

Tesis de Posgrado

Glicoconjugados de Trypanosoma Cruzi : caracterización de sialoglicolípidos

Confalonieri de Ozdy, Adriana Norma

1987

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Confalonieri de Ozdy, Adriana Norma. (1987). Glicoconjugados de Trypanosoma Cruzi : caracterización de sialoglicolípidos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2051_ConfalonierideOzdy.pdf

Cita tipo Chicago:

Confalonieri de Ozdy, Adriana Norma. "Glicoconjugados de Trypanosoma Cruzi : caracterización de sialoglicolípidos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2051_ConfalonierideOzdy.pdf

**GLICOCONJUGADOS DE
TRYPANOSOMA CRUZI**

Caracterización de sialoglicolípidos

**ADRIANA N. CONFALONIERI DE OZDY
1987**

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

GLICOCONJUGADOS DE TRYPANOSOMA CRUZI

CARACTERIZACION DE SIALOGLICOLIPIDOS

Director de Tesis

Dra. Rosa M. de Lederkremer

Lugar de Trabajo

Departamento de Química Orgánica

ADRIANA NORMA CONFALONIERI DE OZDY

Tesis presentada para optar al Título de

DOCTOR EN QUIMICA

-1987-

*A Andrés y nuestros hijos:
Luciana y Matías, quienes son lo
más importante en mi vida.*

*A mis padres, por mostrarme
el camino.*

*A mis hermanos, Viviana y Ale-
jandro que siempre están a mi lado.*

*Agradezco sinceramente a la Dra.
Rosa Muchnik de Lederkremer,
directora de este trabajo de tesis
por su permanente dedicación y
apoyo, que permitió mi correcta
formación científica.*

Agradezco:

- Al Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por haberme concedido el lugar de trabajo.
- Al CONICET, por haberme otorgado becas de Iniciación y Perfeccionamiento que me permitieron realizar parte de este trabajo de tesis.
- Se agradece la ayuda financiera de UNDP/ World Bank (WHO) (OMS) Programa especial para la investigación en enfermedades tropicales, y de SECYT.
- Al Dr. Walter Colli y colaboradores por la provisión de cultivos de T.cruzi, cepa Y.
- A la Dra Elsa Segura y colaboradores, del Instituto Fátala Chabén, por la provisión de los cultivos de T.cruzi, cepa Tulahuén.
- A UMIMFOR (CONICET-FCEN) y a su personal por el equipo técnico suministrado
- A las Lic. María de las Mercedes Rivero y María Moglia, la realización de los c.g.l
- Al Sr. Jorge Aznares la realización de los c.g.l. acoplados a espectrometría de masas
- Al Dr. Pedro Cattáneo por su cooperación con testigos de ácidos grasos y bibliografía.

- Al Dr. Arturo Vitale por su ayuda informática.
- A mis compañeros de laboratorio Liliana Casal, Daniel Cicceró, Alicia Couto, Cecile du Mortier, Griselda de Fina, Jose Groisman Lucio Jeroncic, Carlos Lima, Carla Marino, Elisa Oliva, Marcos Snaidman, Oscar Varela y Claudio Wolfenson, por compartir los buenos y malos momentos de este trabajo.
- A los restantes compañeros, profesores y demás miembros del Dto de Química Orgánica por su permanente cordialidad y apoyo.

INTRODUCCION

Es conocida la importancia de la Enfermedad de Chagas en nuestro país y en otros de Latinoamérica. Por los datos publicados, se estima que unas veinte millones de personas están infectadas con Trypanosoma cruzi. Subsisten muchas incógnitas en cuanto al comportamiento del parásito en sus huéspedes invertebrados y vertebrados. La participación de glicoconjugados en ciertas funciones biológicas, como la respuesta inmune, la adhesión celular, la diferenciación y crecimiento celular ya ha sido demostrada para otros sistemas. El conocimiento de la estructura de los glicoconjugados permitirá encarar su modificación por la acción de análogos de azúcares que podrían interferir en su biosíntesis.

En este trabajo de tesis se utilizaron células epimastigote de más fácil obtención en las cantidades necesarias para estudios estructurales.

Un hecho saliente es la caracterización por primera vez de gangliósidos en las células. Este resultado es interesante desde dos enfoques:

- a) Por la función de los sialoglicolípidos en la regulación de fenómenos biológicos.
- b) Desde el punto de vista de la evolución ya que los gangliósidos son característicos de vertebrados y sólo se describieron en pocos invertebrados

En primer lugar se ha conseguido incorporar (³H)-palmítico

y (^3H)-galactosa lo cual confirmó que los gangliósidos no provienen del medio complejo en que se cultiva el parásito. Los mismos se han marcado también en forma exógena por dos métodos:

a) Oxidación con galactosa-oxidasa seguida de reducción con B^3H_4

b) Oxidación controlada con IO_4^- , seguida de reducción con B^3H_4 método que marca selectivamente azúcares con glicoles exocíclicos como el ácido siálico.

En esta tesis se ha conseguido marcar por todos los métodos mencionados, y purificar dos gangliósidos. La determinación de su composición permitió establecer diferencias notables con la composición de gangliósidos animales, tanto en los azúcares como en la fracción lipídica de las moléculas. Esas diferencias con la célula huésped, puede ser un objetivo para el ataque al parásito.

CAPITULO I

TRYPANOSOMA CRUZI

TAXONOMIA Y MORFOLOGIA

1.1 INTRODUCCION

Los trypanosomas son protozoarios parásitos que causan algunas de las más importantes enfermedades del hombre.

Estas enfermedades, que incluyen la Trypanosomiasis africana (enfermedad del sueño), trypanosomiasis sudamericana (enfermedad de Chagas) y la leishmaniasis (kala-azar), atacan a millones de seres humanos, principalmente en los continentes en vías de desarrollo.

Por otra parte, debido a la trypanosomiasis bovina, la mayor parte del continente africano no es apto para la crianza de bovinos y, consecuentemente, contribuye a la malnutrición humana.

Se conocen pocos tratamientos satisfactorios para estas enfermedades, por ello es importante el estudio de estos parásitos en sus aspectos bioquímicos, médicos y de biología molecular.

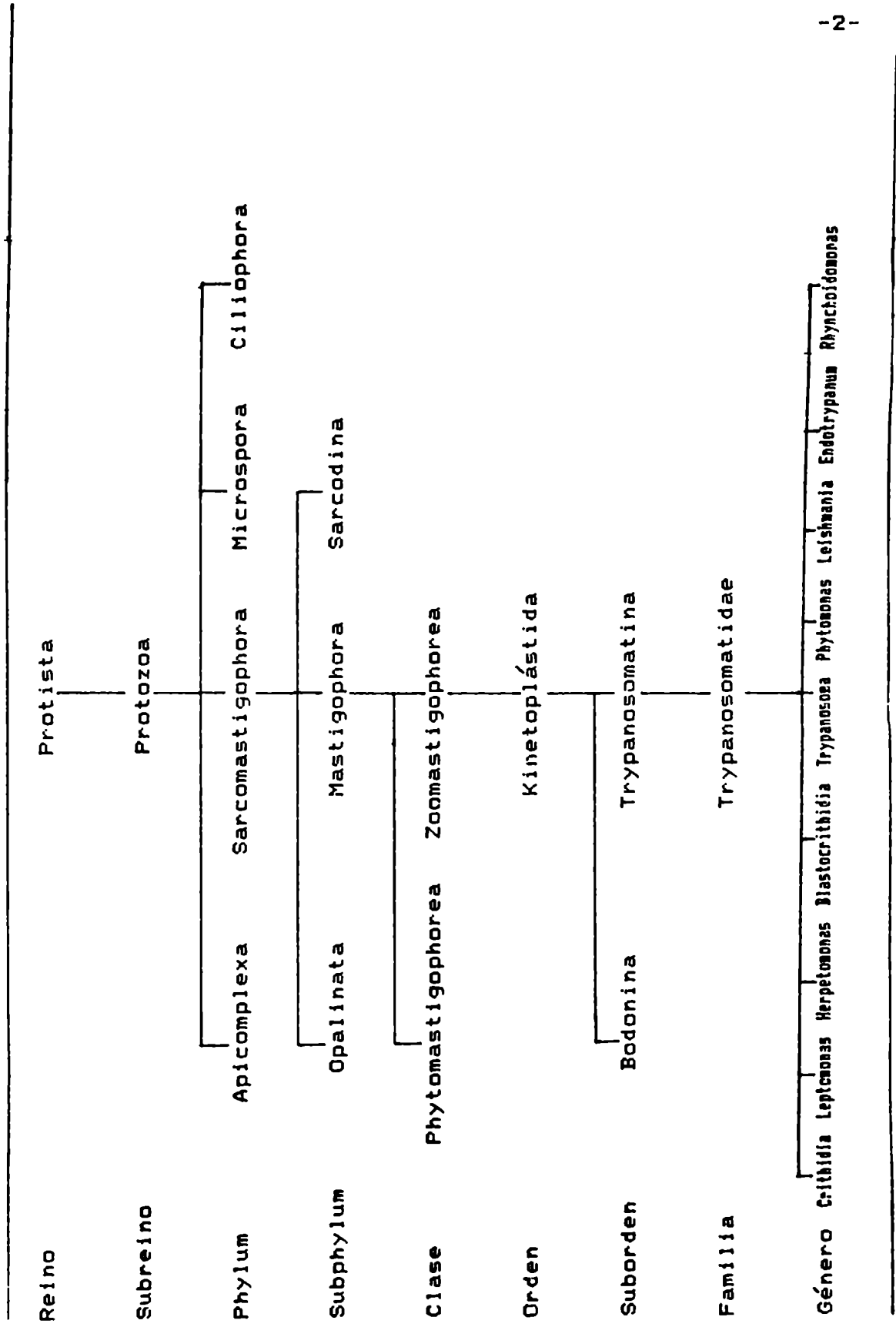
1.2 CLASIFICACION GENERAL DE LOS TRYPANOSOMATIDEOS

Estos organismos representan algunos de los más primitivos y especializados del reino animal. La clasificación más reciente (1), designa a Protozoa como un subreino, y ubica a la familia Trypanosomatidae según la Tabla I

El subreino protozoa se divide en cuatro phila.

El Sarcomastigophora incluye al subphylum Mastigophora que corresponde a los protozoarios que poseen uno o más fla-

Tabla I: Clasificación general de los trypanosomatídeos (1)



gelos . La mayoría de estos organismos son de existencia libre , pero un número considerable de ellos es de naturaleza simbiótica, ya sea de invertebrados o vertebrados. La mayoría de las especies endosimbióticas habitan en los tractos digestivos de sus hospedadores, así como también en los sistemas circulatorios y tejidos. La capacidad natatoria de los flagelados los ha ayudado a adaptarse a distintos entornos. Pueden sobrevivir en medios líquidos tales como la sangre, linfa y fluido cerebroespinal de sus huéspedes. Los trypanosomas exhiben una adaptación aún mayor a la vida en medios líquidos debido a la forma de sus cuerpos celulares. Poseen una apariencia alargada, en forma de torpedo, por lo cual los fluidos corporales les ofrecen escasa resistencia para su desplazamiento.

El subphylum Mastigophora, se divide a su vez en dos clases: Phytomastigophorea, caracterizada por organismos flagelados en que se observan cromatóforos, y Zoomastigophorea , que son flagelados de naturaleza animal, la mayor parte de los cuales son parásitos. Todos los miembros de esta clase carecen de cromatóforos y son en general, mononucleados . Cada organismo posee uno o varios flagelos, dependiendo de la especie. La reproducción asexual se produce por fisión longitudinal, aunque en algunos pocos grupos se conoce la reproducción sexual.

ORDEN KINETOPLASTIDA: Este orden, incluye varias especies de

existencia independiente, además de especies parásitas en plantas, invertebrados o vertebrados. Los kinetoplásticos son en general flagelados pequeños con uno a cuatro flagelos. El cuerpo es de aspecto plástico, pero no ameboidal, como en el orden Rhizomastigida. La reproducción es generalmente por fisión longitudinal y durante el ciclo de vida de las células adoptan usualmente más de una forma (condición denominada polimorfismo) Esto es especialmente cierto entre los miembros de la familia Trypanosomatidae.

El orden Kinetoplástica comprende a su vez dos subórdenes: Bodonina, de existencia libre y Trypanosomatina, de existencia parasitaria. Dentro de este suborden se ubica solamente la familia Trypanosomatidae.

FAMILIA TRYPANOSOMATIDAE: Los miembros de esta familia son todos parásitos. Sus cuerpos son elongados y más o menos achatados. Un único flagelo surge de un befleroplasto cerca del cual se localiza el kinetoplasto. La posición del befleroplasto varía, encontrándose en posición anterior, media o posterior según la especie.

La familia Trypanosomatidae se subdivide a su vez en nueve géneros:

- | | | |
|----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 1) <u>Leptomonas</u> | 2) <u>Herpetomonas</u> | 3) <u>Criithidia</u> |
| 4) <u>Blastocriithidia</u> | 5) <u>Rhinchoidomonas</u> | 6) <u>Leishmania</u> |
| 7) <u>Endotrypanum</u> | 8) <u>Phytomonas</u> | 9) <u>Trypanosoma</u> |

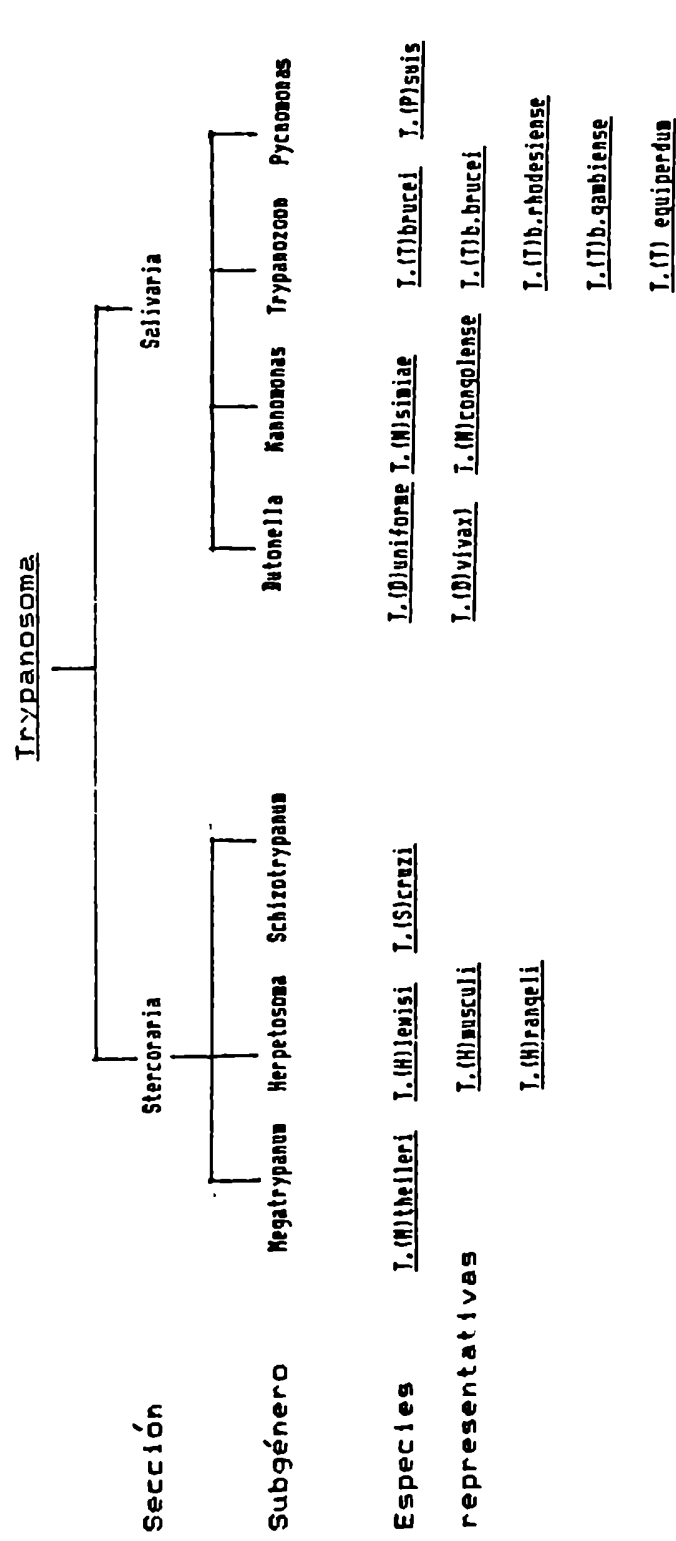
Los primeros cinco géneros de esta Familia son parásitos monogenéticos de animales invertebrados (especialmente insectos), en tanto que los cuatro últimos géneros son parásitos digenéticos cuyo ciclo de vida transcurre entre dos hospedadores: uno de ellos constituido por un invertebrado, o vector en el cual el parásito se desarrolla principalmente en el canal alimentario; el otro un animal o planta, en cuya sangre o tejidos, habitan (*Leishmania*, *Endotrypanum*, *Trypanosoma*). Otros viven en la saliva (*Phytomonas*). Algunos autores sugieren que los trypanosomas digenéticos se originaron a partir de los flagelados monogenéticos. (2)

1.3 TRYPANOSOMA CRUZI

Hoare (3) agrupó a los trypanosomas de mamíferos, según la Tabla II de acuerdo a las siguientes características:

a) Salivaria: Flagelo libre, presente o no; quinetoplasto terminal o subterminal; extremo posterior usualmente redondeado; patogenicidad; desarrollo en el vector de estación anterior; transmisión inoculativa. Las especies incluidas en este grupo serían de evolución más reciente, las que pertenecen a los subgéneros: *Duttonella* (*T. (D) vivax*); *Nannomonas* (*T. (N) congolense*); *Pycnomonas* (*T. (P) suis*); *Trypanozoon* (*T. (T) brucei*, *T. (T) gambiense*, *T. (T) evansi*,

TABLA II: Clasificación del género *Trypanosoma*



T.(T)equiperdum).

Dentro del subgénero Trypanozoon, la especie T.(T) evansi se transmite por contaminación por las patas de las moscas, y el T.(T)equiperdum (que parasita en el ganado equino), por coito.

b) Estercolaria: Grupo más primitivo cuyas características son las siguientes: flagelo libre presente; quinetoplasto grande no terminal; extremo posterior puntiagudo; multiplicación en el mamífero discontinua (sólo en el estadio amastigote); desarrollo en el vector en el estadio posterior; transmisión contaminativa (excepto T.rangelli).

A este grupo pertenecen los subgéneros: Megatrypanum (especies grandes : T.(M)theileri , T.(M)traqalaphi, T.(M)ingens;

Herpetosoma (especies medianas : T.(H)lewisi, T.(H)rangeli,

T.(H)musculi); -Schizotrypanum (especies pequeñas : T.(S)cruzi,

T.(S)pipistirelli). La única especie patógena del grupo es el T.(S)cruzi, el cual es el causante de la enfermedad de Chagas.

Durante mucho tiempo existió una polémica entre los estudiosos de la enfermedad de Chagas sobre la adopción del género Trypanosoma o Schizotrypanosoma, para la identificación del agente etiológico de la enfermedad. Por razones de orden taxonómico y de conveniencia, la gran mayoría de los autores se inclinaron por la denominación Trypanosoma cruzi. Sin embargo, la clasificación de Hoare deja abierta la adopción del nombre Schizotrypanum como subgénero que incluiría especies de trypanosomas relativa-

mente pequeñas, con quinetooplasto voluminoso y subterminal, que presentan multiplicación intracelular, bajo la forma amastigote.

Por lo tanto, la ubicación sistemática del Trypanosoma cruzi es la siguiente:

Reino: Protista

Subreino: Protozoa (Godfus, 1818)

Phylum : Sarcomastigophora (Honigberg y Balamuth, 1963)

Subphylum : Mastigophora (Diesing, 1866)

Clase: Zoomastigophorea (Calkins, 1909)

Orden: Kinetoplástida (Honigberg, 1963)

Suborden: Trypanosomatina (Kent, 1880)

Familia: Trypanosomatidae (Doflein, 1901)

Género: Trypanosoma (Gruby, 1843)

Subgénero: Schyzotrypanum (Chagas, 1906)

Especie: cruzi (Chagas, 1909).

1.4 CICLO EVOLUTIVO DEL TRYPANOSOMA CRUZI

El ciclo evolutivo de este protozario es bastante interesante y complejo. Comprende dos fases: una en un huésped invertebrado (triatomíneo) y otra en un huésped vertebrado (numerosos mamíferos).

En la naturaleza, la perpetuación de la especie se hace por alternancia de los huéspedes, siendo el invertebrado el agente

transmisor. El triatomíneo, al succionar la sangre de un individuo infectado por el parásito, ingiere formas denominadas trypomastigote. A medida que se acercan a la luz del intestino, estas formas se ensanchan y se acorta el flagelo diferenciándose a epimastigote, el que se multiplica activamente por fisión binaria en la región media del intestino. En la parte final del tubo digestivo, una fracción de la población de epimastigotes se diferencian a trypomastigotes. Ahora, el trypanosoma puede volver al huésped vertebrado, cuando éste fuera picado por el insecto.

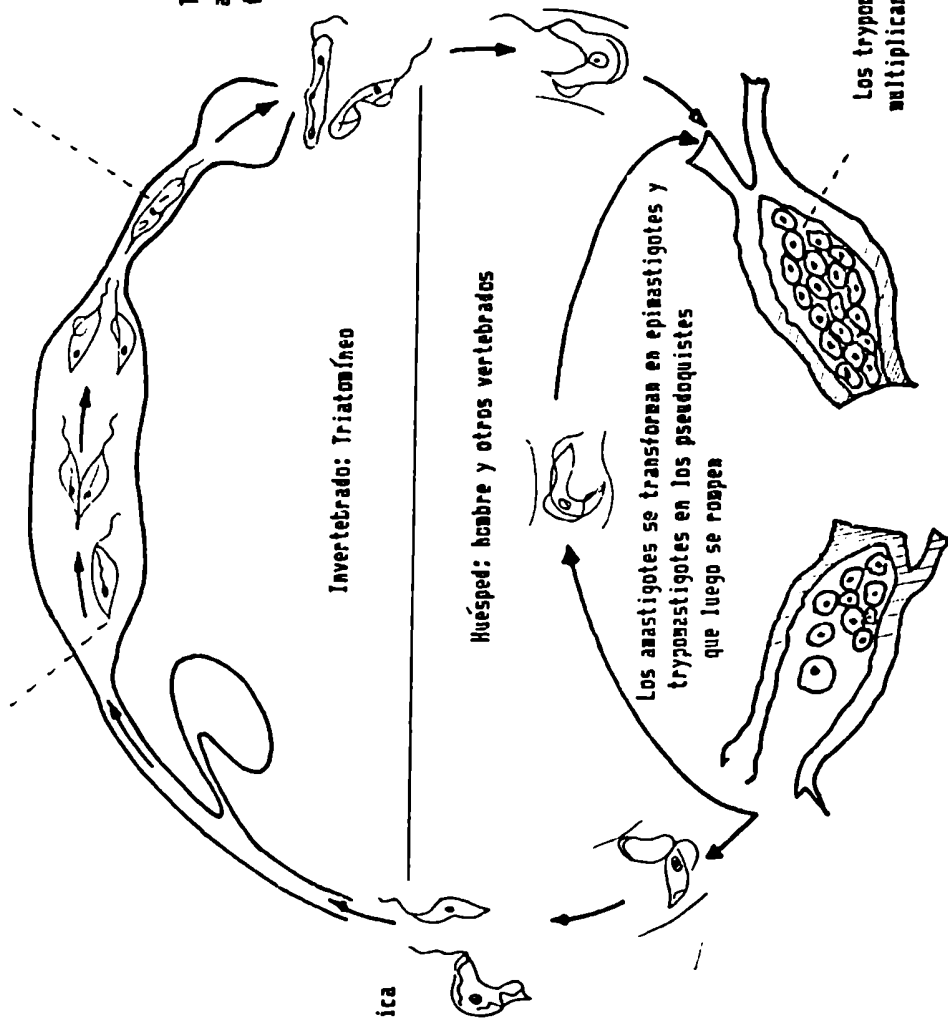
El insecto, al alimentarse, defeca mientras come, y en las deyecciones habrá parásitos que pueden penetrar a los tejidos del vertebrado en la región atacada.

En el vertebrado, los trypomastigotes penetran en las células de algunos tejidos donde se diferencian en formas denominadas amastigotas. Estas formas, que se dividen por fisión binaria, se multiplican y diferencian en trypomastigotes. En un dado instante, la célula huésped se rompe y los trypomastigotes se encuentran en la circulación sanguínea.

Los trypomastigotes pueden penetrar en nuevas células del huésped o ser ingeridos por el insecto, reiniciando el ciclo en el invertebrado. Un resumen puede verse en la Fig 1.

Los epimastigotes se transforman en trypanostigotes infectantes en el intestino posterior

Los trypanostigotes se transforman en epimastigotes por fisión en el intestino



Invertebrado: Triatómíneo

Los trypanostigotes, en la sangre periférica son ingeridos por el insecto

Los trypanostigotes inoculados no se multiplican pero entran en tejidos, especialmente músculo

Los anastigotes se transforman en epimastigotes y trypanostigotes en los pseudoquistes que luego se rompen

Los trypanostigotes se transforman en anastigotes y se multiplican formando pseudoquistes

Fig. 1: Ciclo de vida de *T. cruzi*

1.5 ESTRUCTURA DEL TRYPANOSOMA CRUZI.

El Trypanosoma cruzi mide, según la forma de desarrollo, entre 5 y 25 μ de largo, por 3 a 5 μ de diámetro y presenta, por pertenecer al orden Kinetoplástida, un conjunto de estructuras peculiares que pueden ser descritas de un modo integrado. Este conjunto está constituido por el quineto-plasto, el cuerpo basal y el flagelo.

El quineto-plasto se define como aquella parte de la mitocondria única, donde se encuentra el ADN mitocondrial. El ADN está rodeado por una doble membrana, cuya naturaleza mitocondrial se demuestra por la presencia de crestas mitocondriales en la membrana interna. Los trypanosomatídeos tienen un 20% del ADN total en su localización mitocondrial, mientras que en el resto de los eucariontes apenas alcanza al 1% (4).

El ADN quineto-plástico difiere del ADN nuclear en la composición de las bases, en la estructura molecular, y en la ausencia de histonas.

En el T.cruzi, la morfología del quineto-plasto varía en los diferentes estadios evolutivos del parásito. En el epimastigote, el material fibrilar se dispone en capas dobles mientras que en el trypomastigote, las fibrillas forman círculos en capas triples o cuádruples.

En las diferentes formas del parásito, el nacimiento del flagelo se encuentra adyacente al quineto-plasto, hacia la parte

anterior o posterior (5). El "mastigón" (aparato del movimiento), está constituido por el flagelo y el cuerpo basal, o bleferoplasto.

El cuerpo basal es una estructura que en su parte proximal es totalmente intracitoplasmática y en su parte distal, o zona de transición, se proyecta sobre el bolsillo flagelar.

Se trata de un cilindro hueco que está limitado por 9 triplete de microtúbulos que son continuación del flagelo. Tiene la misma estructura en todas las formas de evolución.

El flagelo presenta un sistema de 9x2 microtúbulos en una matriz amorfa. El trayecto del flagelo no es igual en los distintos estadios. En todos los casos, la membrana que cubre el flagelo está en contacto con la película que cubre el parásito, pero no se observa conexión estructural entre ambas.

El núcleo del T. cruzi es de naturaleza fibrilar, con acumulos de material genético contiguos a la membrana, cuando el parásito comienza la división celular.

La membrana plasmática tiene fundamental importancia en la interacción huésped-parásito. La membrana plasmática propiamente dicha tiene un espesor de 8 a 10 nm y se encuentra recubierta por una cubierta superficial, con un espesor de 5 nm en el epimastigote. Por debajo de la membrana, del lado citoplasmático se encuentra el armazón de microtúbulos.

Las características de los distintos estadios en que se puede encontrar el parásito son las siguientes:

El epimastigote es el estadio de multiplicación activa del parásito en el intestino del vector. Es más corto (10 a 16u) y más grueso que el trypomastigote. Tiene el quineto-plasto ubicado por delante del núcleo y en forma de disco y el flagelo emerge aproximadamente de esa región. Sus movimientos lo diferencian del trypomastigote y, en general, se producen en un solo plano.

El trypomastigote es la forma circulante en el mamífero. Es fino, y tiene movilidad en todos los planos, lo que lo diferencia del epimastigote, es más largo (entre 20 a 25 u), no se divide y presenta un quineto-plasto de forma esférica ubicado por detrás del núcleo.

El flagelo acompaña prácticamente todo el cuerpo del parásito con una membrana ondulante que lo envuelve.

El trypomastigote metacíclico es semejante al circulante pero más delgado y tiene una gran movilidad. Es la forma infectante que se encuentra en las deyecciones del vector y en algunos cultivos axénicos.

El amastigote es la forma intracelular del parásito que carece de flagelo y se multiplica activamente en diversas células.

1.6 AISLADOS DE T. CRUZI

Se han efectuado numerosos estudios de caracter bioquímico, antigénico, etc, sobre distintos aislados de T. cruzi.

Actualmente se conoce que dichos aislados, provenientes de pacientes, o vectores o animales infectados, hasta ahora llamados cepas, constituyen una mezcla de poblaciones diferentes (6), y los clones de un mismo aislado presentan características distintas (7)

1.7 CULTIVO AXENICO DE TRYPANOSOMA CRUZI

Los epimastigotes de T. cruzi pueden cultivarse axénicamente en medios indefinidos (difásicos , o líquidos monofásicos) o en medios químicamente definidos.

El T. cruzi fue cultivado por primera vez por Carlos Chagas en 1909, usando un medio complejo desarrollado por Novy y Mc Neal (8). Desde entonces se han desarrollado muchos medios para el cultivo de T. cruzi (9).

Los medios difásicos, en general son variantes del medio Novy y Mc. Neal, cuyos componentes son básicamente triptosa, infusión de hígado, de cerebro, corazón, peptona, sangre o suero, y hemina.

Los medios líquidos contienen infusión de tejidos, sangre o suero, y hemina. El medio LIT (Liver Infusion Triptose), diseñado por Yaeger (9) es uno de los más difundidos para cultivar y

mantener los trypanosomas.

En 1955, Citry y Grossowics (10) introdujeron un medio parcialmente definido donde el único componente no definido era un hidrolizado de caseína. Más tarde Boné y Parent's (1963) (11) desarrollaron un medio que contenía tiamina, ácido fólico, ácido esteárico y tryptosa, la que permanecía indefinida.

El primer cultivo exitoso de T.cruzi en un medio definido fue comunicado por Anderson y Krassner en 1975 (12), fue denominado XH25. Azevedo y Roitman, en 1978, lo simplificaron, omitiendo algunas coenzimas y obtuvieron un cultivo igualmente exitoso (13).

Estos medios permiten realizar estudios metabólicos y bioquímicos del parásito. Resulta complejo de preparar, de elevado costo y de rendimiento pobre, por lo que es desaconsejable para la producción masiva o el mantenimiento de cepas.

La producción de trypomastigotes "in vitro" se realiza en cultivos de células de mamíferos. Varias líneas celulares, de mantenimiento sencillo, son apropiadas células-huesped.

Las más ampliamente usadas son las líneas de células de epitelio de riñón denominadas Vero, NMCKK y LLCMK2, ya que forman monocapas perfectas, sin que se superpongan elementos individuales (14).

CAPITULO 2

GLICOESFINGOLIPIDOS

Y

GANGLIOSIDOS

2.1. GLICOESFINGOLIPIDOS

Los glicoesfingolípidos están formados por una fracción hidrofóbica denominada ceramida, y otra parte hidrofílica compuesta por hidratos de carbono.

Una ceramida consiste en una esfingosina (trans-4-esfingenina, (2S,3R,4E)-2-amino-4-octadeceno-1,3-diol), o un análogo tal como la dihidroesfingosina (esfinganina) o fitoesfingosina (4-D-hidroesfinganina), las cuales están N-aciladas con ácidos grasos cuyas cadenas pueden variar entre 14 y 26 átomos de carbono.

Se postula que los glicoesfingolípidos están sujetos en la bicapa lipídica de la membrana a través de la ceramida.

La longitud de las cadenas de azúcar, en los glicoesfingolípidos pueden variar de uno a treinta residuos de monosacárido. La cadena se une al grupo 1-hidroxilo de la ceramida. Todos los azúcares se han encontrado en los glicoesfingolípidos en configuración D, con la excepción de la L-fucosa.

Las funciones específicas que cumplen los glicoesfingolípidos en las células están reflejadas en la naturaleza de la parte sacarídica de los mismos.

Los glicoesfingolípidos se dividen en glicoesfingolípidos ácidos, que pueden contener ácido siálico o sulfato. y glicoesfingolípidos neutros, que contienen solamente azúcares neutros (no cargados).

Los glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico, se denominan gangliósidos, mientras que los que contienen un grupo ester sulfúrico se denominan sulfoglicoesfingolípidos.

En general los glicoesfingolípidos ácidos abundan en tejidos neuronales y en órganos viscerales.

Debido a la diversidad de la fracción sacarídica de estas moléculas y el continuo descubrimiento de nuevos glicoesfingolípidos es muy difícil mantener una nomenclatura uniforme para todos los glicoesfingolípidos.

La comisión de Nomenclatura Bioquímica de IUPAC-IUB (15) ha recomendado una nomenclatura sistemática para estas moléculas.

La clasificación y la interrelación estructural y metabólica de estos lípidos complejos, están basados en la fracción sacarídica de los glicoesfingolípidos. En la Tabla III se muestran las diferentes familias en que se clasifican los glicoesfingolípidos más simples.

Además se han aislado glicoesfingolípidos conteniendo fucosa de diversas fuentes tales como adenocarcinoma humano (16), eritrocitos humanos (17), mucosa gástrica de cerdo (18), etc.

En contraste con los glicoesfingolípidos de vertebrados solamente se han encontrado glicoesfingolípidos conteniendo manosa en invertebrados tales como los bivalvos (19). Algunos de estos últimos pueden contener, además xilosa (20).

Tabla III: Estructura de los oligosacáridos más comunes encontrados en glicoesfingolípidos

<u>Prefijo</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Estructura</u>
LACTO	Lc	Gal β (1-3)GlcNac β (1-3)Gal β (1-4) Glc
LACTONEO	Lcn	Gal β (1-4)GlcNac β (1-3)Gal β (1-4) Glc
MUCO	Mc	Gal β (1-3)Gal β (1-4)Gal β (1-4)Glc
GALA	Ga	GalNac β (1-3)Gal β (1-4)Gal α (1-4)Gal
GLOBO	Gb	GalNac β (1-3)Gal α (1-4)Gal β (1-4)Glc
GLOBOISO	Gbi	GalNac β (1-3)Gal α (1-3)Gal β (1-4)Glc
GANGLIO	Gg	Gal β (1-3)GalNac β (1-4)Gal β (1-4)Glc

2.2 GANGLIOSIDOS

Los gangliósidos son un tipo de glicoesfingolípidos caracterizados por la presencia de una o más unidades de ácido siálico en la cadena del oligosacárido.

Forman parte de los glicoconjugados de la membrana plasmática que determinan las propiedades de la superficie celular.

Se han encontrado más de 40 distintas estructuras en el oligosacárido de estos lípidos. Si se tiene en cuenta las variaciones en el tipo de ácido siálico, este número se incrementa hasta 50.

Los gangliósidos fueron identificados por primera vez por

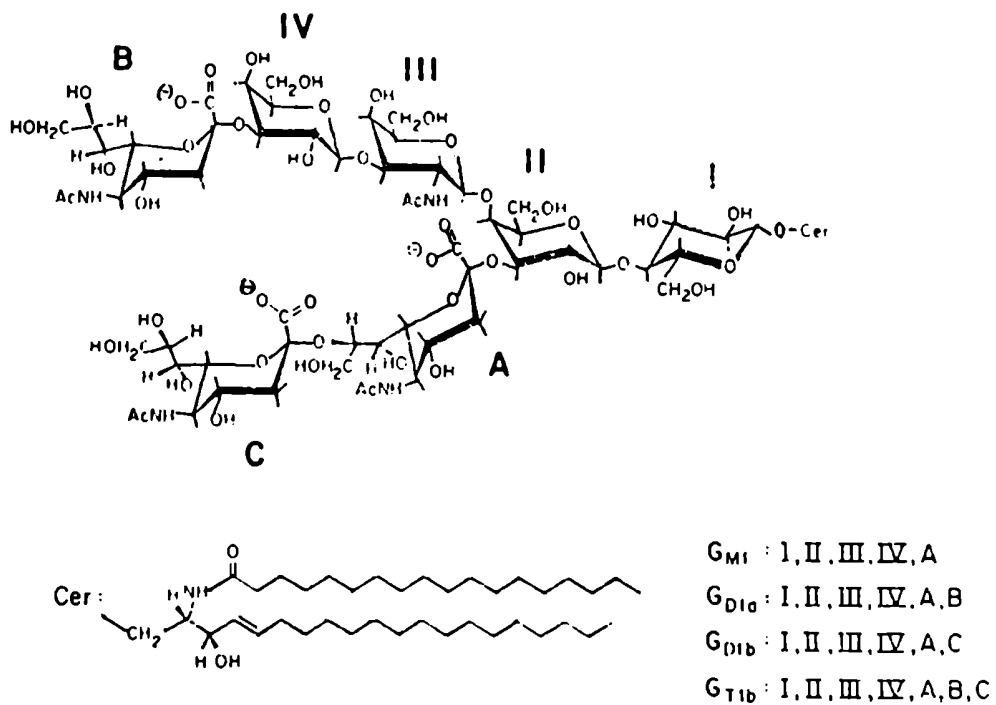


Fig 2: Estructura de los gangliósidos más importantes presentes en mamíferos.

Klenk en 1935 (21). Luego se han encontrado gangliósidos de complejidades diversas prácticamente en casi todos los tejidos de los vertebrados, aunque en diversas concentraciones, siendo la materia gris, el órgano en que se encuentran en mayor proporción. Algunas de las estructuras se representan en la Fig. 2.

Hasta el momento, en invertebrados, se han encontrado gangliósidos solamente en gónadas, gametas y otros tejidos de varias especies del phylum Echinodermata (22). Sus estructuras difieren de aquellos encontrados en tejidos de vertebrados. Algunos de ellos contienen glucosa, como único azúcar, además de ácido siálico (23).

Se han descrito disialogangliósidos conteniendo una (24) o dos unidades de glucosa (25)

Un gangliósido conteniendo arabinosa y un ácido siálico interno se ha aislado de la estrella marina Asterina pectinifera (26).

Estudiando la estructura de gangliósidos de estrellas marinas, Kotchekov (27) identificó en Evasteria pectinifera, una cuya estructura era NeuNAc(2->9)NeuNAc(2->3)GalNAc(1->3) gal (1->4) glc (1-1') Cer. Por otra parte en Asterias amurensis, la cadena oligosacáridica del sialoglicolípido es 8-O-Me NeuNGc (2->3) 8-O-Me NeuNGc (2->6) GalNAc (1->3) gal(1->4) Glc(1->1')Cer.

2.2.1 Estructura

a) **Acido siálico:** Este nombre es el termino genérico para una serie de compuestos derivados del Acido Neuramínico (Acido 5-amino-3,5,6-didesoxi- α -D-glicero-D-galactononulosónico). Hasta el momento se ha encontrado aproximadamente 20 tipos distintos de ácidos siálicos (28). (Fig. 3)

Los más abundantes son el N-acetil Neuramínico (NeuNAc) y el N-glicoil Neuramínico (NeuNGc). De todas formas, la variedad de ácidos siálicos en gangliósidos debe ser mayor de la conocida ya que algunas formas acetiladas pueden desacetilarse durante el aislamiento de los gangliósidos.

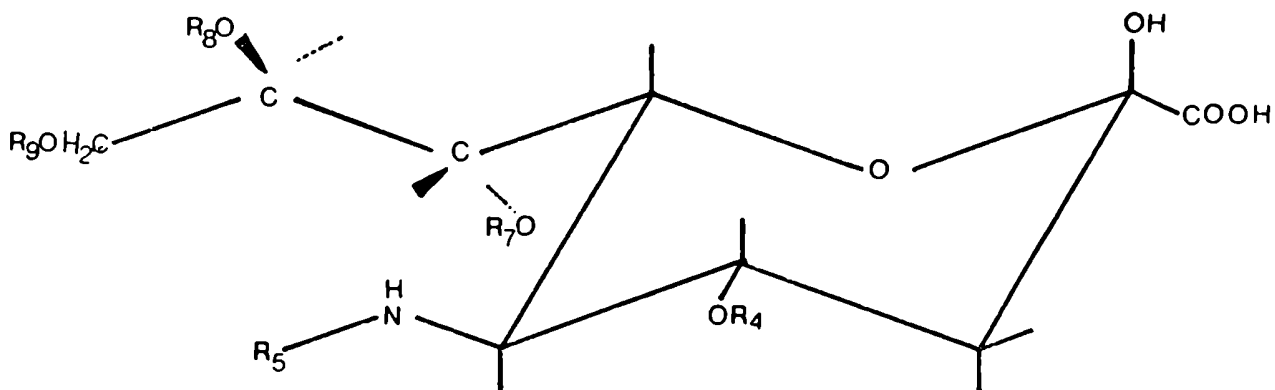
Se han aislado de cerebro de pescado varios gangliósidos con el NeuNAc y NeuNGc O-acetilados en diversas posiciones (29).

Reuter y col (30) han caracterizado de cerebro de rata un trisialogangliósido, derivado de GT1B conteniendo 9Ac NeuNAc además de NeuNAc y NeuNGc

De la membrana de eritrocitos de equino (31) se aisló un glicosfingolípido no hidrolizable por neuraminidasa donde se identificó 4Ac NeuNGc .

