 28 °C, en mitad de la fase logarítmica, se cosecharon y resuspendieron en solución amortiguadora KRT estéril (5×10^7 cel/ml) y las células se estabilizaron en un baño termostático a 28 °C. Posteriormente se trataron con los diferentes efectores, bajo condiciones de esterilidad, según se indica en cada caso. Luego de la incubación durante 2 horas en baño termostático a 28 °C, se transfirieron a eppendorf de 2 ml y se centrifugaron a 1000 *xg* durante 10 minutos en centrifuga Eppendorf® 5403 (rotor 16 F24-11). El pellet se transfirió a medio de Grace's Modificado (Sigma®) y se incubó a 28°C. En periodos de 24 horas se tomaron alícuotas de cada condición y se procedió al recuento de los mismos (Item 2.4).

En ambos casos, la metacicloogénesis se evaluó en cada condición según la forma del parásito y la posición relativa del cinetoplasto y el núcleo de la célula. Para ello, los parásitos se fijaron con metanol durante 6 minutos y se tiñeron con Giemsa dilución 1/20 durante 15 minutos. Finalmente el exceso de colorante se lavó con agua destilada. Se realizó el recuento de 100 organismos por cada muestra en microscopio de epifluorescencia Axiolab (Zeiss®). Los parásitos se clasificaron según la siguiente tipificación: epimastigotes (E), formas intermedias entre epimastigotes y tripomastigotes (FI) y tripomastigotes (T).

2.14. Aislamiento de los acidocalcisomas

Los epimastigotes (6×10^7) de la cepa Tulahuen de *T. cruzi* fueron crecidos como se describe previamente (2.1), colectadas por centrifugación, y lavadas dos veces en amortiguador KRT y una vez con buffer de homogeneización y con inhibidores de proteasas: Leupetina y Aprotinina (1µg/ml), PMSF (1mM). Luego se procedió a la obtención de membranas como se describe en el ítem 2.5, una vez obtenida la fracción enriquecida en mitocondrias y otras organelas, el pellet fue resuspendido en 1 ml de buffer de homogeneización y aplicado a un gradiente discontinuo de iodixanol, con fracciones de 1 ml de 24, 28, 34, 37 y 40% de iodixanol diluido en buffer de homogeneización. El gradiente fue centrifugado a 50,000 *g* en ultracentrifuga Beckman, rotor SW 41 Ti. La fracción de los acidocalcisomas fue recolectada en el fondo del tubo y fue resuspendida en buffer de homogeneización.

2.15. Análisis estadísticos

La significancia estadística de los resultados fueron analizados mediante el test de Student's usando el software Microcal™ Origin™ versión 7.5.

2.16. Drogas y reactivos

La mayoría de los reactivos utilizados en este trabajo se compraron a la firma Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina), el Fura 2-AM alicuotado en 50 µg a Molecular Probe (Eugene, Oregón, USA), el Suero Fetal Bovino estéril fue adquirido en NATOCOR (Carlos Paz, Pcia. de Córdoba, Argentina).

2.17. Preparación de soluciones

2.17.1. Digitonina: Se prepararon soluciones 2 mg/ml en alcohol etílico 95%. Se la utilizó a una relación de 5 µg/1 x 10⁻⁶ de células.

2.17.2. EGTA: (Etilen gliocol-bis (β-amino etil eter)-N,N,N',N' ácido tetraacético): se pesó la cantidad suficiente para obtener soluciones de 6 mM y 100 mM. La droga se resuspendió en KRT o en Base-Tris y se ajustó el pH a 8,4- 8,5 o a mayor que 9 de tal manera de obtener pHs de 7,4 o mayor que 8,3 respectivamente, cuando se mezclaron con las células resuspendidas en solución amortiguadora KRT. La primera de las mezclas se la utilizó para disminuir la concentración de Ca²⁺ extracelular de 2,6 mM a 100-200 nM y la segunda se la empleó durante la calibración para secuestrar todo el Ca²⁺ y lograr la intensidad de fluorescencia a 340 nm mínima. Un pH mayor que 8,3 fue necesario ya que en rangos alcalinos la afinidad del EGTA por el Ca²⁺ aumenta.

2.17.3. Hemina: Se pesó la cantidad necesaria de hemina bovina (Sigma) para preparar una solución 0,1% en NaOH 0,2 M. Se disolvió por agitación durante una noche y posteriormente se esterilizó por filtración (filtros millipore de 0,45 µM). Se fraccionó en tubos estériles y se conservó a 4°C.

2.17.4. Medio de Grace's: Se disolvió 22,25 gr de Medio de Grace's (Sigma®) en 500 ml de agua bidestilada y se agregó 0.35 g de NaHCO₃. Se llevó a volumen final. Para esterilizar el medio se utilizó un filtro de 0.22 micrones, el medio se conservó en la heladera. Luego se llevó a pH 6.7 con NaHCO₃ estéril.

2.17.5. Grace's modificado: Al medio de Grace's (Item 2.17.4) se le agregó: Suero Fetal Bovino 7%, Ultra filtrado de huevo 10% y Albúmina 1%, bajo condiciones de esterilidad.

2.17.6. Reactivo de Bradford: Para 1000 ml de reactivo se pesaron 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G 250, se disolvieron en 50 ml de alcohol al 95% y se agregaron 100 ml. de PO_4H_3 85% (v/v). Se llevó a 1000 ml con agua bidestilada, se dejó reposar toda la noche y finalmente se filtró con papel de filtro. Todos los pasos fueron realizados en oscuridad. Una vez preparado el reactivo se conserva en frasco color caramelo protegido de la luz.

2.17.7. Resuspensión del Fura-2/AM: Fura 2-AM adquirido en alícuotas de 50 μg , se disolvió con DMSO anhídrido de alta calidad (Sigma), se conservó a -20°C y no se lo utilizó después de transcurrido el mes de preparado.

2.17.8. Solución sulfonítrica: se mezcló H_2SO_4 y HNO_3 concentrados en relación 3:2. Al H_2SO_4 mantenido en frío se le adicionó HNO_3 lentamente hasta la obtención del volumen final. La solución se conservó en envase de vidrio y se utilizó para el lavado del material de vidrio utilizado en las determinaciones fluororimétricas.

2.17.9. Soluciones amortiguadoras: Se pesaron las cantidades de drogas sólidas requeridas para las concentraciones detalladas anteriormente, se solubilizaron con agua bidestilada y se llevaron a pH 7,4. Se completaron los volúmenes requeridos y se conservaron a -20°C . Cuando las soluciones preparadas se utilizaron para la medición de calcio intracelular los frascos y todos los recipientes utilizados para su preparación fueron de vidrio y lavados con solución sulfonítrica. En los experimentos donde se requirió que los parásitos estén libre de Ca^{2+} extracelular, se logró mediante el agregado de 6 mM de EGTA (100-200 nM $[\text{Ca}^{2+}]_e$). En el caso de ausencia de Na^+ extracelular, se reemplazo al ión Na^+ por 120 mM de N-metilglucamina.

2.18. Efectores utilizados

2.18.1. 2-APB (2-Aminoetoxidifenil borato): Se preparo una solución de 1000 μM en solución amortiguadora C. La concentración final utilizada fue de 100 μM .

2.18.2. BAPTA: Se resuspendió 1 mg de la droga en un volumen adecuado de DMSO para obtener una solución 0,05 M, dicha solución se sonicó durante una hora antes de ser utilizada.

2.18.3. Cafeína: Se resuspendió una cantidad conocida en metanol (5% del volumen final) y en H₂O bidestilada para obtener una concentración de 100 mM. A partir de esta solución se llevaron a cabo las diluciones correspondientes.

2.18.4. EIPA (S-[N-etil-N-isopropil-amilorida]): se preparó una solución 2×10^{-2} M en 100% de DMSO. A partir de cual se hizo una dilución en amortiguador KRT de tal manera de obtener una concentración 1×10^{-2} M y a partir de la cual se realizó una dilución 1/100 (1×10^{-5} M). La concentración final en el medio de estimulación fue de 1×10^{-6} M y la de DMSO 0,005%. Las soluciones se mantuvieron protegidas de la luz.

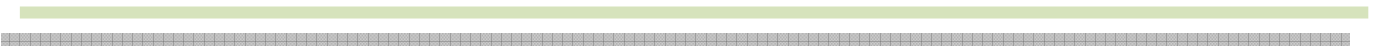
2.18.5. Manitol: Se pesó una masa adecuada de la droga patrón y se resuspendió en KRT.

2.18.6. NaCl: Se pesó una masa adecuada de la droga patrón y se resuspendió en KRT.

2.18.7. PMA (forbol 12-miristato 13-acetato): se tomó el volumen necesario desde una solución madre 0.46×10^{-3} M en DMSO al 100% y conservada a -20°C para realizar diluciones con solución amortiguadora KRT de 1×10^{-4} M y 1×10^{-5} M para los experimentos donde se miden inosítoles fosfatos y calcio intracelular, respectivamente. Las concentraciones finales fueron de 1×10^{-6} M de PMA y 0,5% de DMSO, para las dos clases de experimentos. La solución madre y las diluciones se mantuvieron protegidas de la luz.

2.18.8. Rianodina: Se realizó una solución 2 mM en KRT, a partir de la cual se llevaron a cabo las correspondientes diluciones empleadas en cada determinación.

RESULTADOS



3.1 Capítulo 1:

CANALES DE CALCIO PERTENECIENTES A LA SUPERFAMILIA DE RECEPTORES A IP₃/RyR

3.1.1 Introducción

Los RcIP₃ y RcRyR se ubican en membranas de organelas intracelulares y participan en la liberación del ión calcio. Ambos canales son sensibles al Ca²⁺ a través de un proceso conocido como liberación de Ca²⁺ inducida por el mismo ion. Ellos contribuyen a los rápidos aumentos de los niveles de Ca²⁺ en el citosol.

La activación de la vía de los fosfoinosítidos, en eucariotas superiores, eleva la concentración citoplasmática de IP₃, el cual libera calcio desde el Sistema Retículo Endoplásmico. Como el mecanismo por el cual el Ca²⁺ es liberado desde reservorios intracelulares en eucariotas inferiores es un tema controvertido y poco conocido, nos propusimos estudiar el efecto del IP₃ sobre la movilización de calcio intracelular en epimastigotes de *T. cruzi*.

3.1.2. Resultados

3.1.2.1 Efecto del IP₃ y la Rianodina sobre la movilización de calcio intracelular

Para demostrar la liberación de Ca²⁺ desde reservorios intracelulares mediada por IP₃, se utilizó una suspensión de la fracción de membranas (105.000 μ g) incubadas con CaCl₂ y ATP-Tris para cargar el lumen de las mismas con Ca²⁺ en presencia de azida sódica (NaN₃) para inhibir la acción de ATPasas mitocondriales. La Fig. 7 muestra que el agregado de IP₃ exógeno fue capaz de provocar la liberación de Ca²⁺ desde esta preparación. Además, se observó inhibición de la señal frente a 2-Aminoetil difenilborinato (2-APB) y heparina, ambos inhibidores de los receptores a IP₃. Como control se utilizaron parásitos resuspendidos en amortiguador pH 7,2 (Fig. 7). Los resultados sugieren la presencia de una molécula en las membranas de epimastigotes capaz de censar el IP₃ del medio y permitir la liberación de Ca²⁺.

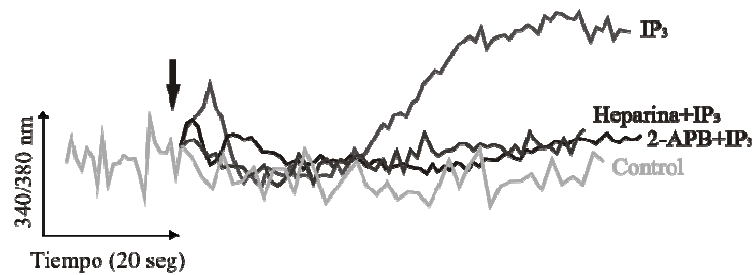


Fig. 7. Efecto del IP_3 sobre la señal de calcio en fracción de membranas de epimastigotes de *T. cruzi*. Las fracciones de membranas ($105.000 \times g$) se pre-incubaron en presencia de NaN_3 3mM, $CaCl_2$ 5 μ M y ATP-Tris 2 mM durante 10 minutos. Posteriormente se agregó Fura-2 (desesterificado químicamente) e inmediatamente los diferentes efectores: IP_3 -Na 20 μ M (IP_3); 2-APB 100 μ M+ IP_3 o Heparina 0.5 mg/ml + IP_3 . Los inhibidores fueron agregados 2 min aproximadamente antes del IP_3 . La flecha indica el agregado de los efectores. Los datos corresponden a un experimento representativo ($n=5$, cada uno llevado a cabo por duplicado).

Los receptores que liberan calcio en respuesta al tratamiento con rianodina (RcRyR) han sido informados en vertebrados e invertebrados, pero aún no en organismos unicelulares (Stuko y Airey., 1996). Para conocer si la fracción de membranas era también capaz de reconocer a la rianodina (RyR) y por lo tanto aumentar los niveles de calcio en el medio de incubación, se llevaron a cabo ensayos similares a los anteriores cambiando los efectores: cafeína 10 μ M como activador del RcRyR; Rojo de Rutenio y heparina como inhibidores. La Fig. 8A muestra que el agregado de RyR exógena fue capaz de provocar la liberación de Ca^{2+} como en el caso de IP_3 , ya que a niveles micromolares la rianodina estabiliza la forma abierta del receptor, permitiendo la liberación de Ca^{2+} desde el lumen del retículo sarcoplásmico; por el contrario, el canal permanece en una conformación cerrada a concentraciones mayores. Cuando las fracciones fueron pre-tratados con los inhibidores del receptor, en ambos casos, se observó una inhibición de la señal de calcio (Fig. 8A). Además, se determinó la capacidad de la cafeína, agonista farmacológico de RcRyR, para liberar Ca^{2+} al medio. En la Fig. 8B, se muestra que cafeína+RyR fueron capaces de incrementar más la señal de calcio que RyR y cafeína solas. Como control se utilizó amortiguador pH 7,2. Estos resultados sugieren que RyR y cafeína son capaces de liberar calcio desde reservorios intracelulares en epimastigotes de *T. cruzi* y la presencia de un posible receptor, RcRyR.

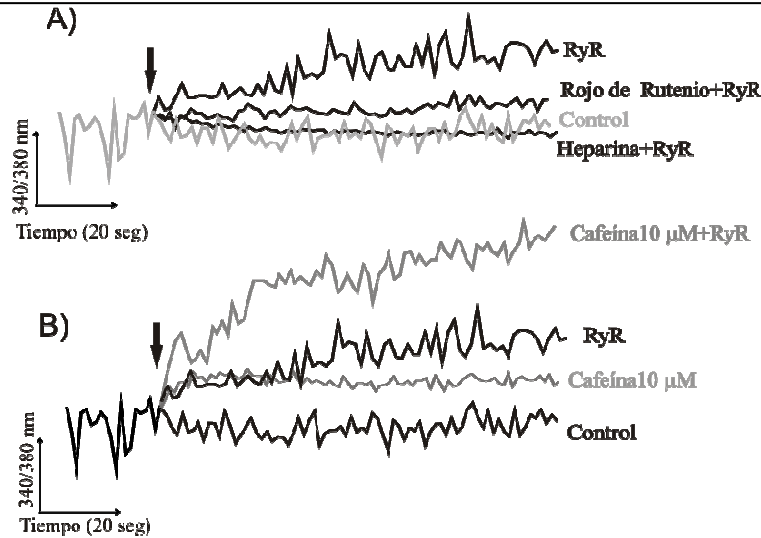


Fig. 8. Efecto de RyR sobre la señal de calcio en fracción de membranas de epimastigotes de *T. cruzi*. Las fracciones de membranas (105.000 μ g) se incubaron en presencia de NaN_3 3mM, $CaCl_2$ 5 μ M y ATP-Tris 2 mM durante 10 minutos. Posteriormente se agregó Fura-2 (desesterificado químicamente) e inmediatamente los diferentes efectores: **A)** Rianodina 1 μ M (RyR); Rojo de rutenio 50 μ M+RyR; Heparina 0.5 mg/ml + RyR. **B)** Cafeína 10 μ M; Cafeína 10 μ M+RyR. Los inhibidores y la cafeína fueron agregados 2 min aproximadamente antes de RyR. La flecha indica el agregado de los efectores. Los datos corresponden a un experimento representativo (n=5, cada uno llevado a cabo por duplicado).

En consecuencia se sugiere un receptor sensible a IP_3 y rianodina en microsomas de epimastigote de *Trypanosoma cruzi*, implicado en la movilización del calcio desde reservorios intracelulares.

3.1.2.2 Presencia de una región genómica en *T. cruzi* capaz de codificar una proteína con característica de los receptores a IP_3 /RyR

Para poder explicar si la superfamilia de receptores de IP_3 /RyR están presentes en *T. cruzi*, se llevó a cabo un estudio de las secuencias que codifiquen para esta proteína en el genoma del parásito a través de la base de datos "The Institute for Genomic Research" (<http://www.tigr.org>). En un primer lugar se obtuvieron las secuencias de las isoformas I, II y III del receptor de IP_3 y de las isoformas I, II y III del receptor de rianodina de humanos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Posteriormente, se realizó una comparación de las secuencias de las tres isoformas de ambos receptores enfrentadas con el genoma completo de *T. cruzi* mediante BLASTn (<http://www.tigr.org>). De esta manera, se identificó una región en el genoma del parásito de 9036 pb (Tc00.1047053509461.90, Nro. de Acceso XM_806684) con alta

homología con todas las isoformas estudiadas. La secuencia hallada codifica para una proteína de 3011 aminoácidos (Fig. 9, Nro. Acceso EAN89926).