Además se han identificado ácidos siálicos metilados fundamentalmente en invertebrados del phylum Echinodermata. Se aisló 8Me NeuNGc de Asterias forbesi (32) y 8Me NeuNAc, de un gangliósido de la estrella marina Diastolaterias Nipon (33)

Ultimamente Suzuki y col caracterizaron por espectroscopía de



R5	R4,7,8,9
$\begin{array}{c} \text{-C-CH}_3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	-H (4,7,8,9)
$\begin{array}{c} \text{-C-CH}_2 \\ \parallel \quad \\ \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{-C-CH}_3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \quad (4,7,8,9)$
	$\begin{array}{c} \text{-C-CH-CH}_3 \\ \parallel \quad \\ \text{O} \quad \text{OH} \end{array} \quad (9)$
	-CH3 (8)
	-SO3H (8)
	-PO3H2 (9)

Fig 3: Estructura de ácidos siálicos naturales. Se indican los sustituyentes en N- y en O-, junto con la posición de los mismos para el último. El ácido N-acetil neuramínico 9-fosfato, es un intermediario de la biosíntesis del ácido siálico y no se encuentra en enlaces glicosídicos.

masa, el Acido Neuramínico 2,7 anhidro como componente de cerumen húmedo humano (33).

b) Familia de oligosacáridos: Los otros azúcares que están generalmente presentes en gangliósidos son: Glucosa, galactosa, GalNAc y GlcNAc. Fucosa y arabinosa también se han detectado en algunas estructuras.

Con la excepción de sialogalactosilceramida, todos los gangliósidos de vertebrados derivan de lactosilceramida, o sea que poseen una estructura de glucosilceramida. Se ha determinado que los gangliósidos se encuentran principalmente dentro de dos familias de oligosacáridos derivados de lactosilceramida, que son la serie Ganglio y Neolacto. Chein y col. sugirieron la presencia de gangliósidos con estructura de las series Globo e Isoglobo.

Algunas estructuras de gangliósidos están representadas en la Tabla IV, ordenadas de acuerdo a la familia de oligosacárido a la que pertenecen.

1) Serie ganglio: La gran mayoría de los gangliósidos de cerebro derivan de esta serie. GM1 (Tabla IV) es la unidad básica en la que se basan un gran número de gangliósidos de cerebro de mamíferos. Estudios comparativos han revelado diferencias significativas del perfil típico de gangliósidos de cerebro de

Tabla IV: Estructura del oligosacárido de algunos gangliósidos

ESTRUCTURA	SIMBOLO	TEJIDO
<p><u>Serie Ganglio</u></p> $\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GalNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}$ $\begin{array}{c} \text{3} \\ \\ \text{NeuNGc2} \end{array}$	<p>II3NeuNAc-6g0se4 6M1-6M1a</p>	<p>Cerebro humano (64)</p>
$\text{GalNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GalNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}$ $\begin{array}{c} \text{3} \\ \\ \text{NeuNAc2} \end{array}$	<p>IV3NeuNAcIV4 GalNAc6g0se4 6M1b-GalNAc</p>	<p>Cerebro de paciente con enfermedad de Tay-Sachs (65)</p>
$\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow2)\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GalNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}$ $\begin{array}{c} \text{3} \\ \\ \text{NeuNGc2} \end{array}$	<p>IV2 FucII3NeuNAc5g0se4 6M1Fuc(NeuNGc)</p>	<p>Hígado bovino (64)</p>
<p><u>Disialo</u></p>		
$\text{NeuNAc}\alpha(2\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GalNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}$ $\begin{array}{c} \text{3} \\ \\ \text{NeuNAc2} \end{array}$	<p>IV3NeuNAcII3NeuNAc6g0se4 6D1a</p>	<p>Médula adrenal bovina (66)</p>
$\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow2)\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GalNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}$ $\begin{array}{c} \text{3} \\ \\ \text{NeuNAc (2}\rightarrow\text{8)NeuNAc 2} \end{array}$	<p>IV2 FucII3(NeuNAc)26g0se4 6B1bFuc</p>	<p>Cerebro de cerdo (67)</p>
<p><u>Trisialo</u></p>		
$\text{NeuNAc}\alpha(2\rightarrow8)\text{NeuNAc}\alpha(2\rightarrow8)\text{NeuNAc}\alpha(2\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}$ $\begin{array}{c} \text{4} \\ \\ \text{GalNAc1} \end{array}$	<p>II3(NeuNAc)36g0se4 6T2</p>	<p>Cerebro de pez (63)</p>
<p><u>Pentasialo</u></p>		
$\text{NeuNAc}\alpha(2\rightarrow8)\text{NeuNAc}\alpha(2\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GalNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}$ $\begin{array}{c} \text{3} \\ \\ \text{NeuNAc}\alpha(2\rightarrow8)\text{NeuNAc}\alpha(2\rightarrow8)\text{NeuNAc}\alpha 2 \end{array}$	<p>IV3(NeuNAc)2II3(NeuNAc)36g0se4 6P1</p>	<p>Cerebro de pez (69)</p>
<p><u>Serie Lacto</u></p>		
$\text{NeuNAc}\alpha(2\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}$	<p>IV3NeuNAc-MLC0se4</p>	<p>Eritrocitos humanos (64)</p>
$\text{NeuNAc}\alpha(2\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}$ $\begin{array}{c} \text{3} \\ \\ \text{Fuc 1} \end{array}$	<p>IV3NeuNAcIII3 Fuc-nLC0se4</p>	<p>médula humana (71)</p>

Serie Hematósido

NeuNAc α (2-3)Gal β (1-4)61c

II3NeuNAcLac (6N3)

Hígado y cerebro humano (64)

NeuNAc α (2-8)NeuNAc α (2-8)NeuNAc ω (2-3)Gal β (1-4)61c

II3(NeuNAc)3Lac (6T3)

Cerebro de pez (78)

Gangliósidos en invertebrados

Ara(1-6)Gal β (1-4)B-0-MeNeuGc?(2-3)Gal β (1-4)61c

Asterina Pectinifera (26)

Ara β (1-6)Gal β (1-4)NeuGc?(2-3)Gal β (1-4)61c

Asterina Pectinifera (26)

NeuNAc α (2-9)NeuNAc α (2-3)GalNAc β (1-3)Gal β (1-4)61c

Evasterias Retifera (27)

B-0-MeNeuGc?(2-3)B-0-MeNeuGc?(2-6)GalNAc β (1-3)Gal β (1-4)61c

Asterias Amurensis (27)

mamíferos con respecto al de otros vertebrados inferiores tales como los peces. Estas últimas especies tienen mayoritariamente tetra y penta sialogangliósidos, y relativamente poco mono y disialo gangliósidos, los cuales abundan en mamíferos (36).

2) Serie Lacto: Virtualmente casi todos los gangliósidos en que se ha caracterizado glucosamina pertenecen a la serie neolactotetraosa. La estructura IV3NeuNAcLc0se4Cer (Tabla IV) cuyo nombre común es sialosilparaglobiosa, es el gangliósido más abundante en el nervio periférico y en eritrocitos humanos. (37)

3) Serie hematósido: El nombre "hematósido" proviene de que fueron detectados inicialmente en eritrocitos (38) pero este tipo de gangliósidos, que se caracteriza por la ausencia de hexosamina, se encontró luego en todos los tejidos de vertebrados. La mayoría de ellos derivan de lactosilceramida siendo los más comunes GM3 y GD3 (Tabla IV).

c) Componentes lipofílicos: Aunque algunos gangliósidos, al igual que los glicoesfingolípidos se clasifican generalmente en base a la estructura del oligosacárido, se han hallado amplias diferencias en su composición lipofílica. Los gangliósidos de cerebro contienen en general bases esfingosínicas de 18 y 20 carbos

nos .Esta última no se ha detectado en otros esfingolípidos de cerebro y se encuentra raramente en esfingolípidos extraneuronales . Crece su presencia en gangliósidos de vertebrados en función de la escala zoológica (39).

El ácido esteárico es el predominante en gangliósidos cerebrales, mientras que mezclas de ácidos grasos que van desde C16 a C24, se encuentran fuera del sistema nervioso central. La presencia de ácidos grasos hidroxilados ,aunque es rara, se ha detectado en hígado y en riñón humano (40,41)

En invertebrados, dentro del phylum Echinodermata, se ha encontrado fitoesfingosinas normales y ramificadas cuyas cadenas varían entre 15 y 22 átomos de carbono (26,27).

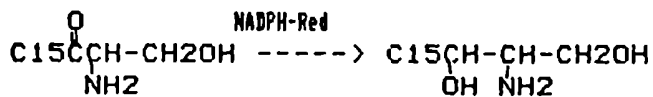
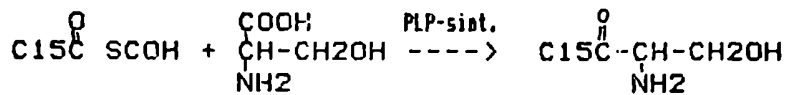
Los ácidos grasos componentes de gangliósidos en el género Echinodermata poseen desde 12 hasta 25 átomos de Carbono. Una alta proporción de los mismos se halla hidroxilado.

En A.pectinífera, sólo se encontraron ácidos grasos α -hidroxilados, siendo el C22:0 el que se halla en mayor proporción (26)

2.3 BIOSINTESIS DE GANGLIOSIDOS

2.3.1. Biosíntesis de bases esfingosínicas

Snell et al (42) propusieron el siguiente camino para la biosíntesis de la esfinganina;

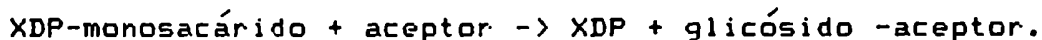


El producto de la condensación de Palmitoil CoA y la serina, catalizado por la PLP sintetasa se identificó químicamente como 3-dehidroesfinganina. La enzima condensante requiere la presencia de fosfato de piridoxal.

Una reductasa microsomal reduce estereoespecíficamente la 3-dehidroesfinganina a D-esfinganina en presencia de NADPH (43). La enzima condensante y la reductasa son específicas para ésteres de Coenzima A de ácidos de 14 a 18 átomos de carbono.

2.3.2. Biosíntesis de oligosacáridos

La adición secuencial de residuos de monosacáridos es catalizada por enzimas conocidas como glicosiltransferasas. Cada reacción involucra la transferencia de un residuo de azúcar de un donador tal como un nucleótido de azúcar (XDP-monosacárido) a un aceptor.



El camino biosintético de los gangliósidos principales ha sido estudiado por Basy y col(44) y por Fishman (45) y se esquematiza en la Fig III.

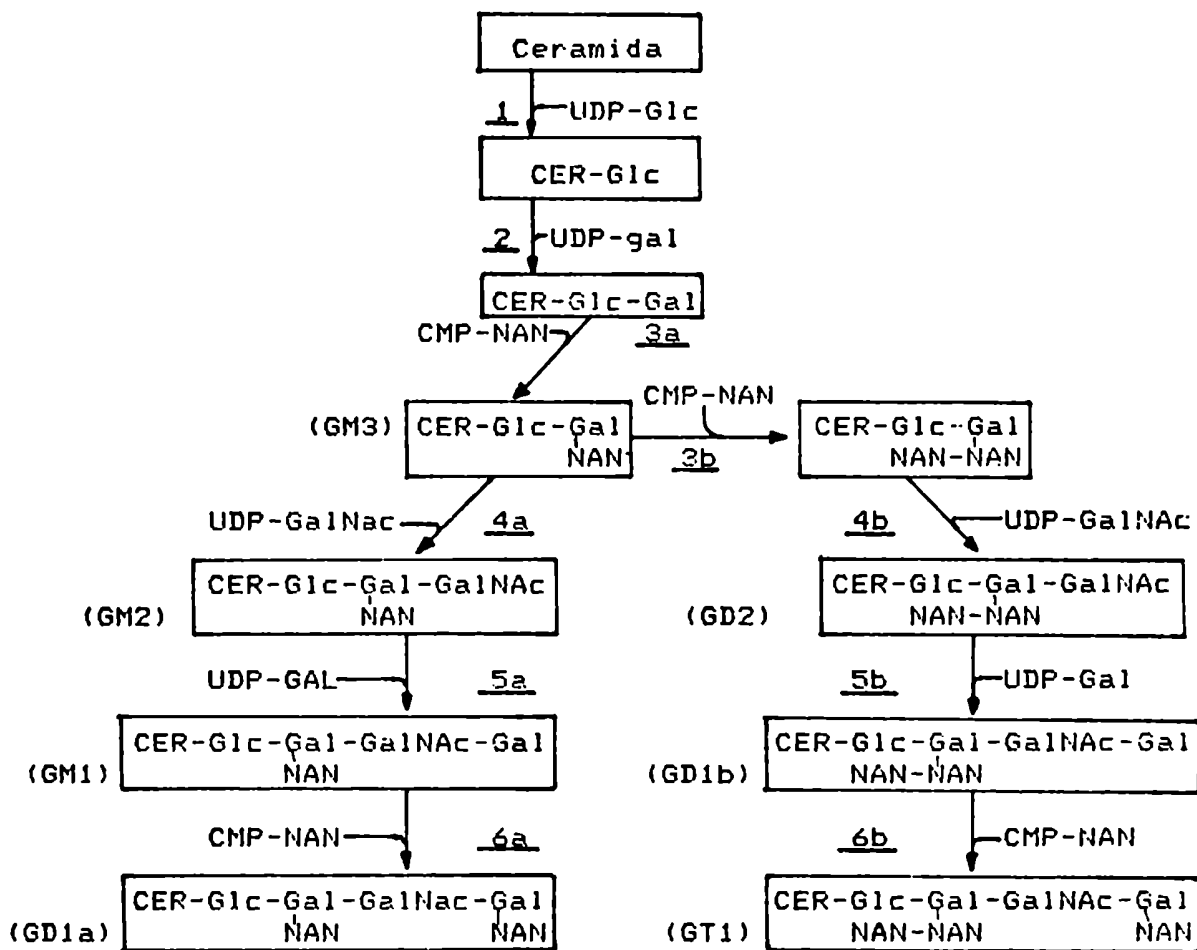


Fig 4: Vías de biosíntesis de los gangliósidos. Cada reacción está catalizada por una glicosil transferasa específica.

La adición de residuos de azúcar parece ser altamente ordenada y las glicosiltransferasas, altamente específicas. Así, aunque GM2 es una molécula ramificada, el residuo de Acido siálico se adiciona antes que el de GalNAc. De todas formas, la especificidad de estas enzimas no debe ser absoluta, ya que la aparición de gangliósidos minoritarios puede ser consecuencia de especificidad incompleta (46).

Roseman propuso que la biosíntesis de las cadenas de oligosacáridos de carbohidratos complejos es catalizada por un sistema de multiglicosiltransferasas (47), las cuales están asociadas dentro de la célula como un complejo enzimático. En los sistemas celulares estudiados, las glicosiltransferasas de gangliósidos se hallan localizadas en una determinada organela subcelular. (47,48,49)

2.4. FUNCION DE LOS GANGLIOSIDOS

2.4.1. Organización celular

Estudios de reacción cruzada han sugerido la asociación de gangliósidos con proteínas específicas de membrana. Se ha aislado de membranas de eritrocitos humanos un polipéptido con actividad de antígeno de Paul Bunell que tiene una afinidad específica con GM3 (50). Este antígeno gangliofílico debe estar asociado con gangliósidos en la membrana celular y este complejo

es sensible a la actividad de la sialidasa, por lo cual el gangliósido regula la antigenicidad del polipéptido.

Con el uso de anticuerpos antiglicolípido, se han detectado estructuras comunes entre glicosfingolípidos y proteínas. Hakomori (51) ha agregado anticuerpos anti GM1 a cultivos de células tumorales 3T3 y ha detectado algunas glicoproteínas reactivas a este anticuerpo.

En glicoproteínas de cerebro se ha detectado cadenas de NeuNAc(2->8) NeuNAc(2->3) Gal, similares a la presente en algunos gangliósidos (52)

2.4.2 Interacción celular y diferenciación

El hecho de que los gangliósidos de una determinada membrana celular puedan ser reconocido por otra membrana celular y viceversa, puede constituir un argumento importante de reconocimiento celular y diferenciación.

Por ejemplo se ha detectado una pronunciada síntesis del gangliósido GD1B cuando se cultivan conjuntamente células neuronales y ganglionares, a pesar de que ninguna de ellas posee GD1B inicialmente (53).

Se postula que las moléculas que reconocen los gangliósidos pueden ser lectinas o enzimas. Es posible una interacción del tipo "llave-cerradura" entre el gangliósido y estas glicoproteínas (54)

2.4.3. Regulación del crecimiento celular

La respuesta al contacto entre glicosfingolípidos de membranas celulares, está asociada a la inhibición del crecimiento celular por contacto intercelular, lo cual sugiere que los glicosfingolípidos pueden regular el crecimiento celular. Por ejemplo se encontró un aumento en la síntesis de GD3 y GM1 antes de la inhibición del crecimiento celular de fibroblastos humanos(55). También la mitogénesis de linfocitos de cabra está acompañada por un cambio en la composición de gangliósidos (56) .

Frees y col han agregado en medio de cultivo ácidos grasos de bajo peso molecular, lo cual redujo la densidad de saturación celular y restableció la inhibición por contacto (57). Estos cambios en el comportamiento del crecimiento celular están asociados con un gran incremento en los niveles de GM3, debido a una gran actividad de la enzima GM3 sintetasa. (58)

También se observó el aumento de la reactividad de la toxina colérica debido a una síntesis inducida de GM1 (59)

2.4.4. Transformaciones oncogénicas

Hokomori (60) describió por primera vez un cambio en la composición de glicosfingolípidos asociados a la transformación oncogénica.

Desde entonces se han llevado a cabo muchos estudios empleando líneas de células de fibroblastos, o cultivos transformados por virus o productos químicos carcinogénicos (61). Estos cambios pueden deberse a síntesis incompleta de gangliósidos o síntesis de nuevos carbohidratos, ausentes en células no transformadas.

2.4.5. Interacción con factores bioactivos

Los gangliósidos interactúan con varios factores bioactivos (Tabla V), inhibiendo o interfiriendo con los efectos fisiológicos de estos factores en las células.

La interacción más estudiada es la que existe entre GM1 y la toxina colérica. La toxina colérica causa una respuesta biológica en una amplia variedad de células, éstas incluyen acumulación de fluidos intestinales, lipólisis de células grasas, inhibición de la síntesis de DNA en fibroblastos, etc

GM1 actúa como receptor de la toxina en la membrana plasmática e induce cambios conformacionales en la misma (62).

Por otra parte varios gangliósidos interactúan con hormonas glicoproteicas e interferón (63)

Los gangliósidos GT1 y GD1B inhiben la unión de varias hormonas glicoproteicas con las membranas del tejido "Blanco"

Se han desarrollado diversas teorías para explicar la interacción de las hormonas con los gangliósidos.

i) La interacción puede ser una reacción cruzada con el receptor

real que tiene una estructura similar a la del gangliósido.

ii) Los gangliósidos pueden ser cofactores para el receptor real y regular la unión de la hormona al receptor .

Tabla V: Interacción de Gangliósidos con Factores bioactivos

<u>BIOFACTOR</u>	<u>GANGLIOSIDO INTERACTUANTE</u>
TOXINAS BACTERIANAS	
T.colérica	GM1
T.tetánica	GT1B, GQ1B
T.botulinus	GT1B
HORMONAS GLICOPROTEICAS	
Tirotrofina	GD1B
Gonadotrofina coriónica	GT1
Hormona luteinizante	GT1
Interferón	GM2,GT1

CAPITULO 3

GLICOCONJUGADOS

EN TRYPANOSOMA CRUZI

3.1 LA MEMBRANA DEL TRYPANOSOMA CRUZI

La membrana celular del T.cruzi posee las propiedades normalmente asociadas a las membranas celulares, tales como el transporte de nutrientes y el mantenimiento del balance iónico.

Particularmente importantes para el T.cruzi son la presencia de receptores para ligar y penetrar las células huésped, la habilidad de sobrevivir en el ambiente hostil del tracto intestinal del insecto vector y la resistencia al sistema inmune del huésped. Además, cada estadio tiene distintos requerimientos. Probablemente estos estén reflejados en las propiedades de la superficie celular. Diversas experiencias han demostrado diferencias en las propiedades de las membranas en los distintos estadios. Así se han encontrado diferencias en la habilidad de unirse a lectinas (72), en las proteínas de membrana y en la antigenicidad (73).

Para el estudio de la membrana celular del T.cruzi, se han utilizado diversas técnicas, tales como la purificación de la membrana, el uso de lectinas que reconocen distintos carbohidratos de las moléculas de la membrana, y la utilización de anticuerpos monoclonales.

En una primera aproximación para estudiar la membrana, ésta se ha aislado por métodos tales como sonicación (74), homogeneización en presencia de detergentes no iónicos (75), o

alternativamente, se ha inducido la vesiculación de membranas por tratamiento con buffer acetato (76). Se ha encontrado que la membrana comprende un 31% de proteínas, 34% de lípidos, 16% de hidratos de carbono y 9% de esteroides (76). También se detectaron fosfolípidos en baja proporción (77).

La membrana plasmática del T.cruzi, no es una organela uniforme. Existen diferencias en la composición antigénica y en la estructura de la membrana, del cuerpo y del flagelo (78).

El flagelo es un área de la membrana altamente organizada, y podrían preverse propiedades distintas al resto de la membrana plasmática.

Se han identificado las proteínas de superficie usando técnicas de iodación con ^{125}I o ^{131}I utilizando yodógeno (79) o catalizada por lactoperoxidasa (80). Estos estudios mostraron que el perfil proteico es distinto para cada estadio .

En todos los estadios del ciclo de vida del T.cruzi existen macromoléculas que poseen una porción de carbohidratos. (81)

Su presencia se confirmó por estudios de marcación específica con la enzima galactosa oxidasa seguida de reducción con $\text{B}^3\text{H}_4\text{Na}$ (82) o usando lectinas con especificidades para distintos azúcares (83,71).

También se han utilizado reacciones con anticuerpos policlonales o monoclonales, para aislar antígenos de membrana. La aplicación de estas técnicas ha llevado a identificar en la

membrana de los epimastigotes una serie de glicoconjugados, que se detallan en la Tabla V.

Tabla V: Glicoproteínas aisladas de la membrana celular de Trypanosoma cruzi.

GLICOPROTEINAS	CARBOHIDRATOS		DISTRIBUCION	COMENTARIOS
	% en peso	Tipo		
GP 90 (80)	19	Alta manosa	E,A,T	Factor antifagocítico.
GP 72 (77)	49	Fosforilada pentosa, fucosa	E,M,T	Control de la diferenciación.
Gp 25 (107)	40	Gal-man	E,T	Potencial de diagnósticos.
GP 37,31,25 (95)	50	Gal-man	E	No se purificaron individualmente.
LPPG (95-99)	42-63	Man-Gal-Inos.	E	
Tc85 (108)			T	Inhibición de penetración.

3.2 GLICOPROTEINA DE 90KDa

La glicoproteína de 90kDa fue identificada por marcación con ¹²⁵I-lactoperoxidasa y separada por cromatografía de afinidad con la lectina de Lens culinaris, por el grupo de Snary (80)

Está presente en trypomastigotes de sangre y es el mayor antígeno detectado por sueros de pacientes infectados crónicos (73). También fue encontrada en epimastigotes.

La Gp de 90kDa, se identificó como un posible antígeno de protección. Cuando se inmunizaban ratones con epimastigotes muertos, éstos protegían al ratón de una infección aguda letal (84). A esta glicoproteína se le asignaba esta protección ya que se encuentra en los tres estadios. Iguales resultados se obtuvieron inyectando la glicoproteína pura (87).

La importancia de encontrar antígenos puros, reside en que T.cruzi contiene un alto número de antígenos que tienen reacción cruzada con el tejido del corazón de mamífero, y con el tejido neuronal (85,86) . Los sueros de pacientes chagásicos tienen anticuerpos que reaccionan tanto con estos órganos como con T.cruzi. En caso de vacunación se requiere que no existan estos efectos secundarios, los cuales podrían ser los causantes de la patología de la enfermedad , y la Gp90, parece no tener determinantes que causen reacción cruzada con los tejidos antes mencionados. (87).

De todas formas, la inmunización no fue total, ya que si bien

sobrevivían a otra dosis letal, se detectaba la presencia de parásitos por xenodiagnóstico. (67).

Se ha propuesto que la función biológica de la GP90 es la de proteger a los trypanosomas de sangre de las células fagocíticas del sistema inmune (73).

La composición de esta glicoproteína es relativamente simple; tiene un 19% de hidratos de carbono (Tabla VI), siendo manosa el azúcar que se encuentra en mayor proporción. No se detectó la eliminación de carbohidratos por reacción de β -eliminación con álcali, lo que sugiere que la porción sacarídica está unida por N a asparagina, probablemente a GLcNAc. Esta observación concuerda con el hecho de haber encontrado en T.cruzi precursores de Dolicol Fosfato (88,89,90) y oligosacáridos unidos a proteínas, intermediarios de la biosíntesis de glicoproteínas N-glicosidadas, con estructuras coincidentes con la esperada para la GP90, en base a su composición general.

3.3 GLICOPROTEINA DE 72KDa

Snary y col en 1981 (91) produjeron un anticuerpo monoclonal por fusión celular de bazo de ratón inmunizado con epimastigotes de T.cruzi. El anticuerpo, denominado WIC29.26 era específico para epimastigotes, no así para trypomastigotes o amastigotes.

Si se marcaban los epimastigotes con la técnica de

Tabla VI: Composición de los componentes de membrana de epimastigotes de Trypanosoma cruzi

	GP90	GP72	GP 37,31,25	LPPG
AZUCARES				
Manosa	14	8,2	16	36.0
Galactosa	1.3	15,6	18,8	26.0
Glucosa	1,3	1,3	6,3	1.0
Glucosamina	2,3	2,9	1,5	0.8
Fucosa	0	6,5	0	0
Xilosa	0	10,6	0	0
Ribosa	0	4,3	0	1
Inositol	0	0	0	2.5
PROTEINA	81	41	44	9.5
FOSFATO	0	10	n.d.	6.0
AC.GRASOS	0	n.d.	n.d.	12.5
Bases Esfing.	0	n.d	n.d	6.3

¹²⁵I-lactoperoxidasa y luego se realizaba una inmunoprecipitación sobre extractos de epimastigotes, realizados con detergentes no iónicos, precipitaba un antígeno que reconocía el anticuerpo monoclonal, el cual fue posteriormente identificado por electroforesis en geles como una glicoproteína de PM 72000 (GP72).

Ferguson y Snary llevaron a cabo estudios sobre la estructura de la GP72 (77). Contiene un 41% de proteína, 49% de hidratos de carbono y 10% de fosfato. Se encontró que todo el fosfato está unido covalentemente a carbohidrato.

Los azúcares que contiene la Glicoproteína son : ribosa, xilosa, fucosa, galactosa, manosa, glucosa y glucosamina (Tabla VI).

La unión a la proteína se realiza a través de xilosa o fucosa a serina o treonina y glucosamina a asparragina. Sólo el 50% de la glucosamina está involucrada en la unión a la proteína.

Por tratamiento alcalino se liberan dos clases distintas de oligosacáridos. La primera de ellas comprende el 15% del total de los carbohidratos y contiene GlcNAc, Man y Gal. La unión a proteína es por la GlcNAc. La otra clase, que comprende el 85% de los hidratos de carbono, contiene xilosa, fucosa, ribosa, galactosa, manosa, glucosa y fosfato. La unión es a través de xilosa o fucosa.

La estructura de esta glicoproteína es bastante inusual, ya

que contiene una alta proporción de fosfato unido a cadenas laterales ricas en pentosas, y uniones a través de tres azúcares distintos a la proteína.

La inmunización de ratones con la glicoproteína purificada, no los protege de una infección letal con trypomastigotes de T.cruzi, pero sí los protege parcialmente de una infección con parásitos metacíclicos. En éste último caso los niveles de anticuerpo en suero eran muy altos (92).

Se sugirió que la función biológica de la GP72 reside en el control de la transformación de epimastigotes en trypomastigotes metacíclicos, que ocurre en el intestino del insecto vector (93). Cuando se agregaba el anticuerpo monoclonal WIC29.26 al medio donde ocurre la transformación, se observó que solamente se transformaban a trypomastigotes un 20% de los parásitos esperados. Esta observación condujo a la hipótesis que la Gp72 tiene un rol importante en el control de la diferenciación del parásito en el insecto vector, , posiblemente por interacción con las lectinas presentes en el último tracto del intestino del vector, que se sabe, son capaces de unirse a epimastigotes (94).

3.4 EL COMPLEJO DE GLICOCONJUGADOS ABCD

En 1975, Alves y col (95), describieron la extracción por fenol-agua de un complejo glicoconjugado que por análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida, revelaba la presencia

de cuatro componentes, denominadas bandas ABCD. Se demostró su localización en vesículas de membrana plasmática de epimastigotes (82).

También se realizaron estudios de marcación superficial en los tres estadios usando técnicas de marcación enzimática con galactosa oxidasa B^3H_4Na . En estas condiciones, se encontró incorporación de la marca en las bandas ABC de epimastigotes. La banda D, no se marca probablemente por poseer la galactosa en configuración furanósica. Aprovechando la presencia de esta estructura se realizó una marcación de las galactosas furanósicas por oxidación suave con periodato de sodio, seguida por reducción con B^3H_4Na . Cuando se marcaron de esta forma células epimastigote, se detectó por electroforesis en gel de poliacrilamida de un homogenato total, la incorporación de la marca en la banda D y en una banda de mayor movilidad que se llamó E (100).

Experiencias de marcación in vivo con ^{14}C - glucosa, mostraron la naturaleza endógena de este complejo (100).

Este complejo no se ha logrado marcar en trypomastigotes intactos o lisados. Por otra parte anticuerpos anti- ABCD, reaccionan con compuestos presentes en sangre de animales con infección aguda (101), y con amastigotes (102). Una posible interpretación de estos datos es que estos glicoconjugados se

expresen en la superficie de epimastigotes y amastigotes y que también puedan ser excretados por los estadios encontrados en el huésped mamífero.

Hasta el momento, no se describió el aislamiento individual las tres glicoproteínas ABC que se extraen junto a la banda D, probablemente debido a que posean estructuras similares. La composición global de las mismas se muestra en la Tabla VI

La banda D ha sido purificada por pesaje a través de columnas de filtro molecular y extracción con solventes (95-99). La composición en carbohidratos, que representan el 60% en peso es: Manosa, glucosa, galactosa y glucosamina, en relación: 35:22:1:0.8. También se identificó ribosa como componente minoritario. Contiene un 9.5 % de proteínas, 2.5% de fósforo unido a inositol (97) y 12.6% de ácidos grasos. Los ácidos grasos principales son Palmítico (6.9%), Lignocérico (4.6%), esteárico (0.5%), oleico (0.15%) y mirístico (0.16%). Un tercio de los ácidos grasos están unidos como ésteres y 2/3 como amida (97), a esfingosina. El ácido lignocérico se une sólo como amida.

Las esfinganinas que forman la ceramida del LPPG, se identificaron por c.g.l-em como 17-metil esfinganina y, en menor proporción, esfinganina (98)

Se realizaron estudios sobre la estructura del oligosacárido del LPPG (99) por espectroscopia de ^{13}C y análisis de metilación. Unido a la ceramida, a través de inositol fosfato (Fig 5), se

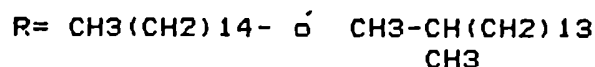
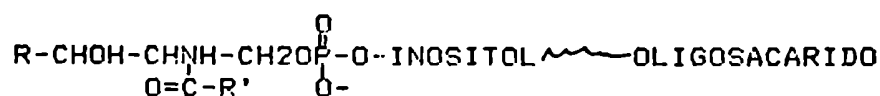


Fig 5: Estructura parcial de la porción lipídica del LPPG de T.cruzi. (98).

encuentra un oligosacárido formado por manosas 2-O y 6-O sustituidas, el cual se separó de una cadena externa que contiene residuos de manosas 3-O-sustituidas. Las galactofuranosas, se encuentran ramificando en C-3 a manopiranosas unidas (1->2).

No se conoce la función del LPPG en T.cruzi. Moléculas de estructura similar se han encontrado en Acantomeba castellani (106). Ambas moléculas contienen ácido aminoetilfosfónico.

Se ha postulado que la presencia de fosfonatos provee a organismos de existencia libre, alguna protección contra su entorno, y posiblemente la presencia de fosfonato en T.cruzi provenga de un antecesor de vida libre o, alternativamente, que el LPPG tenga algún rol en la protección del parásito de las condiciones del medio del intestino del vector (106).

Andrews y col (103) llevaron a cabo un estudio más profundo sobre las glicoproteínas de membrana de las formas epimastigote y trypomastigote de T.cruzi, analizando las proteínas iodables por electroforesis bidimensional, inmunoprecipitación y afinidad a lectinas. Se encontraron dos glicoproteínas afines a concanavalina A, comunes a epimastigote y trypomastigote, que corresponderían a las glicoproteínas descritas por Snary y Hudson (80), y Nogueira (73), y otra de 80 Kda que puede corresponder a la descrita por Nogueira (73).

Los trypomastigotes presentan, además, varias glicoproteínas iodables, afines a concanavalina A de 85kDa, 100kDa, 120kDa y 68kDa. Muchas de estas proteínas se remueven por tratamiento con tripsina. Simultáneamente se pierde la capacidad del parásito de penetrar la célula.

La glicoproteína de 85kDa, denominada TC-85, además, se liga a la aglutinina de germen de trigo, no así a Lens culinaris, consecuentemente debe contener en su molécula, manosa y N-acetil glucosamina (83). Se sugirió que la TC-85 puede estar involucrada en la adhesión e internalización del T.cruzi en las células de mamíferos, y es inmunoprecipitada de la superficie de trypomastigotes por el suero de pacientes chagásicos. Se encontró que un anticuerpo monoclonal contra la misma inhibe la penetración de trypomastigotes en células de mamíferos (104).

Cuando los trypomastigotes son tratados con tunicamicina (105), pierden su capacidad de penetración, y cambian su perfil electroforético, ya que no se encuentran las glicoproteínas de 120-125, 90-95 y 85 kDA. Cuando estos parásitos son incubados nuevamente en medio fresco, recuperan su capacidad de penetración y su perfil electroforético. Estas experiencias llevaron a la hipótesis que estas glicoproteínas están involucradas en la penetración de los trypomastigotes.

CAPITULO 4

ACIDO SIALICO EN

TRYPANOSOMA CRUZI

4.1 PRESENCIA DE ACIDOS SIALICOS EN LA NATURALEZA

El interés por los ácidos siálicos se ha incrementado en los últimos años, desde que se tuvo conocimiento de su importancia en una gran variedad de fenómenos biológicos. Los ácidos siálicos tienen una función protectora en células la cual se debe, fundamentalmente a su posición periférica en glicoconjugados y, con secuentemente, a su localización externa en membranas celulares.

La carga electronegativa de un eritrocito humano se debe principalmente a una capa con unas 20 millones de moléculas de ácido siálico.

El nombre "ácidos siálicos", fue usado por primera vez por Blix, Gottshalk y Klenk (109), y comprende a todos los N y O-acil derivados del ácido neuramínico, cuyo nombre sistemático es: 5-amino-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosico (Figura 3).

El ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac), fue aislado por primera vez por Gottschalk (110) en mucinas urinarias. Poco tiempo después se aisló el ácido N-glicolil neuramínico (Neu5Gc) de una glicoproteína de glándula submaxilar porcina (111), y más tarde se obtuvieron varios ácidos siálicos O-acetilados de mucinas bovinas y equinas (112). No se ha encontrado ácido neuramínico sin sustituir en la naturaleza. En la Tabla VII puede verse distintos ácidos siálicos naturales.

Tabla VII: Nombres, abreviaturas y ocurrencia de algunos ácidos siálicos naturales.

<u>Nombre</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Ocurrencia</u>
Ac. N-acetil neuramínico	Neu5Ac	Tejido humano, de mono, <u>E.coli</u> (121)
Ac. N-acetil 9-O-acetil neuramínico	Neu9,5Ac2	Tejido de ratón, mono (30)
Ac. N-Acetil 4-O-acetil neuramínico	Neu4,5Ac2	Glándula submaxilar equina (122)
Ac. N-acetil 7,9-dio-O-acetil neuramínico	Neu5,7,9Ac3	Glándula submaxilar bovina (122)
Ac. N-acetil 8-O-metil neuramínico	Neu5Ac8Me	Estrellas marinas (<u>D.nippon</u>) (27)
Ac. N-glicolil neuramínico	Neu5Gc	Membrana de eritrocito equino (123)
Ac. 4-O-acetil N-glicolil neuramínico	Neu4Ac5Gc	Eritrocito y suero equino (122)
Ac. 4,9 di-O-acetil N-glicolil neuramínico	Neu4,9Ac25Gc	Tejido y suero equino (122)
Ac. N-glicolil 8-O-metil neuramínico	Neu5Gc8Me	Estrellas marinas (<u>A.pectinifera</u>) (26)
Ac. N-glicolil 8-O-sulfoneuramínico	Neu5Gc8S	Erizo de mar (23)

La presencia de ácidos siálicos en plantas no se ha podido confirmar (113). También están ausentes en la mayoría de las bacterias; las únicas excepciones las constituyen Escherichia coli, Neisseria meningitidis y varias cepas de Salmonella (112,114)

Es de notar que todas ellas son huéspedes de mamíferos e inclusive patogénicos. Los ácidos siálicos se han descrito raramente en virus. Se han encontrado como componentes de glicoproteínas del virus Sindbis, el Sarcoma de Rous y el virus que causa estomatitis vesicular. Se cree que los ácidos siálicos virales son sintetizados por sus huéspedes (113).

Una gran variedad de investigaciones han establecido la ausencia de ácidos siálicos en animales inferiores pertenecientes a los Protostomia, así como en insectos. (114). Existen datos discordantes sobre la presencia de ácidos siálicos en moluscos y crustáceos. Aunque en algunas especies se han encontrado en pequeñas cantidades, en otras no se han detectado (114). Warren describió la presencia de ácidos siálicos en la glándula digestiva del crustáceo Uca tangeri, la langosta Homarus americanus y el astáceo Astascus leptodactilus. Este último fue investigado en mayor detalle y solo se encontró ácido siálico en el intestino. Tampoco sintetizaba el ácido siálico a partir de N-acetilmanosamina como precursor (113). Esta observación, junto con el hecho de que el ácido siálico en éstos animales no estaba unido glicosidicamente, llevó a la conclusión

que, probablemente, este derive de los alimentos o de bacterias intestinales (113).

El grupo de animales pertenecientes a los Echinodermata , contiene ácidos siálicos unidos glicosidicamente a moléculas que tienen alguna función fisiológica .Warren (114) describió la presencia de ácido siálico en las cinco clases de Echinodermata. Además de Neu5Ac, se han detectado en estos animales, ácidos siálicos conteniendo grupos N-glicolil, O-acetil O-metil y O-sulfato, como componentes de gangliósidos (26 , 33)

Los ácidos siálicos se hallan ampliamente distribuidos en vertebrados (113) como componentes de glicoproteínas ,y gangliósidos. Se encuentran en muy baja proporción como moléculas libres en materiales biológicos como orina, suero y saliva humanos. Concentraciones mucho mayores acompañan ciertas enfermedades humanas.

4.2 SIALOGLICOCONJUGADOS EN TRYPANOSOMA CRUZI

En 1980 ,Pereira y colaboradores (72), llevaron a cabo estudios de aglutinación y ligamento de diferentes lectinas, con actividades específicas para diversos monosacáridos , con T.cruzi, en diferentes estadios. Encontraron receptores específicos para la lectina de germen de trigo en epimastigotes, Cuando se incubaban previamente las células con la enzima sia-

lidasas (C.perfringens), se perdía la capacidad de la lectina de aglutinar las células y de ligarse a epimastigotes. Analizaron colorimétricamente la cantidad de ácido siálico liberado por el tratamiento enzimático y estimaron un promedio de $7,7 \times 10^6$ residuos por célula. La capacidad de aglutinación de la lectina se regeneraba cuando se incubaban las células durante 4 horas en un medio de cultivo, el cual había sido pasado varias veces por una columna de WGA sepharosa 4B, para remover todo el material del medio que podía ligarse a la lectina, asegurándose así, la ausencia de ligaciones no específicas a la célula.

Por otra parte, Schauer y col (115), sometieron células enteras de diferentes cepas de epimastigotes de T.cruzi a la acción de la sialidasa, y a hidrólisis ácidas débiles, y analizaron por métodos colorimétricos, cromatografía en placa delgada y c.g.l, la presencia de ácidos siálicos en los sobrenadantes.

Para la cepa Y, determinaron la liberación del 36% del ácido siálico por la neuraminidasa, mientras que el 28% permanecía ligado. El análisis de la naturaleza del ácido siálico por c.p.d. y c.g.l reveló que se trataba de Neu5Ac y Neu5Gc en una relación 9:1, mientras que en la cepa Cl, esta relación era de 1:1

Cuando se incubaban los trypanosomas con N-acetil (³H) manosamina, precursor de ácidos siálicos, éstos incorporaban metabólicamente la marca. Sin embargo, cuando un hidrolizado de

las células se pasaba por una columna de intercambio aniónico, casi toda la radiactividad se eluía con agua, mientras que en el eluído con ácido fórmico se recuperaba muy poca radiactividad, la cual no comigraba con los ácidos siálicos ya identificados en varios sistemas cromatográficos. Este resultado les sugería que los ácidos siálicos no eran biosintetizados por el parásito, sino que eran tomados del medio, hipótesis que podría explicar también las distintas proporciones en que se encontraban los ácidos siálicos en las diferentes cepas, ya que éstas se cultivaban en distintos medios.

J. da silveira y Colli (116), llevaron a cabo un análisis químico de la membrana plasmática de epimastigotes de T.cruzi.

En la fracción libre de lípidos no detectaron la presencia de ácido siálico por métodos colorimétricos, lo cual sugería la presencia del mismo en fracciones lipídicas.

La movilidad electroforética de células epimastigote y trypomastigote, indicó que poseen una carga superficial negativa neta, siendo en el trypomastigote mayor que en epimastigote (117).

El tratamiento de las células con neuraminidasa, redujo la movilidad electroforética celular en un 17% para los epimastigotes y un 52%, para los trypomastigotes. Estas células recuperaban su normal movilidad electroforética cuando eran incubadas en un medio de cultivo fresco. El proceso de recu-

peración era inhibido, en parte cuando se agregaban al medio de cultivo inhibidores de síntesis de proteínas (puromicina), o tunicamicina. Estos resultados sugerían la presencia de sialoglicoproteínas y/o sialoglicolípidos en la superficie celular de epimastigotes y trypomastigotes de T.cruzi.

Las formas epimastigote de T.cruzi se lisan por suero normal, a través de la activación del camino alternativo del complemento (ACP). En contraste, los trypomastigotes son resistentes a la lisis por activación del ACP en ausencia de anticuerpos. Kipnis y col (118), han demostrado que el tratamiento de los trypomastigotes con sialidasa o tripsina, hace a estas formas sensibles a la lisis por ACP.

La sensibilidad a tripsina y sialidasa de los componentes superficiales de membrana, que protegen a los trypomastigotes de la lisis por activación del ACP, ha indicado que puede estar involucrada una sialoglicoproteína.

En ninguna de las experiencias anteriormente descritas se ha determinado inequívocamente la naturaleza del sialoglicoconjugado.

Couto y col (119), han realizado estudios de incorporación de (³H)galactosa y (³H)palmitico en glicolípidos ácidos de formas trypomastigote de T.cruzi. La incorporación de palmitico fue mucho mayor que la de galactosa. El análisis de los glicolípidos acídicos por c.p.d., mostró la incorporación de

ácido palmítico en cuatro componentes, dos de los cuales cambiaban su movilidad cuando eran tratados con neuraminidasa, por lo que se dedujo que se trataban de sialoglicolípidos.

Por otra parte, cuando se trataba la superficie celular con la enzima galactosa oxidasa, seguida por reducción con B^3H_4NA , se marcaban los sialoglicolípidos, lo que indicó su localización en la membrana plasmática.

Previato y col (120), aislaron de un extracto fenol agua de epimastigotes, un glicoconjugado de PM 43.000 cuya composición de azúcares variaba de acuerdo al medio de cultivo utilizado.

Cuando crecían en una infusión de cerebro, corazón, hemina y suero fetal, el glicoconjugado, contenía galactosa, manosa, glucosa, hexosamina y ácido siálico. En ausencia del suero fetal, se encontraban los mismos azúcares, salvo el ácido siálico.

Este glicoconjugado se pegaba a una lectina de germen de trigo, a Concanavalina A y a una hemoaglutinina de Wisteria floribunda. El asialoglicoconjugado, obtenido del medio sin suero fetal, o por tratamiento con neuraminidasa del sialoglicoconjugado, solamente no se unía a la lectina de germen de trigo.

Cuando los epimastigotes obtenidos del medio suplementado con suero fetal, se trataban con neuraminidasa, y luego se incubaban en presencia de suero fetal, recuperaban su capacidad de aglutinar la lectina de germen de trigo.

Esta capacidad también se regeneraba en presencia de fetuina marcada en el ácido siálico por oxidación con periodato y reducción con D^3H_4 -, y de sorbitol(3H) sialil lactitol, pero no en presencia de Neu5Ac(^{14}C). Las células se marcaban solamente cuando eran incubadas con la fetuina radiactiva.

Debido a la efectividad de la fetuina y la sialil lactosa como sustratos donores de ácidos siálicos, los autores han sugerido la existencia de una sialil transferasa de superficie que no utilice como donador de ácido siálico, CPM - siálico.

Recientemente (198), se ha descrito una sialoglicoproteína (Tc85) de formas trypomastigote de células de cultivo, que estaría involucrada en la penetración del parásito en la célula huésped.

DESCRIPCION Y DISCUSION

DE LOS RESULTADOS

CAPITULO 5

ANALISIS DE GLICOCONJUGADOS DE
CEPAS TULAHUEN Y YPSILON EN
FORMAS EPIMASTIGOTE DE T. CRUZI

5.1 FRACCIONES SUBCELULARES DE CELULAS EPIMASTIGOTE DE
TRYPANOSOMA CRUZI, CEPA TULAHUEN 2

Las fracciones subcelulares de epimastigotes de T.cruzi, separadas por centrifugación diferencial, muestran un comportamiento diferente desde el punto de vista bioquímico e inmunológico (124). Segura y col. analizaron el contenido de DNA, RNA y marcadores enzimáticos en estas fracciones. La fracción nuclear (precipitada a 1000g y extraída convenientemente), contenía la mayor parte del DNA, y la fracción microsomal, (precipitada a 105.000g), la mayor parte del RNA. Dentro de los marcadores enzimáticos, la succinato dehidrogenasa se encontraba en la fracción mitocondrial, la fosfatasa ácida en la fracción lisosomal (precipitada a 11.500g), y la glucosa-6-fosfatasa, en la microsomal.

En este estudio se ha encarado la diferenciación de las distintas fracciones subcelulares, en base al análisis de los glicoconjugados presentes en las mismas.

Todas estas fracciones fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida 15%, en presencia de SDS. Los geles se revelaron con el reactivo de Acido periódico -Schiff (APS) (oxidación de azúcares convenientemente ligados y posterior reacción con reactivo de Schiff) y luego se realizaron las densitometrías a 560 nm (Fig. 6). Las densitometrías se

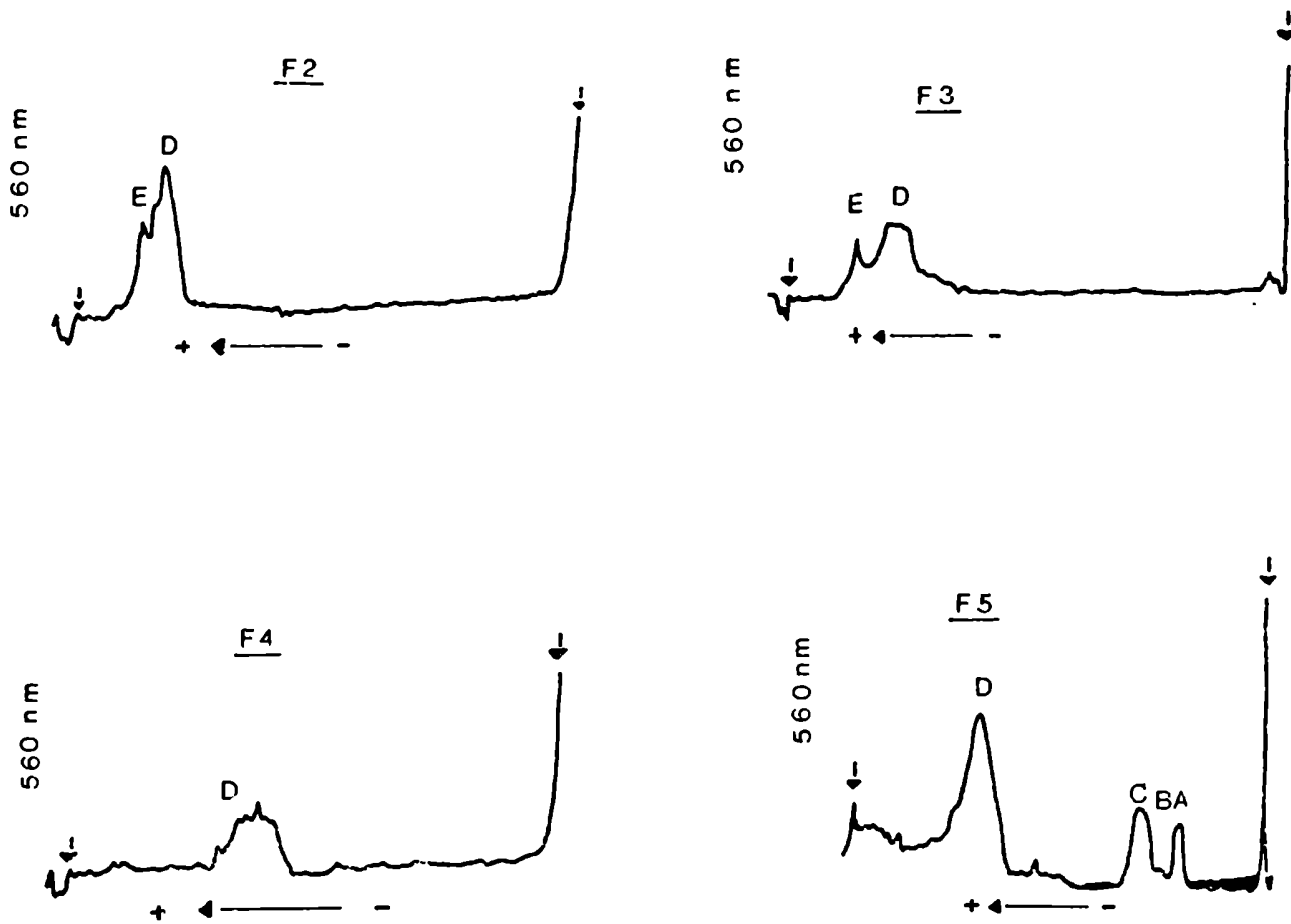


Fig 6: Densitometrías de electroforesis en geles de poliacrilamida (15%) en presencia de SDS de las fracciones subcelulares de *T.cruzi* epimastigotes, cepa Tulahuen 2. Los geles se colorearon con el reactivo de APS. F2= Precipitado a 5000g; F3= Precipitado a 11.500g; F4= Precipitado a 30.000g; F5= Precipitado a 105.000g .

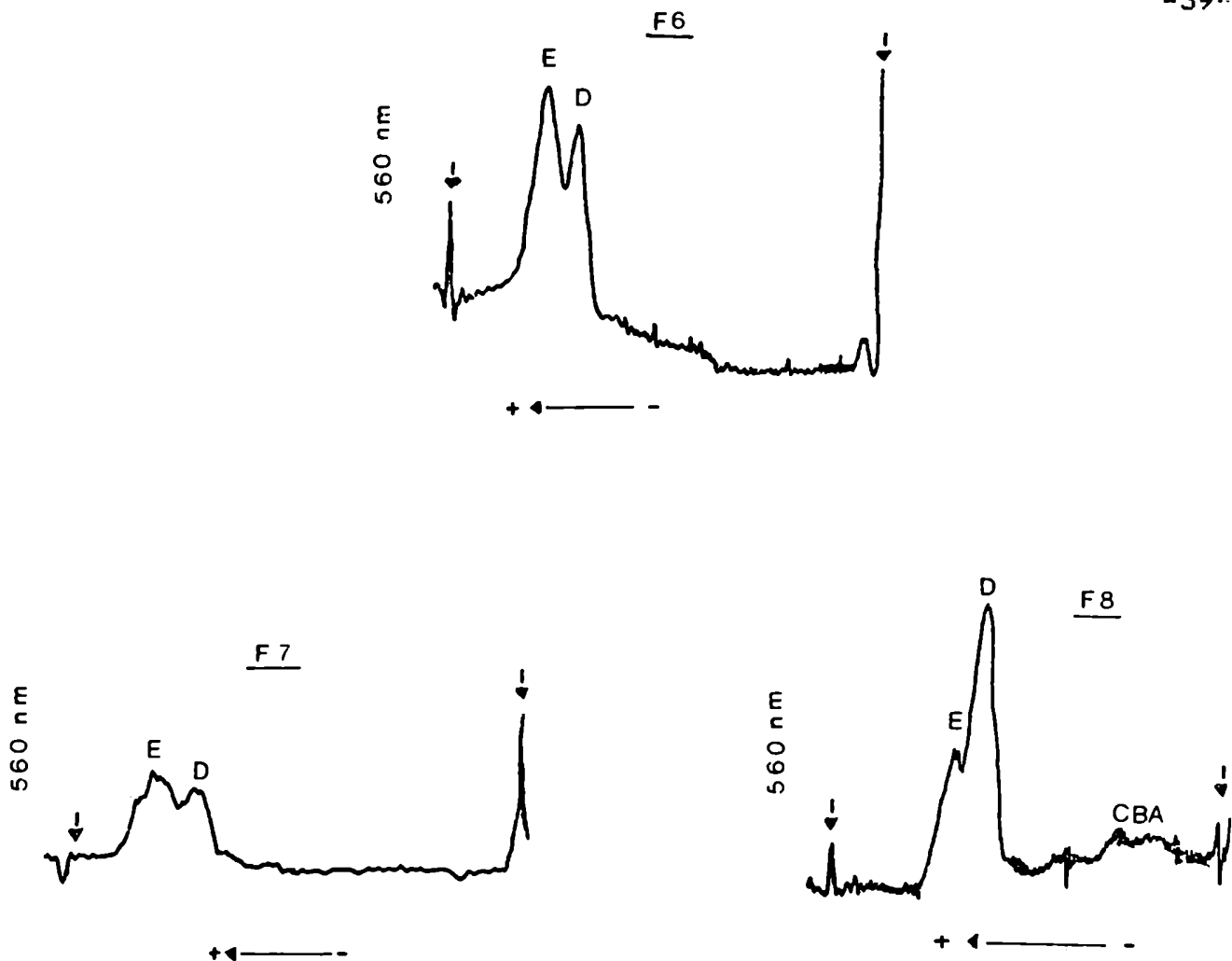


Fig 6(cont): Densitometrías de electroforesis en geles de poliacrilamida (15%) en presencia de SDS de las fracciones subcelulares de *T.cruzi* epimastigotes, cepa Tulahuen 2. Los geles se colorearon con el reactivo de APS. F6= Flagelo; F7= Homogenato total obtenido con desintegrador Sorvall Ribi; F8= Homogenato total sonicado con inhibidor de proteasas.

compararon con la del complejo de glicoconjugados (A,B,C,D) aislados de la cepa Y (95-99).

En el homogenato total (F8) en presencia de inhibidor de proteasas, se observan cinco bandas (Fig 6 y 7). Las tres de menor movilidad se corresponden con las bandas ABC, descritas por Alves y Colli (95), en la cepa Y, como un complejo glicoproteico extraible por fenol-agua. Es de notar que la cepa Tulahuén que proviene de la cepa Tulahuén mantenida 8 años en cultivo y que había perdido su infectividad, presenta en el análisis por electroforesis en geles, una sola glicoproteína en la zona en que aparece el complejo ABC (125,126). Por otra parte Gottlieb informó la presencia de las tres bandas para la cepa Tulahuén (127).

También se observa la presencia de la banda D, purificada y caracterizada por Lederkremer y col, como un lipopeptidofosfoglicano (96-99,128). A la altura del colorante, se observa otro glicoconjugado, de naturaleza lipídica denominado para la cepa Y, banda E (100,129).

Este complejo de glicoconjugados está presente en la célula y no se forma por acción proteolítica.

El citosol (F1) no reveló ninguno de estos glicoconjugados por análisis electroforético, lo cual descarta la presencia de los mismos en la fracción soluble de la célula.

En las mitocondrias (representadas por el sedimento a 5000g,

(F2)), sólo se observan las bandas D y E , siendo la primera la más abundante; el perfil electroforético del sedimento a 11.500 g (lisosomas,F3) es similar, mientras que en el sedimento a 30.000 g, (F4), sólo aparece banda D.

La fracción microsomal(F5), formada por un conjunto de membranas externas y del retículo endoplasmático, complejo de Golgi, ribosomas, etc, sedimenta a 105.000g. El perfil electroforético de la misma nos muestra la presencia del complejo ABCD.

Lopetegui y col (130) han comprobado que esta fracción induce la producción de anticuerpos fijadores de complemento en conejo, aunque se comporta como un inmunógeno débil.

La fracción flagelar (F6), fue obtenida por centrifugación en gradiente de sacarosa a 24.500 rpm (78) del sedimento a 1000g. El glicoconjugado más abundante en esta fracción es el glicolípid E. (Fig 6 y 7).

Ruiz (131) observó que esta fracción es capaz de inducir una inmunoprotección alta en animales , contra infecciones letales producidas por el parásito. Además, un anticuerpo anti-flagelo reconocía un compuesto de movilidad electroforética similar a un testigo de PM 15 KDa, con características de glicoconjugado . Este compuesto podría estar relacionado con las bandas D o E.

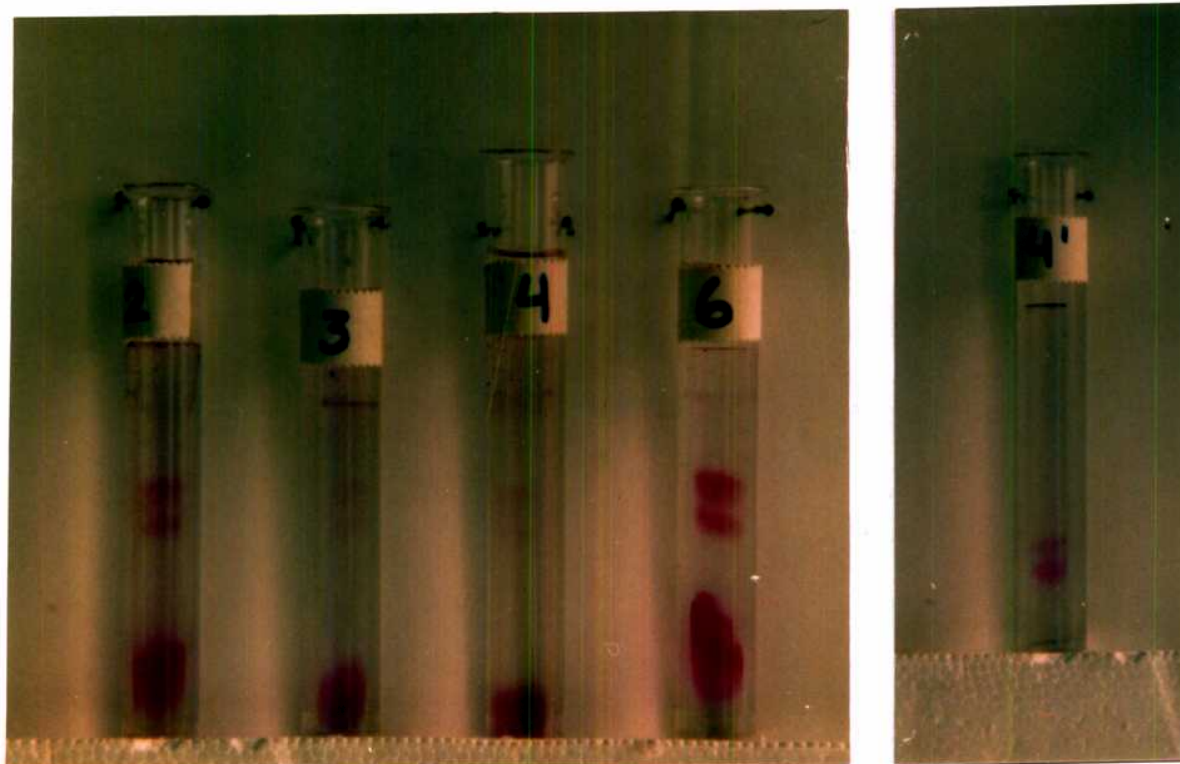


Fig 7: Electroforesis en geles de poliacrilamida (15%) de fracciones subcelulares de T. cruzi, cepa Tulahuen 2.

- 2) Homogenato total, 3) Sedimento a 11.500 g, 4,4') Flagelo,
6) Sedimento a 105.000 g

5.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES

Se analizaron los azúcares totales en relación a proteínas en cada una de estas fracciones, cuyos resultados se representan en la Tabla VIII.

Tabla VIII: Relación azúcar/proteína en fracciones subcelulares de T. cruzi, epimastigotes.

<u>Fracciones</u>	<u>Azúcar</u>	<u>Proteínas</u>	<u>Azúcar/proteína</u>
F1	0,18	3,6	0,05
F2	0,26	5,9	0,04
F3	0,26	5,8	0,04
F4	0,36	4,7	0,07
F5	1,08	9,0	0,12
F6	0,04	0,7	0,06
F7	0,28	7,7	0,03
F8	0,26	6,1	0,04

La fracción microsomal (o sea de membranas) presenta la mayor relación de azúcares con respecto a proteínas, lo cual coincide con la presencia de todos los glicoconjugados en la misma. Su relación aumenta con respecto al homogenato total, indicando que en esta fracción se concentraría la mayor parte de los

glicoconjugados.

Se han analizado los monosacáridos componentes de algunas de las fracciones subcelulares por c.g.i. como acetatos de alditoles (Tabla IX)

Tabla IX: Azúcares componentes de las fracciones subcelulares de *Trypanosoma cruzi*

	RIBOSA	MANOSA	GALACTOSA	GLUCOSA	INOSITOL	AMINOAZUCAR
	(g/ 100 g de azúcares totales)					
F2	15,7	21,5	16,1	19	25,8	5,3
F3	11	24,4	38,0	1	7	2,0
F4	23	19	16,7	3	33,2	5,4
F5	28	25	24,0	9	11,0	6,5
F8	11	20,0	18,5	2	29,1	2,9

En el sedimento a 105.000 g (F5), se encuentra el mayor porcentaje de ribosa, ya que en esta fracción precipitan fragmentos de ribosomas y complejo de Golgi.

También es importante el porcentaje de galactosa y manosa, componentes principales de glicoconjugados presentes en la membrana. Es interesante la proporción alta de galactosa, que, además de estar presente en el LPPG (96-99), es componente principal de la glicoproteína de Tul 0 (125). La glucosa, como se

5.3 MARCACION DE LA MEMBRANA PLASMATICA DE EPIMASTIGOTES DE T. CRUZI, CEPAS TULAHUEN 0 (TUL0) Y TULAHUEN 2 (TUL 2).

La enzima galactosa-oxidasa oxida selectivamente el hidroxilo en C-6 de D-galactosa ; N-acetil D-galactosamina y D-galactosamina presentes en oligosacáridos. El aldehído resultante puede incorporar tritio mediante una reducción con NaB^3H_4 .

Esta técnica ha sido utilizada para marcar selectivamente glicoconjugados de membrana, ya que la enzima no penetra membranas celulares .Steck y col , (136) demostraron que el perfil de glicoconjugados que se marcan en eritrocitos enteros, es cualitativamente el mismo que el de membranas aisladas.

La enzima ataca preferentemente las unidades de galactosa terminales, siendo la velocidad de oxidación de las unidades internas, mucho menor.

Existen controversias acerca de la oxidación por la enzima de unidades de D-galactofuranosa. El galactofuranosilglicerol y el metilD-galactofuranósido no pudieron ser oxidados por la enzima (137). Por otra parte, se ha informado la oxidación de residuos de D-galactofuranosa de un galactano y una glicoproteína (138). La hipótesis de que la enzima necesitaría de un sustrato de alto peso molecular no está de acuerdo con la alta reactividad del metil D-galactopiranosido (139).

Se demostró que es importante el tamaño del sustituyente en

C-4 de la galactosa, para la acción enzimática (140). En la configuración furanósica, el hidroxilo del C-4 está involucrado en la formación del ciclo. El impedimento de los sustituyentes de los dos carbonos exocíclicos para adoptar una conformación óptima para el ataque por la enzima, podría explicar la falta de interacción de algunas estructuras furanósicas con la enzima.

La marcación específica de superficie celular, en conjunción con otros métodos, tales como la inmunoprecipitación, ha sido usada con éxito para identificar importantes componentes de membranas de parásitos, tales como las glicoproteínas.

La presencia de las glicoproteínas ABC en la superficie celular de epimastigotes de cepa Y, fue evidenciada por la oxidación de parásitos vivos con la enzima galactosa oxidasa, seguida por reducción con NaB^3H_4 (100). En la Fig 8 se muestra el perfil de marcación de epimastigotes totales.

En fracciones de membrana plasmática, aisladas por vesiculación a pH ácido (76) o centrifugación diferencial (74), se observa un enriquecimiento en estos componentes.

El LPPG incorpora poca marca por esta técnica, lo cual se debería a que las unidades de galactosa se encuentran en su mayoría en la configuración furanósica (141).

Ninguna de las sustancias del complejo ABCD pudo detectarse por este método en trypomastigotes y amastigotes de I.

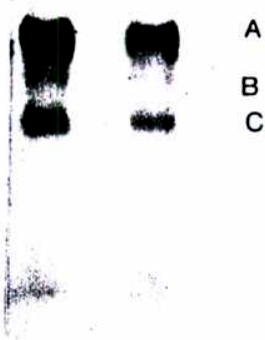


Fig 8: Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de epimas
tigotes (cepa Y), marcados con galactosa-oxidasa- NaB^3H_4 .

cruzi, cepa Y (100).

Gottlieb (101) obtuvo un suero de conejo anti ABCD de cepa Tulahuén. Este suero se unía al parásito vivo, lo cual indicaba la presencia del complejo en la membrana plasmática.

Sin embargo, no existían evidencias por métodos químicos de la localización en membrana plasmática de éstos componentes para la cepa Tulahuén.

Con el objeto de comparar los glicoconjugados de membrana, se llevó a cabo la marcación externa de epimastigotes de dos líneas de cultivo de la cepa Tulahuén por la técnica de galactosa oxidasa- NaB^3H_4 . Este procedimiento se aplicó a una línea mantenida en cultivo durante 8 años, no infectante (Tul 0), y a otra línea de reciente aislamiento en cultivo en medio bifásico desde ratón y usada en el repique 14-16, a partir del aislamiento (142) (Tul 2). Para marcar los parásitos se siguió básicamente la técnica descrita por Zingales y col (100) para epimastigotes de la cepa Y. Paralelamente se marcaron el complejo glicoproteico aislado de la cepa Y (ABC) y la glicoproteína (GP45) aislada de la cepa Tul 0 (125).

El análisis de los compuestos marcados se realizó por electroforesis en gradiente de geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Este sistema (143), que se caracteriza por ser discontinuo en el pH del buffer y en el tamaño del poro de la acrilamida, mejora notablemente la resolución de una mezcla

de proteínas.

Cuando las proteínas son sometidas a electroforesis en gradientes de geles, eventualmente alcanzan la parte de la matriz donde los poros son suficientemente pequeños como para reducir su movilidad a cero, en consecuencia, proteínas de diferentes tamaños se detienen en regiones diferentes del gel, dando como resultado, bandas finas y bien separadas.

Para visualizar los glicoconjugados marcados con tritio, es necesario impregnar el gel con un centellador antes de secarlo, lo cual incrementa la impresión en placas radiográficas de moléculas marcadas con isótopos que emiten partículas de baja energía (144).

Se puede observar en la Fig 9 el perfil diferente de glicoproteínas marcadas para las dos líneas de la cepa Tulahuén

En la línea Tul 0, se observa en la zona de ABC, solamente la glicoproteína de Mr=45 kDa (Rm= 0,35), que coincide con la glicoproteína aislada. Además se observa la incorporación de la marca en las bandas D y E.

En el canal central (Fig 9), en que se sembró mayor número de c.p.m., se distingue una banda tenue de Mr=25 Kda (Gp25). Esta constituye el glicoconjugado que se marca en forma preferencial en Tul 2.

El perfil obtenido para ambas líneas de la cepa Tulahuén, es diferente del de la cepa Y (Fig 9). En esta última se detectó

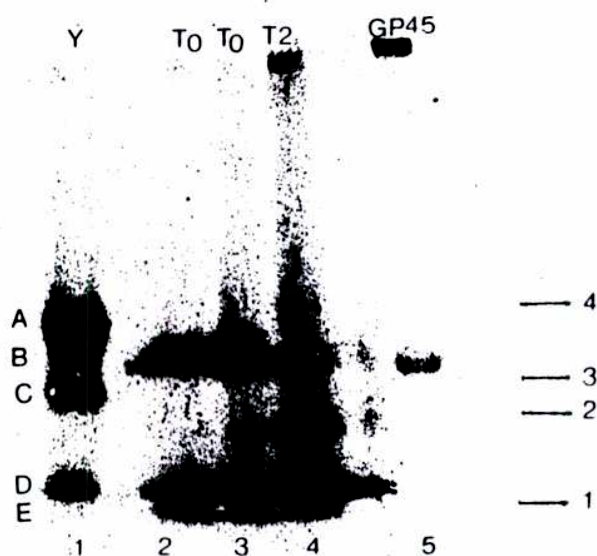


Fig 9: Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de epimastigotes marcados con galactosa oxidasa- $\text{NaB } ^3\text{H}_4$. 1) Extracto fenol-agua (95) de epimastigotes cepa Y (25.000 cpm) 2) Lisado de epimastigotes, cepa Tul 0 (20.000 cpm) ; 3) Lisado de epimastigotes ,cepa Tul 0 (35.000 cpm); 4) Lisado de epimastigotes , cepa Tul 2 (35.000 cpm) ; 5) GP45, purificada según (125) de epimastigotes, cepa Tul 0.

Los pesos moleculares de las proteínas patrones que se muestran a la derecha son 1: 14.300; 2: 28.600; 3: 42.900; 4: 57.200.

un componente de movilidad similar a Gp 25, en epimastigotes marcados endógenamente con (^{14}C)-glucosa (100). Es de señalar que la electroforesis en geles de poliacrilamida de poro homogéneo no permitía diferenciar los glicoconjugados de las cepas comparadas, como pudo hacerse con el uso de geles con gradiente de poliacrilamida.

En el complejo aislado con fenol-agua de cepa Y, revelado con reactivo de Schiff para azúcares, Gp25 no se detectaba (96), pero recientemente la misma se visualizó con el reactivo de nitrato de plata (145). Una glicoproteína de Mr= 25 kDa obtenida de epimastigotes, es inmunoprecipitada por suero de paciente con enfermedad de Chagas crónica (146).

La glicoproteína Gp45 es componente mayoritario de la membrana celular de epimastigotes de la línea Tul 0, mientras que Gp25 sólo se observa nítidamente en Tul 2.

Podría pensarse que la diferente composición de glicoconjugados de membrana para ambas líneas puede estar relacionada con la distinta infectividad (142).

Por iodación de las proteínas de superficie, también se encontró un perfil diferente para Tul 0 y Tul 2 (147).

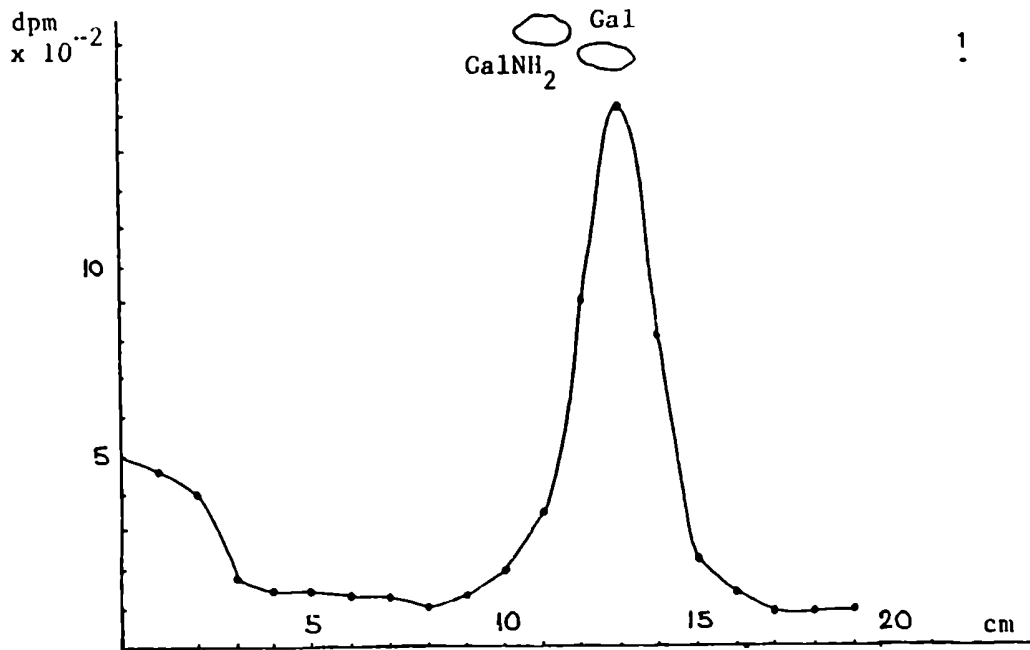
También diferencias interclonales de las proteínas marcadas con iodo, fueron descritas para epimastigotes de varias cepas (148).

El hecho de encontrar incorporación en la banda D (LPPG) que

se marca pobremente en cepa Y, podría indicar una distinta proporción de galactosa pirarósica en muestras de LPPG provenientes de distintas cepas y aún mismo en distintas partidas de la misma cepa. Ferguson y col (149), también encuentran que células de un clone de la cepa Y, incorporan bien la marca en el LPPG, cuando se tratan con galactosa oxidasa seguida de NaB^3H_4 . Por estudios de metilación del LPPG de cepa Y, se determinaron sólo trazas de galactopiranososa terminal (99). La microheterogeneidad en glicoproteínas es un fenómeno conocido (150).

Las células marcadas de las dos líneas, se suspendieron en agua y se extrajeron con cloroformo-metanol (2:1). Se recuperó para Tul 0 un 47% de la radiactividad en la fase orgánica y para Tul 2 un 37%. La electroforesis del residuo no mostró el componente E, lo cual indicaba su naturaleza lipídica y, por el hecho de haberse marcado con galactosa oxidasa- NaB^3H_4 , la presencia de galactosa o galactosamina .

Para determinar los azúcares marcados, se realizaron hidrólisis ácidas de las fracciones deslipidizadas de las células marcadas, como así también de las glicoproteínas aisladas. Las cromatografías en papel de los distintos hidrolizados (Fig 10), mostraron la incorporación de la marca en galactosa.



-74-

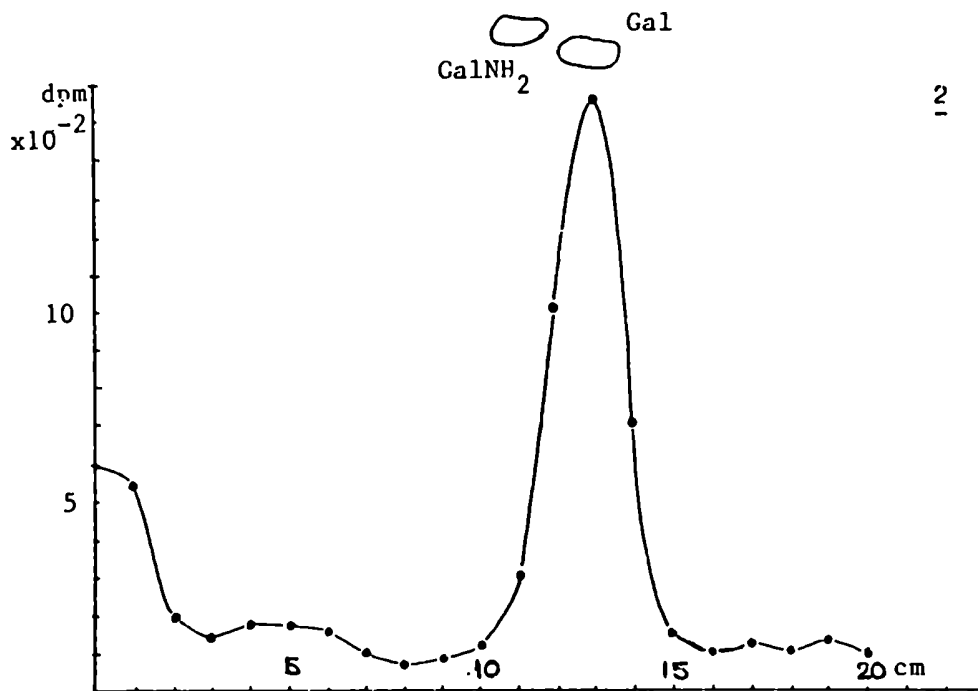


Fig 10: Cromatografía en papel en Butanol: Piridina: Agua (6:4:3) de hidrolizados ácidos, marcados con galactosa oxidasa $\text{NaB}^{14}\text{H}_4$: 1) Gp45; 2) ABC.

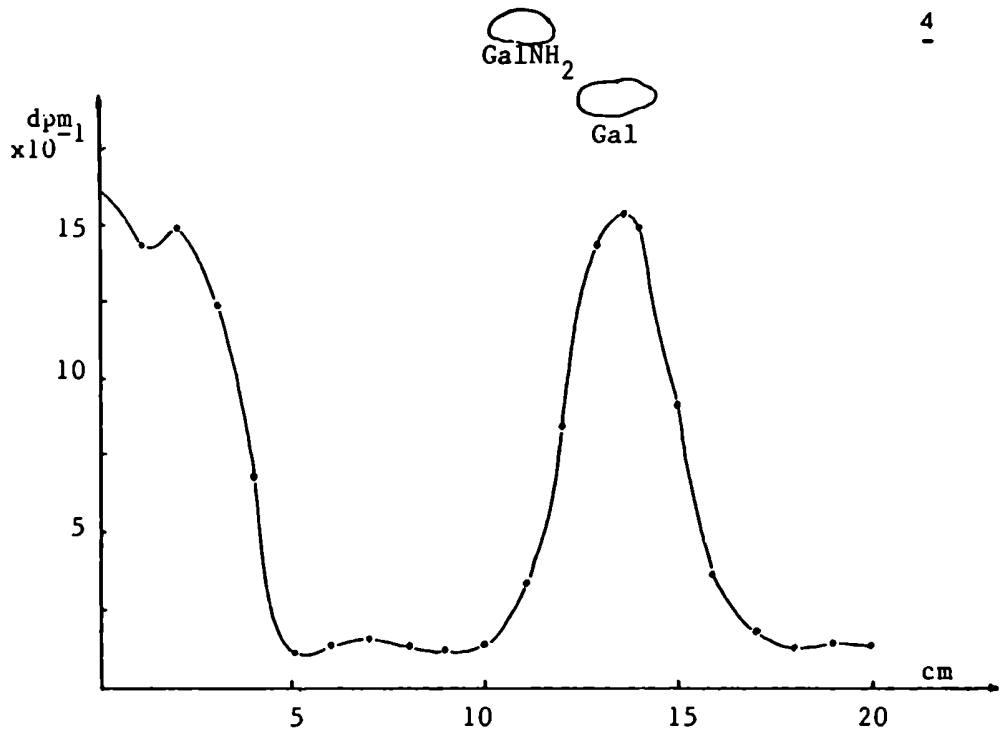
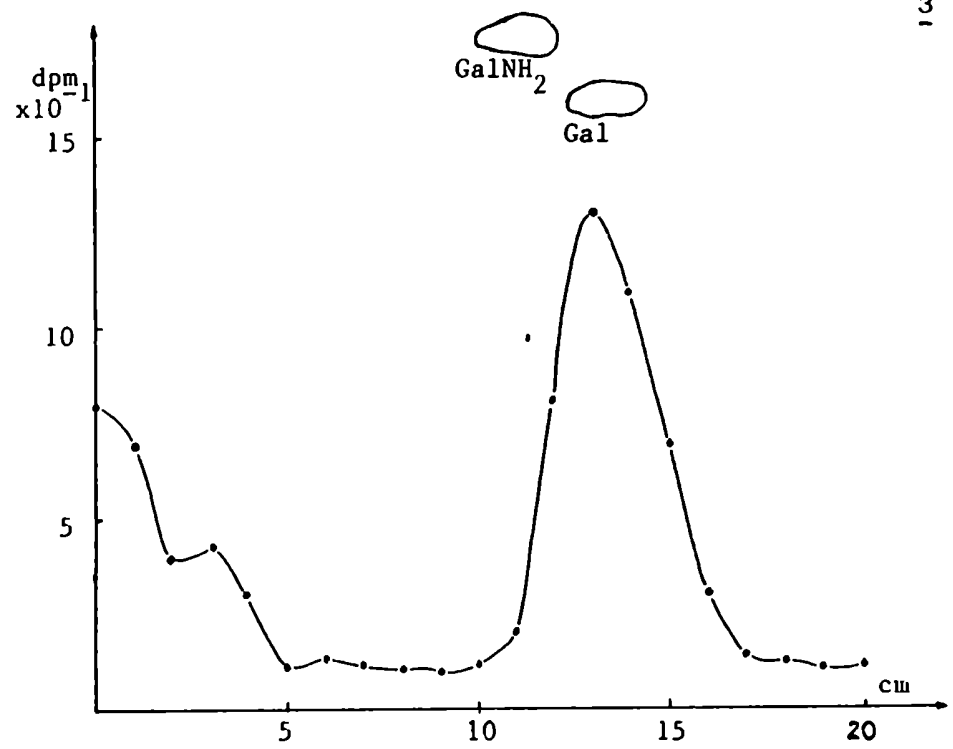


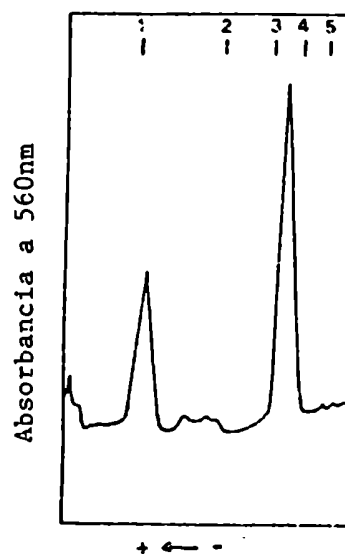
Fig 10': Cromatografía en papel en Butanol: Piridina: Agua (6:4:3) de hidrolizados ácidos, marcados con galactosa oxidasa $NaB^{24}H_4.3$) Lisado de epimastigotes deslipidizados cepa Tul 2
 4) Lisado de epimastigotes deslipidizados, cepa Tul 0.