MDRKQRIIKY	GSLVHFSCEE	GYIAASGLEA	EDLFIREKND	TDIDEEPLPL	LGSETSVMRI	EAPASSLAAK	AQEAVADRF5	NNNTLLMEHF	
SNINTAPELM	YGKPFLLLHS	VSQMCAVAFP	SKPSKSDPNC	VRLVLVKAGE	VESDFCFEVV	TPRYKIHDDG	DPVCRGDEVL	LRLAAFFIFV	180
HVTGRKHPL	NTWGMPSBED	GCDSSINAPE	KGLAAGRMVD	DLRSEVNGSE	ERAVGFVVQR	YDIGRDQANY	QRALYHIARP	YVPSGVPVLL	
YHRERESFLT	TSLSQPRQQ	KESEENKKT	EANVVSGGDN	GISGGALLTN	KESSFVEGVF	VRSATQLEG	SGISTLDTFP	ANDNTDGDVD	360
HTGTPPFLLM	KDETSFGCVS	NEGTALNDFW	RSTALWILE	NENPTIGGAV	RMRSVKYRLR	QACSNMYLAV	AGSGVDAFFE	NGESDFSET	
VDGMGAAALE	EGGDAGSNSS	RNQLRAASLC	MIPPPRTAKD	SQRTLFTLTP	MFFTECNFLI	ENDCLTLQNV	LTGMVCTQE	ARDRLFQWQ	540
PVSVDITVR	SSRQEIVQDV	MFLRSHCERL	CRYRDAFQAL	ARLKNRSHPS	FHRDGGGLEP	YPGKHESDS	CEENLTPTRA	AFVQGGALST	
DFAVSSLGRQ	TRTTEPYAA	ILPVIYASQS	SLEELIRFCS	LARVHDALRL	DGIPIVRRQR	MIFELNIHRL	VMDVILTPFS	LLQSEETDGM	720
GDKTMSGMLP	WGCSPRPLPL	PLMGGFFCMG	VALDDAHSEV	HLVCLAFRF	LQMVRRKAKM	LKKWLVEFIP	YFLELGGYRF	RVSDTMTLEF	
SENNSVPRV	VESVADHFIG	SLRRGRSAGH	LNLLSMCTV	GFSGIFERQA	MVCQKLLVEN	SELLSRFVLN	QNGEAVVVN	EGEAPVECGA	900
LFELTRPQNS	QQQLGSDAKY	ARFLQSEIQL	LGCLCFDGC	SMCCAEVGRV	FPPEVLLRAI	QTFVWTGAEV	MGSPSPDLL	RGHILRLAVQ	
CYIMPRIDDP	AVQLRASTVL	FGSSSLRLRE	ETHLPIGSKP	DDDLISSVKA	AALNIIRANP	HFVQSDMSRS	VLLRVINAW	LRLVKAHQIS	1080
VQEMCDLIPP	LLGLLDGTDK	IVDDNASRVA	AHTLTRLEVS	EASVQVMETR	EMICNTLLQL	LETVSNRVAD	NIIILLYDAF	VKGGSPFRRK	
MFVLLDFDEE	PVLDAKYDLH	VWPSEGOALL	CEKGTGLLHR	VRGKYQSVDI	TDEAQEMDSN	RIDSKEVVLE	LGRVCKSIML	RFRVKELVPL	1260
LMDLTRYESQ	QLTARATELL	IRLCVVKRTV	AHRVLQVHTL	PSSEVRSFSD	HLPTVAVNTL	TLERRGCFDE	AIAFALSNI	EPEGTHDDSV	
PSELEEEYLL	IEDDGSDDA	GGDDGGAGAD	QAGKEAHGGR	HLWGKTAGAV	RVLAYHNAVR	RRRRSVGLSE	NSELPLRLIV	RMLVCHWGI	1440
HIPLMRMHAS	IDPNSRAFFQ	WMRFYLFYTF	VRGNARKLLG	SIDLFMRSLN	LKKECTVMCL	HIIVAFASV	ADPTPYLSNT	FLTECVKYL	
SEVSTRHADV	DFLSRLSNYV	FSNPAVGGVP	RRRMMQLLRD	YNILRCLPRP	GGVQVSPVRC	DFIASMVELL	CHICNCPTSA	LAMGQRALPM	1620
QDIFAILLEY	GSLYSPLHRK	SYHQRDELER	KQFQLVGTYL	RALVLLYITA	EREEGGQKKE	MIKLEWMANR	EWVAVVEMLT	RQLHGITELI	
LTKNGKVVNR	GIRVIQRVYH	VWMLSLPVAL	LTFFSACFSE	AGFYRQDSV	GVTFAVMCSS	LMEFSSNLIS	NSDALELSVQ	EAVNYRLLG	1800
LLHMQTANIV	GLETLSQLE	IVRDQILHWL	LQERERLSKAE	RQGGGGWEE	RARSSDFDEY	SSPHDTLAI	EGVSQRIQDS	LGDSFSARLF	
LSSGVSRCRE	LEATRSALRT	FVKS DVLIPI	EDSLEIGEAA	NVNALLCRS	SALSGVRGFV	WSALDGMRRR	YFSPMALVGL	LNLFYNALYA	1980
SFVVKESPPL	QAAGAGKNS	TEREDTWNLL	QLTFTDLGMS	NVVASLSVKD	DDVITYSSIR	LSVMLLEGN	TRAQYALKD	FGAHQVRFFH	
NIRELLQKSL	QWVRQINLQQ	QLVILECGGT	PVGSNSTLFT	SALFAAVLKS	SSYRKKSERN	GGKEKHILGW	DRVEGCMRLR	LLHALFRMLQ	2160
LFCEGHNLMG	QNYIRFQHDN	MHSVNI VHEV	LLLLAELSGM	THGATVDVIR	GGFELLTELC	QGFCHEHQTA	LLSYDVCVTM	CGLLDVLSKL	
EIIGTRTAPE	NNSRNMNTEM	GITNTTNTNG	TRLTESFMNG	VVSQRGLKLT	RKAVDCLRVS	LTFFLLSLIE	GCRSPETFR	VLAQIPIEII	2340
EHQLSIATPE	MCDRILEDTE	LEDDPTVAAL	FNWLIPLHIV	RPFADGLYLQ	HIDELLRRTT	RLRERLGRIE	IRRDGGLLEK	VFFCIPISICR	
GLSQNIKDDV	LWSVNRTSRA	TKLGDFLHQS	DNLIFEVERA	HDFQRVARW	TRFTLTITDT	AVEKENETDT	EGVMEEKKVR	FYSLLKWCNR	2520
FMAPPIFSSQ	LSYYEYASIL	IAVLINIGLI	SVEGAKWDWA	TVQVSELAIT	CLCVLQFVLS	CVTLCMDAVV	FFPACLYKEY	RRKEHMRIGI	
AKLNATMREV	FDGLTKGEVV	YHFLTRFTIQ	FRFLVVTAA	LSLLVSRFYA	AAHLLFVIYK	VPTLCTFINA	ITQNGKQLLL	TAPLGVVVLY	2700
LFAIVGYLLF	PRQFDSSDGP	ENGCNVNLF	CFLFILWQGL	RQGGVGDIM	QEESSWSSTL	FPRVSYDLVF	FALVNVVFLN	IMFGLIIDTF	
GELRDAKREK	ELDMKSTCFV	CGLEADEFER	AHVGGFRAHV	VHEHNMWYF	YFMHYLRKRD	PNDFTGQESY	VDERIRRGDL	GFFPEEDSLS	2880
LGNGGREEDA	AAGA QKDVSG	MDEEGCATRP	GREKAPAAGS	GAANGQEVAl	TLKELAGVKE	ALSAFVRDVS	ADAQKVKSL	QQLEIMSRGA	
HVMSLGGGTA	NDPGSTSGTR	LSRGEKSKS	LRRSIGEGSK	N					3011

Figura 9. Secuencia de aminoácidos de EAN89926 obtenida en el genoma de *T. cruzi* que codificaría para un posible canal de Ca^{2+} semejante a la superfamilia de receptor de IP_3 /RyR. A través de estudios bioinformáticos se identificó un locus (XM_806684) en el genoma de *T. cruzi*, el cual codifica para una proteína de 3011 aa (EAN89926).

Las principales características de las proteínas correspondientes al RcIP3 Tipo II, RcRyR Tipo I y la proteína hipotética hallada en el genoma de *T. cruzi* (EAN89926) están resumidas en la Tabla I.

3.1.2.2.1. Dominios conservados de la proteína EAN89926 de *T. cruzi*

Con el objeto de determinar si la proteína hipotética EAN89926 posee dominios conservados presentes en los receptores de IP_3 /RyR, se realizó una búsqueda en la base de datos SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>). El estudio de los sitios consenso de los receptores de IP_3 y rianodina demostró la presencia de diferentes dominios característicos de estos tipos de receptores.

Tabla I. Comparación de las principales características del receptor de IP₃ Tipo II, rianodina Tipo I y de la proteína homóloga hallada en el genoma de *T. cruzi*. Las diferentes secuencias proteicas fueron analizadas por el software de análisis de secuencia Protean 4.03 (DNA Star Inc.).

Características	Homo sapiens		<i>T. cruzi</i>
	RcIP ₃ Tipo II	RcRyR Tipo I	EAN 89926
PM aparente (kDa)	308	565	337
Longitud (aa)	2701	5038	3011
AA básicos (K,R)	308	522	319
AA ácidos (D,E)	349	729	368
AA hidrofóbicos (A,I,L,F,W,V)	932	1733	1110
AA polares (N,C,Q,S,T,Y)	723	1143	749
Pto Isoeléctrico	6.26	5.15	6.07

En la Fig. 10 se representa un esquema simplificado de los principalmente encontrados en ambos receptores. Entre estos dominios se puede destacar: a) MIR (4 copias, Nro. de acceso SMART SM00472), altamente conservados en los RcIP₃, RcRyR y en las proteínas o-manosiltransferasas; b) RIH (Pfam01365), también denominados RYDR_ITPR, se encuentran en RcIP₃ y RcRyR, posible sitio de unión a IP₃; c) RIH_assoc (Pfam08454), también presentes en ambos receptores, de función desconocida; d) Ion_trans (Pfam00520), familia de dominios hallada en canales de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺, presenta 6 hélices transmembrana de las cuales las últimas dos flanquean un “loop” que determina la selectividad del ión a transportar; e) RyR (4 copias, Pfam02026), únicamente en RcRyR, de función desconocida; f) SPRY (Nro. de Acceso SMART SM00449), se hallan sólo en RcRyR, función desconocida aunque posiblemente relacionada a la liberación de Ca²⁺ mediada por el RcRyR y g) RR_TM4-6, región transmembrana en el RcRyR.

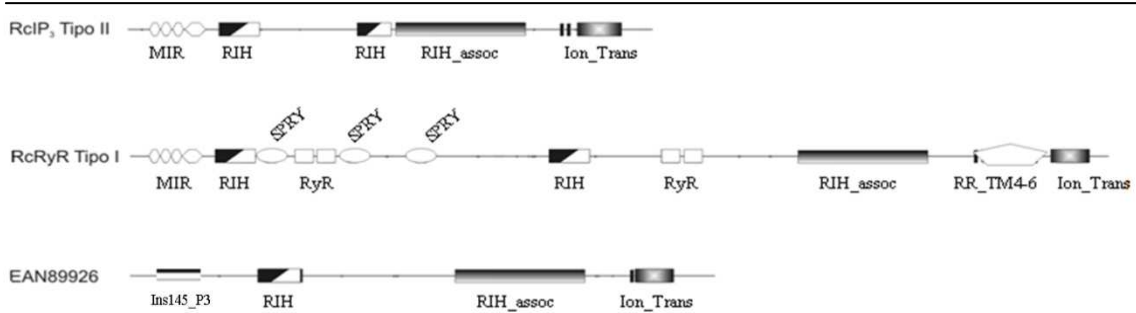


Fig. 10. Representación esquemática del receptor de IP_3 Tipo II, rianodina Tipo I y de la proteína homóloga hallada en el genoma de *T. cruzi*. En el esquema se muestran los diferentes motivos consenso hallados en los receptores a IP_3 y a rianodina. La presencia de los dominios conservados *RIH*, *RIH_assoc* y *Ion_Trans* presentes en ambos receptores también se localizó en la proteína EAN89926 (<http://smart.embl-heidelberg.de>).

3.1.2.2.2 Purificación del receptor para IP_3 /RyR desde la fracción microsomal de epimastigotes

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron la presencia de una proteína de 330 KDa, purificada con heparina - sefarosa e inmunodetectada con el anticuerpo anti-RcIP₃ tipo II de humano, con características semejantes a la superfamilia de receptores a IP_3 /RyR en formas epimastigotes de *T. cruzi*. En base a todos los antecedentes mencionados, purificamos nuevamente el RcIP₃ según se describe en materiales y métodos. Los ensayos de purificación se llevaron a cabo utilizando la propiedad de la heparina de interaccionar con el receptor de IP_3 y no así con el RcRyR. Para demostrar si el receptor para IP_3 /RyR posee características híbridas de ambos receptores, el siguiente paso fue realizar ensayos de reactividad cruzada con el Ac. primario anti-RcRyR tipo I de humano. Así, las muestras provenientes de la fracción microsomal de epimastigotes se incubaron con heparina unida a sefarosa activada con bromuro de cianógeno (heparina-sepharose). Como control positivo se utilizaron membranas de cerebro de rata.

La Fig. 11 muestra un gel SDS-PAGE al 7,5% teñido con Coomassie Brilliant Blue, en el cual se detectó una banda en la fracción microsomal (M) de aproximadamente 330 kDa y una banda en el control positivo C (+).

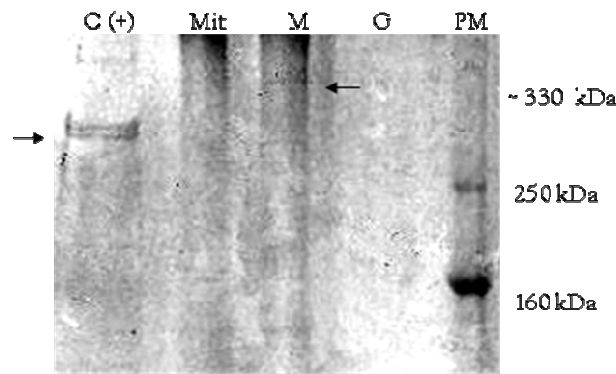


Fig. 11. Purificación de la proteína de *T. cruzi* con características posiblemente semejantes a los receptores de IP_3/RyR . Las fracciones microsomal (M) y mitocondrial (Mit) de epimastigotes de *T. cruzi* y membranas de cerebro de rata (CR, control positivo, Rc IP_3 ~300 kDa) fueron purificadas mediante heparina-sepharose como se indica en Materiales y Métodos. Todas las muestras fueron sometidas a electroforesis desnaturizante SDS-PAGE (7,5%) teñido con Coomassie Brilliant Blue. Nótese que las solución de glicina 0.05 M (G) empleada en la técnica no afectó al proceso de purificación.

Posteriormente, los ensayos por Western blot demostraron que la proteína hipotética de *T. cruzi* purificada con heparina-sepharose (Rc IP_3) fue capaz de interaccionar con el anticuerpo policlonal anti-RcRyR Tipo I de humano (Fig. 12).

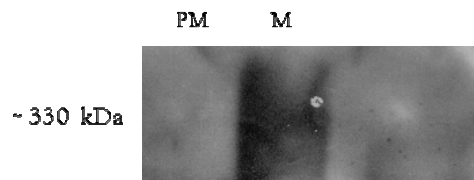


Fig. 12. Inmunoreactividad cruzada entre la proteína hipotética de *T. cruzi* purificada con heparina-sefarosa y el anticuerpo anti-RcRyR Tipo I de humano. Las resina preincubada con la fracción microsomal (M) fue sometida a electroforesis, transferida a membrana de nitrocelulosa e incubada con el anticuerpos anti-RcRyR Tipo I de humano como se indica en Materiales y Métodos.

3.1.2.2.3 Inmunodetección del Receptor para IP_3/RyR en epimastigotes de *T. cruzi*

Para poder determinar la localización subcelular del receptor para IP_3/RyR se realizó la técnica de inmunofluorescencia y análisis por microscopia de epifluorescencia (Fig. 13A y 14A) y confocal (Fig. 13B y 14B). A través de este ensayo se pudo visualizar una reacción positiva entre epimastigotes y el anticuerpo (Ac.) anti-Rc IP_3 Tipo II de humano (Fig.13Aa y 13Ba) y entre epimastigotes y el Ac. Primario anti-

TcBIP, marcador de RE (Fig. 13Ab y 13Bb). La superposición de las imágenes indica la co-localización del RcIP₃ y TcBIP (Fig. 13Ac y 13Bc).

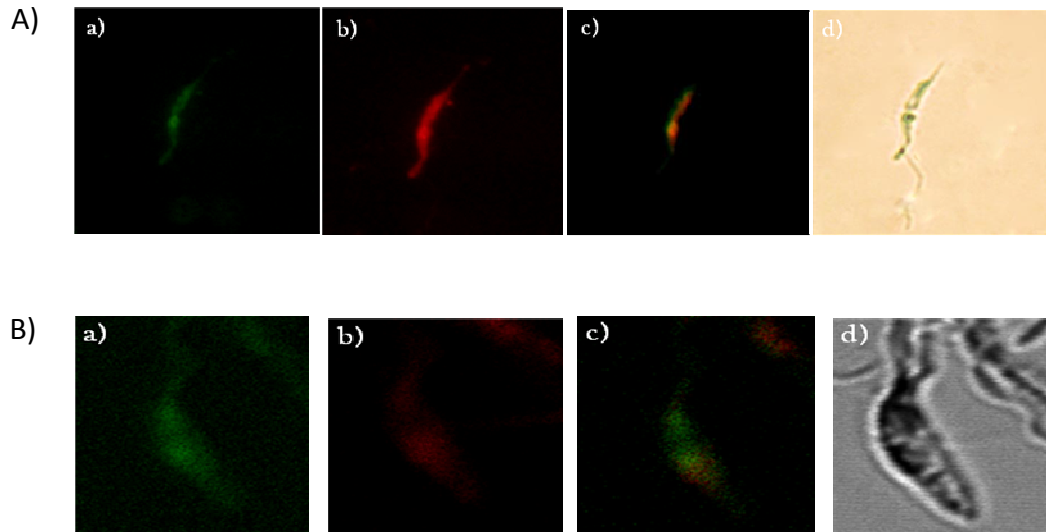


Fig. 13. RcIP₃ en formas epimastigotes de *T. cruzi*. Los parásitos fueron fijados e incubados con el Ac. primario policlonal anti-RcRIP₃ tipo II de humano y luego con Ac. secundario anticabra IgG-FITC (A) o con el Ac. primario anti- TcBIP y luego con Ac. secundario anti-conejo IgG-Rodamina (B). La superposición de las imágenes muestra co-localización de RcIP₃ y TcBIP (C). Campo claro (D). Las muestras se visualizaron con microscopía de epifluorescencia. Aumento 1000X. La superposición fue realizada con el software ImageJ (A). Las muestras se visualizaron con microscopía confocal (Nikon Eclipse C1si espectral, Excitación con la línea 488 del láser Argón para FITC y el láser He-Ne (543) para Rodamina. Se observó a través de filtros BP 515/30 y LP 650 respectivamente) (B).

Del mismo modo se incubaron los parásitos con el Ac. primario anti-RcRyR Tipo I de humano (Fig. 14Aa y 14Ba) y con TcBIP (Fig. 14Ab y 14 Bb) observándose una reacción positiva entre los epimastigotes y ambos anticuerpos. La superposición de las imágenes indica la co-localización del RcRyR y TcBIP (Fig. 14Ac y 14Bc).

En base a lo expuesto, se sugiere que el receptor de IP₃/RyR se localiza en el retículo endoplásmico de epimastigotes de *T. cruzi*, a semejanza de lo que ocurre en mamíferos. Si bien se necesitan más ensayos en esta área para poder dilucidar por el cual los RcIP₃ y RcRyR median la señal de calcio intracelular en este tipo de células, no se descarta la posibilidad de que este organismo primitivo posea un simple canal ancestral con propiedades híbridas de ambos receptores, tal como ocurre en *Toxoplasma gondii* (Lovett y col., 2002).

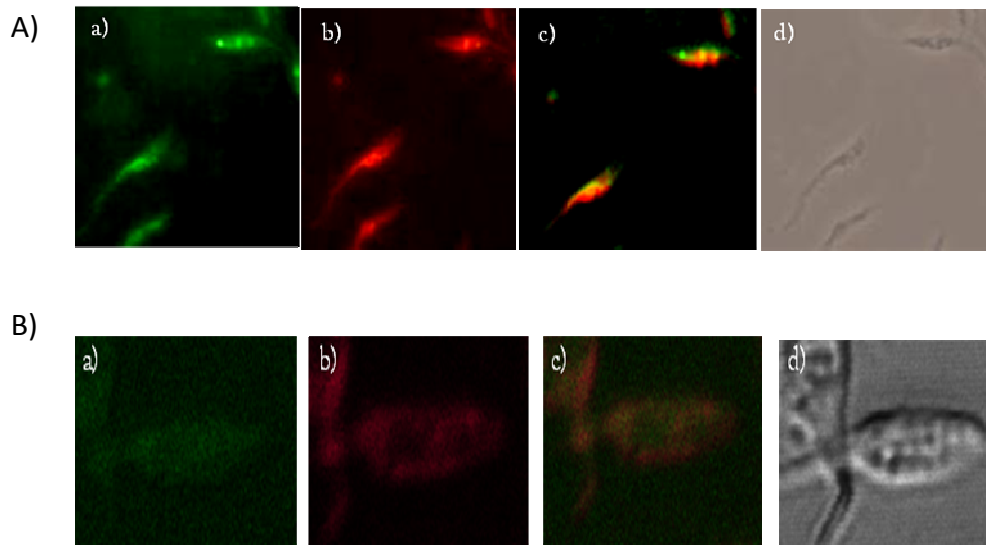


Fig. 14. RcRyR en formas epimastigotes de *T. cruzi*. Los parásitos fueron fijados e incubados con el Ac. primario policlonal anti-RcRyR tipo I de humano y luego con Ac. secundario anti-cabra IgG-FITC (A) o con el Ac. primario anti- TcBIP y luego con Ac. secundario anti-conejo IgG-Rodamina (B). La superposición de las imágenes muestra colocalización de RcRyR y TcBIP (C). Campo claro (D). Las muestras se visualizaron con microscopía de epifluorescencia. Aumento 1000X. La superposición fue realizada con el software ImageJ. (A). Las muestras se visualizaron con microscopía confocal (Nikon Eclipse C1si espectral, Excitación con la línea 488 del láser Argón para FITC y el láser He-Ne (543) para Rodamina. Se observó a través de filtros BP 515/30 y LP 650 respectivamente) (B).

3.2. Capítulo 2 (Parte A):

FUNCIONALIDAD DEL INTERCAMBIADOR Na⁺/H⁺ EN RELACIÓN CON LA SEÑAL DE CALCIO

3.2.1 Introducción

Los intercambiadores Na⁺/H⁺ son proteínas transmembránicas que transportan Na⁺ y H⁺ en direcciones opuestas, y la dirección del intercambio está determinada por el gradiente electroquímico de ambos iones. Estos transportadores están ampliamente distribuidos en membranas plasmáticas y en organelas intracelulares (Padan y col., 2000). En mamíferos, estas proteínas mantienen la homeostasis del pH (Counillon y Pouysségur., 2000) y regulan el flujo de Na⁺ y el volumen celular luego de un estrés osmótico (Shrode y col., 1996).

Por otro lado, el Ca²⁺ intracelular cumple un importante papel funcional en numerosos procesos celulares. Así, Moreno y col., (1994) demostraron la importancia del ión en mecanismos de invasión por parte de los tripomastigotes a la célula hospedadora mamífera. Además, Lammel y col. (1996) informaron la participación del ión en el proceso de diferenciación del parásito. Las organelas que contienen Ca²⁺ de rápido intercambio en *T. cruzi* son los acidocalcisomas (Docampo y col., 1995). En el lumen de estas vacuolas, el Ca²⁺ se encuentra secuestrado por los polifosfatos presentes, proceso favorecido por el pH ácido de la organela (Vercesi y Docampo, 1996). Además, existen evidencias de que es necesaria una alcalinización previa de la organela para disponer del ión en el citoplasma de la célula. Así, se ha demostrado que el ionóforo de Na⁺/H⁺, monensina, es capaz de liberar calcio desde vacuolas ácidas en muchos organismos (Beraldo y col., 2002; Srinivas y col., 2002; Bollo y col., 2006).

Los epimastigotes de *T. cruzi* sufren diferenciación (metacicloogénesis) dentro del tracto digestivo del vector, donde el aumento en la osmolaridad es causada principalmente por el elevado contenido de Na⁺ de la orina (Kollien y Schaub, 1998 y 2000). Así, el parásito posee mecanismos capaces de sensor estos cambios e iniciar respuestas apropiadas que le permitan adaptarse a las diferentes etapas de su ciclo de vida.

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 El estrés osmótico provocó alcalinización de los acidocalcisomas y acidificación citoplasmática, vía un intercambiador Na^+/H^+ .

Aun los eventos bioquímicos que se producen en este parásito en respuesta a la alta osmolaridad no han sido totalmente dilucidados. Por lo tanto, estudiamos el efecto del estrés hiperosmótico (Manitol 0,5 M) sobre la activación de un intercambiador Na^+/H^+ de vacuolas ácidas de epimastigotes de *T. cruzi*. Para ello, medimos cambios en la absorvancia del colorante Naranja de Acridina (AO), herramienta ampliamente utilizada para monitorear gradientes de pH a través de membranas por poseer una alta afinidad por las organelas ácidas (Palmgren, 1991). Manitol indujo la liberación de AO desde las vacuolas, indicando alcalinización de esta organela. Una disminución significativa ($35 \pm 16,9\%$, $n=3$, $p<0.05$) en la magnitud de este efecto fue observado en parásitos pre-incubados con EIPA, inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ (Fig. 15).

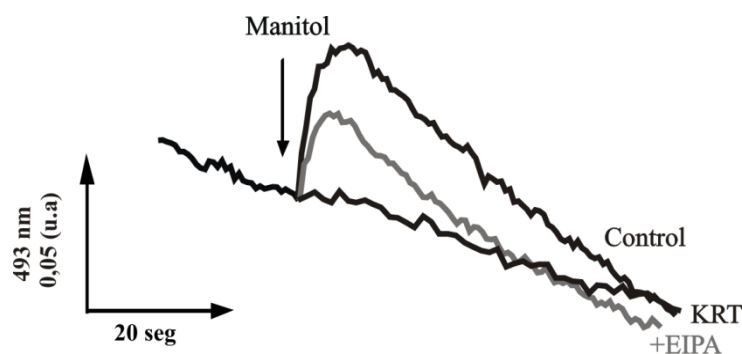


Fig. 15. Alcalinización de las vesículas ácidas provocado por estrés hiperosmótico. Los parásitos (5×10^7 células/ml) fueron cosechados, lavados con KRT/glucosa y cargados con AO durante 15 min. Luego los epimastigotes fueron pre-tratados con EIPA bajo condiciones de estrés hiperosmótico, manitol 0.5 M. Se determinaron los cambios en el pH intraorganelar. El pH extracelular fue de 7,2. La flecha indica el agregado manitol (control de estimulación). Los datos corresponden a un experimento representativo de $n=3$, cada uno realizado por duplicado.

En otra serie de experimentos, la hiperosmolaridad (0,75 M de manitol) del medio de incubación de los epimastigotes, indujo una alcalinización citoplasmática y una posterior acidificación, determinada por cambios en la fluorescencia del 2'-7'-bis(carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína (BCECF), indicador de pH. Por otro lado, manitol indujo una mayor acidificación citoplasmática cuando los parásitos fueron pretratados con el activador de PKC, PMA 1 μM . Este efecto fue revertido

parcialmente por el agregado de $1 \mu\text{M}$ de EIPA, inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ (Fig. 16).

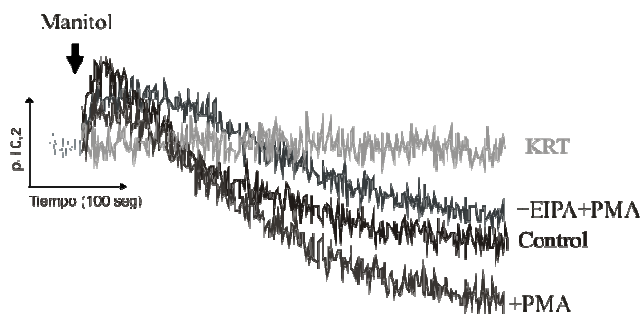


Fig. 16. Cambios en el pH intracelular provocado por estrés hiperosmótico (Manitol 1 M) Los parásitos (5×10^7 células/ml) fueron cosechados, lavados con KRT/glucosa-sulfipirazona y cargados con BCECF. Luego se determinaron los cambios en el pH citoplasmático. Se utilizó el activador de PKC (PMA $1 \mu\text{M}$) bajo condiciones de estrés hiperosmótico (manitol 1 M), tanto en presencia como en ausencia de EIPA. El pH extracelular fue de 7.2. La flecha indica el agregado de los efectores. Los datos corresponden a un experimento representativo de $n=3$ realizados por separado y por triplicado.

3.2.2.2. Efecto de la hiperosmolaridad sobre la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares

El entendimiento de los mecanismos que regulan los incrementos de Ca^{2+} citosólicos podrían ser útiles para el diseño de nuevas drogas con fines terapéuticos. Así, se propuso estudiar si el proceso de liberación de Ca^{2+} es favorecido por la alcalinización de las vacuolas ácidas. Manitol indujo también liberación de calcio desde los acidocalcisomas determinado por cambios en la fluorescencia del Fura-2/AM (Fig. 17, control, 100%).

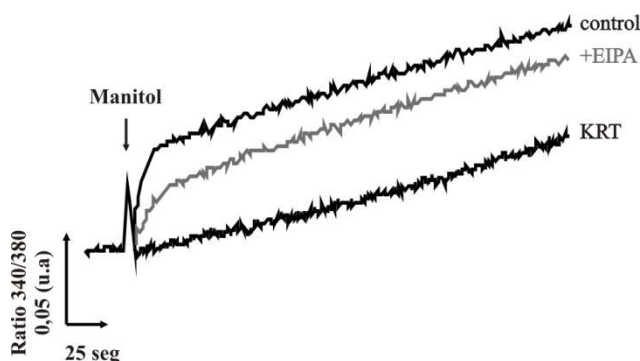


Fig. 17. El estrés hiperosmótico indujo la movilización de calcio intracelular vía un intercambiador Na^+/H^+ . Los epimastigotes cargados con Fura-2/AM como se describe en materiales y métodos fueron resuspendidos en amortiguador KRT (vehículo), y en presencia de $1 \mu\text{M}$ EIPA por 10 min antes del tratamiento (+EIPA). La flecha indica el agregado de 0,5 M manitol (control de estimulación). Se muestra un experimento representativo ($n = 6$, cada uno realizado por triplicado).

El pre- tratamiento de los parásitos con EIPA también disminuyó significativamente esta señal ($+EIPA$, $33.6 \pm 6.4\%$, $p < 0.01$).

El estrés hiperosmolar originado por NaCl 0,5 M también fue capaz de liberar calcio desde estas vacuolas acídicas (Fig. 18).

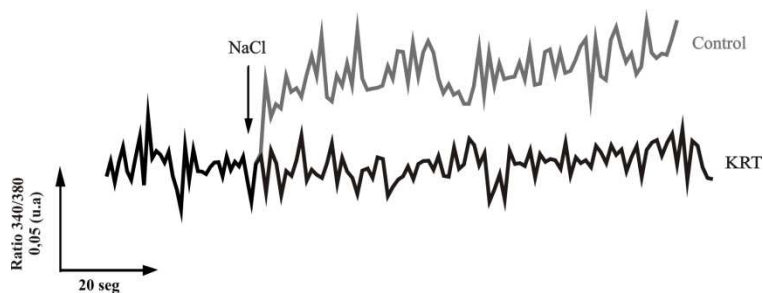


Fig. 18. El estrés hiperosmótico indujo la movilización de calcio intracelular. Los epimastigotes cargados con Fura-2/AM como se describe en Materiales y Métodos fueron resuspendidos en amortiguador KRT (vehículo). La flecha indica el agregado de 0,5 M de NaCl (control de estimulación). Se muestra un experimento representativo ($n = 3$, cada uno realizado por duplicado).

Por otro lado, se realizó el aislamiento de los acidocalcisomas (ver materiales y métodos). A los acidocalcisomas aislados se los cargaron con el colorante AO y luego fueron sometidos a estrés osmótico. Manitol fue capaz de inducir la liberación de AO desde los acidocalcisomas aislados (Fig. 19).

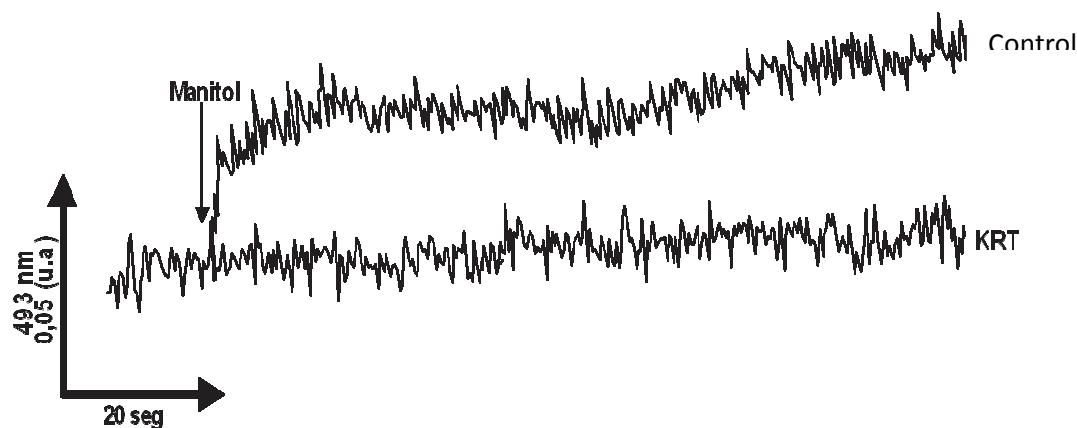


Fig. 19. Alcalinización de los acidocalcisomas aislados provocado por estrés hiperosmótico. Los acidocalcisomas fueron aislados (ver materiales y métodos) y cargados con AO durante 15 min. Luego fueron expuestos a condiciones de estrés hiperosmótico, manitol 0.5 M. Se determinaron los cambios en el pH intraorganelar. El pH extracelular fue de 7,2. La flecha indica el agregado manitol (control de estimulación). Los datos corresponden a un experimento representativo de $n=3$, cada uno realizado por duplicado.

Conjuntamente, los resultados expresados hasta el momento sugieren la participación del intercambiador Na^+/H^+ en la liberación de Ca^{2+} desde vacuolas acídicas como consecuencia de una alcalinización previa de las organelas.

3.2.2.3. El estrés osmótico incrementa el número de formas intermedias entre epimastigotes y tripomastigotes

Las formas epimastigotes de *T. cruzi* enfrentan un ambiente de alta osmolaridad en el recto de los triatomíneos, lugar donde ocurre el proceso de metacicloogénesis. Los resultados obtenidos nos indujeron a estudiar el efecto de la hiperosmolaridad sobre el crecimiento de los parásitos con el propósito de correlacionar algunos cambios bioquímicos en la vía antes mencionada con posibles cambios morfológicos.

La adición de NaCl 0,5 M o Manitol 1 M al medio de cultivo produjo una disminución del 50% en el crecimiento celular (Fig. 20).

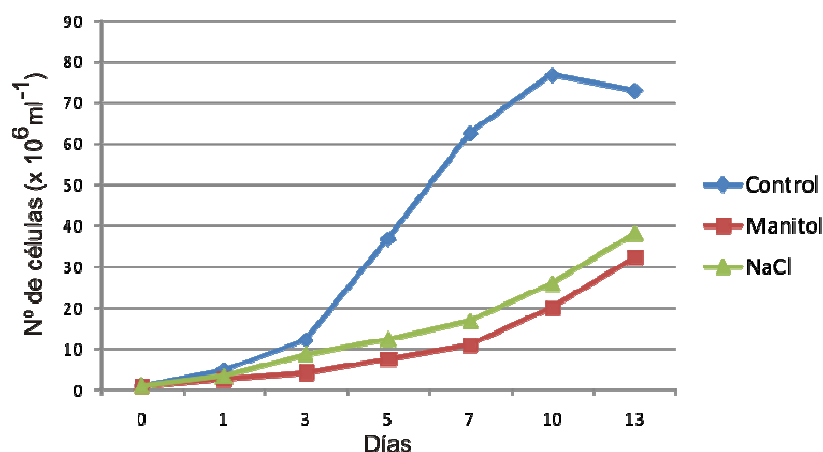


Fig. 20. Efecto del estrés hiperosmótico sobre el crecimiento de formas epimastigote. Se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuén, cultivados a 28 °C en medio líquido monofásico de Warren modificado. El crecimiento fue monitoreado por recuento de las células móviles por ml de cultivo en una cámara de Neubauer. Parásitos sin tratamiento (♦), o suplementado con NaCl 0,5 M (Δ) o manitol 1M (◻) para incrementar la osmolaridad de 320 hasta 1000 mOsm/Lt. Los datos corresponden a un experimento representativo de n=2, cada uno realizado independientemente.

Además se evaluó el efecto del EIPA, inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ , sobre el crecimiento de los parásitos en presencia y/o ausencia de estrés osmótico. La Fig. 21 muestra que el crecimiento de epimastigotes disminuyó con el inhibidor en el cultivo, pero sin afectar la viabilidad de los parásitos.

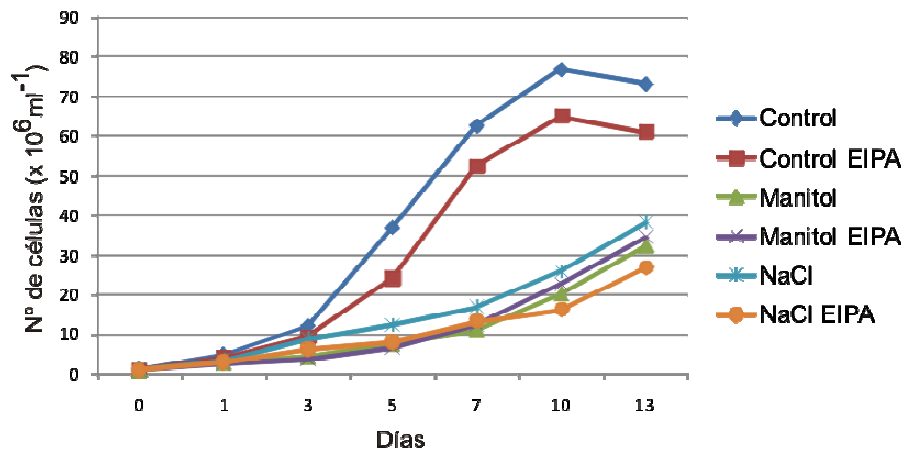


Fig. 21. Efecto del inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ (EIPA) sobre el crecimiento de epimastigotes y FI. Se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi*. El crecimiento fue monitoreado por recuento de las células móviles en una cámara de Neubauer. Control: KRT; Manitol 1M; NaCl 0,5M; EIPA 0,5 μM . Todos los efectores fueron agregados al medio de cultivo al día 0. Se muestra un experimento representativo de dos independientes.