5.4 ESTUDIOS COMPARATIVOS REALIZADOS SOBRE LA GLICOPROTEINA GP45 DE TUL Ø Y APC AISLADAS DE CEPAY

5.4.1. Purificación de Gp45 y ABC respectivamente

Para aislar las glicoproteínas de la cepa Y, al igual que para aislar la GP45 de la cepa Tul Ø, se utilizó la técnica de extracción con fenol 44% en agua (95). De la fase acuosa se precipitó el complejo de glicoconjugados con 4 volúmenes de etanol. La electroforesis en geles de poliacrilamida 15% del complejo extraído de la cepa Y mostró la presencia de las bandas ABCD, con valores de $R_m = 0,20; 0,24; 0,29$ y $0,74$ respectivamente. El complejo extraído de la cepa Tul Ø presentó dos glicoconjugados de $R_m = 0,24$ $0,74$ (GP45 y Banda D) respectivamente. El M_r de GP45, fue estimado por comparación de la migración electroforética con proteínas patrones (Fig 11).

Fig 11: Densitometría de la electroforesis en geles de PAA 15% del complejo extraído con fenol-agua de T.cruzi, cepa Tul Ø. El gel se reveló con APS. Los pesos moleculares de las proteínas patrones que se muestran en el tope de la figura son 1: 14.300; 2: 28.600; 3: 42.900 4: 57.200; 5: 71.500.



En ambos casos se procedió a extraer el lipopeptidofosfoglucano (banda D), con cloroformo:metanol:agua (10:10:3) (99). Las glicoproteínas quedan impurificadas principalmente con ácidos ribonucleicos.

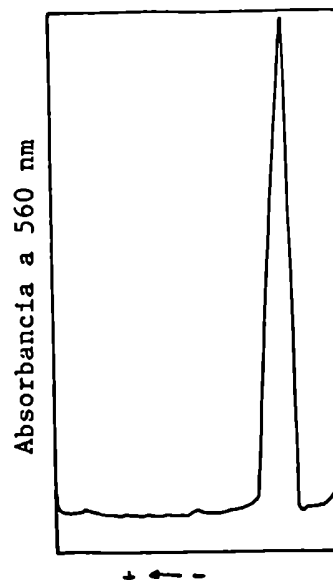
El complejo ABC se purificó por cromatografía en biogel P-150 en presencia de SDS 0,1% (96) y se confirmó la pureza por electroforesis en geles 15%.

Para purificar GP45 se utilizó, en cambio, una resina de intercambio aniónico, DEAE celulosa, eluyendo con buffer Tris-HCl con concentraciones crecientes de NaCl (Fig 12)

El análisis electroforético de la fracción eluída con NaCl 0,4%, mostró la presencia de GP45 como único componente (Fig 13)

Este método de purificación es más rápido que el utilizado previamente (125), que consistía en una digestión con ribonucleasa, diálisis y posterior pasaje a través de columna de Biogel P-150.

Fig 13: Densitometría de la electroforesis en geles de PAA 15%, obtenida luego de revelar con APS, de la fracción eluída de la columna DEAE- celulosa con buffer Tris-HCl- NaCl 0,4%



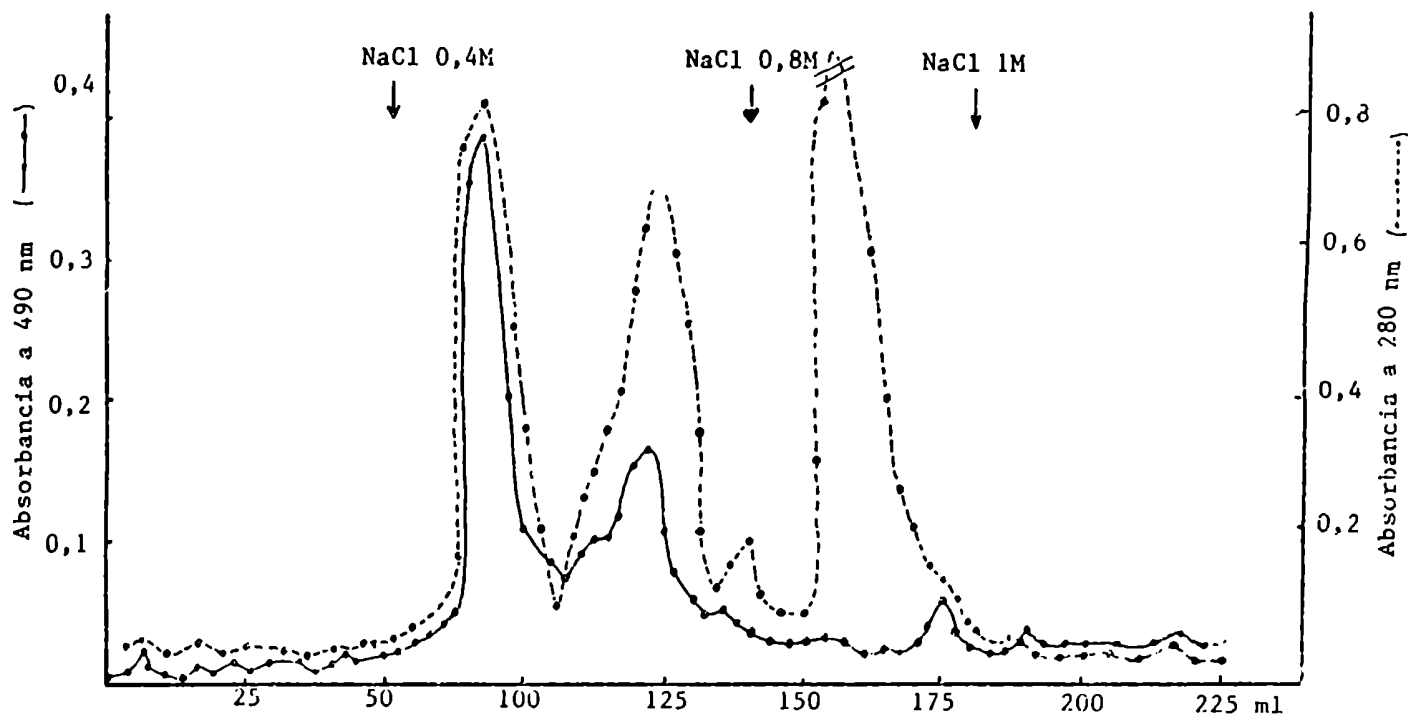


Fig 12: Cromatografía en columna de intercambio aniónico DEAE-celulosa. El extracto fenol-agua de epimastigotes de *T.cruzi*, cepa Tul 0, se precipitó con etanol (4 vol). El precipitado se extrajo con C:M:H₂O (10:10:3 v/v/v) y el residuo (20 mg) se cromatografió en una columna de DEAE- celulosa (0,5 x 20 cm), eluyendo con buffer Tris-HCl 0,05M pH 8,0; con concentraciones crecientes de NaCl.

5.4.2. Composición de azúcares de GP45 y ABC

Los azúcares totales presentes, analizados por el método del fenol-sulfúrico representan un 17% del peso, para GP45 y un 14% para ABC. La composición de los azúcares se analizó por c.p y c.g.l, luego de hidrólisis ácida de las glicoproteínas. Por c.p. se determinó la presencia de galactosa, manosa y glucosamina, para ambas muestras y además, trazas de xilosa para ABC.

Por c.g.l. se encontró una relación molar de galactosa :manosa 3:1 para GP45 y una relación galactosa :manosa : glucosa 3:2:1 para ABC (Tabla X)

Tabla X: Azúcares componentes de las glicoproteínas ABC de cepa Y y GP45 de Tul Ø (% peso de azúcares/peso de glicoproteína)

COMPONENTE	GP45	ABC
Galactosa	13%	8,5%
Manosa	4%	5 *
Glucosa	tr.	2 *
Glucosamina	6^	4 ^
Xilosa	n.d.	tr.

* Determinado por c.g.l

^ Determinado colorimetricamente por Elson Korgan

Por otra parte, la hexosamina se determinó por reacción de Elson Morgan, encontrándose 6% para GP45 y 4% para ABC. Llama la atención la alta proporción de hexosamina, lo cual indicaría que la mayor parte de las cadenas de azúcar no son del tipo alta manosa, N-glicosídicas.

Hasta el momento no ha sido informado la separación en sus componentes del complejo ABC.

Ferguson y col, determinan los monosacáridos en un complejo de tres glicoproteínas que aíslan también con fenol-agua (149), aunque su peso molecular sería menor que el de ABC, y encuentran los mismos azúcares en el mismo orden de abundancia, aunque no detectan xilosa.

5.5. ESTUDIOS DE LAS UNIONES DE LOS OLIGOSACARIDOS Y LA PORCION PEPTIDICA DE GP45Y ABC

La existencia de uniones glicosídicas a grupos hidroxilo de residuos de serina o treonina en cadenas peptídicas fue reconocida por primera vez en glicoproteínas de secreciones mucosas y proteoglicanos (151, 152). Posteriormente tales uniones fueron halladas en un gran número de proteínas plasmáticas, colágeno de anélidos, membranas plasmáticas y glicoproteínas de hongos. En tanto que en la mayor parte de las glicoproteínas conteniendo este tipo de unión, ambos residuos

serina y treonina, están involucrados, en algunos casos solamente uno de ellos interviene (153).

Cuando las glicoproteínas o los glicopéptidos que contienen uniones de azúcares a estos α -amino- β -hidroxiácidos, son tratados en condiciones alcalinas suaves, (NaOH 0,3M, 45°C, 6h), la unión glicopeptídica se rompe por un proceso de β -eliminación liberándose el oligosacárido por su extremo reductor y formándose un aminoácido insaturado en el péptido (Fig 14).

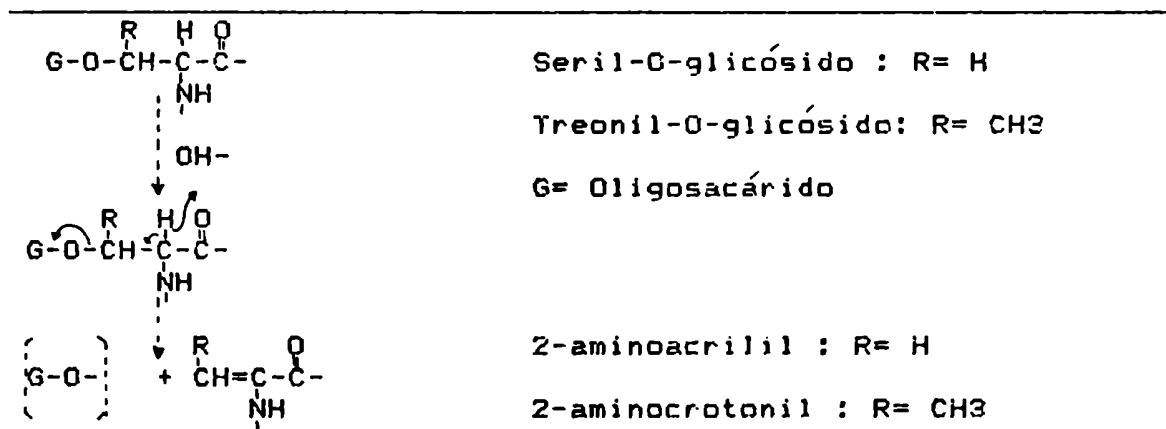


Fig 14: Mecanismo de ruptura por β -eliminación de uniones O-glicosídicas a α -amino- β -hidroxiácidos.

Para estudiar la existencia de este tipo de uniones en las glicoproteínas GP45 y ABC, muestras marcadas con la técnica de galactosa oxidasa- NaB³H₄, se incubaron respectivamente, en NaOH 0,3M a 45° durante 6 h. Las mezclas de reacción de la β -eliminación se neutralizaron y se cromatografiaron en Biogel

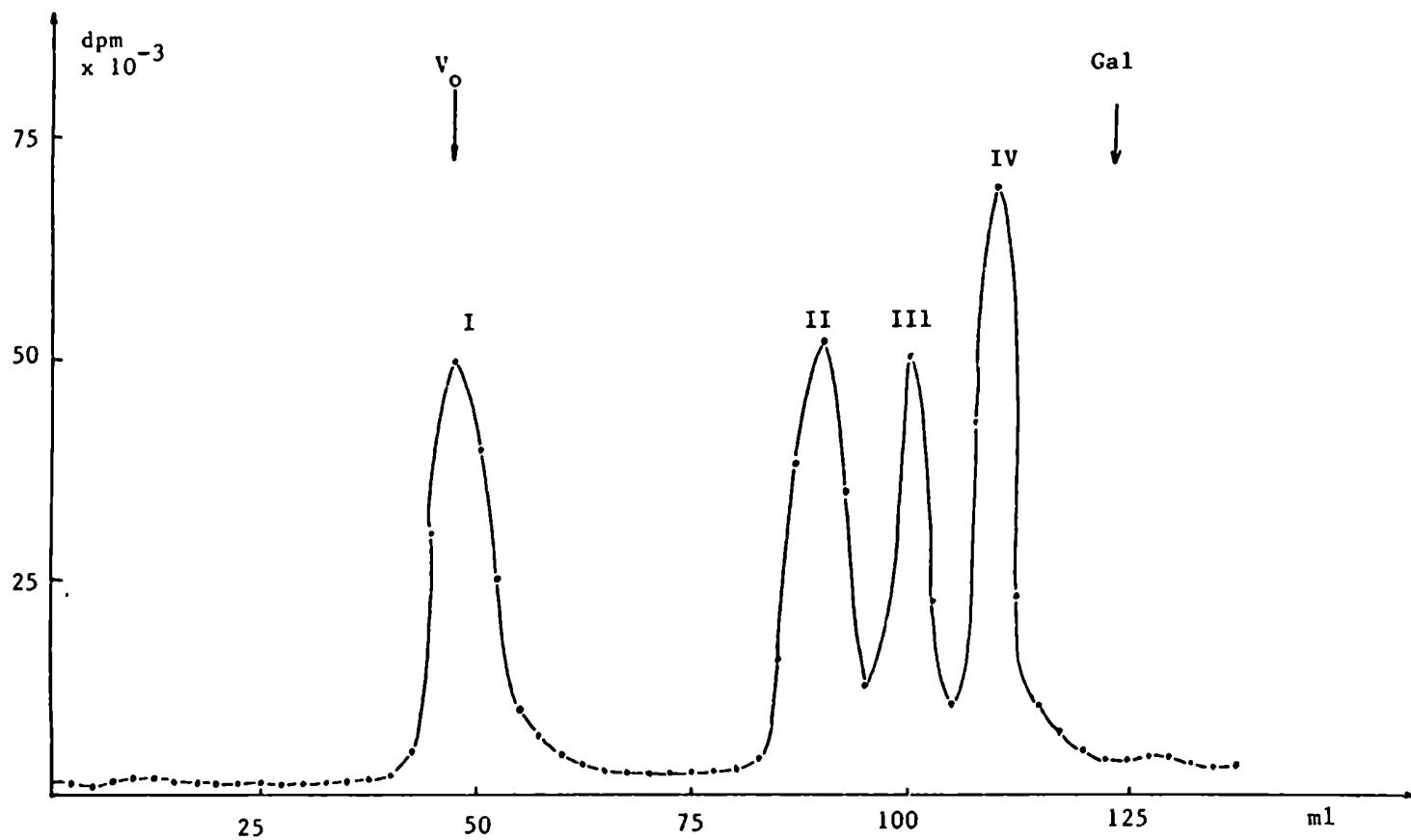


Fig 15: Cromatografía en Biogel P-2 de los productos de β -eliminación de la glicoproteína GP45 de *T. cruzi*, cepa Tul 0, previamente marcada con galactosa oxidasa- NaB³H₄.

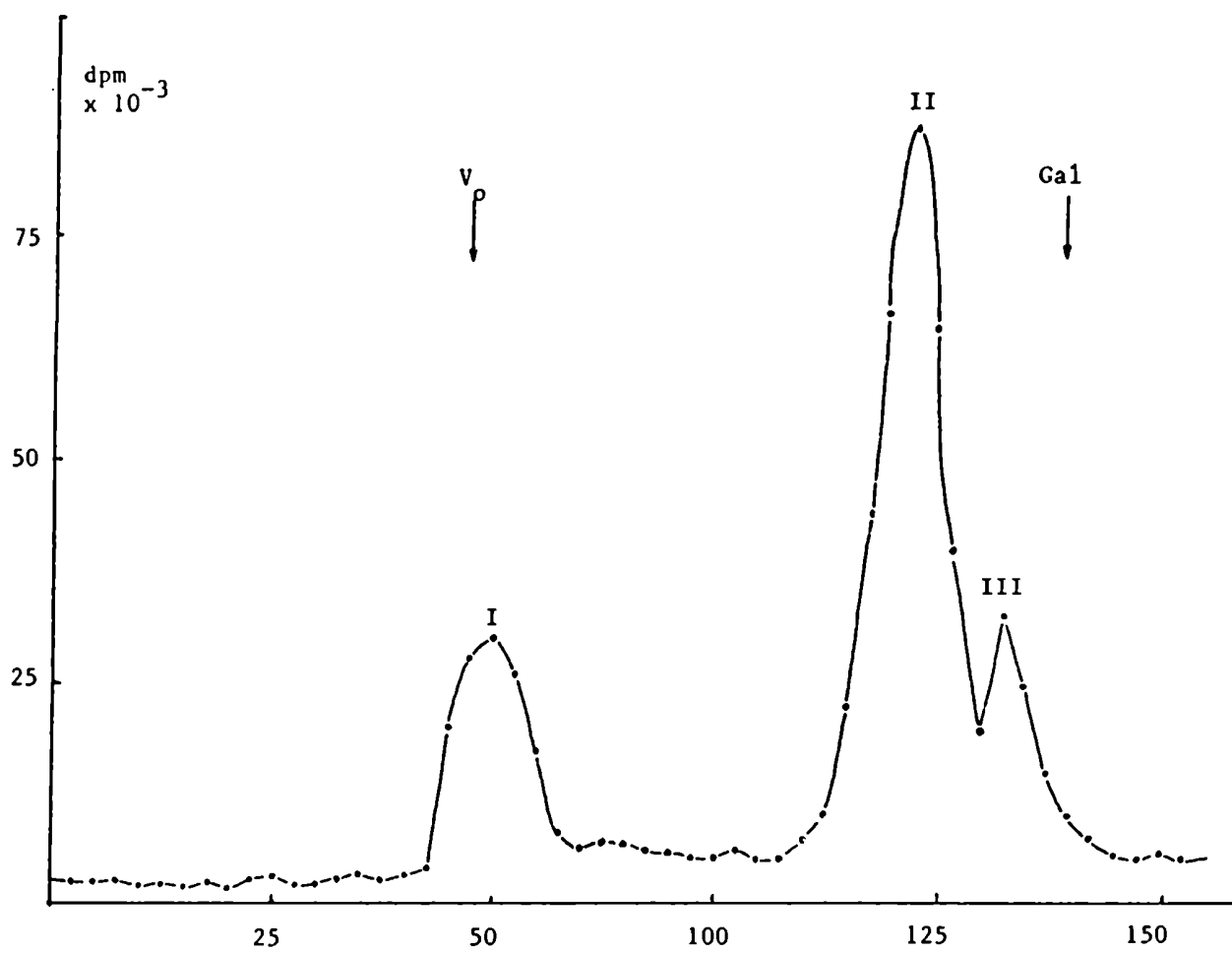


Fig 16: Cromatografía en Biogel P-2 de los productos de β -eliminación de las glicoproteínas ABC de *T. cruzi*, cepa Y, previamente marcadas con galactosa oxidasa- NaB^3H_4 .

P-2. En las Fig 15 y 16, se muestran los perfiles de elución de las mencionadas cromatografías, donde se observa en ambos casos un pico de elución excluido y picos incluidos, que contienen los oligosacáridos marcados.

Las fracciones correspondientes a los picos II y III de GP45 y II de ABC, se cromatografiaron en papel (solvente 6). Los picos IV de GP45 (Fig 15) y III de ABC (Fig 16), correspondían a sales.

En la Fig 17, correspondiente a la c.p. del pico II de GP45 (Fig 15), se observa una zona de radioactividad que coincide con testigos de penta a heptasacáridos. Resultados similares se obtuvieron para el pico II (Fig 16) de ABC (Fig 19). El pico III de GP45 (Fig 15), muestra además radio actividad en la zona de tetrasacárido (Fig 18).

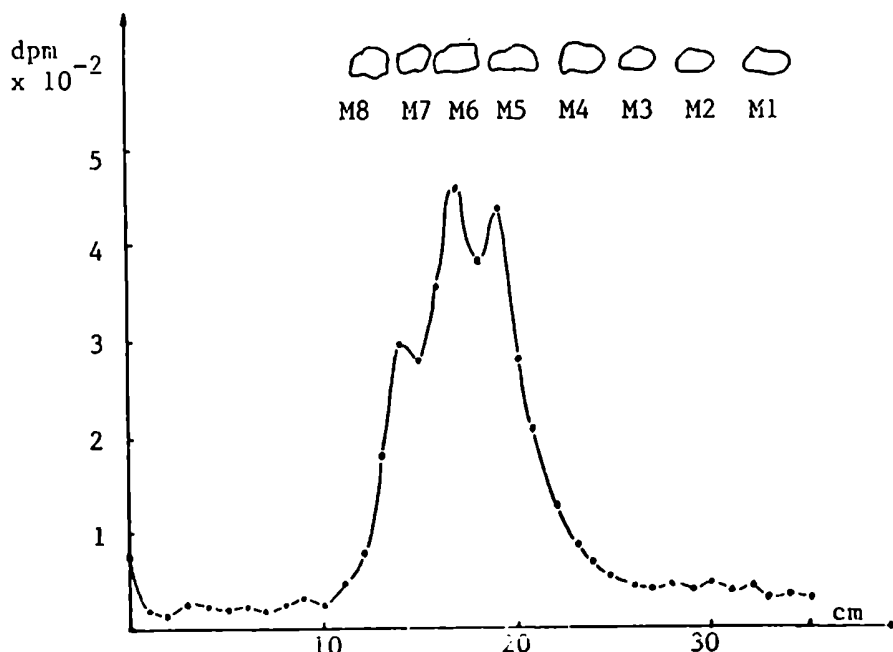


Fig 17: Cromatografía en papel (solvente Butanol:Piridina:agua (3:4:3)), del pico II, Fig 15.

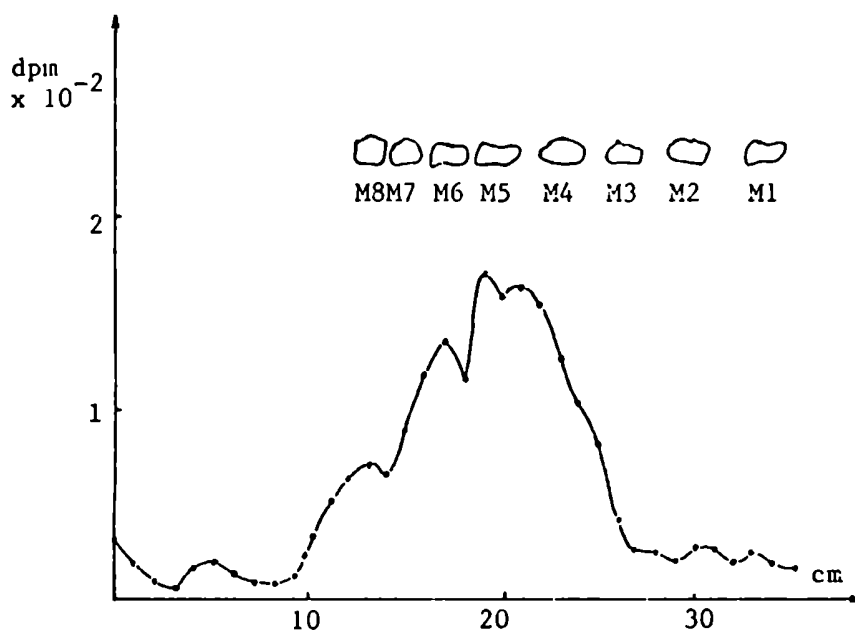


Fig 18: Cromatografía en papel (solvente Butanol:piridina:agua (3:4:3), del pico III, Fig 15.

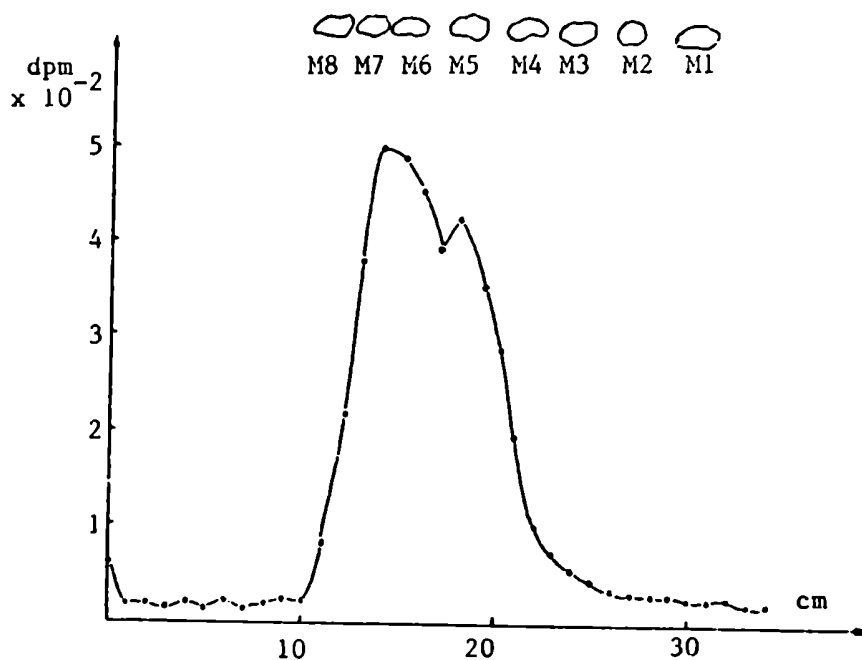


Fig 19: Cromatografía en papel (solvente Butanol:piridina:agua (3:4:3), del pico II, fig 16.

Para confirmar estos resultados se realizó cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), de estas fracciones, las que se cocromatografiaron con una mezcla de testigos de maltooligosacáridos que contenían de 1 a 8 residuos de azúcares. En los tres casos (Tabla XI), la radioactividad comigraba principalmente con pentasacárido. De los resultados obtenidos podemos concluir que en ambas glicoproteínas existen oligosacáridos de 4-7 residuos de azúcar, unidos a través de uniones O-glicosídicas a la proteína y, que por marcarse específicamente con la enzima galactosa oxidasa, poseen galactosa como uno de sus componentes.

Tabla XI: Separación por CLAR de oligosacáridos obtenidos por β -eliminación de GP45 y ABC, respectivamente.

MALTOOLIGO- SACARIDO (MX)	PICO II (Fig 15) (GP45) (cpm)	PICO III (FIG15) (GP45) (cpm)	PICO II (FIG 16) (ABC) (cpm)
M2	23	25	19
M3	34	40	32
M4	145	208	178
M5	2331	2580	1150
M6	356	437	467
M7	124	89	78
M8	53	32	45
M9	21	11	21

Los picos I de GP45 y ABC, se marcaron respectivamente con $^{14}\text{COH}_2$, según la técnica descrita por Means (154), y se desalaron a través de un biogel P-2. Se observó (Fig 20 y 21),

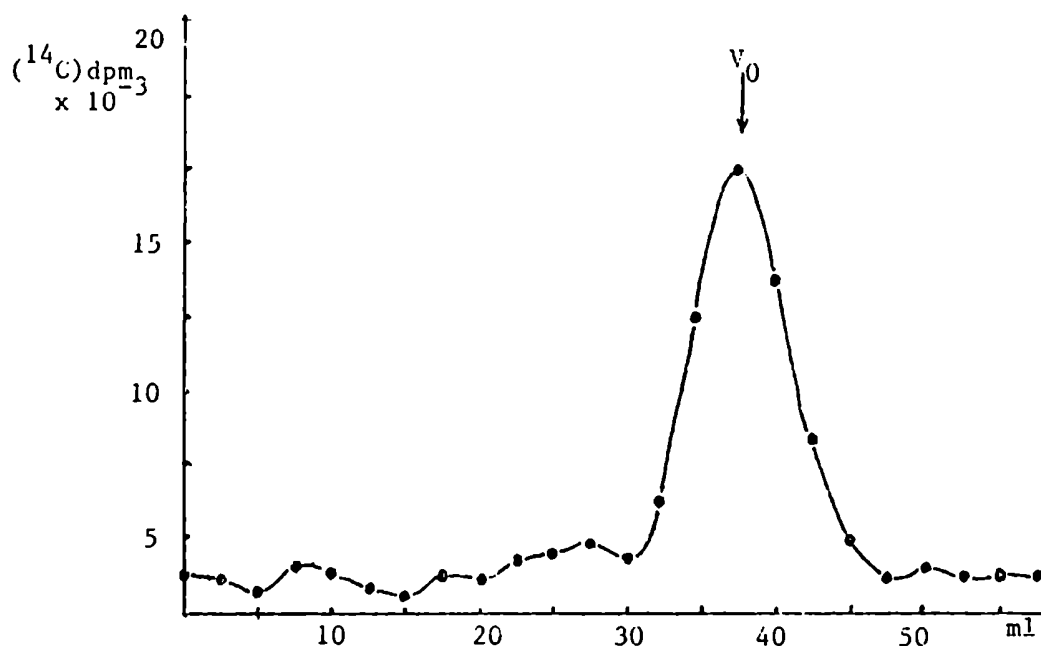


Fig 20: Cromatografía en BioGel P-2 del pico I fig 15, marcado con $^{14}\text{CH}_2\text{O}$

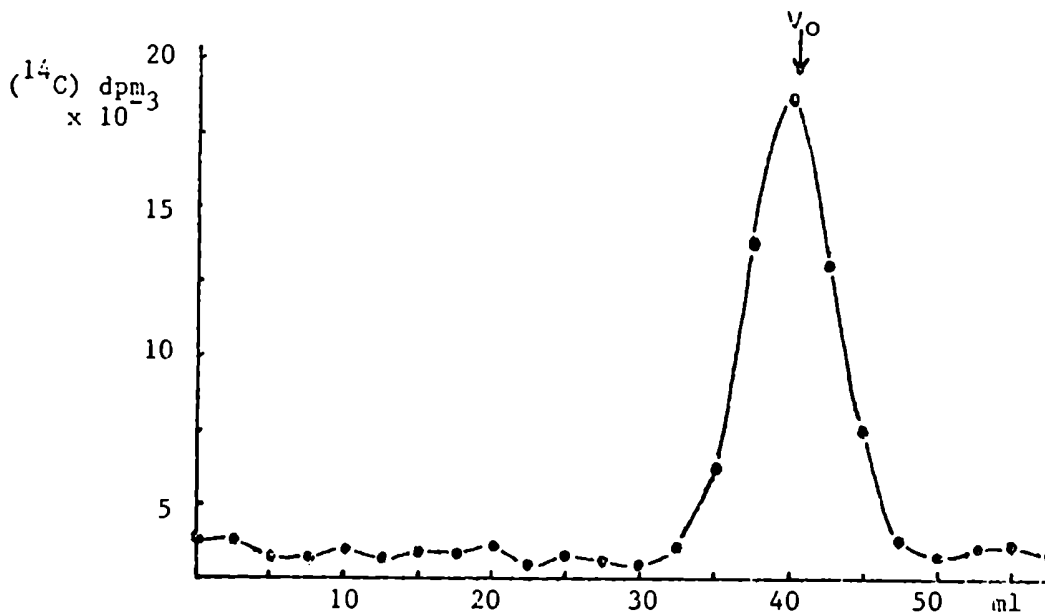


Fig 21: Cromatografía en BioGel P-2 del pico I, fig 16, marcado con $^{14}\text{CH}_2\text{O}$.

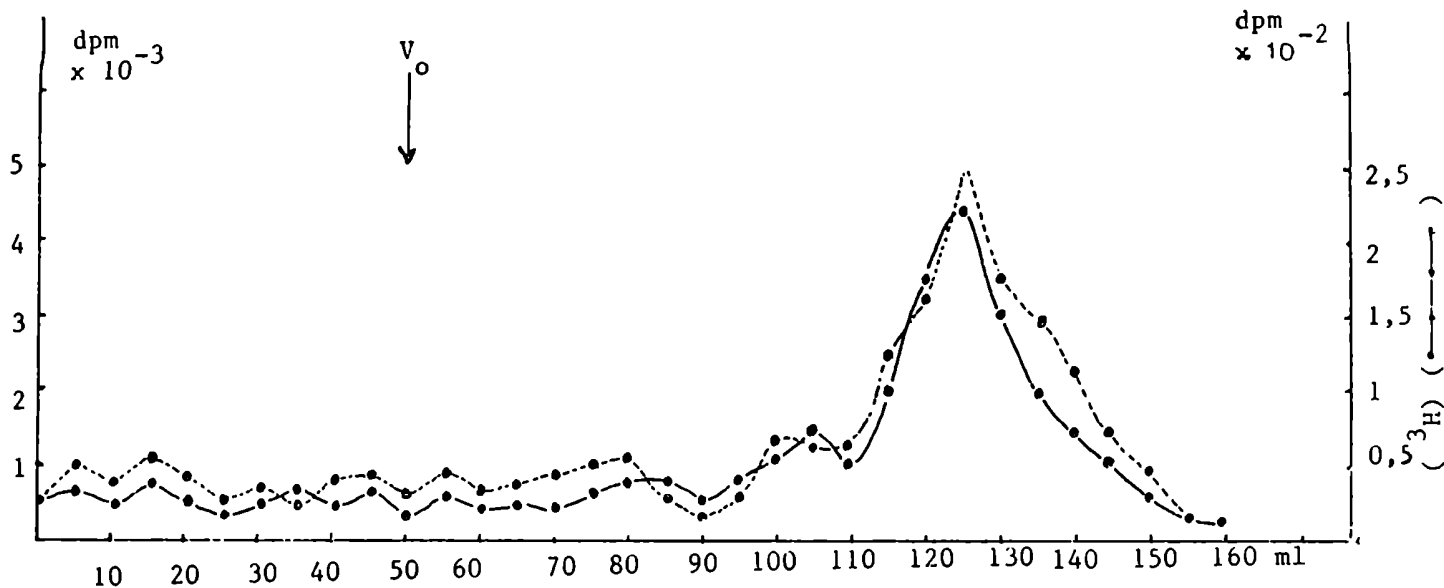


Fig 22: Cromatografía en Sephacril S-200 del pico I de GP45 (Fig 20) (20.000) c.p.m. ^{14}C ; (12.000) c.p.m. ^3H .

en ambos casos, la presencia de un pico excluido marcado con ^{14}C .

El pico I , luego se cromatografió por una columna de Sephacril S-200 (Fig 22). Se observó radiactividad coincidente de ^{14}C y ^3H lo cual indicaría que la cadena de azúcar se halla ligada a la proteína. No se confirmó el tipo de unión, pero dado que el oligosacárido no se pudo β - eliminar podría tratarse de una union N-glicosídica, o sea que Gp45 presentaría los dos tipos de unión más comunes en glicoproteínas.

Ferguson y col.(77), describieron una glicoproteína de 72 kDa (Gp72), cuya composición y estructura son inusuales. Gp72 contiene una alta proporción de carbohidratos (49%), entre ellos xilosa , ribosa, fucosa, manosa, galactosa y glcNH₂. También está

presente una alta proporción de fosfato unido covalentemente a la cadena de carbohidrato. Se encontraron dos tipos de cadenas. Una que posee el 15% de los azúcares, rica en manosa, y unida al péptido por unión GLcNH₂-asparragina. El otro tipo de cadenas unidas por enlace glicosídico a serina o treonina, son ricas en galactosa y contienen la pentosa y fucosa.

También se describió (80) una glicoproteína de Mr 90 kDa que sólo presenta los oligosacáridos unidos por unión N-glicosídica.

CAPITULO 6

ESTUDIOS SOBRE GLICOLIPIDOS DE
FORMAS EPIMASTIGOTE DE T. CRUZI

6.1. LIPIDOS TOTALES

Se realizó una extracción de lípidos totales con Cloroformo metanol (2:1) de epimastigotes de T. cruzi, cepa Y. El método utilizado difiere del descrito por Folch (155), para la extracción de glicolípidos, en que se suprimió el lavado con solución salina, ya que en esta fase se pueden extraer glicolípidos polares y gangliósidos.

Las proteínas y sales contaminantes que usualmente se eliminan con este procedimiento, fueron separadas por filtración del extracto a través de vidrio sinterizado.

Con este procedimiento el porcentaje de lípidos fue de 0,30 mg/mg de célula liofilizada, para la cepa Y; el mismo procedimiento aplicado a la cepa Tul 2, arrojó un valor de 0,28 mg/mg de célula .

Los valores informados anteriormente para un extracto derivado de la cepa Y, fueron de 0,20 mg/mg (116), y 0,15 mg/mg (156) respectivamente. En ambos casos los extractos habían sido lavados con solución salina, lo cual explica el menor valor hallado, por extracción de los glicolípidos polares.

El análisis del porcentaje de carbohidratos del extracto crudo de cepa Y, por el método del fenol- ácido sulfúrico dio como resultado 0,6 mg de azúcares totales / 100 mg de extracto lipídico, lo cual equivale a 30 ug de carbohidrato unido a lípi-

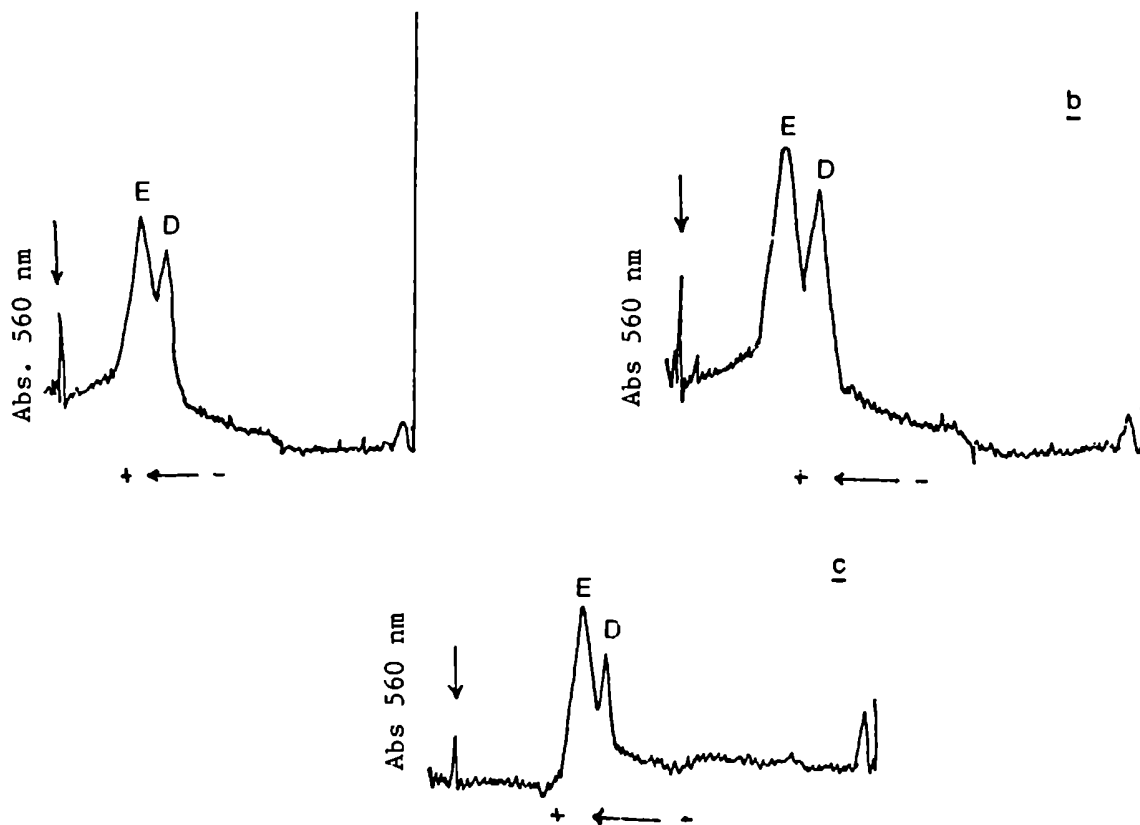


Fig 23: Densitometrías de geles de poliacrilamida 15% de extractos Cloroformo:Metanol (2:1) de células epimastigote de T.cruzi a) cepa Y; b) cepa Tul Ø; c) cepa Tul II .

Los geles se colorearon con el reactivo de APS.

do en 10^4 células. Este valor se asemeja al hallado por Da Silveira (116), en experiencias similares.

Los azúcares neutros liberados por hidrólisis ácida del extracto lipídico, se analizaron por c.g.l como acetatos de alditol, siendo los componentes principales: Inositol: glucosa: galactosa: manosa en relación 87:10:1:1.

El inositol se encuentra generalmente unido a lípido por fosfato. Las células epimastigotes de T.cruzi contienen un 12% de fosfatidil inositol, con respecto al peso total de la célula (116). Por otra parte, en la extracción con C:M se puede extraer una pequeña proporción del LPPG, el cual posee un 2,5% de inositol en su molécula (98).

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida 15% , en presencia de SDS, de extractos C:M (2:1), obtenidos de epimastigotes de cepas Y, Tulahuen 0 y Tulahuen 2.