La adición de NaCl 0,5 M o Manitol 1 M al medio de cultivo produjo un aumento significativo en el porcentaje de formas intermedias entre epimastigotes y tripomastigotes a partir del día 10 de crecimiento (Fig. 23). Estas formas intermedias se caracterizan por presentar un incremento en la longitud total del flagelo y poseer el cinetoplasto delante del núcleo, hecho que los diferencia de los epimastigotes (Fig. 22, flecha). Estas características han sido consideradas como un proceso de pre-adaptación de las formas epimastigotes para que la diferenciación a tripomastigote tome lugar (Tyler y Engman, 2000).

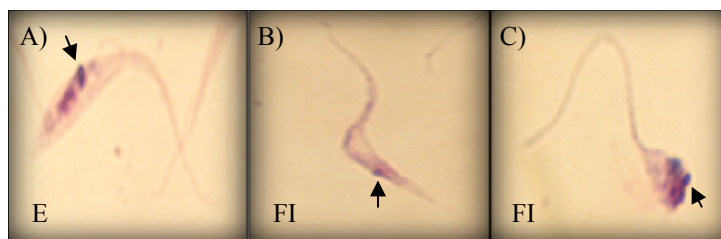


Fig. 22. Diferentes estadios de *T. cruzi* en cultivo. Microscopía óptica convencional que muestra una imagen de los parásitos bajo los diferentes tratamientos. Condiciones estándares de crecimiento sin tratamiento (A), NaCl 0,5 M (B) o manitol 1 M (C). Formas epimastigote (E), formas intermedias entre epi- y tripomastigotes (FI). La flecha indica la posición del cinetoplasto. Amplificación 1000x. Los resultados corresponden a un experimento representativo de 2 llevados a cabo en forma independiente.

El efecto del EIPA, también se evaluó sobre los cambios morfológicos anteriormente observados. Para ello, los parásitos se sometieron al tratamiento de hiperosmolaridad crecidos en el medio de Warren modificado durante 13 días en presencia y ausencia del inhibidor mencionado. La Fig. 23 muestra que los tratamientos con 0,5 M NaCl o 1 M manitol, produjeron un incremento (80-85 %) en el número de formas intermedias entre epimastigotes y tripomastigotes luego de 10 días de tratamiento. Mientras que, en presencia de EIPA, inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ , el % de formas intermedias a partir de los 10 días de tratamiento, se redujo al 30% (Fig. 23, E, NaCl+E, M+E).

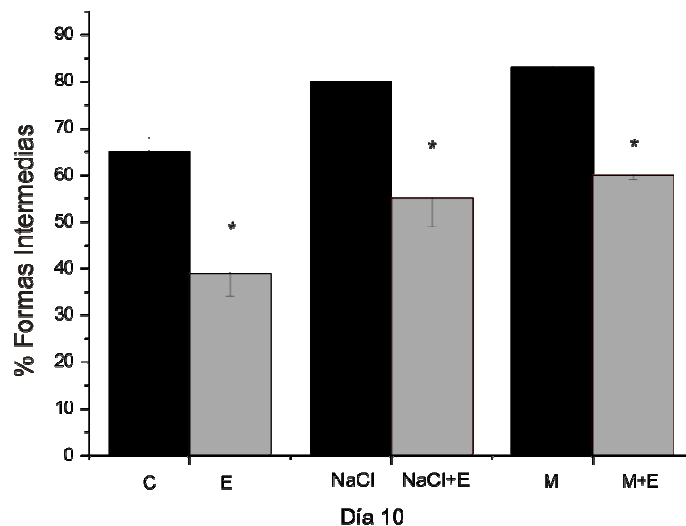


Fig. 23. Efecto del EIPA sobre los cambios morfológicos inducidos por el estrés hiperosmótico. Se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi*. Control: KRT (C); Manitol 1M (M); NaCl 0,5M (NaCl); EIPA 0,5 μM (E). Todos los efectores fueron agregados al medio de cultivo al día 0. Se representa el porcentaje de formas intermedias con respecto al total de parásitos observados, epi+FI (100%). Se muestra un experimento representativo de $n=2$, $p<0,05$, llevados a cabo en forma independiente.

En otra serie de experimentos, quisimos evaluar el efecto del EIPA sobre los cambios morfológicos anteriormente observados y con ello el compromiso del intercambiador Na^+/H^+ en el proceso de diferenciación. Para ello, los parásitos crecidos en el medio de Warren modificado (fase exponencial) se sometieron al tratamiento de hiperosmolaridad durante 2 hs en ausencia y presencia del inhibidor y posteriormente se transfirieron a un medio diferenciable, Grace's modificado. La figura 31 muestra una disminución significativa en el número de epimastigotes y un aumento en el de formas intermedias entre epimastigotes y tripomastigotes con ambos efectores a partir del día 9 de crecimiento. Los tratamientos con 0,5 M NaCl o 1 M manitol,

produjeron un incremento (80-90 %) en el número de formas intermedias entre epimastigotes y tripomastigotes luego de 175 hs de tratamiento. Mientras que, en presencia de EIPA, inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ , el % de formas intermedias a las 175 hs, se redujo al 20% como resultado de prolongación de la fase lag (Fig. 24).

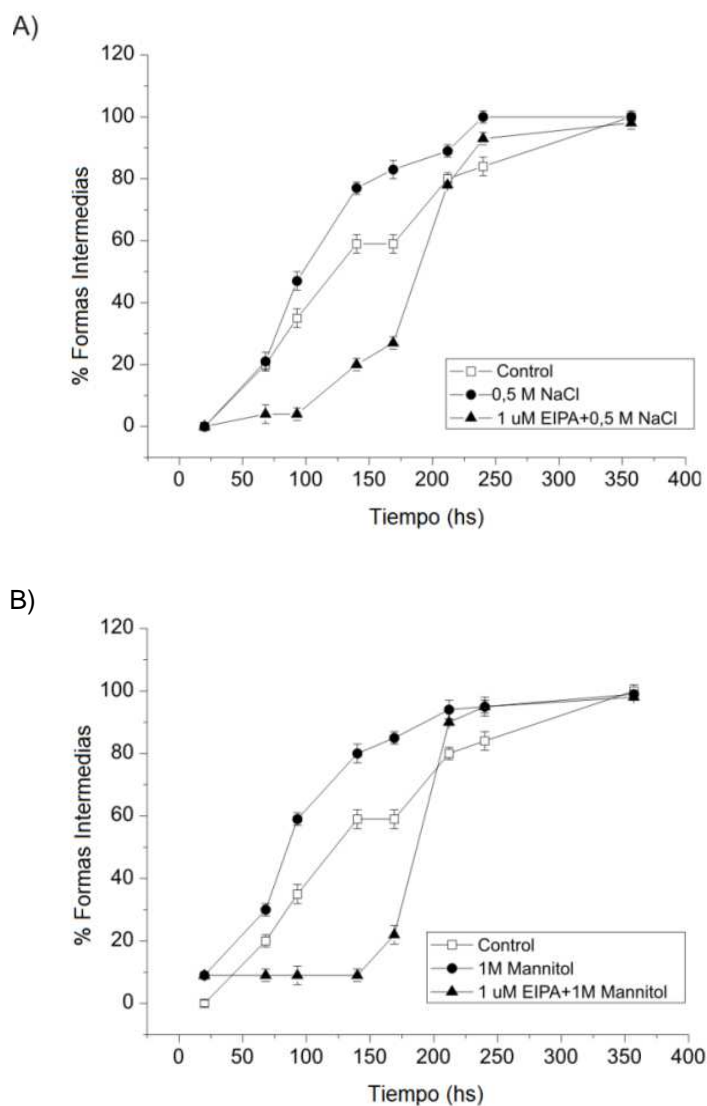


Figura 24. Efecto del EIPA sobre los cambios morfológicos inducidos por el estrés hiperosmótico. Los parásitos crecidos en medio de Warren fueron sometidos a estrés hiperosmótico por NaCl 0,5 M (A) o manitol 1M (B). Control: parásitos sin tratamiento. Parásitos pre-incubados con EIPA 1 μM durante 10 minutos y posterior tratamiento 0,5 M NaCl o 1 M manitol. Se representa el porcentaje de formas intermedias con respecto al total de parásitos observados (100%). Se muestra un experimento representativo de tres llevados a cabo en forma independiente.

3.3 Capítulo 2 (Parte B):

REGULACIÓN DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ POR ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS QUINASAS

3.3.1 Introducción

En *T. cruzi*, se ha identificado la presencia de diferentes isoenzimas de proteína quinasa C (PKC), expresadas diferencialmente en los tres estadios del parásito (Belaunzarán y col., 2009). Al respecto, los isotipos convencionales y nuevos de este tipo de quinasas son blancos de los ésteres de forbol, produciendo la activación de las mismas (Ron y Kazanietz, 1999). Gómez y col., 1989 informaron que la actividad PKC en *T. cruzi* sería crítica en la regulación del crecimiento celular a través de la activación de mecanismos de transducción mediados por receptor. Por otro lado, la existencia de la adenilil ciclasa, fosfodiesterasa y PKA en formas epimastigote ha sido informada por Ulloa y col. (1988). La adenilato ciclasa es una enzima clave, que cataliza la formación de AMPc a partir de ATP. El aumento en los niveles de AMPc activa una serina/treonina quinasa, la proteína quinasa A (PKA). Esta quinasa es un mediador importante de muchas de las vías de transducción de señales que ocurren en células eucariotas, y está implicada como un regulador de diferenciación en *Trypanosoma cruzi* (Bao y col., 2008). Las fosfodiesterasas (PDEs) de nucleótidos cíclicos catalizan la degradación de AMPc y GMPc, y regulan una variedad de procesos celulares controlando los niveles de estos segundos mensajeros (Alonso y col., 2006). En *T. cruzi* existen evidencias de fosfodiesterasas específicas para AMPc. TcPDE4 mostró homología con la PDE4 de vertebrados, esta secuencia reveló tres dominios conservados, FYVE, fosfohidrolasa y PDEasaI. El dominio FYVE es característico de proteínas reclutadas a vesículas endosomales conteniendo fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P). (Alonso y col., 2005). En tripanosomátidos, el AMPc ha sido involucrado en el control del crecimiento y diferenciación como en osmoregulación (Ouaissi y col., 1992; Fraidenraich y col., 1993; Flawiá y col., 1997; Rohloff y col., 2004).

3.3.2 Resultados

3.3.2.1. Regulación del Intercambiador Na⁺/H⁺ por Proteína quinasa C (PKC) bajo condiciones de hiperosmolaridad.

Como el intercambiador Na⁺/H⁺ posee sitios consenso para fosforilación por PKC (Fig. 25), se determinó el efecto del ester de fórbol (PMA), activador no fisiológico de PKC, sobre la alcalinización de acidocalcisomas en epimastigotes cargados con AO. La figura 26A muestra que la alcalinización inducida por manitol aumentó significativamente en parásitos pre-incubados con PMA ($45 \pm 7,5\%$, $n=3$, $p<0,05$). Cuando los epimastigotes fueron pre-tratados con EIPA y luego con PMA no se observaron diferencias significativas entre esta señal y la de EIPA, demostrando que el PMA no pudo revertir este efecto.

Estos resultados están en acuerdo con el efecto de 1 μ M de cheleritrina, un inhibidor de la quinasa, el cual produjo una atenuación de la señal ($25 \pm 7,3\%$, $n=3$, $p<0,05$) (Fig. 26B). Tampoco hubo diferencias significativas entre las señales de cheleritrina y cheleritrina+PMA, mostrando nuevamente que PMA no revierte el efecto de cheleritrina.

```
>gi|70872633|gb|EAN86578.1| Na/H antiporter-like protein, putative
[Trypanosoma cruzi]

MDEPAKGNDAAELETLSQNVLFMLMLIFCGGTFPFMTNMSKIPLPYTVVLFYGI FVGFFAHWITPDVAT
SLGNI PPELLFYIFLPVLI FEGSYAMNVHALRRVFPQVLILASVGVVNTCLLALPVACFFPEWSWYSAL
LLGSLLSATDPVAVVSLKGLGVDSTRITAMVDGEAIMNDGTAI IAFKLLLPAAARVCGCKDSTWNI ILKGV
QLAALPI IVGPFVGFPIQSYWLRHATGGIVKTCITVSVTYVCCYYVAGNI IGTSGVLTLPFSGTFLSFVYCP
LFPREGNLVYNIWEFLVHLGNMFLSLVGLILVADVVP TNLNLDLII IICMYVAVIMARFLMLEIILLPI
LNLFPYRMSQREVTLLAHAGLRGGVAVTLALAVLQTGIEAGVNI LKVTGCVLLSLP INATTAEKVVTF
GHKRRQEHQMEYAMDHLEVVRQKALQKNNNV SRSANWAAAEAYVKEHLLNPKGMSYLRDEDV
VNRLLMKAFKASLWRQRDENL ISETVVLTISRVARAIDS GELIEVRHLHRRKPSPHVEMTEEARLIE
ENLKPLVVTVSEIFLGKGYLEWAHVVRVQNAFMTLI FAACLDEVNPIKYQAKNELHGRRIEAWMTSQR
EEVRRVIRLLYETYPAATMCI SAAVLRVAVNELRKGVEELHGHYHGPAKPTAALEEMVQHMVEH IPRSW
EPPRLDNELVIAALAAATPLGRGLDPEEINTLSAMGSTK NLYEGEEIKLEDKLFHVIVFG EPKLNRTWA
SSEGEYGPFCVIGLERFVVPQLRDNQMNRRVVTSTECQVLCIAYRYIEPFLWEKSPA VAFAFRAVAVE
TLLPTLEHMITLPVNLTSQRDHFTS IMMSGNPLIGPKECNAMDWSLQFQLCFYIRGSDTTGLPCNGHTA
PCYVSAPFARLKWEDPQVLYAVPVNVS DSGYVPWSQSANKSPRGSFMPQRSAAEADLSSAMMLDYIH
HEPSSTYAEAADIFSSILRG IIPGENQPRSPKIDPPVADVGSFDGVDACI LQNPENFVTVNVPYLNOLF
YATVLEGLCIAALRYVRVPTDPLNAKHAQYI SEQALEFLMVFFNELTILSAALRRLSRRDTT SPAHGV
KRQEKEEQLDDELEDIRMIGKVI MWHRVAEMHGAFQLRTMVLQMKSLANRRFRYLSERLALAEQPSL
KGADSVEELQRILLDLNP
```

Fig. 25. Análisis de secuencia del intercambiador Na⁺/H⁺ de *T. cruzi*: sitios de fosforilación por PKC. Secuencia predicha del intercambiador Na⁺/H⁺ putativo (EAN86578.1). En verde se muestran los sitios de reconocimiento por PKC y en rojo la S/T que se predice fosforila PKC. Se utilizó la herramienta bioinformática NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) con un score mínimo de 0,7.

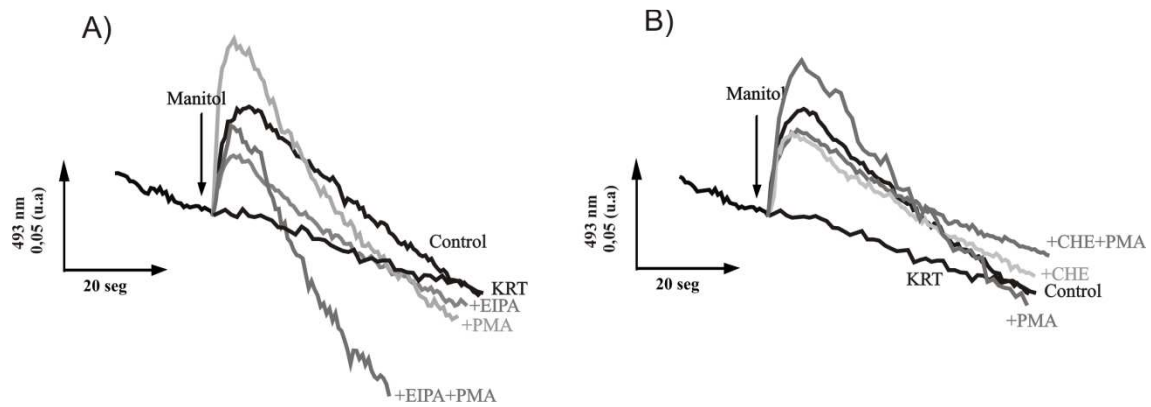


Fig. 26. Alcalinización de las vesículas ácidas provocado por estrés hiperosmótico. Los parásitos (5×10^7 células/ml) fueron cosechados, lavados con KRT/glucosa y cargados con AO durante 15 min. Luego los epimastigotes fueron pre-tratados con el activador de PKC ($1 \mu\text{M}$ PMA) (A) o con el inhibidor de la quinasa, $1 \mu\text{M}$ chelitrina (B); bajo condiciones de estrés hiperosmótico, manitol $0,5 \text{ M}$, tanto en presencia como en ausencia de EIPA. Se determinaron los cambios en el pH intraorganelar. El pH extracelular fue de $7,2$. La flecha indica el agregado de manitol (control de estimulación). Los datos corresponden a un experimento representativo de $n=3$, cada uno realizado por duplicado.

Por otro lado, la liberación de calcio inducida por manitol aumentó significativamente a ($117,3 \pm 8,9 \%$, $n=3$, $p<0,05$) cuando los parásitos fueron pre-incubados con PMA (Fig. 27). Además, cuando los epimastigotes fueron pre-tratados con cheletrina, un inhibidor de la Quinasa C, la liberación de calcio inducida por manitol disminuyó significativamente (Fig. 28).

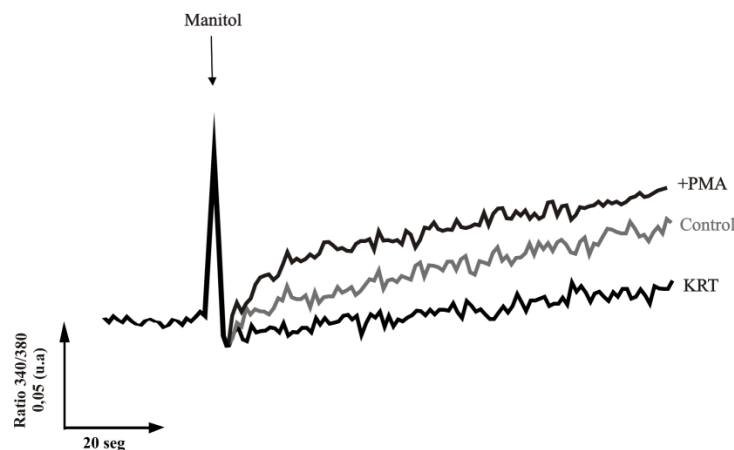


Fig. 27. PMA aumentó la movilización de calcio intracelular inducida por el estrés hiperosmótico. Los epimastigotes cargados con Fura-2/AM como se describe en materiales y métodos fueron resuspendidos en amortiguador KRT (vehículo). Luego los parásitos fueron incubados en presencia de $1 \mu\text{M}$ de PMA por 10 min antes del tratamiento (+PMA). La flecha indica el agregado de $0,5 \text{ M}$ manitol (control de estimulación). Se muestra un experimento representativo ($n = 3$, cada uno realizado por triplicado).

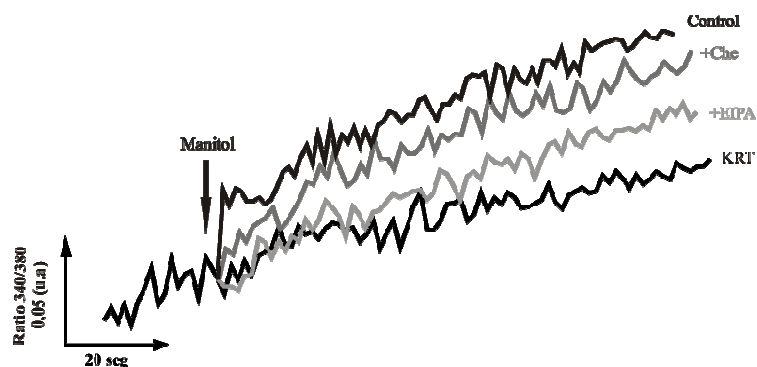


Fig. 28. Cheleritrina y EIPA disminuyeron la movilización de calcio intracelular inducida por el estrés hiperosmótico. Los epimastigotes cargados con Fura-2/AM como se describe en materiales y métodos fueron resuspendidos en amortiguador KRT (vehículo). Luego los parásitos fueron incubados en presencia de 1 μM de Cheletrina por 10 min antes del tratamiento (+*Che*) y/o 1 μM de EIPA (+*EIPA*). La flecha indica el agregado de 0,5 M manitol (control de estimulación). Se muestra un experimento representativo ($n = 3$, cada uno realizado por duplicado).

Conjuntamente, los resultados expresados hasta el momento sugieren que el intercambiador Na^+/H^+ es regulado positivamente por PKC en el proceso de alcalinización vacuolar, a semejanza de lo que ocurre en células eucariotas superiores.

3.3.2.2. Regulación del Intercambiador Na^+/H^+ por Proteína quinasa A (PKA) en *T. cruzi* bajo condiciones de hiperosmolaridad.

Como el intercambiador Na^+/H^+ también posee sitios consenso para fosforilación por PKA (Fig. 29), se estudió el efecto de un derivado semi-sintético de K525a (KT5720), inhibidor de la quinasa A, sobre la alcalinización de acidocalcisomas en epimastigotes cargados con AO, bajo condiciones de hiperosmolaridad. La figura 29 muestra que el KT5720 inhibió significativamente ($88 \pm 7,2\%$, $n=3$, $p<0,05$) la alcalinización provocada por manitol 0,5 M.

Además, se estudió el efecto de forskolin (Fk), activador no fisiológico de Adenilato Ciclasa, en el proceso de alcalinización vacuolar. Previo al agregado de Fk, las células se pre-incubaron con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), inhibidor competitivo de las fosfodiesterasas. Sorprendentemente se observó una inhibición significativa ($78 \pm 8,3\%$, $n=3$, $p<0,05$) en la alcalinización de las vacuolas inducida por el estrés osmótico. (Fig. 30, *Fk*).

>gi|70872633|gb|EAN86578.1| Na/H antiporter-like protein, putative
[Trypanosoma cruzi]

MDEPAKGNDAABELETLSQNVLFMLMLIFCGGTFMTNMSKIPLPYTVVLFYGI FVGFFAHWITPDVAT
SLGNIPPELLFYIFLPVLI FEFSYAMNVHALRRVFPQVLILASVGVVNTCLLALPVACFFPEWSWYSAL
LLGSLSATDPVAVVSLKGLGVDRI TAMVDGEAIMNDGTAI IAFKLLLPAAARVGCLKDSTWNI ILKGV
QLAALPI IVGPVFGFIQSYWLRHATGGIVKTCITVSVTYVVCYVAGNI IGTSGVLTLLFFSGTFLSFYCP
LFPGREGNLVYNIWEFLVHLGNTMLFSLVGLILVADVPTLNILDLII ICMYVAVIMARFLMLEILLPI
LNLFPYRMSQREVTLLAHAGLRGGVAVTLALAVLQTGIEAGVNI LKVTGCVVLLSLFINATTAEKVVTF
GHKRKQEHMRIQMEYAMDHLEVVRQKALQKNKNNVSYRSANWAAAEAYVKEHLLNPYKMSYLREDEDTV
VNRLLMKAFKASLWRQRDENLIS ETVVLTISRVARAIDSGELIEVRHLHR **RKFS**PHVEMTEBLEARLIE
ENLKPLWVTVEIFLGKGYLEWAHVRVQNAFMTLLSFARCLDEVNPIKYQYAKNELHGRRIEAWMTSQR
EEVRRVIRLLYETYPATMCIATSRVAVLRAVNELRKGVEELHHYHGFGAKPTAALEEMVQHMVEHI PRSW
EPRRLDNELVIAALAAATPLGRGLDPPEINTLSAMGSTKNLYEGEEIKLEDKLFHVI VFGSLKPKLNRWTA
SSEGEYGFGCVI GLERFVVPQLRDNQMNRRVVTSTECQVLCIAYRI EPFLWEKSFASVRAFWRVAVAVE
TLLPTLEHMITLPVNLQSSRDHFTS IMMSGNPLIGPKECNAMDWSLQFQLCFYI **RGSD**DTTGLFCNGHTA
PCYVSAFFARRLLKWEDPQVVLYAVPVNVS DSGYVPWSQSANKSPRGSFMPQRSAAEADLSSAMMLDYIH
HEPSSTYAEAADIFSSILRGIIPGENQPRSFKIDPPVADVGSFDGVDACILQNPENFVTNVPYLNQLFLR
YATVLEGLCIAALRYVRVPTDPLNAKHAQYISEQALEFLMVFNFELTILSAAL **RRLS**RRDTTTSSFAHGV
KRQEKEEQLQDDELEDIRMIGKVIWHRVAEMHGAFQLRTMVLQMKSLANRRFRYLSLSLRALAEQPSL
KGADSVBELQRILLDLNP

Fig. 29. Análisis de secuencia del intercambiador Na^+/H^+ de *T. cruzi*: sitios de fosforilación por PKA. Secuencia predicha del intercambiador Na^+/H^+ putativo (EAN86578.1). En verde se muestran los sitios de reconocimiento por PKA y en rojo la S/T que se predice fosforila PKA. Se utilizó la herramienta bioinformática NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) con un score mínimo de 0,8.

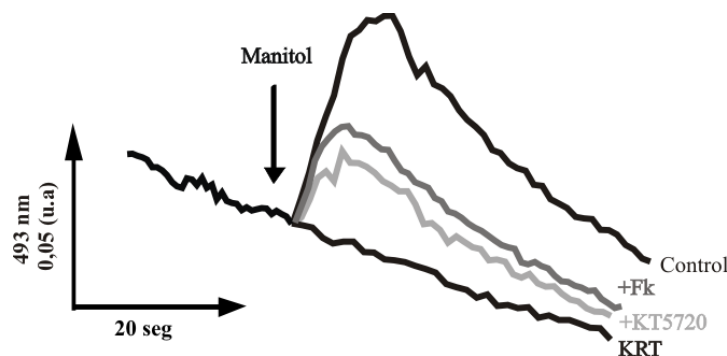


Fig. 30. Alcalinización de las vesículas ácidas provocado por estrés hiperosmótico. Los parásitos (5×10^7 células/ml) fueron cosechados, lavados con KRT/glucosa y cargados con AO durante 15 min. Luego los epimastigotes fueron pre-tratados con el inhibidor de PKA (25 nM KT5720) o con el activador de la quinasa, 10 μM forskolín; bajo condiciones de hiperosmolaridad, manitol 0,5 M. Previo al agregado de forskolín las células se pre-incubaron con IBMX 5 μM , inhibidor de fosfodiesterasas. Se determinaron los cambios en el pH intraorganelar. El pH extracelular fue de 7,2. La flecha indica el agregado manitol (control de estimulación). Los datos corresponden a un experimento representativo de $n=3$, cada uno realizado por triplicado.

La disminución en la alcalinización organelar provocada por Fk, nos llevó a pensar que las fosfodiesterasas podrían estar involucradas en los cambios a la alta osmolaridad. Debido a ello, se estudió el efecto de 1 mM de 8-Bromo AMPc, activador

de PKA resistente a la degradación por fosfodiesterasas, sobre la alcalinización de las vacuolas ácidas, bajo las mismas condiciones experimentales. En presencia del activador mencionado, manitol indujo una mayor alcalinización organelar ($58 \pm 7,8 \%$, $n=3$, $p<0,05$) (Fig. 31).

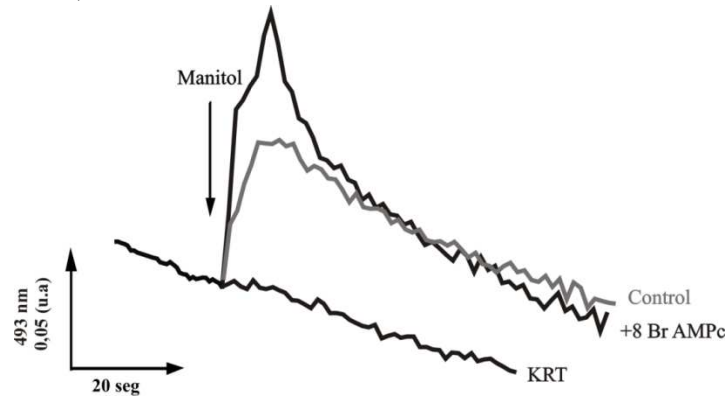


Fig. 31. Alcalinización de las vesículas ácidas provocada por estrés hiperosmótico. Los parásitos (5×10^7 células/ml) fueron cosechados, lavados con KRT/glucosa y cargados con AO durante 15 min. Luego los epimastigotes fueron pre-tratados con EIPA bajo condiciones de estrés hiperosmótico, manitol 0.5 M. Se determinaron los cambios en el pH intraorganelar. El pH extracelular fue de 7,2. La flecha indica el agregado manitol (control de estimulación). Los datos corresponden a un experimento representativo de $n=3$, cada uno realizado por duplicado.

Por otro lado, dibutilil AMPc (dBAMPc), activador de PKA, también fue capaz de movilizar significativamente la liberación de calcio inducida por el estrés hiperosmótico (Fig.32).

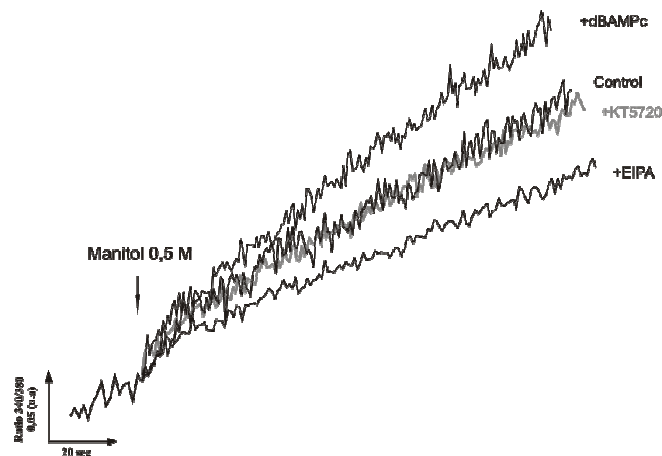


Fig. 32. dBAMPc aumentó la movilización de calcio intracelular inducida por el estrés hiperosmótico. Los epimastigotes cargados con Fura-2/AM como se describe en materiales y métodos fueron resuspendidos en amortiguador KRT (vehículo). Luego los parásitos fueron incubados en presencia de $25 \mu\text{M}$ de dBAMPc por 10 min antes del tratamiento (+dBAMPc). La flecha indica el agregado de 0,5 M manitol (control de estimulación). Se muestra un experimento representativo ($n = 3$, cada uno realizado por duplicado).

De este modo, podemos sugerir la importancia y participación de PKA en la regulación del intercambiador Na^+/H^+ en la respuesta del parásito a la hiperosmolaridad.

En base a los resultados expresados más arriba, se propuso estudiar el compromiso de las fosfodiesterasas en respuesta a la alta osmolaridad.

3.3.2.3. Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos están involucradas en el proceso de osmoregulación.

En *T. cruzi* muy poco se conoce sobre las fosfodiesterasas de AMPc. En base a resultados expresados decidimos estudiar el papel de las fosfodiesterasas en respuesta a la alta osmolaridad, inhibiendo la producción de PI3P, y por lo tanto la unión de este compuesto al dominio FYVE de la PDE4. Para ello, utilizamos Ly 294002, inhibidor de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-k). Cuando los parásitos fueron pre-incubados con este inhibidor, bajo condiciones hiperosmolares (manitol 0,5 M), se observó una disminución significativa ($45 \pm 17\%$, $n=3$, $p<0.05$) en la magnitud de este efecto comparado con el control de estimulación (Fig. 33, Control 100%).

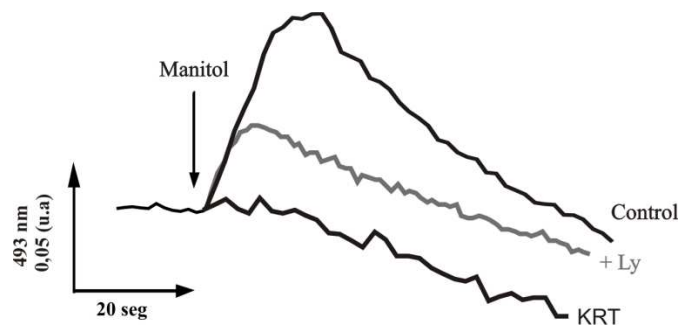


Fig. 33. Alcalinización de las vesículas ácidas provocado por estrés hiperosmótico. Los parásitos (5×10^7 células/ml) fueron cosechados, lavados con KRT/glucosa y cargados con AO durante 15 min. Luego los epimastigotes fueron pre-tratados con $20 \mu\text{M}$ Ly204002 bajo condiciones de estrés hiperosmótico, manitol 0,5 M. Se determinaron los cambios en el pH intraorganelar. El pH extracelular fue de 7,2. La flecha indica el agregado de manitol (control de estimulación). Los datos corresponden a un experimento representativo de $n=3$, cada uno realizado por duplicado.

Por otro lado, ly294002 también fue capaz de disminuir significativamente la liberación de calcio inducida por el estrés hiperosmótico (Fig.34).

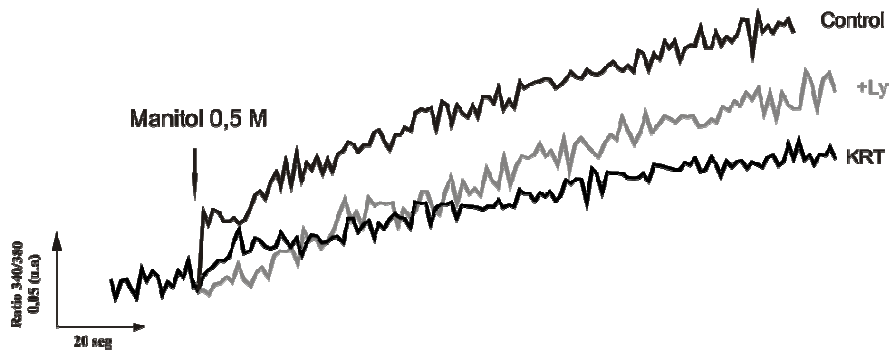


Fig. 34. Ly294002 disminuyó la movilización de calcio intracelular inducida por el estrés hiperosmótico. Los epimastigotes cargados con Fura-2/AM como se describe en materiales y métodos fueron resuspendidos en amortiguador KRT (vehículo). Luego los parásitos fueron incubados en presencia de 20 μM de ly294002 por 10 min antes del tratamiento (+Ly). La flecha indica el agregado de 0,5 M manitol (control de estimulación). Se muestra un experimento representativo ($n = 3$, cada uno realizado por duplicado).

En consecuencia, podemos sugerir la participación de las fosfodiesterasas en el proceso de osmoregulación en condiciones hiperosmolares. Aunque aún no se conoce con exactitud qué es lo que ocurre bajo condiciones de estrés hiperosmótico, experimentos previos de nuestro grupo de trabajo demuestran la presencia y activación de una PI3-k de clase I en epimastigotes de *T. cruzi*.

3.4. Capítulo 3:

LOCALIZACION SUBCELULAR DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+

3.4.1 Introducción

Los intercambiadores Na^+/H^+ están localizados en membranas plasmáticas y en diversas membranas de organelas intracelulares (Padan y col., 2000). En mamíferos, estas proteínas mantienen la homeostasis del pH y regulan el flujo de Na^+ y el volumen celular luego de un estrés osmótico (Counillon y Pouysségur., 2000; Shrode y col., 1996). En bacterias y levaduras, el intercambiador Na^+/H^+ es importante en la regulación de las concentraciones de Na^+ y de H^+ intracelulares bajo condiciones de alcalinidad extracelular (Dibrov y Fliegel., 1998). Una nueva función para estos transportadores ha sido descrita en diversos organismos. Al respecto, su presencia en membranas de organelas intracelulares favorecerían al proceso de liberación de Ca^{2+} , desde vesículas ácidas, a través de una actividad conjunta con el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/n\text{H}^+$ (Moolenaar, 1986; Nass y Rao, 1999; Vercesi y Docampo, 1996; Bollo y col., 2006; Bonansea-Usorach y col., 2012).

3.4.2 Resultados

3.4.2.1. Inmunodetección del intercambiador Na^+/H^+ en epimastigotes de *T. cruzi*

Para estudiar la localización subcelular del intercambiador Na^+/H^+ en las formas epimastigotes realizamos la técnica de inmunofluorescencia y análisis por microscopía de epifluorescencia y confocal. Como control positivo se utilizó el anticuerpo primario anti-V- H^+ ppasa (marcador de acidocalcisomas). A través de estos ensayos se pudo visualizar una reacción positiva entre los epimastigotes y el anticuerpo anti- Na^+/H^+ (Fig. 35 AA y BA) y entre epimastigotes y el Ac. Primario anti-V- H^+ ppasa (Fig. 35 AB y BB). La superposición de las imágenes muestran co-localización del Na^+/H^+ y V- H^+ ppasa (Fig. 35 AC y BC).