En las densitometrías de los geles, revelados con reactivo APS, se observa la extracción del componente de naturaleza glicolipídica denominado Banda E ($R_m = 0,9$) y del LPPG ($R_m = 0,74$) (Fig 23). En los tres casos, los extractos están enriquecidos en la Banda E, cuando se los compara con el perfil obtenido de células enteras (Fig 6).

El estudio de la composición lipídica de epimastigotes, de T.cruzi, ha sido encarado por varios grupos de trabajo.

Oliveira y col (156) encontraron en epimastigotes de cepa Y

lizado para marcar glicoconjugados que contienen ácido siálico, (161), también reveló la banda E, en una electroforesis en gel de poliacrilamida.

No se había detectado la presencia de ácido siálico en fracciones de la membrana plasmática deslipidizada (116). Por otra parte, la superficie celular de epimastigotes interactúa con la aglutinina de germen de trigo (72); si las células eran tratadas con sialidasa, se perdía la capacidad de aglutinarse con la lectina. Estas observaciones nos llevaron a analizar la presencia de ácido siálico en extractos lipídicos.

Se realizó una determinación colorimétrica por el método del ácido tiobarbitúrico (162) del ácido siálico liberado por tratamiento con ácido en condiciones suaves (H_2SO_4 0,1 N, $80^\circ C$) de un extracto C:M 2:1 de 10^{11} células, dosándose 50 ug de ácido siálico total.

Por cromatografía en capa delgada (c.c.d) (solvente 10), del extracto, se revelaban con el reactivo de Resorcinol/Cu (163), específico para gangliósidos, dos componentes de R_f 0,35 y 0,62.

6.2.1 Extracción con Cloruro de Potasio.

Se realizó una extracción con KCl 0,1 N, del extracto C:M 2:1 de 10^{11} células, método recomendado para la extracción de gangliósidos. La c.c.d del extracto mostró los dos componentes que se revelaban con el reactivo de Resorcinol/Cu.

Se determinó la cantidad de ácido siálico liberado por tratamiento enzimático con neuraminidasa, del extracto KCL y separado por diálisis. El valor determinado en el dializado fue de 50 ug/ 10^{11} células. Se obtuvo un resultado similar cuando se substituyó la hidrólisis enzimática por una hidrólisis ácida. En base al contenido de ácido siálico, se calculó un valor de $0,8-1,0 \times 10^6$ moléculas de Acido N-acetil Neuramínico por célula.

Pereira y col (72) estimaron un valor de $7,7 \times 10^6$ residuos de ácido siálico liberados por digestión con sialidasa de parásitos enteros. La diferencia puede ser debida al estado de crecimiento de los parásitos empleados y/o a pequeñas variaciones en la composición del medio de crecimiento, ya que en los estudios efectuados por Pereira, se utilizó un medio complementado con suero fetal caprino, rico en fetuína, que es una glicoproteína que posee numerosos residuos de ácido siálico que podrían servir de fuente de ácido siálico para el trypanosoma. Esa hipótesis está avalada por estudios realizados por Previato y col (120), que aislan de T.cruzi un glicoconjugado de 43 kDa que sólo contenía ácido siálico si los parásitos eran cultivados en un medio suplementado con suero fetal caprino.

La cromatografía en papel de los hidrolizados mostró un componente de movilidad igual al ácido siálico, y una sustancia de $R_{FMANA} = 1,22$, mayoritaria, cuando se revelaba con reactivo de Ácido Tiobarbitúrico, específico para ácidos

Tabla XII: Componentes principales de la fracción extraída con KCl acuoso , del extracto cloroformo:metanol (2:1).

Carbohidratos

Azúcares totales = 23 % *

Composicion de carbohidratos

Arabinosa ^ 7
 Manosa ^ 19
 Galactosa ^ 9
 Glucosa ^ 38
 Inositol ^ 2
 Galactosamina ° 18
 Ac. siálico * 3

Acidos grasos ^

	%	Tr	Tr'
C 12:0	1,6	2,47	2,63
C 14:0	5,5	3,45	3,49
C 15:0	3,2	6,01	6,05
C 16:0	22,5	7,27	7,50
C 17:0	3,2	10,02	10,05
C 18:0	18,1	15,98	16,10
C 18:1	1,5	17,89	18,03
n. i.		19,83	
C 20:0	10,1	7,10 @	7,10 @
C 21:0	4,3	9,26 @	9,34 @
C 22:0	3,5	13,14 @	12,84 @
C 23:0	2,7	17,22 @	17,29 @
C 24:0	5,2	25,03 @	25,10 @

Bases de cadena larga

Bases de cadena larga totales = 28% *

*determinado colorimétricamente ^ determinado por c.g.l.

° determinado por c.g.l. en condiciones II

Tr:Tr de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de FSKCl en condiciones III a , @: determinado a 250 C.

Tr': Tr de los distintos testigos usados.

siálicos. Este último compuesto no cambió su movilidad cuando fue sometido a condiciones de saponificación (pH= 10).

Al mismo tiempo, se debe notar que el valor hallado, corresponde a un extracto, y no se puede asegurar que la extracción de sialoglicolípidos haya sido total.

Los ácidos siálicos están distribuidos ampliamente en la naturaleza. Se han encontrado más de veinte tipos distintos, y por su papel en diversas funciones celulares, no se puede dar un concepto unificado sobre su rol biológico. En protozoarios en particular, se sabe muy poco sobre la presencia de los mismos (165, 166), y en trypanosomas en particular se ha detectado en una glicoproteína de trypanosomas africanos (T. congolense) (167).

Por otra parte, se analizaron por c.g.l. los componentes de esta fracción, liberados en una metanólisis ácida (Tabla XII).

El bajo porcentaje de inositol detectado (2%), con respecto al extracto original, indica, como era de esperar que no se han extraído fosfolípidos del tipo inositol-fosfato, ni el LPPG, utilizando este solvente de extracción.

La presencia conjunta de esfingosina, carbohidrato y ácido siálico en el extracto KCl, llevó a investigar los sialoglico-esfingolípidos, componentes del mismo, los que, según su definición, podríamos denominar gangliósidos.

Otros laboratorios analizaron los ácidos grasos

presentes en la "Fase inferior de Folch", de la extracción con Cloroformo: metanol (2:1) y solución salina (157, 158).

Para la cepa Y, se han hallado ácidos grasos normales de 12 a 20 C e insaturados de 17, 18 y 20 C (157). Los ácidos grasos normales de 22 y 24 C no han sido detectados en estos extractos provenientes de la cepa Y o Tulahuén.

La ceramida de gangliósidos de cerebro de vertebrados se encuentra acilada principalmente por ácido esteárico, mientras que en gangliósidos del sistema nervioso central lo están por ácidos grasos de cadena normal de 16 a 24 átomos de carbono (168).

Los gangliósidos de cerebro contienen una mezcla de bases de cadena larga de 18 y 20 átomos de C. Esta última no es detectable en otros glicosfingolípidos de cerebro y muestra variaciones dentro de los distintos tipos de gangliósidos (169)

Los gangliósidos se hallan prácticamente en todos los tejidos de vertebrados, siendo la materia gris el órgano en que se encuentra en mayor proporción. En invertebrados, hasta el momento sólo se han detectado gangliósidos en gónadas, gametas, y otros tejidos de varias especies del filum Echinodermata (22).

La importancia que se le asigna a los gangliósidos en diversas funciones celulares, tales como la diferenciación celular (54), la regulación del crecimiento celular (55), el reconocimiento antígeno-anticuerpo (62) y la interacción con

factores bioactivos (63), nos ha llevado a confirmar la presencia de los mismos en trypanosoma, por técnicas de marcación química, incorporación metabólica y finalmente, estudios estructurales de los mismos.

6.3 MARCACION CON PERIODATO-NAB³H₄ DE CELULAS EPIMASTIGOTE

En los últimos años se han descrito varios procedimientos para la marcación exógena de la superficie celular (170,171).

La reacción con periodato de sodio se puede controlar para la oxidación selectiva de glicoles exocíclicos. Si el aldehído generado se reduce con NaB³H₄, se cuenta con un buen método de marcación de glicoconjugados que contengan esas estructuras. En el caso de sialoglicoconjugados, la modificación aparece selectivamente en residuos de ácido siálico y lleva a la incorporación de tritio en un producto modificado, el ácido 5-acetamido 3,5-didesoxi-L-arabino-2 heptulosónico (NANA7) (Fig. 24).

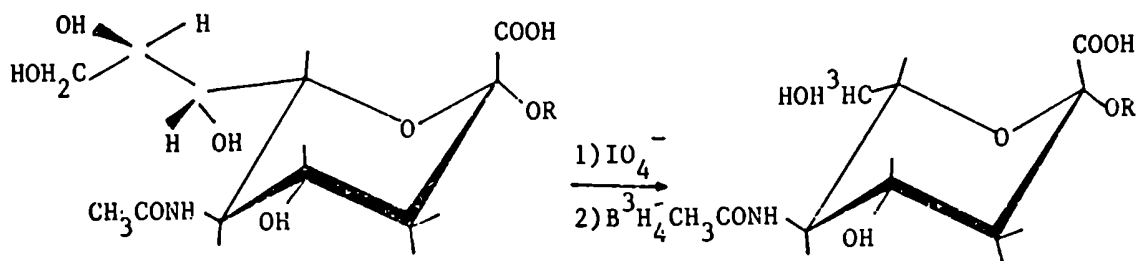


Fig 24: Degradación del ácido N-acetil neuramínico a ácido 7-(³H)5-acetamido 3,5-didesoxi-L-arabino 2-heptulosónico (NANA7)

La unión glicosídica de NANA7, sigue siendo susceptible a la acción de la neuraminidasa, aunque más lenta; y a hidrólisis suave (161).

El tratamiento con periodato de sodio diluido por períodos cortos, también cliva el hidroxilo primario en hexosas furanósicas con grupos libres en C-5 y C-6. Así, los glicoconjugados con galactofuranosa se marcan, introduciendo el tritio en el C-5 de la arabinosa generada por la oxidación de la galactofuranosa (Fig 25). Esta técnica fue utilizada para demostrar la configuración furanósica de la galactosa presente en el LPPG de T. cruzi (141). También se detectó galactofuranosa como componente de un glicopéptido del protozario Crithidia oncopelti, perteneciente también a la familia de los Trypanosomatidae (172)

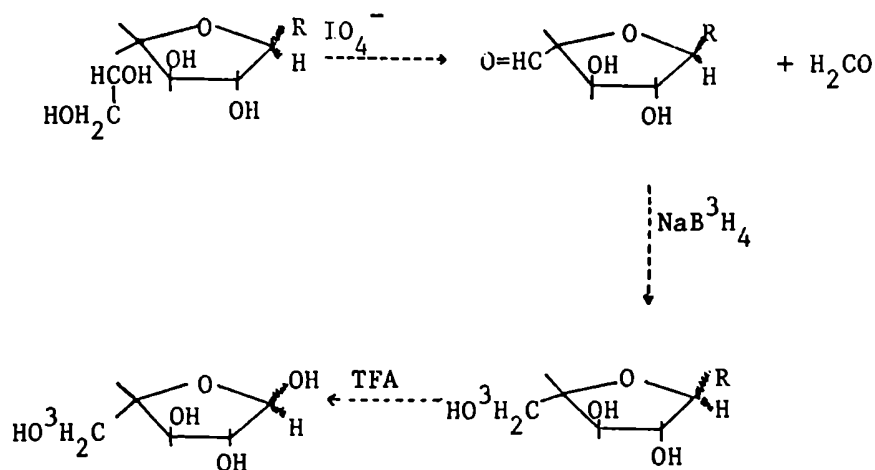


FIG 25: Degradación de D-galactofuranosa a 5-(³H) D-arabinofuranosa.

En la Fig 26, se muestra una electroforesis en geles de poliacrilamida de células epimastigote , cepa Y, marcados con NaB^3H_4 , después de la oxidación con periodato de sodio.

En el lisado total de epimastigotes (canal a, Fig 26) se observa principalmente la incorporación de la radioactividad en el LPPG y en la banda E, indicando que ésta posee glicoles exocíclicos en alguna unidad de azúcar. Las glicoproteínas ABC se pueden observar, aunque muy tenuemente, comparadas con los experimentos en que se utiliza galactosa oxidasa como agente oxidante, ya que las galactosas que poseen estas glicoproteínas se encontrarían en configuración piranósica.

La banda E se extrae junto con una menor proporción de LPPG con el solvente cloroformo:metanol (2:1) (canal d, Fig 26). La mayor parte del LPPG queda en el insoluble de la extracción con C:M:(2:1), (canal b, fig 26), debido al alto porcentaje de hidratos de carbono que posee en su molécula (96).

Cuando el extracto C:M (2:1), es extraído con KCl, en la forma anteriormente descrita, el LPPG queda en la fase inferior (canal c, Fig 26), y el 60% de la radioactividad presente en el extracto original se recupera en la fase superior. La fluorografía indica la presencia de la Banda E, purificada, en este extracto (canal e, Fig 26).

Por su intensa marcación y su solubilidad , podemos concluir que la banda E contiene un glicolípido con glicoles exocíclicos.

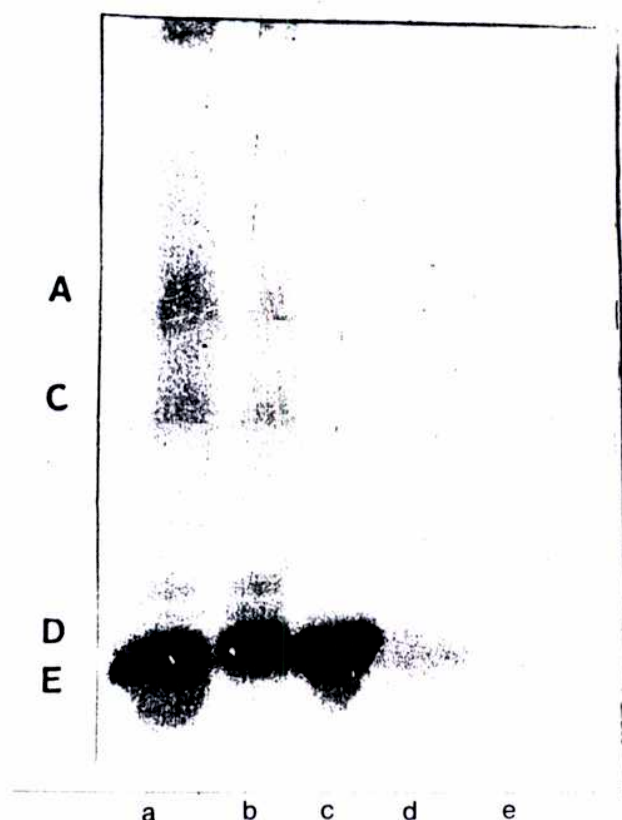


Fig 26: Electroforesis en gel de poliacrilamida de epimastigotes marcados con NAB^3H_4 después de la oxidación con NaIO_4 : a) lisado de epimastigotes b) insoluble en C:M (2:1); c) fase inferior de la partición con $\text{KCl } 0,1\text{N}$ del extracto C:M (2:1); d) extracto C:M (2:1) de células liofilizadas e) fase superior de la partición con $\text{KCl } 0,1\text{N}$ del extracto C:M (2:1).

En un primer intento por purificar el glicolípido que se marca con $^{104}\text{-NaB}^3\text{H}_4$, se realizó un fraccionamiento del extracto C:M (2:1) en sílica gel H, eluyendo con mezclas de polaridad creciente de C:M.

Kawamura y Taketomi (173) emplearon Sílica gel G, para separar gangliósidos, de lípidos totales de cerebro, eluyendo los gangliósidos con C:M:H₂O (60:35:8). La fracción saponificada y dializada, contenía gangliósidos de moderada pureza.

Por fraccionamiento del extracto C:M (2:1) marcado, conteniendo $1,8 \times 10^6$ d.p.m., en sílica gel H, se separaron dos picos principales de radioactividad (A y B Fig 27), los cuales se eluyeron con C:M (7:3) y metanol, respectivamente. La fracción A contenía 1×10^6 dpm y la fracción B $2,6 \times 10^6$ dpm.

Estas fracciones fueron incubadas con neuraminidasa a 37°C 24 hs y posteriormente extraídas con C:M (2:1). En la fase acuosa se recuperó el 30% y 18% de la radioactividad de las fracciones A y B, respectivamente.

Se realizó una cromatografía en papel en solvente 7 del dializado externo de las fases superiores de la extracción, obteniéndose en la fracción A una sustancia de $R_{\text{NANA}7} = 1,33$ (Fig 28, a) y en la fracción B, dos sustancias, de $R_{\text{NANA}7} = 1,33$ y 1,51 (Fig 28, b).

El testigo de NANA7 fue preparado según el procedimiento

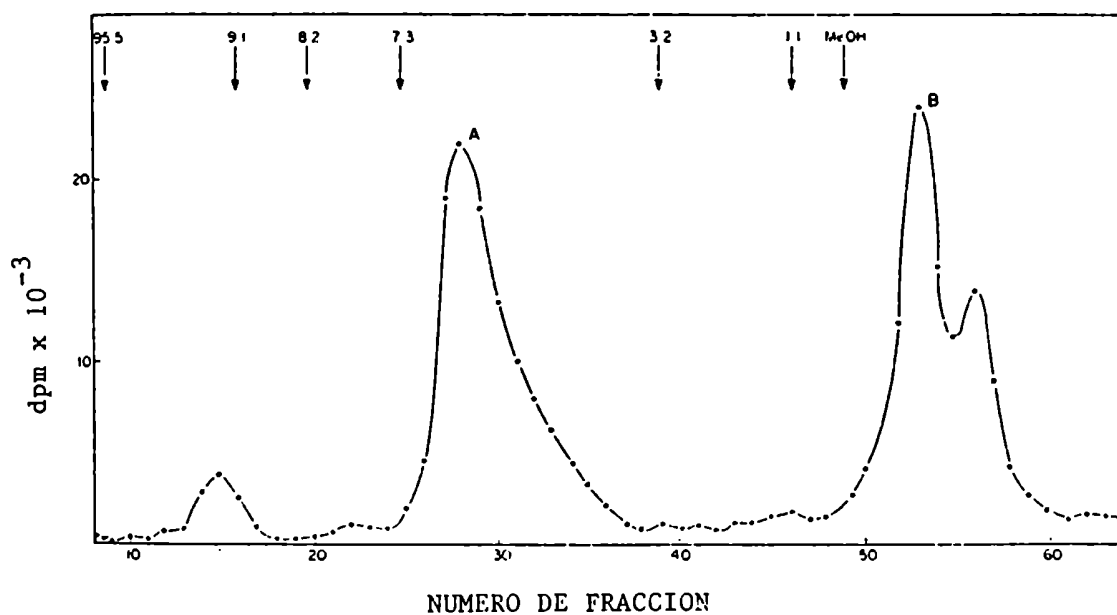


Fig 27: Cromatografía en Silica gel H de un extracto C:M (2:1) de epimastigotes marcados. Volumen de las fracciones colectadas: 3 ml ; dimensiones de la columna 2,5 x 20 cm. Se sembraron 130.000 d.p.m. ; Fracción A: 100.000 d.p.m.; Fracción B: 60.0000 d.p.m.. Las flechas indican la proporción de C:M utilizada. para la elución.

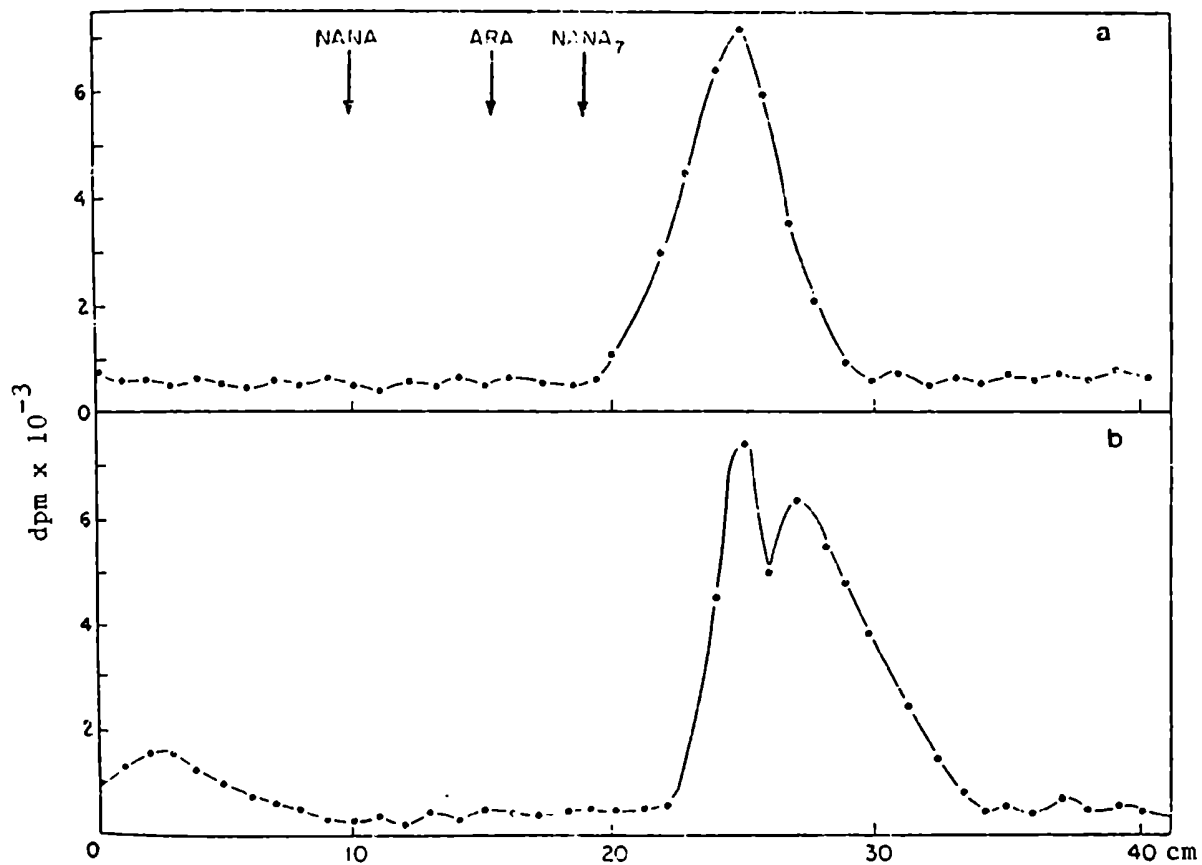


Fig 26: Cromatografía en papel de la fase superior de extracciones con C:M:H₂O , después del tratamiento con neuraminidasa de a) Pico A (Fig 27) ; b) Pico B (Fig 27) Solvente de desarrollo Butanol:Ac. Acético:agua (5:2:2). Las flechas indican la posición de los testigos.

descrito por Yu y Leeden (174), a partir del Acido N-acetil Neuramínico.

Las fases inferiores de las hidrólisis enzimáticas, fueron rehidrolizadas con ácido trifluoroacético 0,05 N, 3h a 100°C, condiciones en las que se hidrolizan selectivamente los azúcares furanósicos, y luego se realizó una partición con C:M:H₂O. En la fracción A, (Fig 27), sólo se recuperó un 2% de la radioactividad total, en la fase acuosa, mientras que en el pico B, (Fig 27) se recuperó un 62% de la radioactividad total. Por c.p. de la fase acuosa de la fracción B se determinó la incorporación de la marca en arabinosa (Fig 29) la cual provendría de las unidades de galactofuranosa del LPPG, un posible componente de la fracción B, que se eluye con metanol.

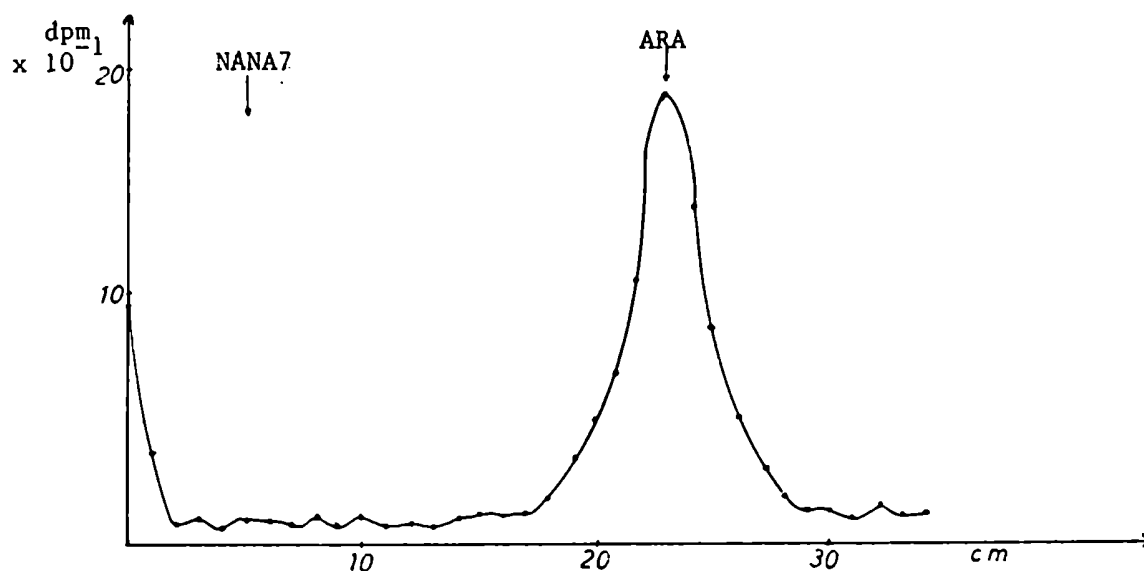


Fig 29: Cromatografía en papel de la fase acuosa de un hidrolizado con ácido Trifluoroacético, del pico B, tratado con neuraminidasa. Solvente de desarrollo: butanol:piridina: agua (6:4:3)

Si bien los sialoglicoconjugados modificados son substratos para la neuraminidasa, la velocidad de la hidrólisis enzimática es menor que la de controles sin modificar. Liao y col (161) encontraron que un 76% de la radioactividad se libera por hidrólisis enzimática, mientras que una hidrólisis ácida libera el 100% de la radioactividad original. Sin embargo en nuestro caso la hidrólisis ácida posterior al tratamiento enzimático no liberó una cantidad significativa de radioactividad, la cual se debería a marcación inespecífica. En algunas sialoglicoproteínas modificadas se encontraba por c.p. de los hidrolizados (161), además del NANA7 otro compuesto de mayor movilidad que también revelaba con el reactivo de Nitrato de plata.

La mayor movilidad del producto oxidado liberado por la neuraminidasa, con respecto al standard de NANA7, podría sugerir una O-sustitución en la molécula. Son conocidos los ésteres de O-acetilo de ácidos siálicos en las posiciones 4,7,8, y 9.

En los métodos utilizados corrientemente para aislar ácidos siálicos de materiales biológicos (hidrólisis enzimáticas o ácidas) pueden ocurrir des-O-acetilaciones o migraciones de los O-acetilos de ácidos siálicos sustituidos, particularmente a pH debajo de 3 o mayores que 6. La utilización de resinas de intercambio aniónico para purificar ácidos siálicos contribuye a la des-O-acetilación y/o la migración de grupos acetilos (175)

El método clásico para hidrolizar ácidos siálicos (H_2SO_4 0,1N 80°C, 1h), puede liberar grupos O-acetil. Asimismo la presencia de grupos O-acetil pueden hacer a la molécula de ácido siálico parcial o completamente resistente a la acción de la neuraminidasa (176).

Por otra parte, en el procedimiento de diálisis utilizado corrientemente para separar el ácido siálico de macromoléculas, sólo se recupera un 60% del ácido siálico presente originalmente (176).

Es conocida la deshidratación de azúcares libres por la acción de ácidos, dando lugar a la formación de anhidro azúcares (177). Se demostró la deshidratación de ácidos siálicos cuando se utilizan condiciones de metanólisis ácida para separarlos de macromoléculas (178). Por c.g.l-e.m. se determinó que un 15% del ácido siálico se deshidrata dando ácido 5-acetamido-2,7-anhidro 3,5-didesoxi- α -D-glicero-D-galacto-nonulopiranosónico.

Además de formas anhidras, se detectaron formas lactónicas del NANA, producidas durante la metanólisis de los glicoconjugados (179). Se postuló también la formación espontánea del 2,7-anhidro derivado a partir del NANA (180).

La estructura del ácido siálico que se marcó con periodato, B^{3H4} -, en las fracciones de I. cruzi, no se puede asignar inequívocamente por los métodos cromatográficos empleados.

En capítulos posteriores, se describirá la identificación

del ácido siálico liberado de un gangliósido puro aislado de T.cruzi.

6.4 INCORPORACION IN VIVO DE ACIDO PALMITICO Y GALACTOSA EN GLICOLIPIDOS DE TRYPANOSOMA CRUZI

La glicosidación de gangliósidos involucra la transferencia secuencial de monosacáridos desde nucleótido-azúcares al aceptor en formación (62,181). Cada paso está catalizado por una glicosiltransferasa específica que se encuentra como un complejo multienzimático en el aparato de Golgi de la célula (182).

Miller Podraza y col (183), realizaron estudios de incorporación in vivo, de precursores marcados adicionados al medio de cultivo de células de neuroblastoma N18, de ratón y determinaron la incorporación en gangliósidos de palmitato, galactosa y N-acetil manosamina, marcados con tritio. La glicosidación secuencial para formar el siguiente homólogo, involucra un pequeño número de intermediarios.

Continuando con la investigación sobre la naturaleza de las fracciones glicolipídicas presentes en las formas epimastigote de T.cruzi, se llevó a cabo la incorporación in vivo de ³H-galactosa y ³H-ácido palmítico, a las células.

6.4.1 Cinética de incorporación de precursores marcados

Con el objeto de determinar el tiempo óptimo para la incorpo-

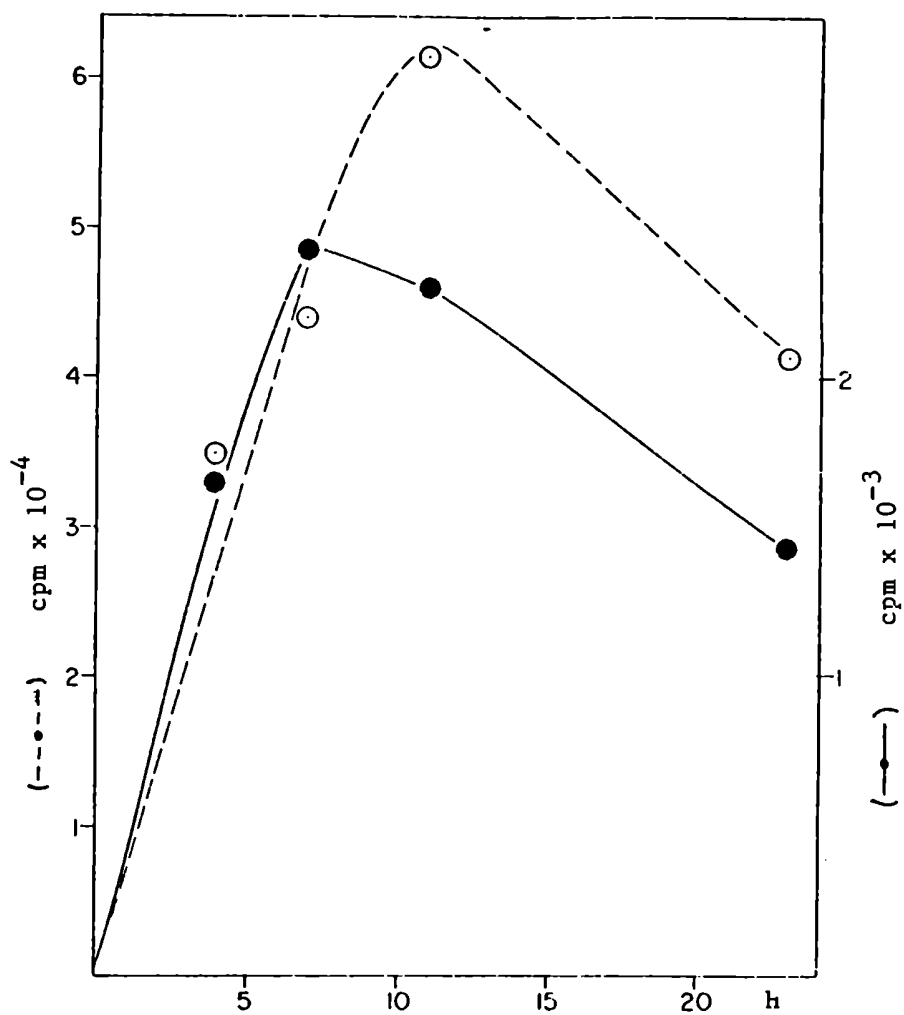


Fig 30 Cinética de incorporación de (^3H) palmítico ($\text{O} \cdots \text{O}$) (^3H) galactosa ($\bullet \cdots \bullet$); células de dos días de crecimiento ($9 \times 10^7/\text{ml}$) se incubaron con $20\mu\text{Ci}$ de precursor.

ración de los precursores marcados, se llevó a cabo una cinética de incorporación, para lo cual, se agregaron 5 ml de una suspensión de 4×10^6 epimastigotes a 100 uCi respectivamente de cada precursor marcado y se tomaron alícuotas después de 4,7,11 y 24 hs. En la Fig 30 se observa que la galactosa se incorpora linealmente durante 7h y el palmítico durante 10 h en extractos C:M.; la máxima incorporación del ácido graso fue de $6,2 \times 10^4$ c.p.m./ 10^6 células, y del carbohidrato, el máximo fue de $2,5 \times 10^3$ c.p.m./ 10^6 células.

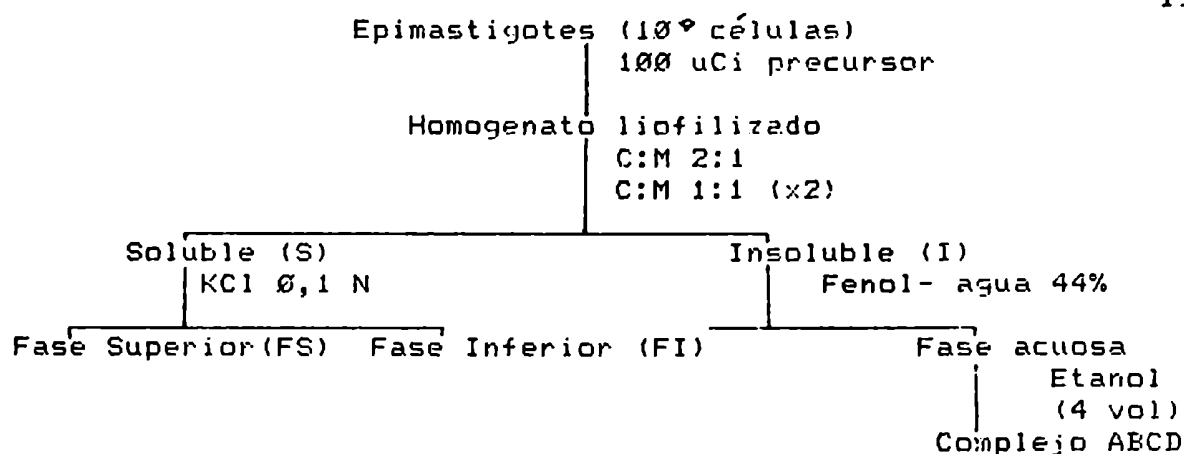
En experiencias con células de neuroblastoma de ratón (183) se comprobó que, si bien el palmítico era tomado en su totalidad por las células, la galactosa y la N-acetil manosamina se incorporaban solamente en un 29% y un 10%, respectivamente.

6.4.2 Extracción de glicoconjugados de las células marcadas

Para la purificación de los glicolípidos, se incorporó (3 H)-palmítico y (3 H)-galactosa respectivamente a suspensiones de 10^9 células, que habían sido cultivadas en medio LIT (184), y las incubaciones se llevaron a cabo durante 12 h a 28°C.

Las células marcadas y liofilizadas, fueron extraídas con C:M (2:1) una vez y con C:M (1:1), dos veces.

El material insoluble fue extraído con fenol 44%, y la fase acuosa se precipitó con 4 volúmenes de etanol de la forma ya descrita. Esta fracción contiene el complejo de glicoconjugados ABCD (95-100). Un resumen del fraccionamiento realizado puede verse en el Esquema (1).



Fracciones	Acido Palmítico c.p.m	Galactosa c.p.m
Extracto C:M	18,8 x 10 ⁶	0,74 x 10 ⁶
Fase superior (FS)	350 x 10 ³	35 x 10 ³
Complejo ABCD	3,3 x 10 ⁴	14 x 10 ⁴

ESQUEMA 1: Fraccionamiento de células epimastigotes de T.cruzi marcadas con ácido 9,10 (³H)-palmítico y 1 (³H)-galactosa.

La fluorografía de la electroforesis en gel de poliacrilamida (Fig 31), muestra que los cuatro componentes aislados del extracto fenólico de las células epimastigote incorporan biosintéticamente ³H-galactosa (3, Fig 31). Solamente el LPPG (4, Fig 31) y los glicolípidos de alta movilidad (Banda E) (7, Fig 31), incorporan ácido palmítico.

Es de notar que en el residuo insoluble en C:M de las células (5,6, Fig 31), no se evidenciaron otros componentes importantes.

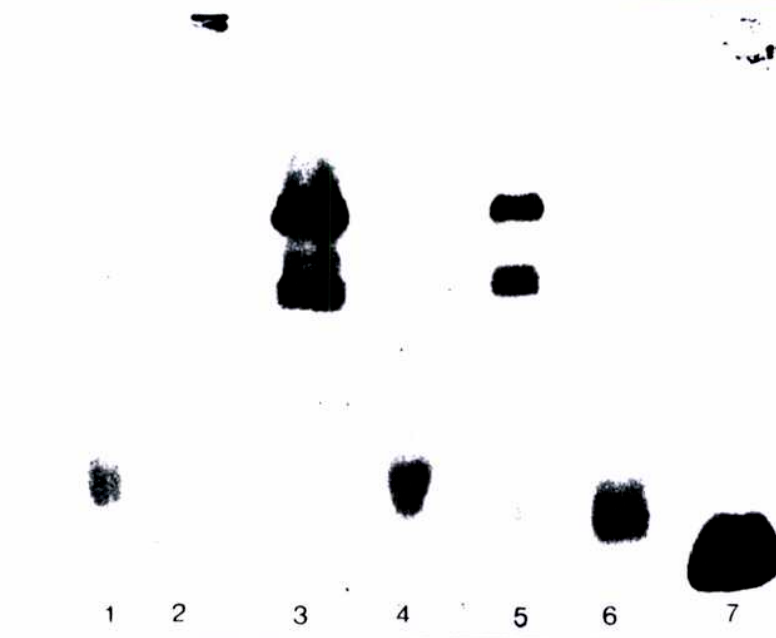


Fig 31: Fluorografía de electroforesis en gradiente de gel de poliacrilamida (8-15%) 1) LPPG marcado in vitro con NaIO_4 - NaB^3H_4 ; 2) glicoproteínas ABC marcadas con NaB^3H_4 después de ser oxidadas con galactosa oxidasa; 3) epimastigotes marcados con (^3H) -galactosa, extraídos con fenol 44% en agua y precipitados con etanol de la fase acuosa 4) idem 3), pero marcados con (^3H) -palmítico; 5) Insoluble en C:M de las células marcadas con (^3H) -galactosa; 6) idem 5), pero marcadas con (^3H) -palmítico; 7) Extracto C:M de células marcadas con ácido (^3H) -palmítico.

La estructura de glicofosfoceramida, demostrada para el LPPG (97), explica la incorporación de ambos precursores en la molécula.

Por otra parte, si bien no se han realizado estudios estructurales exhaustivos sobre el complejo glicoproteico ABC, el hecho de que no incorporó ácido palmítico, confirma su naturaleza glicoproteica.

6.4.3. Extracción de glicolípidos acídicos marcados

Los extractos C:M de los epimastigotes marcados respectivamente con ácido palmítico y galactosa, se fraccionaron utilizando el método recomendado por Yu y Leeden para el aislamiento de gangliósidos (185). El mismo emplea una resina de intercambio aniónico (DEAE-Sephadex), para separar los gangliósidos junto con otros lípidos acídicos, de la gran cantidad de lípidos neutros que no se pegan a la resina. Debido a que es un intercambiador aniónico débil, los gangliósidos se eluyen con solución salina cuantitativamente. Los pasos subsiguientes, que comprenden el tratamiento con base, diálisis y cromatografía con ácido silícico, fueron diseñados para remover otros lípidos acídicos, y cualquier otro contaminante ácido de bajo peso molecular que pueda acompañar a los gangliósidos. La columna de ácido silícico asegura la remoción de pequeñas cantidades de proteína que hayan resistido el tratamiento

precedente.

Evitando la partición con KCl, se logra una recuperación alta de todas las especies de gangliósidos, incluso los gangliósidos poco polares.

En la Tabla XIII se muestra la recuperación obtenida en los sucesivos pasos de fraccionamiento de los extractos C:M.

Tabla XIII: Fraccionamiento de glicoesfingolípidos marcados de T.cruzi

Los epimastigotes ($9,6 \times 10^6$) se incubaron 12 h a 28°C con 230 uCi de ácido (^3H)-palmítico (500 mCi/nmol) y 320 uCi de (^3H)-galactosa (3,6 mCi/nmol). Las células se procesaron y extrajeron como se describe en el texto.

Fracciones	Acido Palmítico		Galactosa	
	c.p.m.	nmol	c.p.m.	nmol
Extracto C:M	$5,9 \times 10^7$	105,6	$5,5 \times 10^5$	140
Cromatografía en DEAE-sephadex				
Fracción de lípidos neutros	$2,9 \times 10^7$	52,6	$3,9 \times 10^5$	98,6
Fracción de lípidos ácidos	$1,2 \times 10^7$	21	$1,2 \times 10^5$	30,7
Lípidos ácidos saponificados y dializados	$1,1 \times 10^7$	19,5	$1,2 \times 10^5$	30
Cromatografía en Ac. silícico				
Cloroformo:Metanol (8:2)	$4,0 \times 10^4$	7,2	$8,2 \times 10^4$	20,5
Cloroformo:Metanol (1:1)	$2,2 \times 10^4$	3,9	$4,5 \times 10^4$	11,3
Metanol	$6,0 \times 10^3$	0,1	$8,0 \times 10^3$	0,2

En la columna de DEAE-Sephadex que separó los lípidos neutros de los acídicos, se nota una mayor incorporación de galactosa en los glicolípidos neutros. Cuando los lípidos acídicos se saponificaron y dializaron exhaustivamente, se retuvo la mayor parte de la radioactividad.

La cromatografía en ácido silícico del material no dializable, separó los sialoglicolípidos, eluidos con C:M (1:1), de otros lípidos menos polares. En la Tabla XIII se puede observar una buena correlación entre la incorporación de ácido palmítico y galactosa en las fracciones separadas por el ácido silícico.

El eluido con C:M (8:2) del ácido silícico fue analizado por c.c.d en solvente 14. En la Fig 32 se puede apreciar que la fracción proveniente de la incorporación con galactosa contiene dos sustancias de Rf 0,45 y 0,52 respectivamente, mientras que en la fracción incorporada con ácido palmítico, se detectaron 4 sustancias de Rf 0,4; 0,45; 0,7 y 0,75. Una muy baja incorporación se encontró en la sustancia de Rf 0,52. La incorporación de ambos precursores en las sustancias de Rf 0,45 y 0,52 indica que se tratan de compuestos de naturaleza glicolípídica. Esta fracción puede contener fosfolípidos no eliminados por la saponificación y lípidos acídicos menos polares que los gangliósidos (sulfatidos).

Por otra parte, el eluido con C:M:(1:1), se purificó posteriormente por c.c.d., en solvente 10 (Fig 33). El perfil

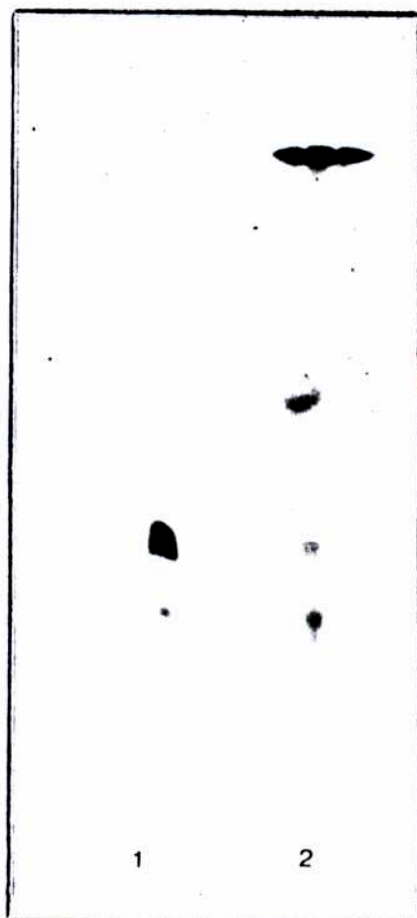


Fig 32: Fluorografía de c.c.d (solvente C:M:NH₃ (65:25:5)) de glicolípidos acídicos de T.cruzi eluidos de columna de Unisil con C:M: (8:2) 1) Marcados con (³H)-galactosa 2) Marcados con ácido (³H)-palmítico.

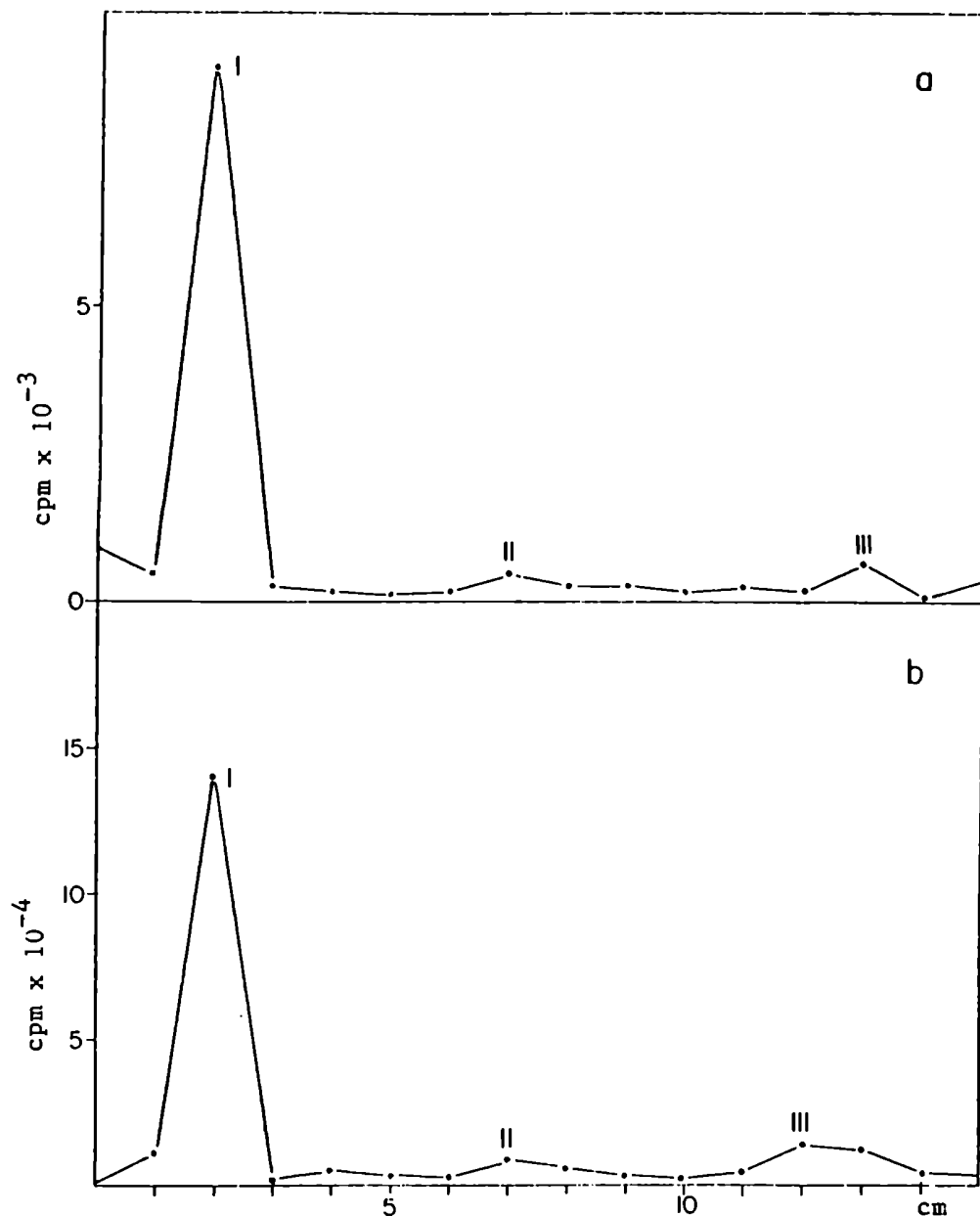


Fig 33: C.c.d de glicolípidos ácidos de T.cruzi. Los eluidos C:M (1:1) de la columna de Unisil se recromatografiaron en placas de silica gel (solvente n-propanol:NH₃ 28%:H₂O 75:5:5) a) glicolípidos marcados con (³H)- galactosa b) glicolípidos marcados con ácido (³H)-palmitico .

obtenido era similar para ambos precursores (Fig 33 a,b)

El componente I (Fig 33, a,b) migra considerablemente en el sistema de solventes 11 (Fig 34) En la fluorografía se detectaron dos glicolípidos de movilidad similar, independientemente del precursor. Estos glicolípidos migran con un Rf similar a los detectados en un extracto con KCl, marcados con Periodato de sodio- NaB^3H_4 , como se vió anteriormente, por lo cual se concluye que los glicolípidos purificados en los cuales se llevó a cabo la incorporación in vivo de precursores radioactivos corresponden con los extraídos con KCl de un extracto C:M y donde se caracterizó la presencia de ácido siálico. El Rf algo mayor de los sialoglicolípidos modificados (3, Fig 34), se debería a la presencia de NANA7 en lugar de NANA en los mismos, y por lo tanto su mayor movilidad.

Se obtuvo una mejor separación de los sialoglicolípidos realizando una c.c.d. bidimensional del componente I, marcado con ácido palmítico (Fig 35).

6.4.4 Análisis de los productos de incorporación del ácido palmítico

Las manchas X e Y (Fig 35) fueron extraídas separadamente de la placa y dividida cada una en dos alícuotas.

Una alícuota se sometió a hidrólisis ácida con HCL:Metanol:agua (3:29:4), el hidrolizado se alcalinizó y se extrajo con éter.

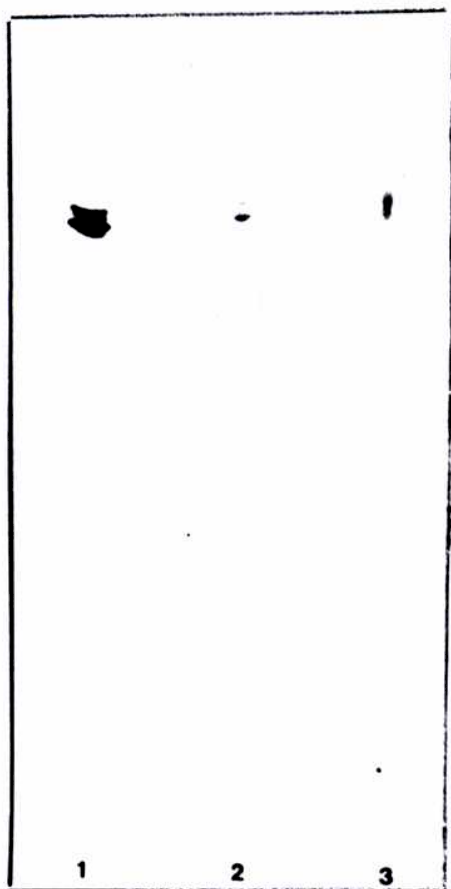


Fig 34: Fluorografía de c.c.d (Solvente Cloroformo:metanol:NH₃ 2,5 M (70:40:8)) de sialoglicolípidos marcados de T.cruzi : 1) Fracción marcada con ácido (³H)-palmítico y eluida de la columna de ácido silícico con C:M (1:1); 2) idem 1), pero marcado con (³H)-galactosa ; 3) glicolípidos extraídos con C:M:KCL 0,1 N (fase superior), marcados con NaIO₄-NaB³H₄.

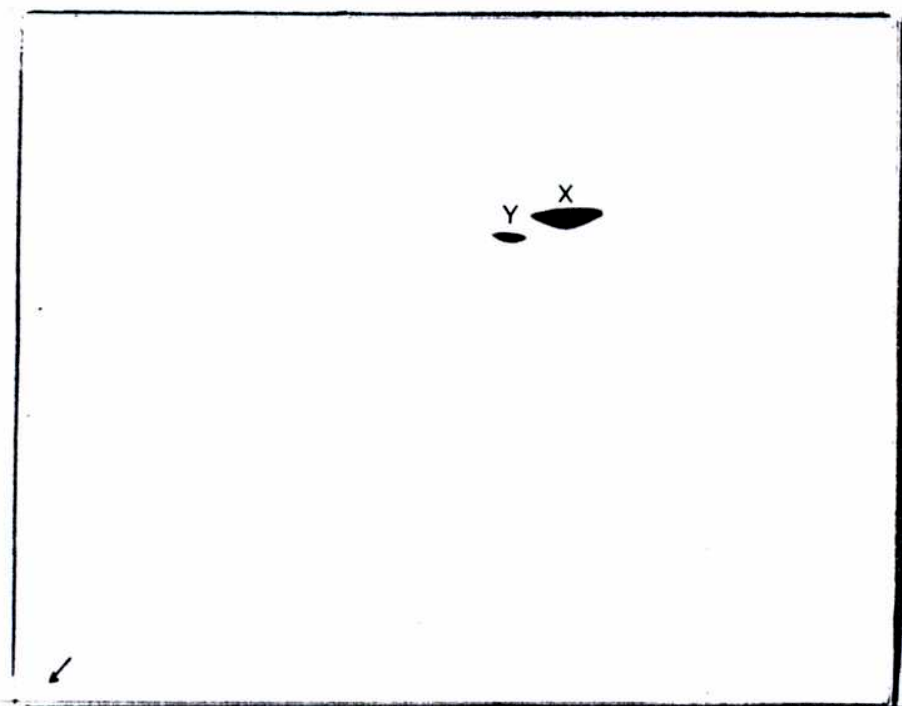


Fig 35: Fluorografía de c.c.d bidimensional de sialoglicolípidos de T.cruzi. El pico I (Fig 33(a)) fue eluido y recromatografiado . Se emplearon los solventes Cloroformo:metanol:CaCl₂ 0,2% (5:4:1) , en la primera dirección (hacia arriba) y cloroformo:metanol: NH₄OH 2,5M (5:4:1) en la segunda dimensión (hacia la derecha). La flecha indica el origen .

El extracto etéreo se analizó por c.c.d. en solvente 13 (Fig 36). Se demostró la incorporación de ácido palmítico en una esfingarina en X (G1TC) y una esfingenina en Y (G2TC), respectivamente. La estructura de estas bases de cadena larga, componentes de los glicolípidos, será discutida en capítulos posteriores, junto con la estructura total de estas moléculas.

6.4.5. Hidrólisis con neuraminidasa

Las otras alícuotas fueron incubadas con neuraminidasa y analizadas por c.c.d. (Solvente 10), antes y después del tratamiento enzimático. Como era de esperar, ambos glicoesfingolípidos hidrolizados, migran con Rf mayores que los originales (Fig 37).

La incorporación de ácido palmítico en la porción de bases de cadena larga de los compuestos que son modificados por el tratamiento con neuraminidasa, confirma que los epimastigotes de T.cruzi, biosintetizan sustancias del tipo gangliósidos. Era importante también asegurar la naturaleza endógena de los gangliósidos, pues las células se cultivan en un medio complejo, conteniendo suero bovino y es conocida la capacidad que tienen de adsorber sustancias del medio (186).

El perfil cromatográfico de los glicolípidos provenientes de incorporaciones con (³H)-palmítico y (³H)-galactosa en trypomastigotes de T.cruzi, es distinto al obtenido en epimastigotes (119).

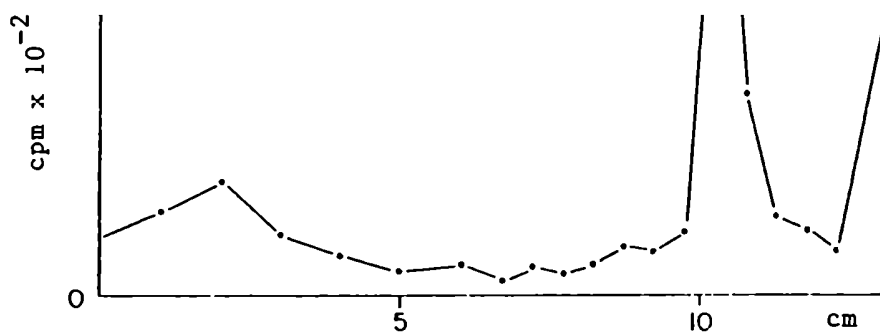


Fig 36: Cromatografía en capa delgada en Cloroformo:metanol: NH₄OH 1M (40:10:1) (doble desarrollo). Las sustancias X (G1Tc) e Y (G2Tc) (Fig 35), extraídas de la placa, fueron hidrolizadas con HCl(c):metanol:H₂O (3:29:4). Los productos de la hidrólisis se cromatografiaron. La placa se cortó, y la sílica gel se extrajo con C:M (1:1) para la determinación de la radioactividad a) Producto de la hidrólisis de X (G1Tc) b) producto de la hidrólisis de Y (G2Tc). Los patrones eran 1) fitoesfingosina; 2) eritrodihidroesfingosina; 3) esfingosina.

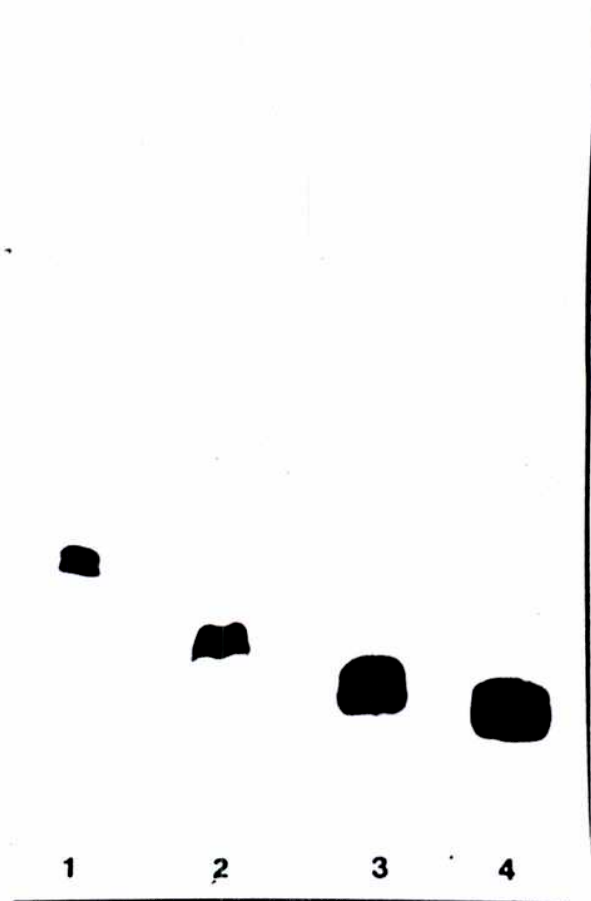


Fig 37: Tratamiento con neuraminidasa de los glicosfingolípidos X (G1Tc) e Y (G2Tc) de T.cruzi . X e Y (Fig 35) se trataron con neuraminidasa . Después del tratamiento enzimático las muestras se analizaron por c.c.d en solvente n-propanol: NH4OH 28%: H2O (75:5:5). Las manchas se detectaron por fluorografía. 1) X tratado con neuraminidasa; 2) X; 3) Y tratado con neuraminidasa 4) Y.

CAPITULO 7

PURIFICACION Y COMPOSICION DE

LOS GLICOLIPIDOS ACIDICOS DE

T. CRUZI (EPIMASTIGOTE)

7.1 FRACCIONAMIENTO DE GLICOLIPIDOS ACIDICOS.

Conocida la presencia de sialoglicolípidos en T.cruzi, se encaró el estudio de su composición, lo cual sería interesante para comparar con otros gangliósidos de células de organismos más evolucionados. Para ello era necesario contar con suficiente material puro.

$1,7 \times 10^{12}$ células liofilizadas de epimastigotes de T.cruzi (15,7 g), se extrajeron con C:M (2:1) y C:M (1:1). El peso del extracto seco fue de 4,8 g. El mismo, luego de separar un insoluble en el primer solvente de elución, se fraccionó en DEAE-Sephadex, utilizando el método descrito anteriormente para separar glicolípidos provenientes de incorporaciones metabólicas. Se obtuvieron 3,4 g de la fracción que eluye como lípidos neutros y 0,35 g de la fracción que eluye como lípidos acídicos. Esta última se separó a través de una columna de Unisil, luego de una saponificación en condiciones suaves y diálisis. Se obtuvieron dos fracciones, la fracción eluida con C:M (8:2) (32 mg), (CM 82) y la fracción eluida con C:M (1:1) (14mg) (CM 11).

7.1.1. ANALISIS DE LA FRACCION CM 82

Se llevó a cabo el análisis de la FR CM 82 por c.c.d. Con el

reactivo de α -naftol, específico para glicolípidos se revelaron 3 componentes de Rf (solvente 14) 0,45; 0,52 y 0,60 . Utilizando reactivo específico para fosfato, se revelaron cuatro sustancias de Rf= 0,6; 0,7; 0,8 y 0,95. Un testigo de galactosil ceramida tiene un Rf de 0,7.

El porcentaje de azúcares determinado por el método de Dubois, fue de 7% en peso, lo que equivale a 0,39 umoles/ mg, y el de hexosaminas, determinado por el método colorimétrico de Elson Morgan, fue de 0,6 % del peso total. Se analizó fosfato total en la muestra ,y fosfato inorgánico , luego de una hidrólisis ácida en condiciones fuertes . El valor en ambos casos fue de 0,23 umoles / mg, lo que equivale a 0,59 umoles de fosfato por umol de carbohidrato. Este hidrolizado fue analizado también por c.p. Se determinó la presencia de colina ($R_{f1} \text{ en } \text{NH}_2 = 2,5$) y etanolamina ($R_{f1} \text{ en } \text{NH}_2 = 2,3$), y tres sustancias de menor movilidad sensibles al reactivo de ninhidrina y de fósforo. Las dos primeras provendrían de fosfatidiletanolmina y fosfatidilcolina , respectivamente, que son los fosfoglicéridos más abundantes en I. cruzi (156).

Se obtuvo una reacción positiva para sulfato en esta fracción (187), indicando la posible presencia de sulfátidos en la misma.

Los azúcares que componen CM 82 son = arabinosa: xilosa: Manosa: Galactosa : Glucosa en relación 2:1:1:1:1 (Tabla XIV).

Esta fracción no se pudo marcar con la técnica de galactosa

oxidasa- NaB^3H_4 , descripta para la marcación de galactosas o galactosaminas en configuración piranósica y con el OH-6 libre.

Por otra parte, si se oxida la fracción CM 82 con periodato de sodio, seguida de reducción con NaB^3H_4 , en las condiciones utilizadas para marcar ácidos siálicos y/o galactofuranosas, el tritio se incorpora en tres sustancias de Rf 0,45 ; 0,70 y 0,80 en c.c.d en solvente 14 .Estos tres componentes se eluyeron de la placa y se hidrolizaron en las condiciones descriptas por Lederkemer y col (141), para las galactofuranosas modificadas. Por c.p. (Fig 38), se demostró la presencia de arabinosa radioactiva sólo en el componente de Rf 0,45.

Estos resultados indicarían que la galactosa presente en un glicolípido de esta fracción se encuentra en la configuración furanósica. Hasta el momento sólo se había determinado la presencia de galactofuranosa en T.cruzi como componente del LPPG (141).

Se realizó una determinación cuantitativa de las esfingosinas liberadas en una metanólisis, de la Fracción CM 82. Se dosaron 0,63 umol de bases de cadena larga/ umol de azucar. Por c.c.d. en solvente 13, se reveló una sustancia de movilidad similar a esfingosina.

El análisis de los ácidos grasos se efectuó por c.g.l. , y c.g.l.-e.m.. Los resultados se muestran en las tablas XIV y XV.

La asignación de los iones se realizó en base a datos de literatura (187).

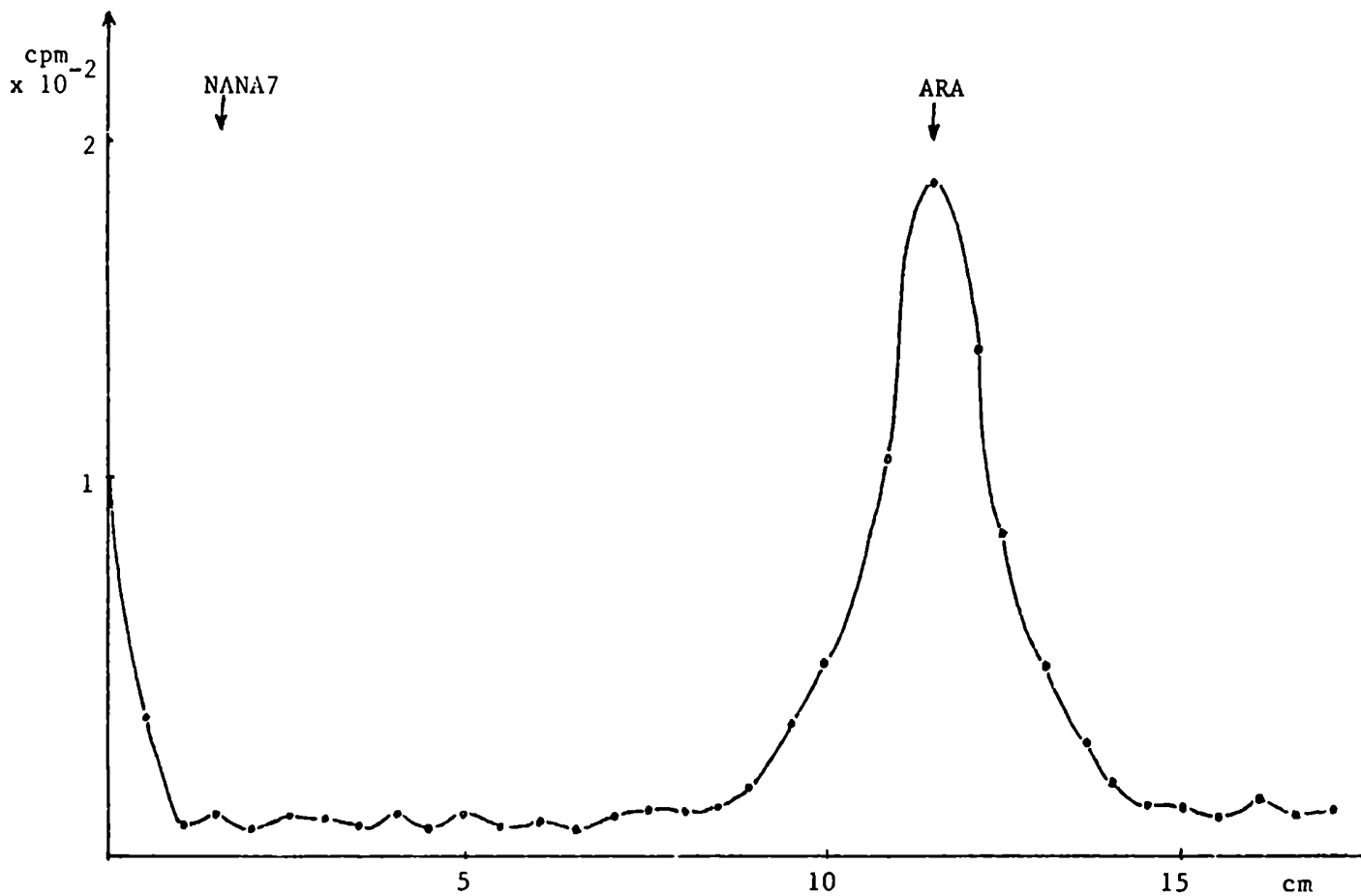


Fig 30: Cromatografía en papel del hidrolizado con Ac. Trifluoroacético 0,05 N de la sustancia de Rf 0,45 marcada con la técnica de Pericdato de sodio - Na²²H₄.

Tabla XIV: Composición de CM 82.

CARBOHIDRATOS:

Azúcares Totales: 7% (p/p) *
 Aminoazúcares: 0,6% (p/p) *

Composición de azúcares *

Arabinosa	2
Xilosa	1
Manosa	1
Galactosa	1
Glucosa	1

FOSFATO: 0,59 umol/ umol azucar *

BASES DE CADENA LARGA : 0,63 umol/ umol azucar *

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS Pt

Acido graso	Abundancia (%)	Tr'	Tr''
C 14:0	0,9	3,01	3,03
C 15:0	0,3	4,24	4,28
C 16:0	6,8	5,95	6,05
C 17:0	0,8	8,99	9,10
C 18:0	23,8	12,65	12,76
C 18:1	27,4	14,52	14,71
C 18:2	40,0	17,21	17,66
C 20:0	0,2	27,39	27,71

Tr' Tr experimental de los componentes de CM 82

Tr'' Tr de los distintos testigos usados

* Determinado colorimetricamente

* Determinado por c.g.l.

Pt Determinado por c.g.l en condiciones IIa

Los ácidos grasos insaturados de 18 C son los que se hallan en mayor proporción (67,4%) en CM 82, siendo el ácido linoleico, el más abundante. Estos últimos son los ácidos grasos más abundantes en T.cruzi (157-158). Se encontró que en los fosfolípidos de T.cruzi, el ácido linoleico constituye el 50% del total de ácidos grasos (158).

Tabla XV: Iones característicos de los ésteres metálicos de los ácidos grasos presentes en CM 82.

	M+ (%)	M-31 (%)	M-43 (%)	74 (%)	87 (%)
Ac. palmítico	260 (13)	239 (3)	227 (5)	100	59
Ac. estearico	298 (17)	267 (3)	255 (6)	100	6,1
Ac. oleico	296 (8)	265 (16)		92	39
Ac. linoleico	294 (19)	263 (9)		16	14

Como se discutió en la sección 6.4.3 la fracción CM 82 incorpora metabólicamente galactosa en tres componentes. Uno de estos compuestos ($R_f = 0,45$), se marca también por la técnica de periodato-Borhidruro de sodio, e incorpora ácido palmítico, lo cual indicaría que se trata de un glicolípido que contiene galactosa en la configuración furanósica.

El compuesto de $R_f = 0,60$ revela con reactivo de fosfato, por lo que se trataría de un fosfoglicolípido.

La sustancia de $R_f = 0,7$ que se revela con el reactivo de fosfato, también incorpora metabólicamente ácido palmítico, pero no se revela con el reactivo para glicolípidos ni incorpora galactosa, por lo cual se trataría de un fosfolípido que no saponificó en las condiciones empleadas.

La fracción CM 82 esta formada por dos glicolípidos, uno de ellos conteniendo fosfato , y fosfolípidos. Probablemente el glicolípidos de menor movilidad contenga un grupo sulfato en su molécula , que le conferiría el caracter ácido. Es de notar que no se detectó la presencia de ácido siálico en esta fracción

Dado que el interés principal de esta tesis era el estudio de los sialoglicolípidos, no se analizaron los componentes individuales de esta fracción.

7.2 PURIFICACION DE LOS GANGLIOSIDOS

Por cromatografía en columna de Unisil de la fracción CM 11, se separaron dos sustancias de Rf 0,42 y 0,50 en c.c.d (solvente 12) ambas se detectaban al U.V (en placas de sílica gel Merck PF 254), y con el reactivo de Resorcinol/Cu

Se obtuvieron 3,2 mg de la sustancia de Rf= 0,50 (G1Tc) , y 1,3mg de la sustancia de Rf=0,42 (G2Tc). Estos valores representan 200 ug de G1Tc/g de célula seca y 80 ug de G2Tc/g de célula seca respectivamente.

EL contenido de gangliósidos en tejidos de vertebrados varía entre 5 mg/g de tejido húmedo, en materia gris de cerebro; hasta 2 ug / g de tejido húmedo, en fluido cerebroespinal (189). Por otra parte, en la estrella marina Asterina pectinifera (26), el contenido de gangliósidos es de aproximadamente 40 ug/g de cé

lula húmeda.

Dado que todos estos valores están dados en peso húmedo, se calculó para T.cruzi un contenido de 56 ug de G1Tc/ g de peso húmedo ,y 22 ug de G2Tc/ g de peso húmedo. Estos valores están en el orden de los determinados para invertebrados.

7.2.1. Composición de G1Tc y G2Tc

En alícuotas convenientes de G1Tc y G2Tc, se dosaron colorimétricamente azúcares totales, aminoazúcares, bases de cadena larga y fósforo total. Los resultados se muestran en la Tabla XVI

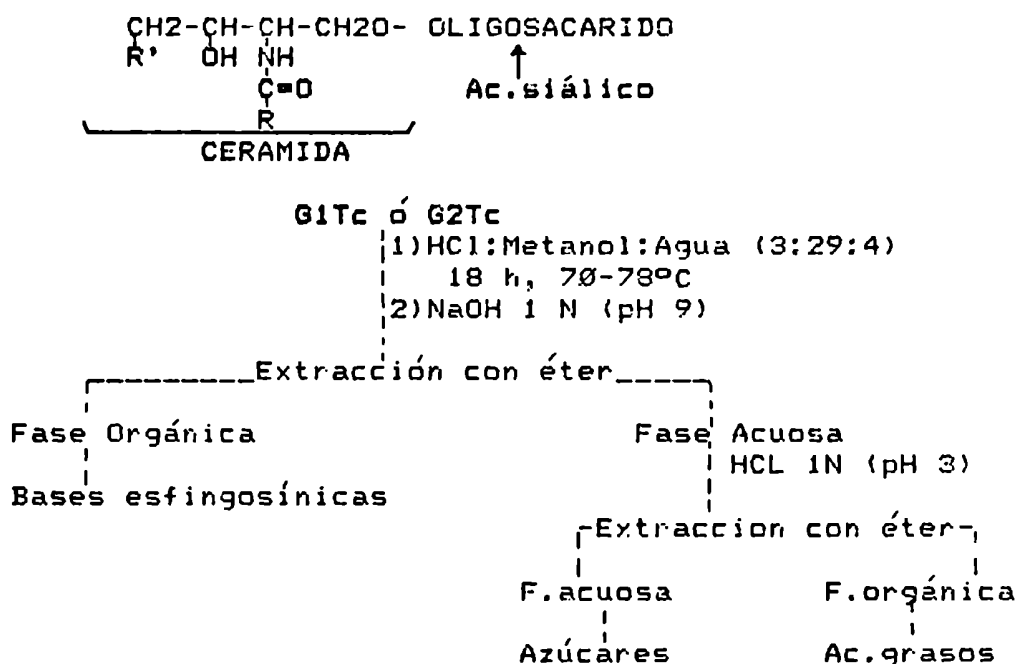
Tabla XVI: Composición de los gangliósidos de G1Tc y G2Tc de células epimastigote de T.cruzi

	G1Tc		G2Tc	
	relación molar	peso (%)	relación molar	peso (%)
ACIDO SIALICO	0,9	13,7	1	12,7
AZUCARES TOTALES	4,4	42	4,8	56,8
AMINOAZUCARES	1	9		
BASES ESFINGOSINICAS	1,1	17.1	1,1	13,6
FOSFORO TOTAL				

7.3. ANÁLISIS DE LA CERAMIDA DE G1Tc

G1Tc se sometió a una hidrólisis con HCl:Metanol:Agua 3:29:4 18h a 70-78°C y se separaron los productos según el Esquema (2)

El tratamiento ácido en medio metanólico hidroliza la unión glicosídica de la cadena del oligosacárido al OH de C-1 de la base esfingosínica (189). A la vez hidroliza la unión amida entre la base de cadena larga y el ácido graso de la ceramida. En estas condiciones también se rompen las uniones glicosídicas entre los azúcares de la cadena del oligosacárido, pero debido a la posible formación de los metil glicósidos, se prefirió realizar la hidrólisis con HCl 1 M en agua, como se describe más adelante para el análisis de los monosacáridos .



Esquema 2: Hidrólisis de los gangliósidos G1Tc y G2Tc y separación de bases de cadena larga y ácidos grasos.

7.3.1. Bases de cadena larga deGITc

En el extracto etéreo obtenido en medio alcalino, se dosaron esfingosinas por la reacción del naranja de metilo (Tabla XVI).

Las bases de cadena larga se derivatizaron como trimetilsilil derivados para su posterior análisis por c.g.l. y c.g.l.-e.m.

En la cromatografía gas-liquido, se detectó un único compuesto, cuya movilidad, en las condiciones usadas, era 1,03 con respecto a una esfinganina de 18 átomos de carbono. La co-cromatografía de ambas sustancias, mostró que no se trataba del mismo compuesto.

El espectro de masa del derivado trimetilsililado, de la base de cadena larga dió evidencia de su estructura (Tabla XVII)

En las condiciones usadas no aparece el ion molecular, como es usual para los trimetilsililéteres de las bases esfingosínicas (190).

El peso molecular se calculó por los iones m/z 445 ($M+1-Me$); m/z 356 ($M-CH_2OSiMe_3$), que corresponden a una esfinganina de 19 átomos de carbono.

El ion $M+1-15$ de una muestra auténtica de esfinganina trimetilsililada es también más abundante que el ion $M-15$.

La formación de iones protonados concuerda con la observación

Tabla XVII Iones característicos de la base esfingosínica de G1Tc.

ION(m/z)	Estructura de los fragmentos	Intensidad	
		Base de G1TC	Esfinganina testigo
43	(C ₃ H ₇) ⁺	13,1	0,8
57	(C ₄ H ₉) ⁺	42,2	2,7
73	(Me ₃ Si) ⁺	31,1	13,0
103	(CH ₂ OSiMe ₃) ⁺	16,0	4,8
116	(CHCH ₂ OSiMe ₃) ⁺	10,5	23,6
117	(NH ₂ CHCH ₂ OSiMe ₂) ⁺	42,5	3,2
132	(NH ₂ CHCH ₂ OSiMe ₃) ⁺	0,5	100
133	(NH ₃ CHCH ₂ OSiMe ₃) ⁺	46,1	25,7
147	(Me ₃ OSiMe ₂) ⁺	45,2	5,0
205	(Me ₃ SiH ₂ NCHCH ₂ OSiMe ₃) ⁺	100	2
313	(M+1- 57 - Me ₃ SiOH)?	9	-
341	(M+1-Me-Me ₃ SiOH) ⁺	-	1,3
342	(M-CH ₂ OSiMe ₃) ⁺	-	47,4
343	(M+1-CH ₂ OSiMe ₃) ⁺	-	12,4
354	(M+1-Me ₃ SiOH) ⁺	-	1
355	(M+1-Me-Me ₃ SiOH) ⁺	2	-
356	(M-CH ₂ OSiMe ₃) ⁺	2,5	-
357	(M+1-CH ₂ OSiMe ₃) ⁺	2,0	-
370	(M+1-Me ₃ SiOH) ⁺	2,5	-
431	(M+1-Me) ⁺	-	1,5
445	(M+1-Me) ⁺	4	-

que los iones moleculares de las aminas tienen una gran tendencia a protonarse (191).

El pico base a m/z 205 podría derivar de la ruptura entre el C-2 y C-3 con migración del grupo trimetilsililo del oxígeno del C-3 al nitrógeno del C-2. Se ha observado un reordenamiento similar para N-acetil-Q-trimetilsililéteres de bases esfingosínicas

(192). Sin embargo el pico base en la dihidroesfingosina sililada corresponde a m/z 132, o sea 205- TMSi.

Dado que su tiempo de retención es poco mayor que el de la esfinganina de (C18), se trataría de una base ramificada de 19 átomos de carbono. A este respecto se puede señalar que la intensidad del ion m/z 57 es bastante mayor que el de las esfinganinas lineales, lo cual podría indicar una estructura anteiso.

Por los estudios de incorporación de ácido palmítico, se había determinado que la base de cadena larga presente en GITc era una esfinganina; el análisis por c.g.l.-em permite asignar a la misma la estructura de una metil esfinganina.

Iso y anteiso metil esfinganinas han sido descritas (193).

Así, se ha informado la presencia de esfinganina :17-metil esfinganina en relación molar 1:3, en la ceramida del LPPG de T.cruzi (98). En el glicoesfingolípido neutro, aislado de epimastigote de T.cruzi por Barreto-Bergter se identificaron C-18 esfinganina y 17-metil esfinganina como bases de cadena larga componentes de la ceramida (160).

En otros organismos, se ha detectado esfinganina y 17-metil esfinganina como componentes mayoritarios de la ceramida de los fosfolípidos de Bacteroides melaninogenicus(194).

Carter y Graver (195) caracterizaron esfingosinas de cadena ramificada (C-19 y C-17), como constituyentes de la fracción de

esfingolípidos de Tetrahymena pyriformis . En Chritidia fasciculata se ha encontrado una 19-metil C-20 fitoesfingosina (196).

Los gangliósidos de cerebro de vertebrados contienen en general bases esfingosínicas de 18 a 20 carbonos, no saturadas.

En invertebrados, dentro del filum Echinodermata, se han encontrado fitoesfingosinas (4-D-hidroxiesfinganina), normales y ramificadas , cuyas cadenas varían entre 15 a 22 átomos de Carbono (26,27) (Tabla XXIV).

El tipo de base esfingosínica detectada, saturada y ramificada, es diferente, tanto de la de gangliósidos de vertebrados como de la de invertebrados, aunque se relaciona con las características por otros autores en otros glicoconjugados de T.cruzi probablemente por provenir todas, de una misma vía metabólica.

7.3.2. Ácidos grasos de la ceramida de GITC

Para estudiar los ácidos grasos componentes de la ceramida , luego de extraer las bases esfingosínicas del hidrolizado a pH 9 con éter, la fase acuosa se acidificó con HCl y se extrajeron los ácidos grasos con éter etílico. La Tabla XVIII ilustra los porcentajes de los ácidos grasos , caracterizados por c.g.1 y c.g.1.-e.m como ésteres metílicos.

Tabla XVIII :Acidos grasos componentes de GITc

Acido graso	GITC (%)	Tr#	Tr'
Mirístico (C14)	1,4	1,73	1,66
Palmítico (C16)	7,8	3,20	3,21
2-Metil Palmítico	6,3	3,69	
Esteárico (C18)	31,6	6,47	6,45
Oleico (C18:1)	4,6		
2-Metil Esteárico~	44,0	7,40	
Araquídico (C20)	2,9	13,20	13,28
Behénico (C22)	1,1	24,25	24,19

Tr# = Tr experimental de los componentes de GITc en columna NPGS

Tr' = Tr de los distintos testigos usados.

~En la columna NPGS salió junto con el ácido oleico. Este último se separó en una cromatografía programada en OV17 (180-290°C; 1°C x min), donde se calculó el porcentaje aproximado

En el análisis por c.g.l. de los ésteres metílicos en la columna NPGS (cte de Reynolds 2,72 (198)), no pudieron asignarse por comparación con testigos, el pico más abundante, de Tr 7,4 como así tampoco el de Tr 3,69.