Los presentes resultados indican una localización posible del intercambiador Na^+/H^+ en los acidocalcisomas de epimastigotes de *T. cruzi*.

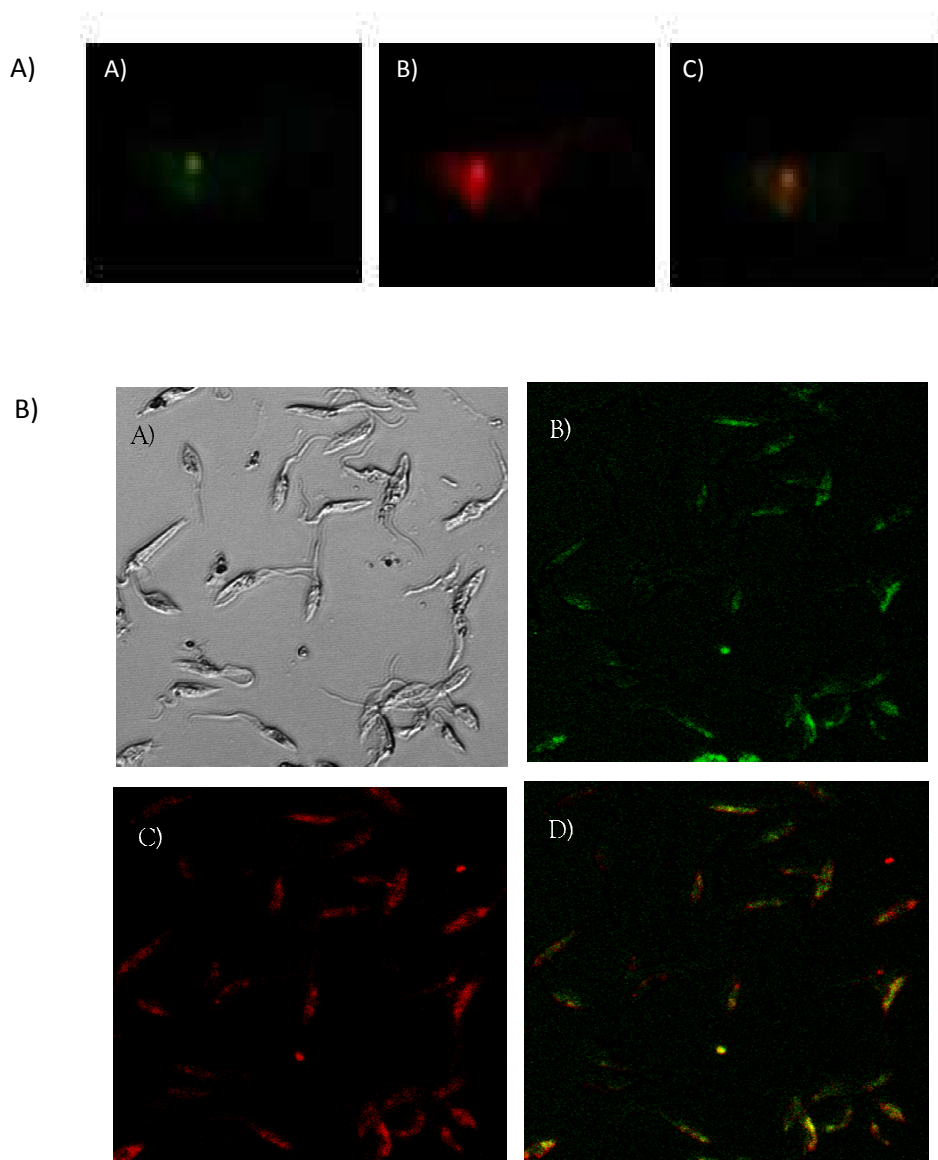


Fig. 35. Intercambiador Na^+/H^+ en formas epimastigotes de *T. cruzi*. Los parásitos fueron fijados e incubados con el Ac. primario policlonal anti- Na^+/H^+ y luego con Ac. secundario anti-cabra IgG-FITC (A) o con el Ac. primario anti- V-H⁺ ppasa y luego con Ac. secundario anti-conejo IgG-Rodamina (B). La superposición de las imágenes muestra co-localización de Na^+/H^+ y V-H⁺ ppasa (C). Las muestras se visualizaron con microscopía de epifluorescencia como se describe en materiales y métodos. Aumento 1000X. La superposición de las imágenes fue realizada con el software ImageJ (A). Las muestras se visualizaron con microscopía confocal (Nikon Eclipse C1si espectral, Excitación con la línea 488 del láser Argón para FITC y el láser He-Ne (543) para Rodamina. Se observaron a través de filtros BP 515/30 y LP 650 respectivamente) (B).

3.4.2.2. Presencia del intercambiador Na^+/H^+ en acidocalcisomas aislados de epimastigotes de *T. cruzi*

A partir de una fracción de acidocalcisomas aislados de epimastigotes de *T. cruzi* (ver materiales y métodos) se realizaron ensayos por Western blot, mediante esta

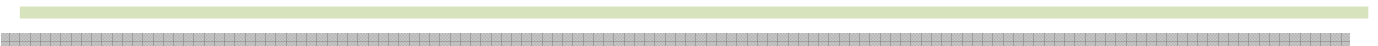
técnica demostramos que la proteína hipotética de *T. cruzi* (Na^+/H^+) fue capaz de interactuar con el anticuerpo policlonal anti- Na^+/H^+ (Fig. 36).



Fig. 36. Reconocimiento del Intercambiador Na^+/H^+ por el anticuerpo primario anti- Na^+/H^+ en acidocalcisomas aislados de epimastigotes de *T. cruzi*. Los epimastigotes (6×10^7) de la cepa Tulahuen de *T. cruzi* fueron crecidos, cosechados y lavados con amortiguador KRT. Luego se procedió al aislamiento de los acidocalcisomas (ver materiales y métodos). La fracción de los acidocalcisomas fue recolectada en el fondo del tubo y se resuspendió en buffer de homogenización. La muestra fue sometida a electroforesis, transferida a membrana de nitrocelulosa e incubada con el anticuerpo policlonal anti- Na^+/H^+ como se indica en Materiales y Métodos.

En base a lo expuesto, demostramos que el intercambiador Na^+/H^+ se localiza en los acidocalcisomas de epimastigotes de *T. cruzi*, a semejanza de lo que ocurre en *T. brucei* (Vercesi y col., 1996, Vercesi y col., 1997).

DISCUSIÓN



4. DISCUSION

El ión calcio (Ca^{2+}) desempeña un papel fundamental en el metabolismo y la fisiología de las células, controlando procesos que dependen de la amplitud, la frecuencia y la localización subcelular de las señales de Ca^{2+} citosólico. La activación de la vía de los fosfoinosítidos, en eucariotas superiores, eleva la concentración citoplasmática de IP_3 , el cual libera calcio desde el sistema de Retículo Endoplásmico. El mecanismo por el cual el Ca^{2+} es liberado desde reservorios intracelulares en eucariotas inferiores es un tema controvertido y poco conocido, por ello en el presente trabajo se dilucidó como los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* pueden liberar calcio desde los reservorios intracelulares. Se demostró así, un receptor sensible a IP_3 y rianodina (RyR) localizado en microsomas del parásito. Además, se muestra el compromiso de un intercambiador Na^+/H^+ , localizado en los acidocalcisomas, en el incremento de la señal de calcio citosólico, como un mecanismo alternativo a PLC/IP_3 sugerido por Bollo y col; (2006); proceso comprometido en la diferenciación de epimastigote a tripomastigote en respuesta al estrés hiperosmótico que sufren los parásitos en el tránsito del intestino del insecto vector.

Es bien conocido en organismos multicelulares que los receptores a IP_3 y RyR corresponden a canales de calcio intracelulares pertenecientes a una misma superfamilia, los cuales son estructuralmente similares (Sorrentino y col., 2000). Los estudios informáticos, determinaron la presencia de una región genómica en *T. cruzi*, (Tc00.1047053509461.90, Nro. Acceso XM_806684) con alta homología a las isoformas de los receptores de IP_3 y de RyR de origen humano. A pesar de que los dominios conservados en los mismos, tales como SPRY y MIR, están ausentes en el parásito, IP_3 y rianodina fueron capaces de incrementar los niveles de calcio intracelular en formas epimastigotes. Más aún, la proteína codificada (EAN89976) mostró dominios altamente conservados en esta superfamilia, una región identificada como el posible sitio de unión a IP_3 (RYDR_ITPR) y los dominios Ion_trans y RIH_assoc en la región carboxiterminal. En conjunto, los resultados sugieren que el parásito posee canales de Ca^{2+} poco convencionales tanto en su secuencia como en su función.

La liberación de Ca^{2+} a través de estos receptores en organismos unicelulares aún no fue totalmente dilucidada. En nuestro laboratorio, Bonansea (2007) purificó selectivamente una proteína de fracción microsomal de epimastigotes mediante el empleo de heparina-sefarosa. La formación de este complejo (heparina-Rc IP_3) ha sido

reportada en plantas y utilizada para la purificación de un posible receptor a IP_3 en células vegetales de *Vigna radiata* (Biswas y col., 1995). En el trabajo experimental de esta tesis se purificó nuevamente esta proteína de fracción microsomal de epimastigotes mediante la misma técnica y se realizó una inmunoreactividad cruzada con el anticuerpo primario anti-RcRyR. Los ensayos por Western blot demostraron que las membranas de cerebro de rata purificadas interaccionaron con el anticuerpo anti-Rc IP_3 tipo II de humano (Fig. 11 A) pero no así con el anti-RcRyR tipo I de humano (Fig. 11 B). Esto puede deberse a que como los ensayos de purificación se realizaron en base a la propiedad de la heparina de interaccionar con el receptor de IP_3 y no con el RcRyR, solamente logramos purificar al Rc IP_3 . En cambio, la proteína hipotética de *T. cruzi* purificada (Rc IP_3) sí fue capaz de interaccionar con ambos anticuerpos policlonales, sugiriendo la presencia de una posible proteína de ~330 kDa que posee características híbridas de los Rc IP_3 /RyR.

Si bien, en *T. cruzi* aún no se conoce si el receptor para IP_3 /RyR posee características híbridas de ambos receptores, considerando que la heparina, inhibidor del Rc IP_3 y no del RcRyR, fue capaz de inhibir la señal de calcio inducida por RyR, afirma la idea de que ésta proteína hipotética pueda ser un híbrido (Rc IP_3 /RcRyR). En otro protozoo como *Toxoplasma gondii* existen evidencias de un receptor de membrana que posee características híbridas de ambos receptores, Rc IP_3 y RcRyR (Lovett y col., 2002), a diferencia de lo que ocurre en mamíferos donde estos existen como dos entidades separadas. Hasta el momento no se había determinado la localización subcelular del receptor de IP_3 /RyR en formas epimastigote de *T. cruzi*, en este trabajo mostramos que la reacción positiva del anticuerpo anti-Rc IP_3 tipo II de humano y los epimastigotes fue visualizada en estructuras internas del parásito (Fig. 12 y 13), sugiriendo una localización intracelular del receptor a IP_3 /RyR a semejanza de lo que ocurre en mamíferos. Conjuntamente, estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores quienes determinaron indirectamente canales liberadores de calcio en respuesta a IP_3 . Así, en *Entamoeba histolitica* se observó que extractos crudos de membrana son capaces de unir IP_3 radioactivo (Raha y col., 1994); en *Blepharisma japonicum* una proteína de tamaño aproximado al del receptor de IP_3 se evidenció con anticuerpos contra el Rc IP_3 de humanos, (Matsuoka y col., 2000); en ovocitos de *Xenopus* estimulados con cafeína se pudo observar inhibición de la liberación de calcio vía IP_3 (Berridge, 1991; Parker y col. 1991); en contraste, los receptores de RyR son activados por la cafeína (Bezprozvanny y col. 1991). *Plasmodium chabaudi* posee

reservorios de Ca^{2+} sensibles al IP_3 en el retículo endoplásmico (Passos y col, 1998). *Toxoplasma gondii* también posee reservorios sensibles a IP_3/RyR , demostrado a través de estudios farmacológicos; sin embargo, el receptor de IP_3/RyR homólogo a los de mamíferos aún no había sido identificado por técnicas moleculares (Lovett y col., 2002). Posteriormente, Ladenburger y col., (2006) lograron clonar por primera vez en protozoos (*Paramecium tetraurelia*) la secuencia completa del gen que codifica para un posible RcIP_3 , con características moleculares semejantes al de eucariotas superiores. La proteína hallada posee ~ 321 kDa y se localiza sorpresivamente en el sistema osmorregulatorio del parásito. Luego del agregado de IP_3 exógeno se observó un incremento en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las cercanías del sistema osmorregulatorio. Por otro lado, en *T. brucei* el receptor de IP_3 se localizó en los acidocalcisomas (Huang y col., 2012). Recientemente, Hashimoto y col., (2013) identificaron el gen del receptor de IP_3 en *T. cruzi* (TcIP_3R) localizado en el sistema de retículo endoplásmico y mostraron que dicho receptor es una proteína esencial para el crecimiento, la diferenciación y la virulencia del parásito. De este modo, los resultados obtenidos por Hashimoto y col; (2013) conjuntamente con nuestros resultados, son concluyentes para la demostración de estos canales en *T. cruzi* y aclararían en parte la controversia mencionada durante 20 años.

Un evento bioquímico importante en la señal de calcio es la actividad de intercambiadores Na^+/H^+ en organelas subcelulares (Padan y Schuldiner, 1994). Debido a ello, nos propusimos determinar la localización subcelular de dicho transportador en *T. cruzi*. Como marcador de acidocalcisomas utilizamos un anticuerpo primario anti- $\text{V-H}^+\text{PPasa}$. La reacción positiva del anticuerpo anti- Na^+/H^+ y los epimastigotes fue visualizada en estructuras internas del parásito, mostrando que el intercambiador Na^+/H^+ está localizado en los acidocalcisomas (Fig.36) al igual que ocurre en *T. brucei* (Vercesi y col., 1996, Vercesi y col., 1997). Este mecanismo de transporte ha sido implicado en la regulación de la homeostasis del pH, en el control del volumen celular y en la adaptación a la alta salinidad, lo que evita los efectos dañinos de Na^+ en los procesos bioquímicos claves en el citosol (Nass y Rao, 1998).

La hiperosmolaridad originada por NaCl ha sido ampliamente estudiada en muchos tipos de células. En *T. cruzi* un gradiente de Na^+ entre el medio extracelular y el lumen organelar favorece la liberación de calcio de las vacuolas ácidas a través de un intercambiador Na^+/H^+ sensible a EIPA (Bollo y col., 2006). Así, la acidificación citoplasmática de los epimastigotes originada por hiperosmolaridad aumenta cuando

los parásitos se preincubaron con PMA y se revierte parcialmente, por el agregado de EIPA. Esto demuestra una correlación entre pH citoplasmático y luminal del acidocalcisoma y muestra la participación del intercambiador Na^+/H^+ en la regulación del pH citoplasmático en respuesta al estrés hiperosmótico a semejanza de lo que ocurre en otros organismos (Counillon y col., 2000).

El pH ácido en el interior de los acidocalcisomas favorece la retención de Ca^{2+} , y es necesario una neutralización previa del gradiente de pH entre el lumen organelar y el citosol, para la liberación de Ca^{2+} desde estas vacuolas ácidas (Vercesi y Docampo, 1996). Bollo y col., (2006) demostraron que la alcalinización de los compartimentos ácidos del parásito inducido por monensina, ionóforo Na^+/H^+ y su efecto sobre la señal de calcio indican una relación entre el proceso de alcalinización de las vacuolas y la liberación de Ca^{2+} . Por otro lado, el hecho que el efecto de monensina sobre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sea independiente del calcio extracelular, descarta la entrada del ión desde el medio exterior y por lo tanto refuerza el concepto que su liberación se produce desde los reservorios intracelulares. Es importante notar que en el año 2000 de Souza y col, sugirieron a la regulación del pH citoplasmático como una de las funciones de los acidocalcisomas.

Como NaCl es capaz de generar un incremento en la osmolaridad del medio y/o incrementar la fuerza conductora impuesta por el gradiente de Na^+ , y para distinguir entre estas dos posibilidades, se realizaron experimentos reemplazando a la solución iónica por manitol. Estos ensayos revelaron que manitol 0,5 M también indujo una alcalinización de los acidocalcisomas similar a NaCl (Bonansea, 2007), lo que demuestra que el mecanismo descrito responde tanto a un incremento en la osmolaridad como a un efecto iónico.

En base a estos antecedentes, en este trabajo también mostramos que hay una relación entre el aumento en la osmolaridad del medio y la funcionalidad de la vía del fosfatidilinositol en epimastigotes of *T. cruzi*, imitando la situación que los parásitos encuentran en el recto del insecto vector, lugar donde ocurre la diferenciación. Las vías de señalización que se activan como consecuencia de provocar estrés hiperosmótico resultarían importantes en la inducción de la metaciclogenesis.

En el recto del triatomino se encuentran factores capaces de promover la diferenciación del parásito (Kollien y Schaub, 1998). Así, un incremento en la osmolaridad (320 mOsm--1000 mOsm), causado por el alto contenido de NaCl, es uno de los principales cambios observados en el proceso de diferenciación informado por Kollien y Schaub, (2000) y Kollien y col., (2001). También se muestra la participación

del intercambiador Na^+/H^+ en respuesta a la hiperosmolaridad originado por manitol 0,5 M, determinado mediante la alcalinización de las vacuolas ácidas y su inhibición parcial por EIPA. De este modo, en formas epimastigote la relación entre la vía del inositol fosfato y la señal de calcio no está restringida sólo a la acción del IP_3 como un segundo mensajero. Además, los tratamientos con alta osmolaridad condujeron también a la liberación de calcio desde los acidocalcisomas como consecuencia de la activación conjunta de los intercambiadores $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ y Na^+/H^+ y liberación del ión vía un canal de Ca^{2+} sensible a IP_3 . Resultados previos de nuestro laboratorio, Santander, (2004) y Bonansea, (2007), apoyan el primer mecanismo al mostrar una correlación entre activación del intercambiador Na^+/H^+ y liberación de calcio en parásitos estimulados con manitol. Esta respuesta podría ser similar a la evocada por carbacol, que induce alcalinización de las vacuolas y liberación de calcio vía activación del intercambiador Na^+/H^+ y subsecuente activación de un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ (Bollo y col; 2006).

La funcionalidad de este tipo de proteínas es de gran importancia en la homeostasis iónica y por ello las mismas están sujetas a la acción de diferentes factores para su regulación. En mamíferos, por ejemplo, el proceso de fosforilación-desfosforilación y la acción de lípidos es fundamental para la activación de ciertas isoformas de intercambiadores (Orlowski y Grinstein, 1997; Counillon y Pouyssegur, 2000).

Es bien conocido que en diferentes tipos celulares, los intercambiadores Na^+/H^+ son regulados vía fosforilación por proteína quinasa C (PKC) y median la respuesta a muchas de las señales que intervienen en el control de la proliferación celular, la diferenciación, el volumen y los cambios de osmolaridad (Nass y col., 1998; Wang y col., 1997). Estos hallazgos fueron confirmados con la publicación del genoma completo del *T. cruzi* (El-Sayed y col., 2005; Atwood y col., 2005), permitiéndonos identificar una región genómica en el parásito capaz de codificar para un posible intercambiador Na^+/H^+ (Nro. de acceso AAHK01001190.1, desde el nucleótido 9650 hasta 13276). La búsqueda de homología de esta proteína contra la base de datos del NCBI mediante BLASTp mostró homología en su porción amino-terminal con intercambiadores Na^+/H^+ de plantas, hongos, protozoos, bacterias y animales. El análisis de la secuencia encontrada reveló sitios conservados de fosforilación por proteína quinasa C ([ST]-x-[RK]) localizados en la región C-terminal de la proteína (<http://smart.embl-heidelberg.de>) (Bonansea, 2007). En base a lo expuesto, en este trabajo, se muestra el papel de PKC en el estadio de epimastigote en similitud a lo que

ocurre en el intestino del insecto vector. Así, la activación de PKC por PMA indujo una alcalinización vacuolar en el parásito. La reversión del efecto del PMA por el inhibidor de intercambiador Na^+/H^+ sugiere la participación de dicho transportador en el proceso de alcalinización vacuolar bajo estas condiciones. Resultados similares se obtuvieron cuando los parásitos fueron tratados con chelitrina, inhibidor de la quinasa C. De este modo, la alcalinización inducida por fosforilación del intercambiador Na^+/H^+ en *T. cruzi* por PKC es un proceso semejante a lo que ocurre en eucariotas superiores (Busch y col., 1995; Pederson y col., 2002). Estos hallazgos apoyaron la hipótesis de que la actividad de esta quinasa sería parte del mecanismo por el cual la hiperosmolaridad activa al intercambiador Na^+/H^+ . Aunque no se muestra experimentalmente la fosforilación del transportador por PKC, un hecho interesante a considerar y correlacionar con nuestros resultados es la observación que realizaron Wainszelbaum y col., (2003) quienes mostraron una banda de 120 kDa aproximadamente, valor semejante al predicho para esta quinasa, cuando analizaron el patrón de fosforilación de proteínas en epimastigotes de *T. cruzi*, cepa RA, luego de la preincubación con PMA.

Por otro lado, el análisis de la secuencia de TcNHE reveló sitios consensos para la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA). La adenil ciclasa que genera AMPc, la PKA y varias fosfodiesterasas que lo degradan, fueron informadas como enzimas activas en epimastigotes (Ulloa y col., 1988; Alonso y col., 2007). AMPc regula vías fundamentales en muchos tipos de organismos; en tripanosomátidos está involucrado en el control del crecimiento, diferenciación y en los procesos de osmoregulación (Ouaissi y col., 1992; Fraidenraich y col., 1993; Flawiá y col., 1997; Rohloff y col., 2004). En consecuencia, la activación de PKA se postuló como el principal mecanismo efector (Bao y col., 2008). Nuestros resultados sugieren un compromiso de PKA en la regulación del intercambiador Na^+/H^+ en condiciones de estrés hiperosmótico. En epimastigotes, tanto el activador como el inhibidor de PKA, forskolín y KT5720 respectivamente, indujeron una disminución en la alcalinización organelar inducida por el estrés. El activador, forskolín, no fue capaz de incrementar la alcalinización en las vesículas acídicas aun cuando el inhibidor de fosfodiesterasas, IBMX, estuvo presente; condición que favorecería el aumento del AMPc. Este hecho induce a pensar en una fosfodiesterasa activa y resistente a IBMX, como TcrPDEA1, reportada por Alonso y col. (2007) y ser un componente importante en el proceso de osmoregulación bajo condiciones de hiperosmolaridad. Apoya esta hipótesis el hecho

que, la presencia de 8-bromo AMPc, análogo no hidrolizable de PKA, incrementó significativamente la alcalinización organelar inducida por manitol.

Se conoce que las fosfodiesterasas de AMPc de *T. cruzi* (TcPDEs) están implicadas en el proceso de osmoregulación bajo condiciones de hipoosmolaridad, (King-Keller y col., 2010). La TcPDE4 posee tres dominios conservados, FYVE uno de ellos, es característico de proteínas reclutadas a vesículas endosomales conteniendo fosfatidilinositol 3-fosfato, PI3P, (Alonso y col., 2005). En *T. cruzi*, este fosfoinosítido es el producto no sólo de la actividad de PI3-k de clase III (Schoijet y col., 2008) sino de PI3-k clase I, (Gimenez, 2012). Como PI3-k es un regulador importante de diversos transportadores incluyendo el intercambiador Na^+/H^+ (Rotte y col; 2010), se evaluó si, inhibidor de fosfatidilinositol 3-quinasa, Ly-294002, cambia la alcalinización de los acidocalcisomas en condiciones de alta osmolaridad. Cuando los epimastigotes fueron incubados en presencia del inhibidor de la quinasa se observó una disminución en la alcalinización provocada por manitol. Esto mostraría que la actividad del intercambiador Na^+/H^+ también dependería de una fosfoinosítido quinasa o de incrementos en los niveles de PI3P, afectando posiblemente la actividad fosfodiesterasa. Por lo tanto, PI3-k sería una conexión importante para inducir actividad de PDEs, ya que el incremento de AMPc por Ly-294002 podría deberse a la acción directa o indirecta sobre una adenilato ciclasa y/o PDEs, vía inhibición de PI3-k u otro mecanismo aun desconocido (Andersson y col., 2003).

Recientemente, King-Keller y col., (2010) informaron sobre una fosfodiesterasa C (TcrPDEC) de *Trypanosma cruzi*, nueva e inusual, ya que posee un dominio catalítico localizado en la mitad de la cadena polipeptídica. Esta enzima es capaz también de hidrolizar el GMPc, aunque prefiere al AMPc, y tiene un dominio FYVE en la región N-terminal (Kunz y col., 2005). TcrPDEC muestra homología con los miembros de la familia PDE4. Estos autores muestran que potentes inhibidores de PDE4 de *T. cruzi*, sintetizados originalmente por ellos, fueron capaces de incrementar los niveles de AMPc en el parásito y mediar la recuperación del volumen celular bajo condiciones de estrés hipoosmótico. Asimismo, Bao y col., (2008) informaron que la subunidad catalítica de PKA en *T. cruzi* (TcPKAc) interactúa con TcrPDEC2 y dos proteínas implicadas en la osmorregulación: una acuaporina (TcAQP) y TcVps34, entre otras proteínas. Además, la caracterización de TcVps34 en *T. cruzi* mostró que dicha quinasa participa en endocitosis mediada por receptor y osmorregulación bajo condiciones de estrés hipoosmótico en el parásito (Schoijet y col., 2008).

En concordancia, en la mayoría de las células de mamíferos el estrés hiperosmótico causa encogimiento celular debido al eflujo osmótico de agua resultando en un incremento en la fuerza iónica intracelular. Esta rápida reducción en el volumen celular es corregida por el incremento del volumen regulatorio. Este proceso es mediado por sistemas de transporte de iones, incluyendo co-transportadores de Na^+ - K^+ - Cl^- e intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Zhu-Hong y col.; 2011). Además, Montalvetti y col. (2004), Rohloff y col., (2004); Rohloff y col., (2008) informaron que *T. cruzi* posee un gen (TcAQP) que codifica para una proteína con alta homología a las acuoporinas de plantas. Este gen se clonó, secuenció y su producto se localizó en acidocalcisomas y en el complejo de la vacuola contráctil del parásito. De modo que, esta acuaporina sería la responsable de la entrada de agua en el lumen de los acidocalcisomas, como consecuencia de la acumulación de Na^+ en el interior de la misma. El incremento en la fuerza iónica es contrarrestado por la síntesis temprana de poliP y secuestro de iones inorgánicos en los acidocalcisomas, siendo estos reemplazados por aminoácidos, osmolitos compatibles.

En el recto del triatomino, lugar donde ocurre la metacicloogénesis, se produce un incremento en la osmolaridad (320 mOsm - 1000 mOsm) equivalente a 1M de manitol, y un aumento en el contenido de iones Na^+ , Cl^- y K^+ , es uno de los principales cambios observados en el vector (Kollien y Schaub, 2000; Kollien y col., 2001). En este sentido, la activación del intercambiador Na^+/H^+ en un medio hiperosmolar, sugiere la participación de esta proteína en la adaptación celular frente al estrés hiperosmótico. Para corroborar esta hipótesis se estudió el efecto de la alta osmolaridad a lo largo del crecimiento de los parásitos imitando las condiciones del recto del triatomino donde los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes. La hiperosmolaridad del medio de incubación fue capaz de inducir el desarrollo de formas intermedias entre epimastigotes y tripomastigotes (Fig. 30 y 31). La estimulación de los parásitos en cultivo y/o en un periodo de 2 hs en condiciones de alta osmolaridad y en presencia de EIPA produjo un retraso en la aparición de las formas intermedias. Estas formas parasitarias se caracterizan por poseer el kinetoplasto adyacente al núcleo. Además, mostraron un incremento en la longitud del flagelo, considerado a ser una pre-adaptación de los epimastigotes en la diferenciación a tripomastigotes (Tyler y col., 2000; Giménez y col., 2011).

La metacicloogénesis es un evento importante en el ciclo de vida del parásito y probablemente esté dirigido por diversos mecanismos de transducción de señales. Además, en nuestro laboratorio se demostró que el estrés osmótico aumenta el número

de recambio de fosfolípidos, al igual que la actividad lípido quinasa como consecuencia de la activación de la PLC (Gimenez y col.; 2011). Un importante punto a enfatizar es el compromiso de la PLC en el respuesta al estrés hiperosmótico en formas epimastigote. La acumulación de IP_3 en un medio hiperosmolar, sensible a U73122-inhibidor de PLC-, demostró la participación de la misma como parte de la respuesta del parásito (Bonansea-Usorach y col.; 2012). Aunque diversos estímulos provocan la activación de PLC, ésta no siempre debería implicar la presencia de un receptor de membrana plasmática. En este sentido, experimentos “in vitro” llevados a cabo con la TcPI-PLC aislada de *T. cruzi*, miembro de las tipo $\delta 1$, demostraron una absoluta dependencia por el Ca^{2+} para su actividad (Nozaky y col., 1999; Furuya y col., 2000). Consecuentemente, la inhibición de la acumulación de IP_3 en parásitos pretratados con BAPTA en respuesta a la alta osmolaridad está en concordancia con lo anteriormente mencionado y permiten reafirmar la dependencia de la PLC con respecto al Ca^{2+} citosólico (Bonansea-Usorach y col.; 2012). Además, la inhibición del intercambiador Na^+/H^+ por EIPA, el cual afecta la liberación de Ca^{2+} desde acidocalcisomas, también suprimió los incrementos en los niveles de IP_3 originados por el estrés hiperosmótico (Bonansea-Usorach y col.; 2012). De modo que, es posible considerar que previamente a la activación de la PLC se produciría la del intercambiador Na^+/H^+ , mediado por PKA, con la subsiguiente liberación de Ca^{2+} . Estos hechos sugieren que la activación de la PLC es consecuencia del incremento de Ca^{2+} que proviene de estas vesículas ácidas. El esquema general propuesto para las vías de señalización que se activan como consecuencia del estrés hiperosmótico se muestra en la Fig. 37.

En base a los antecedentes de nuestro laboratorio y a los resultados en la presente tesis inferimos que en el recto del triatomino los epimastigotes sufren shock hiperosmótico cuyos efectos en la membrana celular estarían a nivel de la activación de varias enzimas de señalización y la consecuente formación de segundos mensajeros. El estrés hiperosmótico dispararía señales que conducen a los epimastigotes a cambios indicativos de la inducción de la metaciclologénesis, diferenciación de epi a tripomastigote. Si bien, las actividades enzimáticas mencionadas son estimuladas por la alta osmolaridad; no significa que sean las vías ejecutoras de la diferenciación del parásito pero si las responsables, en parte, de los cambios estructurales y bioquímicos que conducen a la diferenciación, por lo menos, al estadio intermedio.

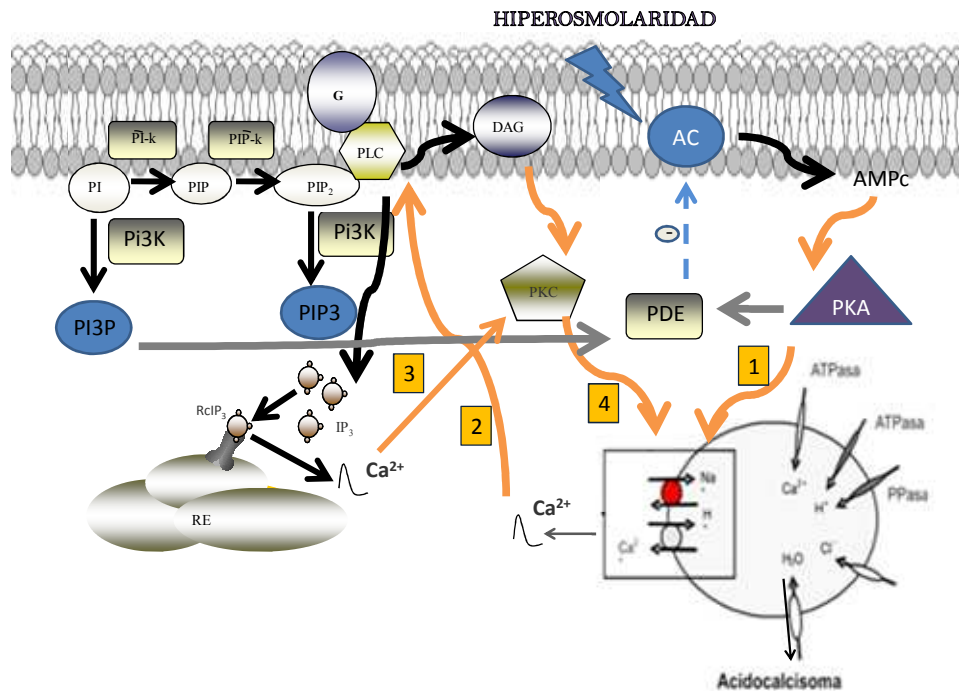


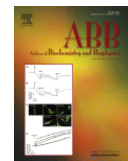
Fig. 37: Esquema propuesto de las vías de señalización activadas por estrés hiperosmótico en epimastigotes. Las flechas naranjas indican activación, la flecha celeste inhibición, las flechas negras, sentido de la reacción enzimática y las flechas grises, interacción.

PUBLICACIONES OBTENIDAS EN ESTA TESIS DOCTORAL

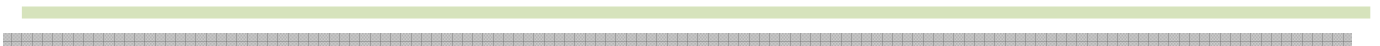
- Sergio Bonansea, **Melina Usorach**, María Celeste Gesumaría, Verónica Santander, Alba Marina Gimenez, Mariana Bollo, Estela E. Machado. Stress response to high osmolarity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 527 (2012) 6–15.

Una de las imágenes del paper fue elegida para tapa de la revista *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 527, Issue 1, Pages 1-64 (1 November 2012).

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00039861/527/1>



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso G, Schoijet A, Torres H, Flawiá M. (2005). TcPDE4, a novel membrane associated cAMP-specific phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Biochemical Parasitology* **145**: 40–49.
- Alonso G, Schoijet A, Torres H, Flawiá M. (2007). TcrPDEA1, a cAMP-specific phosphodiesterase with atypical pharmacological properties from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Biochemical Parasitology* **152**: 72–79.
- Andersson TP, Sköld HN, Svensson SP. (2003). Phosphoinositide 3-kinase is involved in *Xenopus* and *Labrus melanophore* aggregation. *Cell Signal.* **15**(12):1119–27.
- Andrade D, Gollob K, Dutra W. (2014). Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Negl Trop Dis* **8**(7): e3010.
- Atwood JA 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R, Tarleton RL. (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*.**309**:473–6.
- Bao Y, Weiss M, Braunstein V, Huang H. (2008). Role of Protein Kinase A in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* **76**: 4757–4763.
- Belaunzarán ML, Lammel EM, Giménez G, Wainszelbaum MJ, de Isola EL. (2009). Involvement of protein kinase C isoenzymes in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis induced by oleic acid. *Parasitol Res.* **105**: 47–55.
- Benchimol M, De Souza W, Vanderheyden N, Zhong L, Lu H-G, Moreno SN, Docampo R (1998). Functional expression of a vacuolar-type H⁺-ATPase in the plasma membrane and intracellular vacuoles of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* **332**: 695–702.

- Beraldo FH, Sartorello R, Gazarini ML, Caldeira W, Garcia CR. (2002). Red blood cells of the lizards *Ameiva ameiva* (Squamata, Teiidae) display multiple mechanisms to control cytosolic calcium. *Cell Calcium* **31**: 79-87.
- Berridge MJ. (1991). Caffeine inhibits inositol-trisphosphate-induced membrane potential oscillations in *Xenopus* oocytes. *Proc Biol Sc.* **244** (1309): 57-62.
- Berridge M. (1993). "Inositol trisphosphate and calcium signalling". *Nature* **361**: 315-325.
- Berridge MJ. (1996). "Elementary and global aspects of calcium signalling". *J. Physiol.* **499**: 291-306.
- Berridge MJ. (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* **1793**: 933-40.
- Bezprozvanny I, Watras J, Ehrlich BE. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* **351**(6329): 751-754.
- Biswas S, Dalal B, Sen M, Biswas BB.(1995). Receptor for myo-inositol trisphosphate from the microsomal fraction of *Vigna radiata*. *Biochem J.* **306**: 631-6.
- Bollo M, Venera G, de Jimenez Bonino M, Machado-Domenech E. (2001). "Binding of nicotinic ligands to and nicotine-induced calcium signaling in *Trypanosoma cruzi*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**: 300-304.
- Bollo M, Bonansea S, Machado E. (2006) Involvement of Na⁺/H⁺ exchanger in the calcium signaling in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett* **580**: 2686-2690.
- Bonansea S. (2007). "Inositol trisfosfato y señal de calcio en formas epimastigote de *Trypanosoma cruzi*". *Tesis doctoral*, Universidad Nacional de Río Cuarto.