Ambas sustancias presentaban, en las condiciones utilizadas, un Tr relativo a ácido esteárico y ácido palmítico,

respectivamente, igual a 1,15. A su vez, el Tr relativo a éstos en una columna SP-2330 (cte de Reynolds 490), fue en ambos casos igual a 1,05 , lo que indicaría que pertenecen a una serie homóloga.

La identidad de los ácidos grasos fue asignada por c.g.l- e.m. de sus ésteres metílicos en las condiciones descriptas en el capítulo experimental. En la Tabla XIX puede verse los iones característicos obtenidos.

Tabla XIX: Iones característicos de los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en G1Tc.

	M+	M-31	M-43	74	87
Ac. Palmítico	260 (4,3%)	239 (3%)	227 (6%)	100 (%)	59 (%)
Ac. Esteárico	298 (6,6%)	267 (2,5%)	255 (8%)	100 (%)	60 (%)

	M+	M-43	M-57	88	101
Ac. 2-metil Palmítico	284 (4,2%)	241 (6,9%)	227 (3,3%)	100%	55%
Ac. 2-metil Esteárico	312 (4,8%)	279 (6,2%)	255 (2,4%)	100%	56%

Los espectros de masas de los ésteres metílicos de cadena normal de una serie homóloga están bien definidos y dan iones característicos (187).

La abundancia relativa del ion molecular crece con el largo

de la cadena. Su identificación se verifica por el ion acilio M-31 ($R-C\equiv O^+$).

En general el pico base del espectro corresponde a una migración de H seguido por ruptura (reordenamiento de Mc Laffety). En ésteres metílicos de cadena normal, el ion producido es m/z 74. Si el C-2 está sustituido, se corre a valores de m/z más altos.

Los iones de la serie $CH_3OCO(CH_2)_n$, se encuentran a m/z $(59 + 14n)$ (m/z 87, 101, 115, 129, 143, 157, etc). El miembro más abundante de la serie (m/z 87), para los de cadena normal, deriva su estabilidad por la formación del enol ($CH_3O-C-CH=CH_2$),
$$\begin{array}{c} | \\ OH^+ \end{array}$$

El ion M-43, para los lineales y M-57 para los 2-metil ésteres, deriva de un reordenamiento del esqueleto de la cadena, seguido de pérdida de un radical propilo o butilo respectivamente. (Esquema(3)).

Los iones a m/z 69, 83, 97, etc corresponden a la serie saturada C_nH_{2n+1} .

La asignación de la estructura de los ácidos ramificados, fue realizada por c.g.l-em.

El ion molecular de 2-metil esteárico (m/z 284) y 2-metil palmítico (m/z 312), corresponden a ácidos grasos de 17 y 19 átomos de carbono, respectivamente.

En ambos casos el pico base es m/z 88. El corrimiento de 14

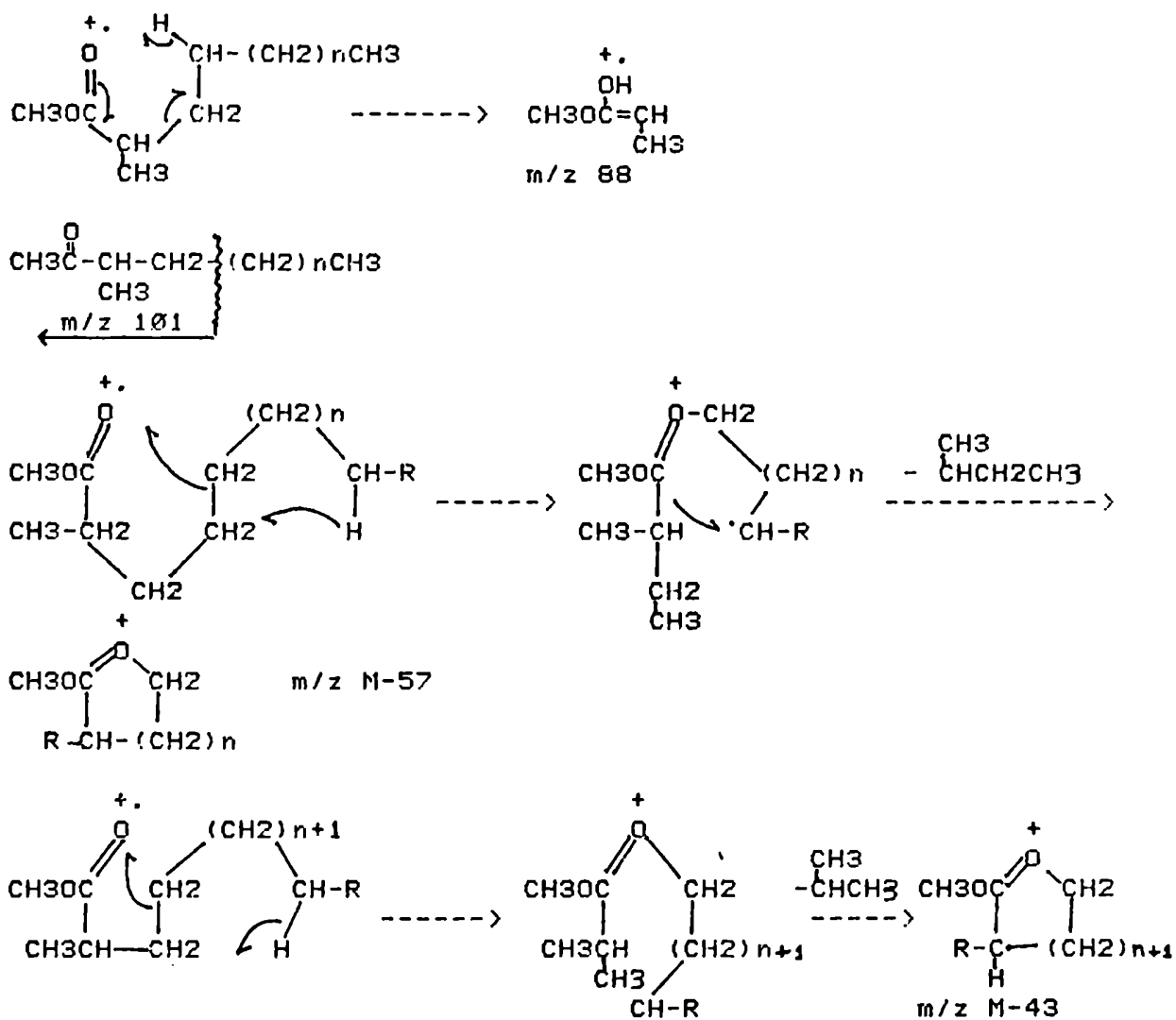
unidades de masa con respecto al pico base de una cadena normal (m/z 74), indica la presencia de metilo en C-2 (188). También se observa el corrimiento de los iones de m/z 87 a m/z 101, M-43 a M-57 y M-29 a M-43, característico de ésteres ramificados con metilo en C-2 (188) (Esquema 3).

En el extracto KCl, que contiene la mezcla de gangliósidos, se determinó (sección 6.2), que los ácidos grasos que se hallaban en mayor proporción eran los normales de 16, 18 y 20 C; En el gangliósido G1TC, purificado los ácidos 2-metil ramificados predominan sobre aquéllos. En ambos casos el ácido oleico se encuentra en una baja proporción, aunque es uno de los ácidos grasos más abundantes en T.cruzi (157)

Hasta el presente no se había determinado la presencia de ácidos grasos ramificados en extractos lipídicos de T.cruzi.

Timm y col (157) describieron la presencia de un ácido graso no identificado de tiempo de retención mayor que ácido esteárico en c.g.l.. Las fracciones acídicas del extracto C:M, que contendrían los gangliósidos estudiados en esta tesis, estaban enriquecidos en el mismo.

Algunos autores (11), han señalado que la composición del medio de cultivo, ejerce influencia sobre la composición lipídica de organismos flagelados y ciliados, sin embargo se informó que la composición lipídica de T.cruzi es relativamente



Esquema 3: Formación de fragmentos característicos en los esteres metálicos de ácidos grasos metil sustituidos en C-2

independiente del medio de cultivo (158).

Existen muy pocos estudios realizados sobre la biosíntesis de lípidos en Trypanosomatídeos. Erwin y col (199), informaron que en protozoarios ciliados, la conversión de ácidos grasos saturados a insaturados, ocurre a través de la vía estearato → oleato → linoleato → α -linoleato.

El metabolismo de los ácidos grasos ramificados, no ha sido estudiado en protozoarios.

Los ácidos grasos metil sustituidos en C-2 se producen como productos mayoritarios en glándulas sebáceas de muchos pájaros (200)

Así, en las ceras producidas por las glándulas sebáceas de Nicotyrax nicotirax, los ácidos 2-metil sustituidos representan el 40,9% del total de la composición de ácidos grasos, siendo el ácido 2-metil esteárico (21,5%) y el ácido 2-metil palmítico (11%), los que se encuentran en mayor proporción (201).

La biosíntesis de ácidos grasos ramificados, ocurre a partir de diversos precursores, dependiendo del tipo de ramificación.

Para los ácidos grasos que contienen un grupo metilo en C-2, se han sugerido, por lo menos, dos rutas posibles.

Estudios de marcación in vivo, indicaron que tales ramificaciones provienen de la sustitución de acetato por propionato (202)

Por otra parte (203) se encontró que en condiciones fisiológicas que llevan a la acumulación de metilmalonil-CoA, se pueden sintetizar esos ácidos grasos ramificados, y que la sustitución de Malonil CoA por metilmalonil CoA, da lugar a los ácidos grasos ramificados, apropiados. Más tarde Buckner y col (200), confirmaron esta hipótesis, ya que aislaron de una glándula sebácea de patos, una sintetasa que cataliza la incorporación de metilmalonil CoA en ácidos grasos.

En gangliosidos de cerebro, el ácido esteárico es el predominante. Fuera del sistema nervioso central, se encuentra una mezcla de ácidos grasos lineales e insaturados (189), que tienen de 16 a 24 átomos de carbono.

En invertebrados, los gangliosidos del phylum Echinodermata contienen, predominantemente, ácidos grasos saturados, de 16 a 24 carbonos (28) (Tabla XXIV).

7.4. COMPOSICION DEL OLIGOSACARIDO DE GITc

7.4.1. Análisis de ácido siálico

Muchos de los métodos utilizados convencionalmente para liberar y purificar los ácidos siálicos de glicoconjugados (metanólisis, hidrólisis con ácidos minerales, hidrólisis enzimáticas) no dan resultados cuantitativos con respecto a los

distintos tipos de ácidos siálicos que pueden estar presentes, especialmente en casos en que se dispone de poco material.

Los problemas, hasta ahora conocidos, incluyen principalmente la liberación incompleta y no específica de ciertos ácidos siálicos y la destrucción extensiva de ésteres de O-acetilo (des-O-acetilación), producida durante la liberación y purificación de los mismos. Otro problema adicional es la migración de grupos de las posiciones 7 y 8 a posición 9 a pH por debajo de 3 o sobre 6.

El método utilizado en esta tesis, propuesto por Varki y Diaz (176) para la liberación y purificación de ácidos siálicos de glicoconjugados, minimiza los problemas mencionados.

La determinación estructural de los ácidos siálicos es bastante compleja, ya que se puede obtener muy poca cantidad de material puro y los compuestos no son muy estables. El análisis se puede llevar a cabo sobre los derivados pertrimetilsililados (203), o sobre los ésteres metílicos de los éteres trimetilsililados. Se eligió el primer método, por resultar más rápido y de alta sensibilidad. Para G1Tc, el análisis se realizó sobre 1 mg de gangliósido puro.

La hidrólisis se llevó a cabo en Acido Acético 2 M durante 4 horas y se procesó según se describe en la parte experimental.

Los ácidos siálicos se analizaron como trimetilsilil deriva-

dos por c.g.l.-e.m.. Los iones obtenidos se observan en la Tabla XX.

Tabla XX: Fragmentaciones del ácido siálico componente de G1Tc

ASIGNACION*	ION (m/z)	INTENSIDAD (%)	
		G1Tc	NANA Patrón
A	726	5,7	3,4
B	634	19,8	81,0
C	536	11,9	68,8
H	458	6,0	8,7
E	375	9,1	35,7
D	356	100	99,4
F	205	17,5	13,6
G	173	12,7	55,0

*= La estructura de los iones se muestra en la Fig 39.

Se han descrito rupturas específicas de los diversos tipos de ácidos siálicos estudiados (203). Estos fragmentos se utilizan para identificar la presencia de sustituyentes y su posición en ácidos siálicos.

Los iones A (M-CH₃) y B (M-COOTMS), indican el peso molecular de los ácidos siálicos y, en general, la cantidad y tipo de sustituyentes presentes. Para el ácido siálico de G1Tc, el

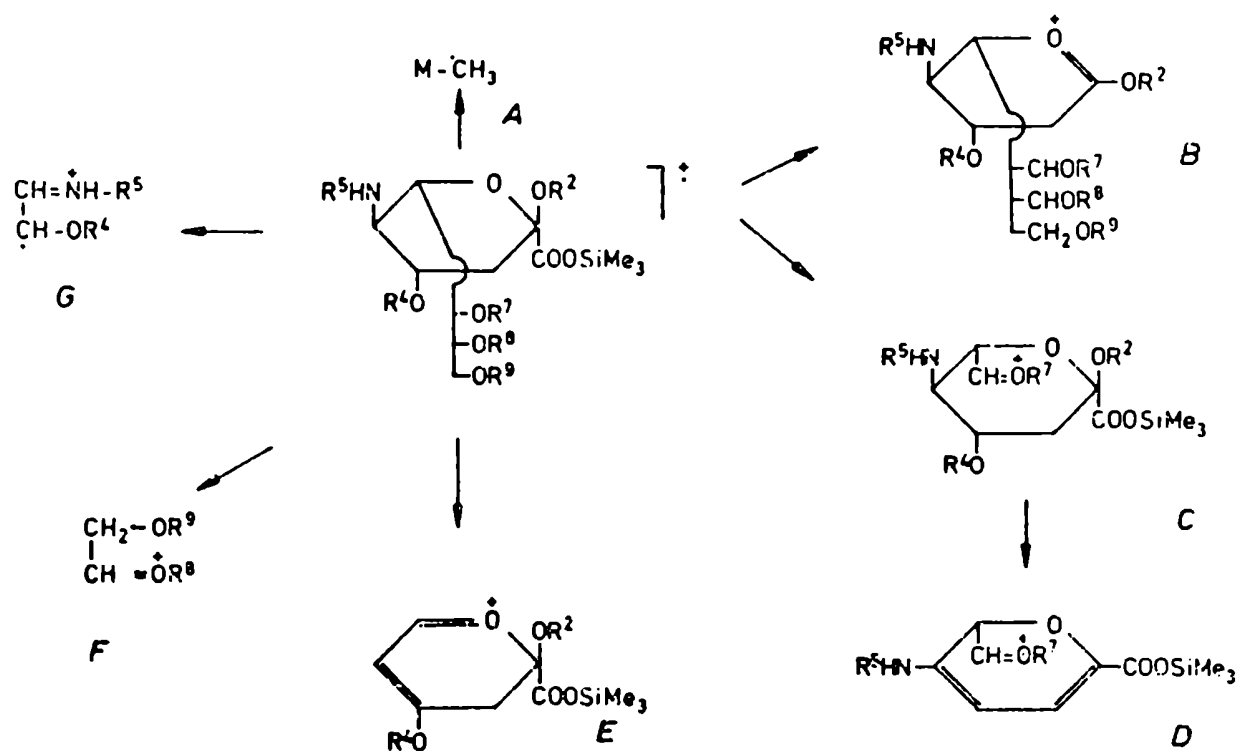


Fig 39: Esquema de las fragmentaciones de los ácidos siálicos
 Para el ácido N-acetil Neuramínico : $R^2, R^4, R^7, R^8, R^9 = SiMe_3$;
 $R^5 = Ac.$

fragmento A tiene un valor de m/z 726 y el B , un m/z 634.

El fragmento C (m/z 536), se forma por eliminación de la porción C8-C9, de la molécula, con localización de la carga formal en la posición 7. Su formación es improbable si existe un grupo éster en C-7. Lindberg (204), demostró que la carga se localiza preferencialmente en un oxígeno de un éter, antes que en un O de un éster.

El fragmento D (m/z 356) (M-CHOTMS-CH2OTMS- 2TMSOH), se forma a partir del fragmento C por eliminación consecutiva de R2OH y R4OH

La eliminación de la cadena lateral en C-7,8,9 y del sustituyente en C-5 lleva a la formación del fragmento E (m/z 375) (M-CH2OTMSCHOTMSCHOTMS- CH3CONH2). El fragmento F (CH2OTMSCHOTMS contiene la porción del C8-C9 de la molécula (m/z 205). Si el C-8 esta sustituido por un grupo ester, la formación de este fragmento no está favorecida.

Finalmente, el Fragmento G (CH3CONHCHCHOTMS), contiene la porción C4-C5 de la molécula (m/z 173).

Por comparación con el espectro de masa de un testigo, se determinó que el ácido siálico presente en G1TC, es el ácido N-acetil Neuramínico (NANA), pues presenta las mismas rupturas características , aunque las intensidades son menores. (Tabla XX)

Un posterior análisis por c.g.l-e.m. del trimetilsililderiva-

do del ácido siálico liberado por hidrólisis ácida de un extracto KCl, mostró la presencia de ácido N-acetil Neuramínico, el cual provendría de G1Tc, ya que como se vio anteriormente (Capítulo 6), este gangliósido es uno de los componentes del extracto KCl.

También se realizó el e.m. de una sustancia de Tr. relativo a NANA = 0,91, en las condiciones que se mencionan en la parte experimental.

La abundancia relativa del mismo, con respecto al Ácido N-acetil Neuramínico, detectado en G1TC, era de 5%.

En el e.m. de esta sustancia (Fig 40), se detectaron iones característicos a m/z 564,, 462, 374, 286, 205 y 173. Los iones de masa alta se detectaron con baja intensidad.

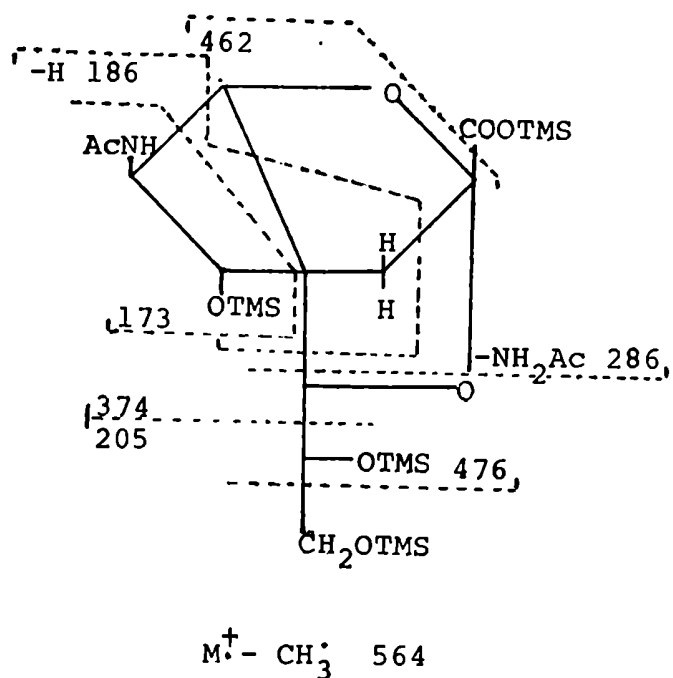
El ion a m/z 564, en la región más alta del espectro, se forma por eliminación de un grupo metilo del ion molecular.

La presencia del ion a m/z 462 provendría de la eliminación de COOTMS de la molécula.

De estos dos fragmentos, se deduce que el PM de la sustancia en cuestión sería 579.

El ion a m/z 374 proviene de la eliminación de la cadena lateral C8-C9 .

El ion a m/z 205 (CH₂OTMS-CH₂OTMS), indica la presencia del glicol exocíclico que se silió. El ion a m/z 272, que se formaría por pérdida de (CH₂OTMS-CHOTMS-CHOTMS), no se observa,



ION (m/z)	INTENSIDAD (%)
564	0,7
476	0,5
462	0,5
374	6,1
286	0,6
205	11,4
186	1,8
173	7,7
73	100

Fig 40: Esquema de las fragmentaciones del ácido 2,7 anhidro N-Acetil neuramínico, detectado en el hidrolizado con Ac Acético 4M de GITC

pero se encuentra un ion a m/z 286 (Fig 40) . Este hecho sugiere que en la molécula no tenemos un grupo OTMS en C-7, sino que se encontraría deshidratado con el OH en C-2.

La estructura de este compuesto, fue finalmente asignada al Acido 2,7 anhidro-N-acetil-Neuramínico (Acido 5-acetamido-2,7-anhidro-3,5-didesoxi- α -D-glicero-D-galacto- nonulopiranosídico), por comparación con el espectro del mismo que Suzuki y col caracterizaron por c.g.l-e.m. en cerumen humano (34)

El espectro obtenido , también se corresponde con el del éster metílico del trimetilsilil derivado del acido 2,7 anhidro siálico, salvo las diferencias de masa debidas a la distinta sustitución del ácido en C-1. Lifely y Cottee caracterizaron el mismo por c.g.l-e.m., como producto secundario de la metanólisis del ácido NANA y de homopolímeros de NANA provenientes de meningococos (178).

Schauer y col (180), informaron que en orina de rata se detectaba una cantidad relativamente grande del ácido 2,7 anhidro N-acetil neuramínico. En el espectro de masas del derivado per-trimetilsililado, también observaban los iones característicos a m/z 564 , 462 , 374, 205 y 173 , los cuales han sido también detectados en la sustancia proveniente de la hidrólisis de G1Tc.

Sin embargo Suzuki y col (34) no lograron detectar este anhidro derivado de NANA en orina de tres cepas de ratas. Estos autores sugirieron que el NANA libre o unido a algun glicoconju-

gado, puede dar espontaneamente el derivado 2-7 anhidro en condiciones particulares . Dado que este último compuesto tiene comprometido su OH glicosídico, no puede formar parte como tal de un glicoconjugado, como sugieren los autores.

Por otra parte se conoce la deshidratación espontanea de azúcares libres, por acción de ácidos para dar lugar a la formación de anhidro azucares (177).

En nuestro caso el anhidro derivado se formaría también a partir del NANA liberado en la hidrólisis . Esto explicaría la detección de un componente de mayor movilidad que NANA en la cromatografía en papel de hidrolizados realizados en condiciones específicas para la liberación de ácidos siálicos (Cap 6).

En efecto, cuando se sometió una muestra autentica de NANA a las condiciones utilizadas en las primeras hidrólisis acidas, se detectó por c.p. con el reactivo de acido Tiobarbitúrico, además del NANA de partida, una sustancia de RNANA= 1,4.

Simultaneamente con nuestro primer trabajo sobre la presencia de sialoglicolípidos en células epimastigote de T.cruzi, (129), Schauer y col detectaron ácido N-acetil neuramínico y Acido N-glicolil neuramínico en relación 9:1 en muestras provenientes de hidrólisis enzimáticas con neuraminidasa de epimastigotes de T.cruzi, cepa Y , aunque no identificaron el origen del mismo (115).

El tipo de ácido siálico caracterizado en G1TC, es el más

abundante en la naturaleza y es el principal tanto en glicolípidos como en glicoproteínas animales.

En los gangliósidos de invertebrados caracterizados hasta el presente, han sido identificados, además de los Ácidos N-acetil y N-glicolil Neuramínico, otros derivados O-acetilados e inclusive, O-metilados en diversas posiciones. (26,31,32).

En la estrella marina Diastolateria Nipon, se detectó un ácido siálico acetilado en C-5 y metilado en C-8 (Tabla XXIV)

De todas formas, la variedad de ácidos siálicos identificados en gangliósidos, debe ser mayor que la conocida actualmente, debido a los inconvenientes que se presentan para aislar los mismos sin que ocurran reacciones de des-O-acetilación y deshidratación.

En las condiciones de hidrólisis utilizadas para liberar ácidos siálicos, también pueden hidrolizarse parcialmente azúcares terminales que se liberan en condiciones ácidas suaves (99).

Como se describe más adelante, arabinosa es un componente del oligosacárido de GITC. En uno de los análisis por c.g.l.-e.m. de un hidrolizado con Ac. acético 4M, se detectaron dos picos de Tr. menor que el del ácido N-acetil neuramínico, cuyas fragmentaciones corresponden a una pentosa sililada en las configuraciones furanósica y piranósica, respectivamente (Tabla XXI).

Las asignaciones se realizaron de acuerdo a la literatura, (205), considerando que en las furanosas, el pico a m/z 217 es el más abundante.

Tabla XXI: Espectro de masa de la pentosa trimetilsililada detectada en un hidrolizado ácido (Ac. Acético 4M) , de G1TC.

ION (m/z)	ESTRUCTURA DE LOS IONES	INTENSIDAD (%)	
		PIRANOSA	FURANOSA
423	M+ -CH ₃	0,7	2,3
333	M+ - CH ₃ - TMSOH	0,7	1,9
243	M+ - CH ₃ - 2 TMSOH	0,5	12,4
320	M+ - O=CHOTMS	17,4	13,1
319	TMSOC-CHOTMS-CHOTMS=CH	63,8	46,8
307	TMSOCH-CHOTMS-CHOTMS	14,3	74,9
217	TMSOCH=CH-CHOTMS	46,4	- 97,1
204	TMSOCH-CHOTMS	64,4	29,1
73	TMS	100	100

7.4.2 Análisis de los azúcares componentes de G1TC

Las condiciones utilizadas para determinar los monosacáridos componentes de G1TC, por análisis de sus acetatos de alditoles, son las recomendadas por Torello y col (206) ,para el análisis de la composición de azúcares en glicosfingolípidos, cuando se posee poca cantidad de muestra.

Los resultados óptimos se obtienen por hidrólisis a 100°C durante 8h con HCl 1N, reducción con borohidruro de sodio por 60

minutos y acetilación con anhídrido acético y piridina por 30 minutos a 100°C. En estas condiciones, se consigue la ruptura cuantitativa de la glucosa unida a ceramida, la hidrólisis de los aminoazúcares, y la mínima destrucción de los azúcares. Se llevó a cabo, posteriormente, la separación de los aminoazúcares por cromatografía de intercambio iónico en una resina Dowex 50 H⁺

El análisis por c.g.l. de los azúcares neutros, mostró que la composición de G1Tc es: Arabinosa: Manosa: Glucosa en relación 1:1:2 (Tabla XXII).

El cromatograma de los aminoazúcares (Tabla XXII), analizados como acetatos de alditoles en las condiciones descritas en métodos generales, mostró la presencia de galactosamina.

Tabla XXII: Monosacáridos componentes de G1Tc.

MONOSACARIDO	Tr	Tr'	RELACION MOLAR
Arabinosa	9,76*	10,08	1
Manosa	24,59*	25,09	1
Glucosa	33,46*	34,12	2
Galactosamina	15,07^	14,97	1~

* Determinado por c.g.l. en columna ECNSSM 3% a 190°C.

^ Determinado por c.g.l. en columna O.V. 225 a 230°C.

~ Determinado colorimétricamente por reacción de Elson Morgan.

Como se vió anteriormente, la relación NANA:azúcares neutros: aminoazúcares, dosados colorimétricamente, es, para GITc aproximadamente 1:4:1, por lo cual, la relación de azúcares en el oligosacárido de GITC es Arabinosa: Manosa: Glucosa: Galactosamina: Ac. N-acetil Neuramínico (1:1:2:1:1).

La presencia de una pentosa y dos hexosas se confirmó por análisis por c.g.l.-e.m de los azúcares neutros como acetatos de alditol (Tabla XXIII).

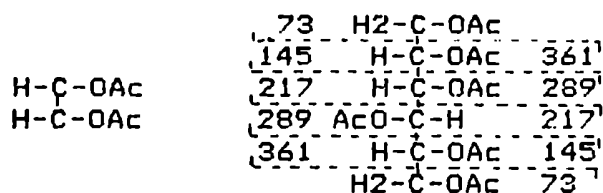
Tabla XXIII: Iones característicos de los monosacáridos neutros de GITC, analizados como sus acetatos de alditoles por c.g.l.-e.m.

MONOSACARIDO	INTENSIDAD DE LOS IONES (%)												
	43	73	85	103	115	145	157	175	187	217	259	289	361
Arabinosa	100	5	15	22	38	22	6	3	12	11			
Manosa	100	3	8	18	30	18	11	4	15	9	7	5	0,5
Glucosa	100	3	8	18	31	22	11	3	18	9	4	5	0,5

El estudio sistemático de los espectros de masas de los acetatos de alditoles, mostró que existe un modo de fragmentación simple para esta clase de compuestos (207).

Los acetatos de alditol no dan ion molecular, pero se encuentra el ion a m/z (M- CH₃COOCH₂)⁺ en baja abundancia. Este ion corresponde a m/z 289, para los acetatos de pentitol y a m/z 361 para los de hexitol.

El pico base en todos los acetatos de alditol es el ion acetil
 lo (m/z 43 (CH₃C=O)⁺). Los iones primarios se forman a partir
 de los acetatos de alditol, por eliminación de grupos acetoxi, o
 por clivaje de la cadena del alditol (Fig 41,a). En la Fig 41,b
 se muestran otras rupturas características de estos compuestos.



a

b

Fig 41: Rupturas características de los acetatos de alditoles

Los fragmentos primarios se degradan por eliminación de
 Acido acético (- 60), cetena (-42) o Anhidrido acético (-102)
 (208). Las eliminaciones pueden proceder a partir de la forma
 acíclica o de una forma cíclica del fragmento primario.

La composición de azúcares determinada para el oligosacárido
 de GITc, difiere de la de todos los gangliósidos conocidos
 hasta el presente, tanto en vertebrados, como en invertebrados.

En gangliósidos de vertebrados, se hallan siempre
 galactosa y ácido siálico, siendo comunes además glucosa, N-ace
tilgalactosamina o N-acetilglucosamina, y ocasionalmente se
 ha detectado fucosa (189). Por lo general existe una sola unidad
 de glucosa.

Dentro del phylum Echinodermata. se hallan gangliósidos conteniendo solamente 1 o 2 unidades de glucosa, y ácido siálico (24,25).

En los gangliósidos de la estrella marina Asterina pectinifera, se ha detectado arabinosa en posición terminal, unida a galactosa. Estos gangliósidos, poseen, además otra característica única, que es la de tener el residuo de ácido siálico localizado internamente en la cadena del oligosacárido (26). (Tabla XXIV).

En la literatura existente, no se ha informado la presencia de manosa como componente de gangliósidos. En contraste con los glicoesfingolípídos de animales vertebrados, se han hallado glicoesfingolípídos neutros, conteniendo manosa, en invertebrados tales como los bivalvos (19,20)

Hori y col (19), aislaron del espermatozoide del bivalvo Hyriopsis Schlegeli, un globósido que contiene manosa, en lugar de galactosa, cuya estructura es $\text{GlcNac } \beta (1 \rightarrow 2) \text{ Man } \beta (1 \rightarrow 3) \text{ Man } \beta (1 \rightarrow 4) \text{ Glc } \beta (1 \rightarrow 1) \text{ ceramida}$.

Dentro de los glicoesfingolípídos de T.cruzi, se ha hallado manosa, como monosacárido mayoritario en el LPPG (99).

Barretto-Bergter y col aislaron recientemente un glicoesfingolí-
pido neutro de epimastigotes de T. cruzi, y determinaron por
c.g.l. que la relación de azúcares en el oligosacárido del mis-
mo era Galactosa:Manosa (1:1) (160). Esta composición es también
inusual para glicoesfingolípidos neutros.

7.5 MARCACIONES ESPECIFICAS REALIZADAS SOBRE LOS COMPONENTES DE LOS OLIGOSACARIDOS DE G1Tc Y G2Tc.

7.5.1 Marcación con periodato de sodio- NaB²¹⁰H4.

Se realizó una marcación de G1Tc y G2Tc, con la técnica de
periodato de sodio-NaB²¹⁰H4, en las condiciones descritas ante-
riormente para marcar ácidos siálicos. El análisis por c.c.d de
los gangliósidos marcados, mostró la incorporación de la radio-
actividad en los mismos (Fig 42).

Alícuotas de G1Tc y G2Tc, (20.000 y 10.000 cpm, respec-
tivamente), se hidrolizaron con H2SO4 0,1N, en las condiciones
en que se liberan ácidos siálicos. Paralelamente, alícuotas
de la misma actividad, fueron tratadas con neuraminidasa.

Luego de procesar las muestras de manera conveniente, los
hidrolizados se secaron, se tomaron en solvente 1 y se
extrajeron con agua. Las fases acuosas se dializaron, y se
midió la radioactividad presente en las aguas de diálisis (Tabla
XXV).

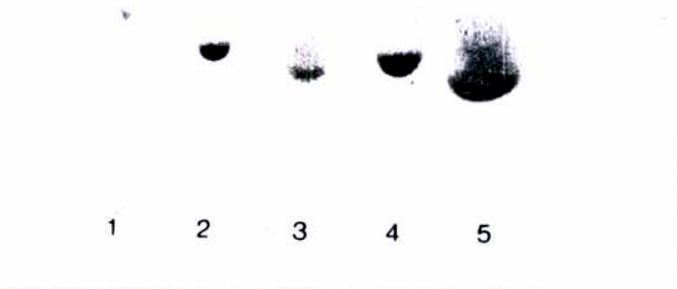


Fig 42: Cromatografía en placa delgada en C:M: NH_4OH 2,5 N (60:40:8), de G1Tc y G2Tc.

1) GM1 (patrón) marcado con Galactosa oxidasa- NaB^3H_4 . 2) G1Tc hidrolizado con neuraminidasa y luego marcado con galactosa oxidasa- NaB^3H_4 . 3) G1Tc marcado con NaIO_4 - NaB^3H_4 . 4) G2Tc tratado como (2) ; 5) G2Tc tratado como (3).

Tabla XXV: Hidrólisis ácida y enzimática de G1Tc y G2Tc, marcados con $\text{NaIO}_4\text{-NaB}^3\text{H}_4$.

	Original (c.p.m.)	Dializado externo (c.p.m.)	% en el dializado
G1TC (Neuramnidasa)	20.000	13.700	68,5%
G1TC (Hidr. ácida)	20.000	15.300	76,5%
G2TC (Neuraminidasa)	10.000	7.030	70,3%
G2TC (Hidr. ácida)	10.000	7.800	78,0%

Para ambos compuestos, es similar la cantidad de radioactividad liberada por hidrólisis ácida que por tratamiento enzimático.

Los extractos orgánicos provenientes de la hidrólisis enzimática de G1Tc y G2Tc, se marcaron utilizando la técnica de Galactosa-oxidasa- NaB^3H_4 previamente descrita para marcar gli coproteínas (100). Las muestras marcadas se analizaron por c.c.d, junto con los gangliósidos originales marcados con $\text{IO}_4\text{-NaB}^3\text{H}_4$. En la Fig 42 , se muestra la movilidad de los gangliósidos antes y después del tratamiento con la enzima. Como era de esperar, los asialocompuestos presentan una mayor movilidad, aunque la diferencia no es significativa, ya que al estar el ácido siálico como NANA7, es menos polar y su liberación no afecta demasiado la polaridad total de la molécula. Estos resultados confirman la

sensibilidad a neuraminidasa de los dos gangliósidos.

La enzima utilizada (Neuraminidasa de C.perfringens), hidroliza solamente residuos de ácido siálico terminales (209)

El cambio de movilidad en c.c.d por el tratamiento con la neuraminidasa de G1Tc y G2Tc y la correspondencia de la radioactividad liberada por tratamiento ácido y enzimático, indican que en ambos gangliósidos el residuo de ácido siálico se encontraría terminal).

7.5.2 Marcación con galactosa oxidasa-NaB²³H₄.

Por otra parte, se llevó a cabo una marcación con la técnica de galactosa oxidasa-NaB²³H₄ de un extracto eluido con C:M (1:1) de la columna de Unisil utilizada para aislar los gangliósidos. El extracto marcado se recromatografió en una columna de características similares a la anterior, pero recogiendo fracciones de 2 ml y midiendo la radioactividad en cada fracción (Fig 43).

Los picos de radioactividad correspondientes a G1Tc y G2Tc, respectivamente, se hidrolizaron con HCl 1N, 8 h a 100°C, se cromatografiaron a través de una resina Dowex 50 H+ y se midió la radioactividad eluida con agua y HCl 2N (Tabla XXVI).

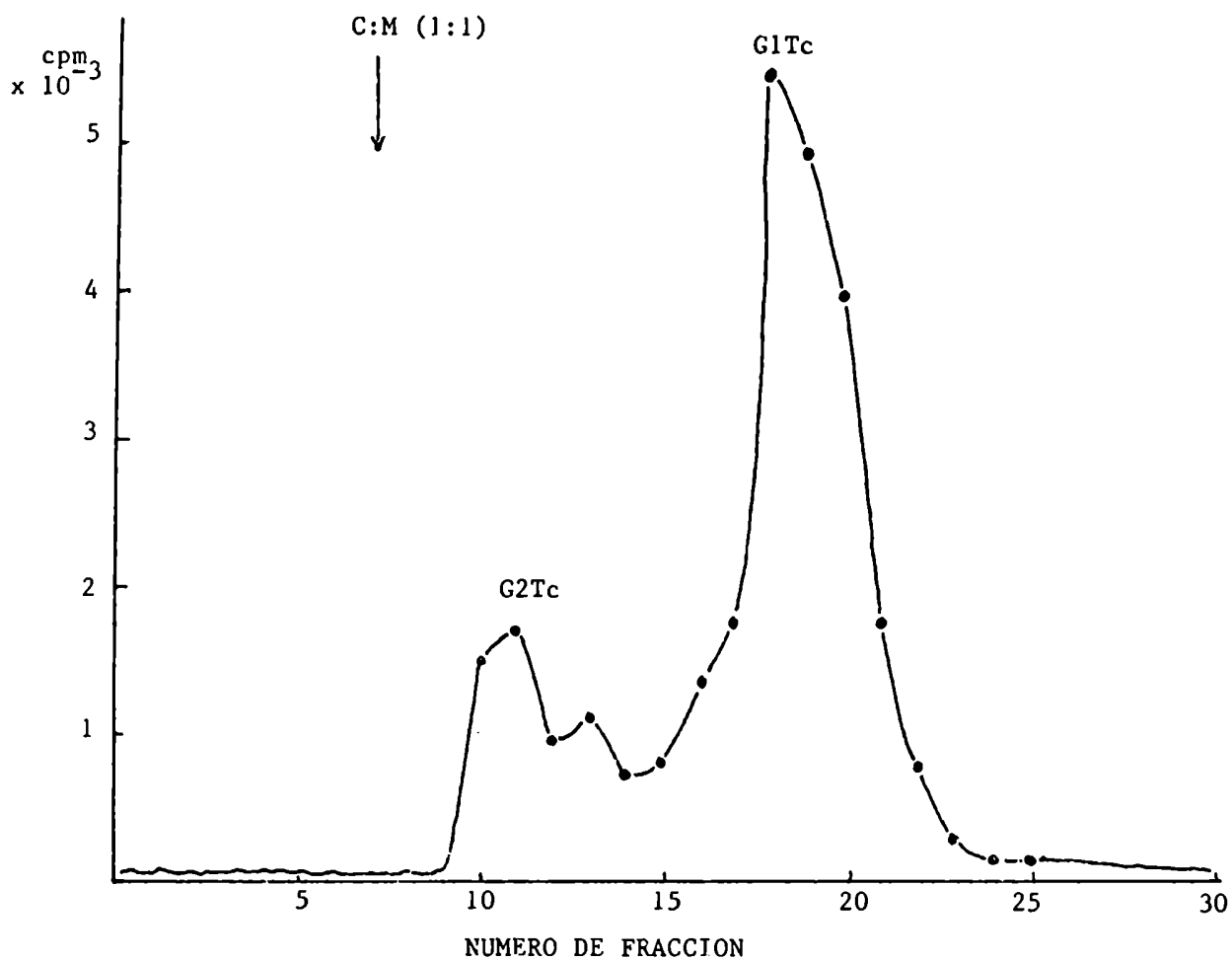


Fig 43: Cromatografía en columna de Unisil de la fracción CM 11, previamente marcada con galactosa oxidasa- NaB²H₄. Se recogieron fracciones de 2 ml.

Tabla XXVI: Separación por resina catiónica de un hidrolizado ácido de G1Tc y G2Tc, marcados con galactosa oxidasa-NaB³H₄.

	<u>Original</u>	<u>Aqua</u>	<u>ClH 2N</u>
	(cpm)	(cpm)	(cpm)
G1TC	15.000	200	8.800
G2TC	10.000	6.200	200

Por análisis cromatográfico en papel (solvente 5), de los eluidos neutros y ácidos de G1Tc y G2TC (Fig 44), se comprobó que en G2Tc, la marca se incorpora en galactosa y en G1Tc, en galactosamina. En ambos casos los residuos de azúcares deben estar en configuración piranósica y tener el OH de C-6 libre.

En capítulos anteriores se describió la especificidad de la enzima galactosa oxidasa por residuos de galactosa o galactosamina que posean el OH de C-6 libre y se encuentren en configuración piranósica.

En el Capítulo 6, se describió la identificación de galactosamina por c.g.l. en el extracto KCl de las células. Se confirmó su presencia en la cadena del oligosacárido de G1Tc por c.g.l. y también por marcación específica con galactosa oxidasa NaB³H₄. Este es el primer informe sobre la presencia de galactosamina en T.cruzi.