- Bonansea S, Usorach M, Gesumaria MC, Santander V, Gimenez AM, Bollo M, Machado EE. Stress response to high osmolarity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **527** (2012) 6–15.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Busch S, Wieland T, Esche H, Jakobs KH, Stilfert WJ. (1995). G protein regulation of the Na⁺/H⁺ antiporter in *Xenopus laevis* oocytes. Involvement of protein kinases A and C. *Biol. Chem.* **270**: 17898-17901.
- Calvert CM, Sanders D. (1995). Inositol trisphosphate-dependent and -independent Ca²⁺ mobilization pathways at the vacuolar membrane of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **270**: 7272-7280.
- Chagas C. (1909). “Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. , agente etiologico de nova entidade morbida do homem”. *Mem. Inst. Osw. Cruz* **1**: 159-218.
- Coso O, Díaz Añel A, Martinetto H, Muschietti J, Kazanietz M, Fraidenraich D, Torres H, Flawiá M. (1992). Characterization of a G_i-protein from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes membranes. *Biochem. J.* **287**: 443-446.
- Counillon L, Pouyssegur J. (2000). “The expanding family of eukaryotic Na⁺/H⁺ exchangers”. *J. Biol. Chem.* **275**: 1-4.
- de Souza W. (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94** (Suppl. 1): 17–36.
- de Souza W, Porto Carreiro I, Miranda K, Cunha E, Silva N. (2000). “Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*”. *An. Acad. Bras. Ci.* **72**: 421-432.

- Dibrov P, Fliegel L. (1998).** Comparative molecular analysis of Na⁺/H⁺ exchangers: a unified model for Na⁺/H⁺ antiport. *FEBS Lett.* **424**: 1-5.
- Diotaiuti L, Pereira A, Loiola C, Fernández A, Schofield C, Dujardin J, Días J, Chiari E. (1995).** Interrelation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brasil. *Mem. Inst. Osw. Cruz* **90**: 443-448.
- Docampo R, Pignataro O. (1991).** "The inositol phosphate-diacylglycerol signalling pathway in *Trypanosoma cruzi*". *Biochem. J.* **275**: 407-411.
- Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SNJ. (1995).** Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* **310**: 1005-12.
- Docampo R, Moreno SNJ. (1999).** Acidocalcisome: a novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol Today* **15**: 443-8.
- Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno S. (2005).** Acidocalcisomes-Conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiol.* **3**:251-261.
- **Docampo R, Jimenez V, Lander N, Li ZH, Niyogi S. (2013).** New insights into roles of acidocalcisomes and contractile vacuole complex in osmoregulation in protists. *Int Rev Cell Mol Biol.* **305**:69-113.
- Eisenschlos C, Paladini A, Molina Vedia L, Torres H, Flawiá M. (1986).** "Evidence for the existence of an Ns-type regulatory protein in *Trypanosoma cruzi* membranes". *Biochem. J.* **237**: 913-917.
- El-Sayed NM, et. al. (2005).** The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* **309**: 409-415.

- Flaadt H, Jaworski E, Malchow D.** (1993). Evidence for two intracellular calcium pools in *Dictyostelium*: the cAMP-induced calcium influx is directed into a NBD-Cl- and 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-hydroquinone-sensitive pool. *J. Cell. Sci.* **105**: 1131-1135.
- Flawiá MM, Tellez-Iñon MT, Torres HN.** (1997). Signal transduction mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* **13**:30-3.
- Fraidenraich D, Peña C, Isola E, Lammel E, Coso O, Díaz Añel A, Pongor S, Barralle F, Torres H, Flawiá M.** (1993). Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an α^D -globin fragment from *Triatoma* hindgut. Effect on differentiation of epimastigote forms to trypomastigote forms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 10140-10144.
- Furuya T, Kashuba C, Docampo R, Moreno S.** (2000). "A novel phosphatidylinositol-phospholipase C of *Trypanosoma cruzi* that is lipid modified and activated during trypomastigote to amastigote differentiation". *J. Biol. Chem.* **275**: 6428-6438.
- Garrido M, Bollo M, Machado-Domenech E.** (1996a). "Carbachol stimulates inositol phosphate formation transiently in *Trypanosoma cruzi*". *Cell. Mol. Biol.* **42**: 221-225.
- Garrido M, Bollo M, Machado-Domenech E.** (1996b). "Biphasic and dose-dependent accumulation of InsP₃ in *Trypanosoma cruzi* stimulated by a synthetic peptide carrying a chicken α^D -globin fragment". *Cell. Mol. Biol.* **42**: 850-864.
- Gimenez M.** (2009). "Señal celular en *Trypanosoma cruzi*: Participación del citoesqueleto en el metabolismo de fosfolípidos y función de enzimas relacionadas" Segundo Informe de Tesis Doctoral.
- Gimenez AM, Santander VS, Villasuso AL, Pasquare SJ, Giusto NM and Machado EE.** (2011). Regulation of Phosphatidic Acid Levels in *Trypanosoma cruzi*. *Lipids*. DOI 10.1007/s11745-011-3577-6

- Gomez ML, Erijman L, Arauzo S, Torres HN, Téllez-Iñón MT. (1989). Protein kinase C in *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms: partial purification and characterization. *Mol. Biochem. Parasitol.* **36**, 101-106.
- Hashimoto M, Enomoto M, Morales J, Kurebayashi N, Sakurai T, Hashimoto T, Nara T, Mikoshiba K. (2013). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates replication, differentiation, infectivity and virulence of the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol.* **87**(6):1133-50.
- Huang G, Bartlett P, Thomas A, Moreno S, Docampo R. (2012). Acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei* have an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor that is required for growth and infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **29**;110(5):1887-92.
- Isola ELD, Lammel EM, Gonzalez-Cappa SM. (1986). “*Trypanosoma cruzi* differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate”. *Exp. Parasitol.* **62**: 329-335.
- Jiménez-Ortiz A, Adroher F, Lupiañez J, Castanys S, Ruiz-Pérez L, Camarro F, Carreras M, Benítez-Rodríguez R, Osuna A. (1987). “Influencia de las alteraciones de pH en los medios de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*”. *Rev. Ibér. Parasitol.* **47**: 23-27.
- Kim HS, Hayashi M, Shibata Y, Wataya Y, Mitamura T, Horii T, Kawauchi K, Hirata H, Tsuboi S, Moriyama Y. (1999). Cycloprodigiosin hydrochloride obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans* is a potent antimalarial agent. *Biol Pharm Bull*; **22**: 532-4.
- King-Keller S, Li M, Smith A, Zheng S, Kaur G, Yang X, Wang B, Docampo R. (2010). Chemical Validation of Phosphodiesterase C as a Chemotherapeutic Target in *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother.*

- Kollien A, Schaub G. (1998). "Development of *Trypanosoma cruzi* after starvation and feeding of the vector – A review". *J. Exp. Clin. Med.* **23**: 335-340.
- Kollien A, Schaub G. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatomine. *Parasitol. Today* **16**: 381-387.
- Kollien A, Schmidt J, Schaub G. (2001). "Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*". *Acta Tropica* **70**: 127-141.
- Kornberg A. (1995). Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J Bacteriol*; **177**: 491-6.
- Kunz S, Oberholzer M, Seebeck T(2005). A FYVE-containing unusual cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*. *FEBS J.* **272**(24):6412-22.
- Ladenburger EM, Korn I, Kasielke N, Wassmer T, Plattner H. (2006). An Ins(1,4,5)P₃ receptor in Paramecium is associated with the osmoregulatory system. *Journal of Cell Science* **119**, 3705-3717.
- Lammel EM, Barbieri MA, Wilkowsky SE, Bertini F, Isola ELD. (1996) "*Trypanosoma cruzi*: involvement of intracellular calcium in multiplication and differentiation". *Exp. Parasitol.* **83**: 240-249.
- Lovett JL, Marchesini N, Moreno SN, Sibley LD.(2002). *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca²⁺ release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)/ryanodine-sensitive stores. *J Biol Chem.* **277**: 25870-6.
- Lu H-G, Zhong L, De Souza W, Benchimol M, Moreno SJ, Docampo R (1998). Ca²⁺ content and expression of an acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Cell Biol* **18**: 2309-2323
- Luo SH, Marchesini N, Moreno SNJ, Docampo R. (1999). A plant-like vacuolar H⁺-pyrophosphatase in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett* **460**: 217-220.

- Machado-Domenech E, Garrido M, García M, Racagni G. (1992). "Phospholipid of *Trypanosoma cruzi*: increase of polyphosphoinositides and phosphatidic acid after cholinergic stimulation". *FEMS Microbiol. Lett.* **95**: 267-270.
- Marchesini N, Bollo M, Hernández G, Garrido M, Machado-Domenech E. (2002). "Cellular signalling in *Trypanosoma cruzi*: biphasic behaviour of inositol phosphate cycle components evoked by carbachol". *Mol. Biochem. Parasitol.* **120**: 83-91.
- Masuda W, Takenaka S, Tsuyama S, Tocunaga M, Yamaji R, Inui IL, Miyalake K, Nakano Y. (1997). Inositol 1,4,5-trisphosphate and cyclic ADP-ribose mobilize Ca^{2+} in a protist, *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol.* **118**: 279-283.
- Matsuoka T, Moriyama N, Kida A, Okuda K, Suzuki T, Kotsuki H. (2000). Immunochemical analysis of a photoreceptor protein using anti-IP₃ receptor antibody in the unicellular organism, *Blepharisma*. *J Photochem Photobiol B.* **54**(2-3):131-5.
- Meldolesi J, Pozzan T. (1998). "The heterogeneity of ER Ca^{2+} stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function". *J Cell Biol.* **142**: 1395-1398.
- Meyer A. (1904). Orientierende Untersuchungen ueber Verbreitung. Morphologie, und Chemie es Volutins. *Bot Zeit*; **62**: 113-52.
- Miranda K, Benchimol M, Docampo R, de Souza W. (2000). "The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*". *Parasitol. Res.* **86**: 373-384.
- Montalvetti A, Rohloff P, Docampo R. (2004). A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* **279**: 38673-82.
- Moolenaar WH. (1986). Effects of growth factors on intracellular pH regulation. *Ann. Rev. Physiol.* **48**: 363-376.

- Moreno S, Vercesi A, Pignataro O, Docampo R. (1992). Calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes: presence of inositol phosphates and lack of an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium pool. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**: 251-261.
- Moreno SN, Silva J, Vercesi A, Docampo R. (1994). Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J. Exp. Med.* **180**: 1535-1540.
- Moreno SNJ, Zhong L, De Souza W, Benchimol M. (1998). Vacuolar-type H⁺-ATPase regulates cytoplasmic pH in *Toxoplasma gondii*. *Biochem J* **330**: 853-860.
- Moreno SNJ, Docampo R. (2003). Calcium regulation in protozoan parasites. *Current Opinion in Microbiology*, **6**: 359-364.
- Moreno S, Docampo R. (2008). The Role of Acidocalcisomes in Parasitic Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **56**: 208-213
- Nass R, Rao RJ. (1998). Novel localization of a Na⁺/H⁺ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. *Biol. Chem.* **273**, 21054-21080.
- Orlowski J, Grinstein S. (1997). Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 22373-22376.
- Osuna A, Adroher F, Lupiáñez J. (1990). "Influence of electrolytes and non-electrolites on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*". *Cell. Differ. Dev.* **30**: 89-95.
- Osuna-Carrillo A, Jiménez-Ortíz A, Lozano-Maldonado J. (1979). "Medios de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*". *Rev. Ibér. Parasitol.* **39**: 129-133.
- Ouassiss A, Cornette J, Schöneck R, Plumas-Marty B, Taibi A, Loyens M, Capron A. (1992). Fibronectin cleavage fragments provide a growth factor-like

activity for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes. *Eur J Cell Biol.* **59**:68–79.

-Oz HS, Wittner M, Tanowitz HB, Bilezikian JP, Saxon M, Morris SA. (1992). “*Trypanosoma cruzi*: Mechanisms of intracellular calcium homeostasis” *Exp. Parasitol.* **74**: 390-399.

-Padan E, Schuldiner S. (1994). Molecular physiology of Na⁺/H⁺ antiporters, key transporters in circulation of Na⁺ and H⁺ in cells. *Biochim Biophys Acta* **1185**:129-151.

-Padan E, Venturi M, Gerchman Y, Dover N. (2000). Na⁺/H⁺ antiporters. *Biochim Biophys Acta* **1505**: 144.-157.

-Palmgren MG. (1991). “Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanism and limitations” *Anal. Biochem.* **192**: 316-321.

-Parker I, Ivorra I. (1991). Caffeine inhibits inositol trisphosphate-mediated liberation of intracellular calcium in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*; **433**: 229-40.

-Passos AP, Garcia CR. (1998). “Inositol 1,4,5-trisphosphate induced Ca²⁺ release from chloroquine-sensitive and -insensitive intracellular stores in the intraerythrocytic stage of the malaria parasite *P. Chabaudi*”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**: 155-160.

-Patel S, Docampo R. (2010). Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca²⁺ signaling. *Trends Cell Biol.* **20**(11):627.

-Pederson SF, Varming C, Christensen ST, Hoffmann EK. (2002). Mechanisms of activation of NHE by cell shrinkage and by calyculin A in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membr. Biol.* **189**, 67-81.

- Philosoph H, Zilberstein D. (1989). Regulation of intracellular calcium in promastigotes of the human protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **264**: 10420-10424.
- Racagni G, Machado de Domenech E. (1991). "Phosphatidylinositol kinase, phosphatidylinositol 4-phosphate kinase and diacylglycerol kinase activities in *Trypanosoma cruzi*". *Mem. Inst. Osw. Cruz.* **86**: 166.
- Racagni G, García de Lema M, Domenech C, Machado de Domenech EE. (1992). "Phospholipids in *Trypanosoma cruzi*: phosphoinositide composition and turnover". *Lipids* **27**: 275-278.
- Raha S, Dalal B, Biswas S, Biswas BB. (1994). Myo-inositol trisphosphate-mediated calcium release from internal stores of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* **65**(1): 63-71.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto J (2010). Chagas disease. *Lancet*, **375**: 1388-402.
- Rodrigues CO, Scott DA, Docampo R. (1999). Characterization of a vacuolar pyrophosphatase in *Trypanosoma brucei* and its localization to acidocalcisomes. *Mol Cell Biol* **19**: 7712-7723.
- Rodrigues CO, Scott DA, Bailey B, De Souza W, Benchimol M, Urbina J, Oldfield E, Moreno SNJ. (2000). Vacuolar proton pyrophosphatase activity and pyrophosphate in *Toxoplasma gondii* as possible chemotherapeutic targets. *Biochem J* **349**: 737-745.
- Rohloff P, Montalvetti A, Docampo R. (2004). Acidocalcisomes and the Contractile Vacuole Complex Are Involved in Osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol. Chem.* **279**:52270-52281.
- Rohloff P, Docampo R. (2008). A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* **118**:17-24.

- Ron D, Kazanietz G.** (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptor. *FASEB Journal* **13**: 1658-1676.
- Rooney EK, Gross JD, Satre M.** (1994). Characterization of intracellular Ca²⁺ pump in *Dictyostelium*. *Cell Calcium* **16**: 509-522.
- Rotte A, Pasham V, Yang W, Eichenmüller M, Bhandaru M, Shumilina E, Lang F.** (2010). Phosphoinositide 3-kinase-dependent regulation of Na⁺/H⁺ exchanger in dendritic cells. *Pflugers Arch.* **460**(6):1087-96.
- Santander V, Bollo M, Machado-Domenech E.** (2002). "Lipid kinases and Ca²⁺ signaling in *Trypanosoma cruzi* stimulated by a synthetic peptide". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**: 314-320.
- Santander V.** (2004). Lípido quinasas de *Trypanosoma cruzi*: respuesta a la estimulación celular y mecanismos involucrados en las señales de transducción. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Schaub G, Lösch P.** (1988). "*Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*". *Exp. Parasitol.* **65**: 174-186.
- Scott D, Docampo R, Dvorak J, Shi S, Leapman R.** (1997). "Ca²⁺ storage in *Trypanosoma brucei*: the influence of cytoplasmic pH and importance of vacuole acidity". *Biochem. J.* **310**: 789-794.
- Scott DA, de Souza W, Benchimol M, Zhong L, Lu HG, Moreno SN, Docampo R.** (1998). Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* **273**: 22151-8.
- Scott DA, Docampo R.** (2000). Characterization of isolated acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*; **275**: 24215-21.

- Sorrentino V, Barone V, Rossi D. (2000). Intracellular Ca^{2+} release channels in evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**: 662-667.
- Schoijet AC, Miranda K, Girard-Dias W, de Souza W, Flawiá MM, Torres HN, Docampo R and Alonso GD. (2008). A *Trypanosoma cruzi* phosphatidylinositol 3-kinase (TcVps34) is involved in osmoregulation and receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem.* **283**: 31541-50.
- Shrode L, Cabado A, Goss G, Grinstein S. (1996). Role of the Na^+/H^+ antiporter isoforms in cell volume regulation. In *the Na^+/H^+ Exchanger* (Fliegel, L., ed.), pp 101-122, Springer/R.G. Landes Company, Austin.
- Srinivas SP, Ong A, Goon L, Bonanno JA. (2002). Lysosomal Ca^{2+} stores in bovine corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 2341-2350.
- Stojdl DF, Clarke MW. (1996). *Trypanosoma brucei*: analysis of cytoplasmic Ca^{2+} during differentiation of bloodstream stages in vitro. *Exp Parasitol*, **83**: 134-146.
- Sutko JL, Airey JA. (1996). Ryanodine receptor Ca^{2+} release channels: does diversity in form equal diversity in function? *Physiol. Rev.* **76**: 1027-1071.
- Tyler K, Engman D. (2000). Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton* **46**: 269-278.
- Ulloa R, Mesri E, Esteva M, Torres H, Tellez-Iñiún M. (1988). "Cyclic AMP-dependent protein kinase in *Trypanosoma cruzi*". *Biochem. J.* **255**: 319-326.
- Urbina J, Moreno B, Vieerotter S, Oldfield E, Payares G, Sanoja C, Bailey B, Yan W, Scott D, Moreno S, Docampo R. (1999). "*Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores and its growth in vitro is blocked by pyrophosphate analogs". *J. Biol. Chem.* **274**: 33609-33615.
- Vercesi AE, Moreno SNJ, Docampo R. (1994). $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J*; **304**: 227- 33.

- Vercesi AE, Docampo R. (1996). Sodium-proton exchange stimulates Ca^{2+} release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* **315**: 265-270.
- Vercesi AE, Grijalba MT, Docampo R. (1997). Inhibition of Ca^{2+} release from *Trypanosoma brucei* acidocalcisomes by 3,5-dibutyl-4-hydroxytoluene (BHT): role of the Na^+/H^+ exchanger. *Biochem J* **328**: 479-482.
- Yoshida N, Favoreto Jr S, Ferreira AT, Manque PM. (2000). Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz. Journal. Medical. And Biol. Research.* **33**: 269-278.
- Wainszelbaum MJ, Belaunzaran ML, Lammel EM, Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, Isola EL. (2003). Free fatty acids induce cell differentiation to infective forms in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* **375**: 705-12.
- Wang H, Singh D, Fliegel LJ. (1997). The Na^+/H^+ antiporter potentiates growth and retinoic acid-induced defferentiation of pig embrional carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 26545-26549.
- Warren L. (1960). Metabolism of *Schizotrypanun cruzi* . Chagas I. Effect of culture age and substrate concentration on respiration rate. *J. Parasitol.* **46**: 429-539.