En los glicoconjugados de membrana de T.cruzi y T.brucei

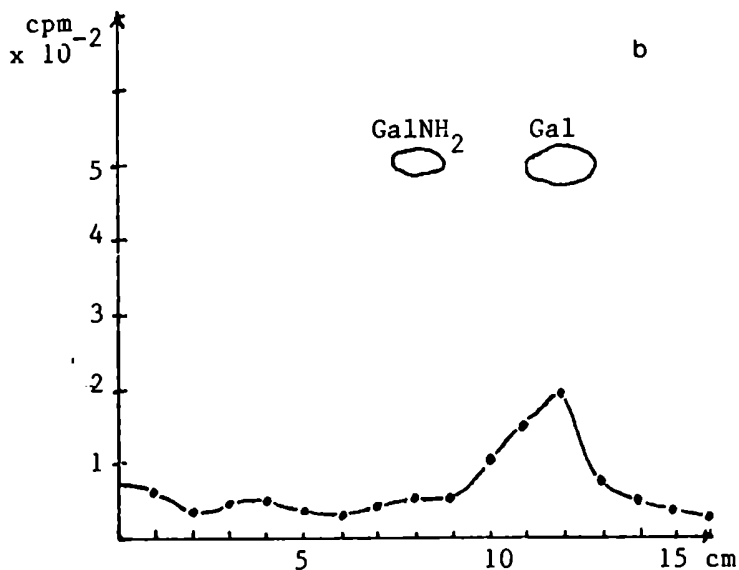
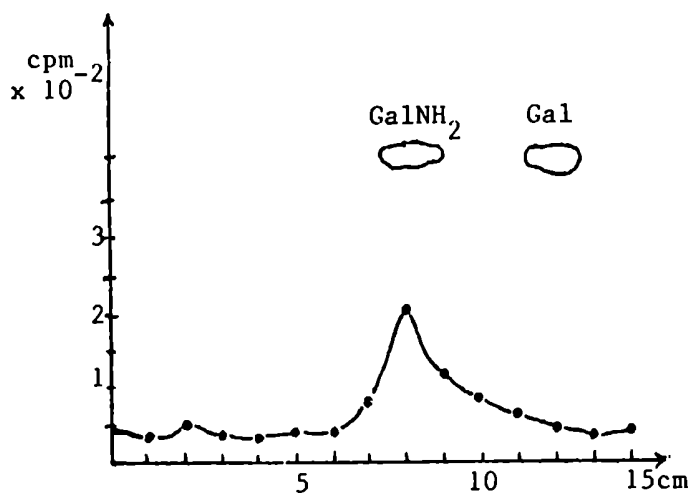


Fig 44: Cromatografía en papel en Butanol:piridina:agua (6:4:3)
a) G1Tc, marcado con galactosa oxidasa-NaB¹⁴H₄, hidrolizado con HCL 1N y eluido de una resina Dowex 50 H+, con HCl .
b) G2Tc, marcado con galactosa oxidasa-NAB¹⁴H₄, hidrolizado con HCl 1N y eluido de una resina Dowex 50 H+, con agua.

(210, 211), no ha sido detectada galactosamina como componentes de los mismos, y sugieren que estos parásitos no pueden sintetizar o incorporar este azúcar en glicoconjugados.

En esta tesis se demuestra que al menos en T.cruzi, las células son capaces de incorporar galactosamina.

7.6 ESTUDIOS DE OXIDACION CON METAPERIODATO DE SODIO DE G1Tc

El gangliósido G1Tc se oxidó con Metaperiodato de sodio 0,05M durante 48 h , se redujo con NaBH₄, y se hidrolizó con HCl 2 N. Luego de la hidrólisis se extrajeron los ácidos grasos con hexano. Por cromatografía gas líquido de los productos de oxidación, analizados como sus acetatos de alditoles, se determinó la presencia de glicerol, treitol y sorbitol en relación 2:1:0,25.

Es conocido (212), que las uniones piranósicas (1->3) y las ramificadas en C2 y C4, son resistentes a la oxidación.

En el producto de oxidación de G1Tc, observamos la presencia de sorbitol, en una proporción que indica que la glucosa no fue oxidada, o sea que estaría 3-O sustituida o ramificada de forma que no sufra oxidación .

El glicerol provendría de la manosa o de arabinosa furanósica terminal. La presencia de treitol, sólo podría deberse a

residuos de galactosamina no N-acetiladas, unidas por la posición 4. La baja proporción en que se detectó treitol, podría deberse a que la hexosamina este sólo parcialmente N-acetilada.

7.7 METILACION DE GITC

Una muestra que contenía 200 ug de azúcares totales, se metiló con hidruro de sodio, yoduro de metilo y dimetilsulfóxido, según la técnica descrita por Hakomori (213).

La hidrólisis del producto metilado se llevó a cabo en Acido sulfúrico 0,7N en Acido acético 80%, a 80° C, 20 h. (214). El hidrolizado se diluyó con agua y se filtró a través de una resina Dowex 1 (forma acetato), eluyendo con metanol. Los ácidos grasos se extrajeron con hexano.

La cromatografía gas líquido de los alditos parcialmente metilados y acetilados dió un pico de Tr 1,95 que por c.g.l-e.m se pudo identificar como el derivado de 3,4,6 tri-O-metilmanosa

Los picos de mayor tiempo de retención eran muy pequeños y no se pudieron asignar en forma concluyente.

La presencia de manosa 2-O-sustituída está de acuerdo con el hecho de no haberse detectado la misma en la oxidación con periodato. El glicerol formado provendría entonces de la manosa y la arabinosa estaría piranosica. Su liberación en condiciones de hidrólisis suave sugiere que está como azúcar terminal

ramificando la glucosa.

La poca cantidad de material disponible impidió determinar la secuencia de los azúcares en el oligosacárido.

7.8 COMPOSICION DE G2Tc

7.8.1 Análisis de la ceramida

G2Tc, purificado por columna de Unisil, se hidrolizó en las condiciones descriptas para G1TC. Las bases de cadena larga y los ácidos grasos se separaron según el Esquema (2).

Las bases de cadena larga se analizaron como trimetilsilil derivados por c.g.l. e-m como se describió en Métodos generales.

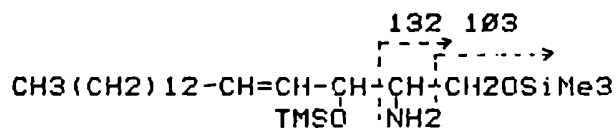
El tiempo de retención era el mismo que el de una esfingenina

Las rupturas y las intensidades relativas, del espectro de masa de la base de cadena larga de G2Tc (Tabla XXVII), coinciden con los de una esfingenina patrón.

El peso molecular (443) está indicado por la presencia de los picos a m/z 428 (M-15), por pérdida de metilo de un grupo trimetilsililo; m/z 338 (M-Me₃SiOH); m/z 340 (M-CH₂OSiMe₃) y corresponde a una cadena de 18 átomos de carbono con una insaturación. La ruptura de la molécula entre los C 2 y C-3 con retención de la carga en el fragmento de mayor masa da origen al ion m/z 311 (M-132). El ion m/z 132 es el pico base del espectro.

Tabla XXVII: Espectro de masas de la base esfingosínica de G2Tc

ION (M/Z)	ESTRUCTURA DE LOS FRAGMENTOS	INTENSIDAD (%)	
		G2Tc	ESFINGENINA PATRON
73	(Me ₃ Si) ⁺	82,7	17,7
75	(Me ₂ SiOH) ⁺	14,7	6,0
103	(CH ₂ SiMe ₃) ⁺	4,4	2,9
116	(CHCH ₂ OSiMe ₃) ⁺	41,5	65,0
117	(NH ₂ CH ₂ CH ₂ OSiMe ₂) ⁺	4,8	7,4
132	(NH ₂ CHCH ₂ OSiMe ₃) ⁺	100	100
133	(NH ₃ CHCH ₂ OSiMe ₃) ⁺	28,4	46,9
311	(M-NH ₂ CHCH ₂ OSiMe ₃) ⁺	3,7	5,2
338	(M-Me ₃ SiOH) ⁺	3,1	8,7
340	(M-CH ₂ OSiMe ₃) ⁺	4,0	12,0
428	(M-CH ₃) ⁺	1,1	2,1
429	(M+1-CH ₃) ⁺	0,4	0,8



Rupturas similares se han observado para N-acetil-O-Trimetilsilil éteres de bases esfingosínicas (215).

Los estudios de incorporación de ácido palmítico a los gangliósidos de *T. cruzi*, señalaron la incorporación del mismo a una esfingenina, para G2TC. El análisis por c.g.l-e.m de la misma indica que se trata de esfingosina o sea 1,3-dihidroxi-2-amino-4-octadeceno.

Los ácidos grasos purificados según el Esquema (2) se analizan por c.g.l. como sus ésteres metílicos (Tabla XXVIII).

Tabla XXVIII: Ácidos grasos componentes de G2Tc

ACIDO GRASO	Tr	Tr'	G2Tc (%)
C 13:0	1,49	1,45	3,6
C 14:0 (Mirístico)	1,98	1,93	2,1
C 15:0	2,67	2,62	1,1
C 16:0 (Palmítico)	3,65	3,60	9,7
2-metil-palmítico	4,38	4,29	27,1 *
no determinado	5,61		0,9
C 18:0 (esteárico)	7,27	7,21	17,3
2-metil-esteárico	8,73	8,65	22,6 *
C 20:0 (Araquídico)	13,23	13,15	5,6
2-metil-Araquídico	16,09		9,6 +

Tr Tr experimental de los componentes de G2Tc en columna HPGS

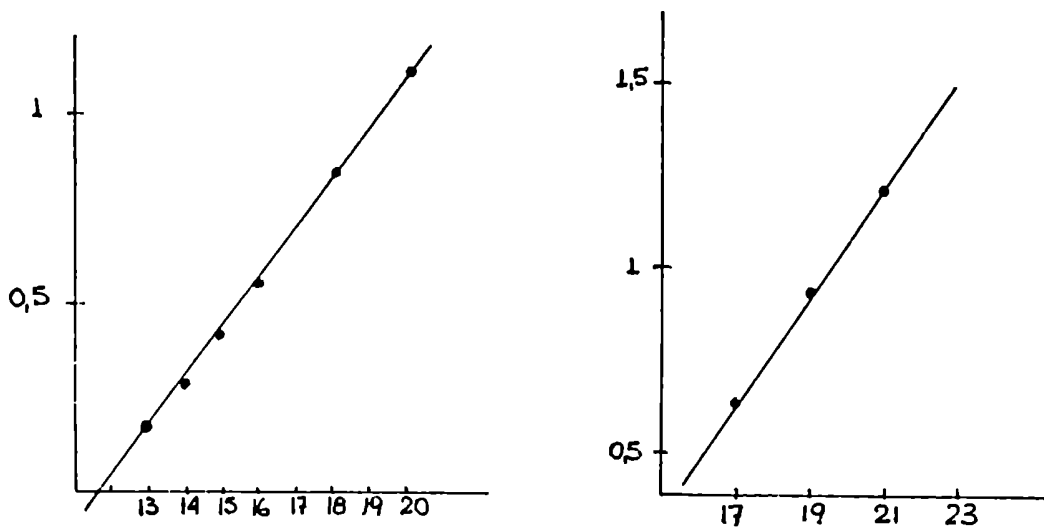
Tr' Tr. de los distintos testigos utilizados

* Identificados por comparación con los Tr de los ácidos

2-metil sustituidos de G1TC

+ Se asignó por cálculo de número de carbono (Fig 45).

Al igual que en G1TC, los ácidos 2-metilsustituidos son los más abundantes (59% del total). Los ácidos 2-metilpalmítico y 2-metil esteárico se asignaron por comparación con los T.r de los presentes en G1TC, y los Tr relativos a los ácidos grasos de cadena normal (Ejemplo $C_{19r}/C_{18n} = 1,20$)



Serie Normal		
N°C	Tr	Log Tr
13	1,49	0,173
14	1,98	0,296
15	2,67	0,426
16	3,65	0,562
18	7,27	0,861
20	13,23	1,12

Serie 2-metilada		
N°C	Tr	Log Tr
17	4,33	0,631
19	8,83	0,941
21	16,23	1,200

Fig 45: Gráfico de la función $\log tr = k \cdot (n \text{ de carbono})$, para los ácidos grasos de la serie normal y 2- metil ramificada de G2Tc.

Finalmente la probable identidad del ácido 2-metil araquídico se realizó utilizando el método gráfico (Fig 45) .

7.8.2 Composición del oligosacárido de G2Tc

Como se describió anteriormente, G2Tc, se marca con la técnica del periodato - $\text{NaB}^{14}\text{H}_4$, y la radioactividad es liberada por hidrólisis ácida débil o por la acción de sialidasa.

La movilidad de G2Tc es modificada por acción enzimática. Estas experiencias indican la presencia de ácido siálico en la molécula. Si bien se cuantificó colorimétricamente, se observó que el color obtenido con ácido tiobarbitúrico , no era igual al de un testigo de ácido N-acetil neuramínico. La diferencia registrada en el color podría deberse a sustitución en el ácido siálico de G2Tc. Ácidos siálicos acetilados, o el ácido N- glicolil neuramínico dan coeficientes de extinción molar menores al del N-acetil neuramínico (216)

La caracterización por c.g.l.-e.m del tipo de ácido siálico presente en G2Tc no fue posible, debido a la baja proporción en que este gangliósido se encuentra en la célula (22 ug/g peso húmedo).

El análisis por c.g.l de los azúcares componentes de G2Tc , mostró la presencia de arabinosa, manosa, galactosa y glucosa. No se detectó galactosamina. Estos resultados concuerdan con los hallados en la marcación con galactosa oxidasa- $\text{NaB}^{14}\text{H}_4$ en los

cuales la marca se incorporó en G2Tc en galactosa y no en galactosamina. -174-

Se realizó una hidrólisis enzimática con β -galactosidasa, de G2Tc, previamente tratado con neuraminidasa (217).

Por c.g.l, se observó la presencia de galactosa como único azúcar que se hidrolizó por acción de la enzima.

La enzima hidroliza galactosas terminales, unidas en β . La susceptibilidad a β -galactosidasa de G2TC, previo tratamiento indicaría que el ácido sialico terminal estaría unido a la galactosa, como es común en gangliósidos animales.

Al igual que G1Tc, G2Tc también posee manosa, componente inusual en gangliósidos de vertebrados

La poca cantidad de material disponible no permitió realizar estudios de secuencia del oligosacárido de G2Tc.

7.9. CONCLUSIONES

El interés por los sialoglicoconjugados en general, se ha incrementado en los últimos años, por su función en la regulación de gran variedad de fenómenos biológicos. Esa función se debe a la posición periférica del ácido siálico en los glicoconjugados y consecuentemente, a su localización externa en las membranas celulares.

Como ya se ha mencionado, algunos trabajos habían sugerido la presencia de sialoglicoconjugados en T.cruzi, por ejemplo, la interacción de las células con lectinas específicas para NANA y la detección colorimétrica de NANA, cuando se sometían las células a la acción de la neuraminidasa (115). Más recientemente se le asignó a los sialoglicoconjugados parte de la carga superficial negativa de la membrana de T.cruzi (117).

En otros trypanosomas, se determinó la presencia de ácido siálico asociado a una glicoproteína de superficie en T. congolense (218). En las formas sanguíneas de T. brucei brucei, Carroll y col. (219) detectaron ácido siálico asociado a lípido, en concentraciones mayores que en plasma y eritrocito de rata.

La movilidad de este sialoglicolípido en c.c.d. era algo mayor que la del gangliósido de mamífero GM1.

En T.cruzi, resultó interesante el estudio estructural de los sialoglicoconjugados, pues no se había establecido la naturaleza de los mismos. Su caracterización como gangliósidos fue realizada por primera vez en este trabajo de tesis.

Es importante la comparación de su estructura con la de gangliósidos animales, ya que toda diferencia con la célula huésped puede servir de objetivo para el ataque del parásito.

Para la identificación, se utilizaron en primer lugar, métodos de marcación de los parásitos lo cual permitió trabajar con menor cantidad de células y por otro lado la marcación metabólica confirmó que los glicoconjugados en estudio no provenían del medio complejo en que se cultivan.

El análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida de las células marcadas exógenamente con NaB^3H_4 , luego de una oxidación controlada con periodato, mostró la incorporación de la radioactividad en una banda de alta movilidad denominada Banda E además de banda D, la cual incorpora la marca por poseer unidades de galactosa en configuración furanósica (141). La marcación de la banda E, sugirió la presencia de sialoglicolípidos ya que el método utilizado marca también unidades de ácido siálico.

La banda E, se extrajo con C:M (2:1), solvente para lípidos, y en especial con un solvente con KCl, recomendado para la ex-

tracción de gangliósidos, donde se recuperaba un 60% de la radioactividad.

Por otra parte, se dosó colorimetricamente el ácido siálico liberado por hidrólisis ácida suave y enzimática de extractos lipídicos y extractos KCl de 10^{11} células. En ambos casos se dosaron aproximadamente 10^4 unidades de NANA por célula. Por c.c.d del extracto KCl se detectó la presencia de dos componentes que revejaban con el reactivo de gangliósidos.

Para confirmar que la porción lipídica era una ceramida, como corresponde a los gangliósidos, se realizó una incorporación metabólica de (3 H)-ácido palmítico a las células. Paralelamente se llevó a cabo una incorporación de (3 H)-galactosa. La incorporación de (3 H)-ac.palmítico en extractos lipídicos, fue 20 veces mayor, que la incorporación de (3 H) galactosa, mientras que en el insoluble, del cual se extrajeron los glicoconjugados A, B, C, D hay cuatro veces más incorporación del azúcar. Se demostró la incorporación metabólica de galactosa en A, B, C, D y E, y la de palmítico sólo en D y E.

Por fraccionamiento de los extractos lipídicos por un método descrito por Yu y Leeden, para obtener alta recuperación de gangliósidos, se purificaron dos glicolípidos, que incorporan palmítico y galactosa y que coinciden en su movilidad en c.c.d. con los extraídos previamente con KCl y que se marcaron con

periodato- NAB^2H_4 .

En el glicolípido mayoritario (G1Tc) se detectó la incorporación de ácido palmítico en una esfinganina y en el minoritario (G2Tc), en una esfingenina. La movilidad de ambos glicolípidos en c.c.d es modificada por el tratamiento con neuraminidasa, con lo cual se comprobó que se trataba de sialoglicoesfingolípidos.

Estas experiencias confirmaron también que los gangliósidos, que son componentes normales de células animales, son también biosintetizados por T. cruzi .

Para determinar la composición de estos dos gangliósidos, se llevó a cabo una purificación de los mismos a partir de 10^{12} células.

La ceramida de G1TC consiste de una esfinganina ramificada de 19 átomos de carbono. Se determinó que los ácidos grasos que se encuentran en mayor proporción son ácidos 2-metil sustituidos , siendo el ácido 2- metil esteárico el mayoritario (44%) (Tabla XXIV). Es de notar que no se habían detectado anteriormente estos ácidos como componentes de las fracciones lipídicas de T. cruzi. La baja proporción de ácidos insaturados (4,6% de ácido oleico), contrasta con la de extractos lipídicos totales de T. cruzi.

Mientras que el ácido esteárico se encuentra en más de un 90% en las moléculas de GM1, gangliósido de vertebrados, en invertebrados se hallaron ácidos grasos hidroxilados.

En GM1 son comunes las esfingosinas no saturadas de 18 a 20 átomos de carbono, mientras que las fitoesfingosinas son características de las estrellas marinas (Tabla XXIV). En el LPPG, glicoconjugado de T.cruzi, se encontró 17-metil esfinganina.

Las distintas hidrólisis realizadas sobre la cadena del oligosacárido de G1Tc, indican que está compuesta por: glucosa:arabinosa: manosa: galactosamina: Acido N-acetil Neuramínico en relación 2:1:1:1:1. Esta composición, es distinta a la de todos los gangliósidos de vertebrados e invertebrados conocidos.

En G1Tc, se detectaron dos azúcares no identificados en gangliósidos de vertebrados: arabinosa y manosa. Esta última se ha descrito como componente de glicoesfingolípidos neutros de bivalvos, y arabinosa en estrellas marinas.

Los estudios de degradación enzimática, hidrólisis ácida suave, oxidación con periodato de sodio y metilación, indican los siguientes hechos estructurales:

- El Acido N-acetil Neuramínico se encuentra en posición terminal, ya que la cantidad de ácido siálico marcado liberado por tratamiento enzimático o hidrólisis ácida, es similar.
- La unidad de arabinosa, se encontraría como ramificación, probablemente de una unidad de glucosa.
- Una unidad de glucosa se halla 3-O-sustituída y la otra ramificada.

- La manosa se halla 2-O-sustituída.

- Por marcación enzimática con galactosa-oxidasa, seguida por reducción con borohidruro de sodio tritiado, se determinó la incorporación de la radioactividad en la galactosamina presente en G1Tc. Este resultado ya descarta una unión de la misma a través de su posición 6. Por otra parte, las trazas de treitol detectadas en la oxidación con periodato podría deberse a galactosaminas no-N-acetiladas y 4-O-sustituídas. La baja proporción de treitol detectada podría deberse a que parte de la hexosamina se encuentre N-acilada o a una oxidación incompleta de la galactosamina libre. La presencia de glucosamina no acetilada ha sido detectada como componente de glicoproteínas de T. brucei (211). G1Tc es aparentemente el primer glicoconjugado de trypanosomatídeos en que se halla presente galactosamina.

Es difícil postular una estructura total para el gangliósido, lo cual requeriría la aplicación de degradaciones enzimáticas secuenciales. La presencia en G1Tc de azúcares no comunes en gangliósidos, dificulta la aplicación de éstas técnicas.

G2Tc, que se encuentra en muy baja proporción en la célula posee esfingosina en la porción de la ceramida unida a ácidos grasos saturados, entre los cuales se halla una alta proporción (54%) de ácidos grasos ramificados en la posición 2 por metilo.

Los azúcares componentes del oligosacárido de G2Tc son galactosa, manosa, glucosa, arabinosa y un ácido siálico cuya estruc

tura no pudo ser determinada. Este ácido siálico marcado ⁻¹⁸¹⁻es re-
movido por la acción de la neuraminidasa, indicando una posición
terminal del mismo. A su vez, G2Tc desialidado, tratado con
β-galactosidasa, libera galactosa, por lo cual la misma se
encontraría unida al ácido siálico como es común en gangliósidos
animales.

Utilizando los métodos de incorporación metabólica desarrolla-
dos para epimastigotes se determinó posteriormente la presencia
de gangliósidos en trypomastigotes (119)

Las características peculiares de ambos gangliósidos, con
respecto a todos los conocidos hasta el presente, junto con la
importancia cada vez mayor asignada a las funciones de los
gangliósidos como receptores de membrana señalan la necesidad de
realizar estudios sobre el papel que los mismos cumplen en el
Trypanosoma.

Con respecto a la biosíntesis, Schauer y col (115), sugieren
que la biosíntesis no tiene lugar por la vía metabólica estable-
cida (o sea a partir de N-acetil manosamina para formar CMP-
siálico).

Por otra parte Previato y col (120), proponen un mecanismo de
transglicosidación para incorporar NANA de glicoconjugados que
los contengan. Esta observación debe ser conciliada con la de
Pereira y col (72), que encontró que después de la acción de la
sialidasa, los sialoglicoconjugados se regeneran en un medio defi

nido sin aporte de NANA. Para ello sería necesario aislar una enzima capaz de transferir NANA a los glicoconjugados de T.cruzi

Recientemente (220) se pudo transferir ácido siálico de donores exógenos a los gangliósidos de formas trypomastigote de T.cruzi.

CAPITULO 8

PURIFICACION Y COMPOSICION DE
UN PLASMALOGENO DE T. CRUZI

(EPIMASTIGOTE)

8.1.- ANALISIS DE UN PLASMALÓGENO DE EPIMASTIGOTES DE T. CRUZI

Se había observado (76), que cuando se analizaban las membranas de epimastigotes por electroforesis en geles de poliacrilamida y se revelaba con reactivo de Schiff, la banda de mayor movilidad se detectaba sin tratamiento previo con periodato. Este comportamiento es característico de plasmalógenos que poseen en su estructura algún aldehído potencial.

Los plasmalógenos son fosfoglicéridos que poseen en la posición 1 del glicerol una cadena larga alifática α, β no saturada en posición cis, unida por un enlace éter (Fig 46 I). Es conocida la ruptura de los α -1-enil-éteres en medio ácido, dando origen a un alcohol, en este caso el fosfatidilglicerol, y un aldehído.

Las reacciones de reconocimiento de los plasmalógenos se basan en las reacciones del aldehído .

Para detectar la presencia de plasmalógenos en el extracto C:M (2:1) , se utilizó el reactivo descrito por Reitsema (221), para revelar plasmalógenos en cromatografía en capa delgada. El reactivo se basa en la reacción de la 2-4 dinitrofenilhidrazina, en medio ácido con el aldehído, para dar origen a una 2-4 dinitrofenilhidrazona de color naranja.

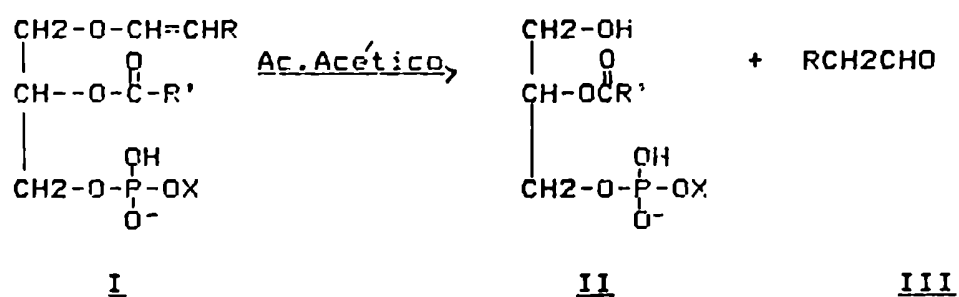
Cuando se sometió al extracto C:M (2:1), a una c.c.d en solvente 15, se reveló con el reactivo anteriormente descrito, una

sustancia de $R_f = 0,55$. Esta sustancia también se revelaba con el reactivo de Bartlett para compuestos que contienen fósforo, y con el reactivo de ninhidrina específico para aminocompuestos, indicando la posible presencia de un fosfoglicérido del tipo de los plasmalógenos, esterificado con un aminoalcohol.

Esta sustancia se aisló de 1g de extracto CM 2:1, por pasaje a través de una columna de Unisil, donde se eluyen primero los lípidos no polares con éter etílico y luego los lípidos polares, entre ellos los fosfolípidos, con metanol. Esta última fracción se purificó por cromatografía en capa delgada. Se obtuvieron 4,5 mg, de una sustancia homogénea de $R_f 0,55$ (solvente 15) (PLTc) lo cual representa un 0,45% del extracto lipídico original y un 0,14% respecto al peso de células secas.

8.2. ESTUDIOS DEGRADATIVOS REALIZADOS SOBRE PLTc

Si un plasmalógeno (Fig 46, I), se trata con un ácido débil, se rompe la unión éter α - β no saturada, dando origen a dos productos, un lisofosfolípido (Fig 46, II), y un alcohol vinílico cuya forma estable es el aldehído de cadena larga (Fig 46, III).



R, R' = (CH₂)_n-CH₃
 X = colina, etanolamina o serina.

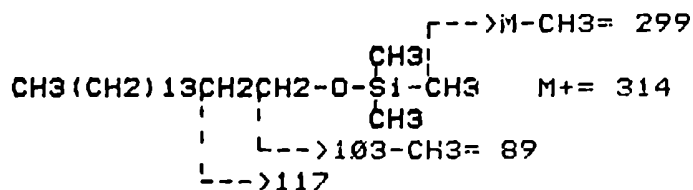
Fig 46: Hidrólisis de un plasmalógeno en medio ácido débil.

El aldehído III (Al PLTc) se separó en columna de ácido silícico, se redujo con borohidruro de sodio al alcohol, y se analizó por c.g.l.-e.m. como derivado trimetilsililado, en las condiciones descritas en métodos generales.

Se identificó hexadecanol proveniente de hexadecanal, como componente del plasmalógeno. Los iones obtenidos se muestran en la Tabla XXIX.

El pico base correspondió al ion M-CH₃, como se describió para otros trimetilsilil éteres de alcoholes (191) y se utilizó para la determinación del peso molecular. La ruptura, característica de estos compuestos, dio lugar al ion m/z 103, que es uno de los más abundantes del espectro.

Tabla XXIX: Rupturas del trimetilsilil derivado del alcohol obtenido por reducción del aldehído proveniente del plasmalógeno de T.cruzi.



ION (m/z)	INTENSIDAD (%)
314	0,9
299	100
117	2,2
103	30,7
89	18,4
73	40

El lisofosfolípido se saponificó, y se identificaron los ácidos grasos componentes como ésteres metílicos por c.g.l. (Tabla XXX).

Los ácidos grasos saturados son los que se encuentran en mayor proporción (89%) siendo los más abundantes, el ácido esteárico y el ácido palmítico. Dentro de los ácidos grasos no saturados se detectó solamente la presencia de ácido oleico.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en fracciones totales de fosfolípidos de epimastigotes de T.cruzi (157), donde los ácidos grasos más abundantes son los insaturados oleico y linoleico. Estos también son los más abundantes en la fracción de fosfolípidos derivados de la fosfatidiletanolamina.

Tabla XXX: Ácidos grasos componentes del plasmalógeno PLTc, aislado de T.cruzi.

ACIDO GRASO	Tr (min)	Tr' (min)	Porcentaje
C 14:0	3,44	3,42	0,17
C 15:0	4,60	4,70	2,10
no identificado	5,63		4,30
C 16:0	6,15	6,43	30,50
C 17:0	9,49	10,01	2,03
C 18:0	12,76	13,29	49,10
C 18:1	14,61	14,89	11,80

Tr: Tr de los ácidos grasos presentes en PLTc

Tr': Tr de los distintos testigos usados.

Por otra parte se determinaron 5×10^2 umol de fosfato por mg de plasmalógeno. Si se calcula el PM aproximado de PLTc en 664 (en base a los ácidos grasos y aldehídos que se hallarían en mayor proporción), este valor de fosfato corresponde aproximadamente a 1 mol de fosfato por mol de plasmalógeno. El valor obtenido para fosfato inorgánico, después de una hidrólisis ácida fuerte se corresponde con el de fosfato total, descartando la posible presencia de ácidos aminofosfónicos.

El análisis por cromatografía en papel de los productos de la hidrólisis de PLTc, en las condiciones en que se rompe la unión éster fosfato, mostró la presencia de etanolamina, que se reveló con ninhidrina.

En consecuencia el plasmalógeno identificado en extractos lipídicos de T.cruzi, deriva de fosfatidiletanolamina.

La movilidad de PLTc en c.c.d. en solvente 15 (Rf 0,55), es similar a la calculada de una c.c.d, en el mismo solvente (Rf 0,59), para plasmalógenos derivados de fosfatidietanolamina, informada por Owens (222).

Teniendo en cuenta la estructura determinada para los plasmalógenos en general (224) (Fig 46), se podría afirmar que, en PLTc se encuentra una cadena alifática de 16 átomos de carbono, unida a través de la unión alq-1-enil éter al C1 del glicerol. El ácido esteárico, y en algunas moléculas ácido palmítico, están esterificando el OH de C2 del glicerol, el cual está esterificado en C3 por fosfato de etanolamina (Fig 47).

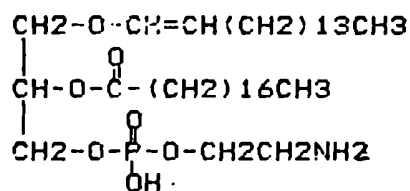


Fig 47: Estructura del plasmalógeno identificado en epimastigotes de T.cruzi.

La hidrólisis de plasmalógenos de eritrocitos humanos dió como componentes principales octadecanal y hexadecanal en relación aproximada 3:1. Aproximadamente el 70% de los mismos derivaba de fosfoglicéridos de etanolamina (223).

Hasta el presente no se había informado la presencia cierta de plasmalógenos en extractos lipídicos de T. cruzi.

Timm y col(156) habían detectado en una fracción de fosfolípidos de T. cruzi , un compuesto que representaba un 4% del total de los fosfolípidos. Las características cromatográficas del mismo, en sistemas de placa delgada bidimensional, correspondían a la de plasmalógenos. Si bien no habían realizado reacciones de reconocimiento sobre el mismo, comprobaron que incorporaba metabólicamente P^{32} , lo cual indicaba que era un producto sintetizado por el parásito.

Los plasmalógenos fueron detectados por primera vez, por Feulgen y Voit , en cortes de tejidos, mediante la reacción con el reactivo de fucsina de tejidos no deslipidizados (224).

Recién en 1939, estos mismos autores, aislaron un fosfátido conteniendo una función aldehído potencial de músculo bovino, el cual estaba compuesto de un éster de glicerofosforiletanolamina y una molécula de aldehído .

Los plasmalógenos, al igual que los glicerofosfátidos, están ampliamente distribuidos en el reino animal, desde los protozoarios hasta el hombre (224).

La función específica que los plasmalógenos cumplen en la célula no ha sido bien definida, a pesar de ser componentes importantes dentro de los fosfolípidos de membrana. Algunos autores, (225, 226) informaron que las propiedades de monocapas de plasmalógenos son diferentes de aquellas de diacil derivados

Por otra parte, la relación en que se hallan los fosfolípidos derivados de fosfatidiletanolamina (como plasmalógenos o como diacilderivados), variaba en los eritrocitos de pacientes normales, con respecto a los que presentaban distrofia miotónica (227). Estos informes muestran los diferentes roles que cumplen los plasmalógenos en las membranas con respecto a los diacilfosfolípidos. Recientemente (228), se describió la marcación de plasmalógenos de etanolamina por incorporación de (1-¹⁴C)-octadecanol en el trypanosomatídeo Leishmania donovani.

Sería interesante elucidar la función que estos fosfolípidos cumplen como componentes de la membrana del T.cruzi.

CAPITULO 9

METODOS EXPERIMENTALES

MATERIALES Y

METODOS

9.1 CONSIDERACIONES GENERALES

- Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron con los siguientes espectrofotómetros: Spectronic 20 (Baush & Lomb) para el rango de 400 a 800 nm, y Beckman DU para 280 nm.
- Las cromatografías gas-liquido se realizaron en un cromatógrafo Hewlett Packard 5830 o 5840 A, equipados con detector de ionización de llama.
- Las cromatografías gas-liquido combinadas con espectrometría de masas se realizaron en un cromatógrafo Varian 1400 acoplado a un espectrómetro de masas Varian Mat-CH-7A con procesador de datos.
- Las densitometrías de los geles de poliacrilamida se llevaron a cabo con un densitómetro Crudo Caamaño.
- Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga International modelo B-20A con refrigeración.
- En las rupturas de las células se empleó un sonicador "Sonicator" (Heat Systems Ultrasonics Inc) con secuencias de 10 pulsos de 15 segundos y una potencia de 70W.
- Las determinaciones de radioactividad de ³H se realizaron en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Cab 3003 o en un Tracor Analytic Mark III.
- Las mediciones de pH se realizaron con un pHmetro Orion modelo 211.

- Las liofilizaciones se llevaron a cabo en un Equipo Eliovac TD2001.
- Las evaporaciones se realizaron siempre a presión reducida en evaporador rotatorio.
- Las cromatografías en capa delgada (c.c.d) se realizaron en placas preactivadas de sílica gel 60 de 0,25 mm de espesor (Merck).
- Para dializar se emplearon membranas de celulosa (A.H. Thomas Co) de 48A de diámetro promedio de poro.

9.2. SOLVENTES EMPLEADOS

9.2.1. Extracciones

Solvente (1) Cloroformo, metanol (2:1 v/v)

Solvente (2) Cloroformo, metanol (1:1 v/v)

Solvente (3) Cloroformo, metanol, KCl 0,1M (1:10:10 v/v/v)

Solvente (4) Cloroformo, metanol, agua (10:10:3 v/v/v)

9.2.2. Cromatografía en papel

Solvente (5) Butanol, piridina, agua (6:4:3 v/v/v)

Solvente (6) Butanol, piridina, agua (4:3:4 v/v/v)

Solvente (7) Butanol, Ac. acético, agua (5:2:2 v/v/v)

Solvente (8) Acetato de etilo, piridina, Ac. acético, agua
(5:5:1:3 v/v/v/v)

Solvente (9) Butanol , Ac. acético, agua (12:3:5 v/v/v)

9.2.3. Cromatografía en capa delgada

- Solvente (10) n-propanol, amoníaco 28%, agua (75:5:5 v/v/v)
- Solvente (11) Cloroformo, metanol, NH₄OH 2,5M (70:40:8 v/v/v)
- Solvente (12) Cloroformo, metanol, NH₄OH 2,5M (60:35:8 v/v/v)
- Solvente (13) Cloroformo, metanol, NH₄OH 1M (40:10:1 v/v/v)
- Solvente (14) Cloroformo, metanol, NH₄OH 28% (65:25:5 v/v/v)
- Solvente (15) Cloroformo, metanol, Ac. acético, agua
(65:43:1:3 v/v/v/v)
- Solvente (16) Cloroformo, metanol, CaCl₂ 0,2% (en agua)
(5:4:1 v/v/v)
- Solvente (17) Cloroformo, metanol, agua (5:4:1 v/v/v)

9.3. MÉTODOS CROMATOGRAFICOS

9.3.1. Cromatografía en papel

Se realizaron por el método descendente empleando papel Whatman Nº1 y los solventes 5,6,7,8 y 9.

9.3.1.1. Reactivos de revelado

a) Nitrato de plata-hidróxido de sodio

Se diluyó 0,1 ml de solución saturada de nitrato de plata con 200 ml de acetona y se redisolvió el precipitado de nitrato de plata formado por adición de la mínima cantidad de agua. Los cromatogramas se sumergieron en esta solución, se secaron a temperatura ambiente y se pulverizaron con solución de hidróxido de sodio 2N en etanol 50%. Los azúcares reductores, polialcoholes y aminoazúcares aparecen como manchas de color marrón oscuro. El exceso de óxido de plata se removió por inmersión en una solución acuosa de tiosulfato de sodio 5%. La cantidad mínima detectable de azúcares reductores es de 2-20 ug (229).

b) Ninhidrina

Los cromatogramas se pulverizaron con una solución de ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) 0,25% p/v en acetona, con una gota de piridina, y se calentaron a 105-110°C durante

10 minutos (230). Este reactivo se empleó para revelar esfingosinas y aminos en placa delgada y aminoazúcares, aminos, y ácidos aminofosfónicos en cromatografía en papel. Todas estas sustancias revelan en distintos tonos de color púrpura.

c) Periodato- Acido Tiobarbitúrico

Se preparó según la técnica descrita por Warren (231). El papel se rocía con una solución de metaperiodato de sodio 0.05 M en ácido sulfúrico 0.05 N y se deja 15' a temperatura ambiente.

Luego se pulveriza con una solución de etilenglicol:acetona:Ac.sulfúrico (50:50:3 v/v/v), y después de 10' el papel se rocía con una solución acuosa de 2-tiobarbiturato de sodio al 6%. Se calienta 10' a 100°C. Se revelan ácidos siálicos y 2-desoxi-azúcares. Se detecta aproximadamente 3 ug de ácido siálico.

d) Reactivo para fósforo

Se disolvió 1g. de molibdato de amonio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ en 11 ml de HCl 3N; se agregó 3 ml de HClO₄ 70% y la mezcla se llevó a 100 ml con acetona. Los cromatogramas se sumergieron en esta solución, se calentó en estufa a 90°C por 5' y se humedecieron brevemente con vapor. Posteriormente se los irradió con lámpara UV (366nm) durante 10'. Los compuestos que contienen fósforo revelan como manchas azules. Se utilizó en cromatografía en papel y en placa delgada (232).

9.3.2. Cromatografía en capa delgada

9.3.2.1. Reactivos para revelado

a) Orcinol-ácido sulfúrico

El reactivo se preparó disolviendo 200 mg de orcinol recientemente recristalizado, en 100 ml de H₂SO₄ 75% (v/v). Esta solución es estable en la oscuridad a 4°C durante una semana. Las placas se pulverizaron con el reactivo hasta humedecer completamente su superficie y se calentó en estufa a 100°C durante 15'. Los glicolípidos dan manchas azules sobre fondo blanco. (233).

b) α-naftol-acido sulfúrico

Las placas se pulverizaron con una solución de α-naftol 2% en etanol y seguidamente con H₂SO₄ concentrado, luego se calentó 10'a 100°C. Los compuestos que contienen una porción glicosídica dan manchas rojo púrpura mientras que los fosfolípidos y los lípidos neutros revelan color marrón; son detectables 1-10 ug de sustancia (234).

c) Resorcinol-Cobre

A 80 ml de HCl (c) , que contiene 0,5 ml de CuSO₄ 0.1M (2,5 g de CuSO₄ en 100 ml de agua) se le agregan 4 h antes de usar, 10 ml de una solución de resorcinol al 2%. Se lleva a 100 ml con

agua. Se rocía las placas y se las calienta en estufa a 120°C durante 15'. Los gangliósidos revelan como manchas azul violáceo (163).

d) Test de Reitsema para plasmalógenos

Se pulveriza la placa con una solución de dinitrofenilhidrazina 0,4% en HCl 2N, y casi inmediatamente aparecen los plasmalógenos como manchas amarillo-anaranjadas. (221).

9.4. CROMATOGRAFIA GAS LIQUIDO (C.G.L)

Se utilizaron columnas de vidrio rellenas con las siguientes fases:

- a: ECNSSM 3% en Gas Chrom Q (100-120) (0,2 x 180 cm)
- b: OV-101 2% en Chromosorb WAW-DMCS (60-80) (0,2 x 120 cm)
- c: OV-17 3% en Chromosorb WAW-DMCS (60-80) (0,2 x 180 cm)
- d: NFGS 10% en Chromosorb WAW-DMCS (60-80) (0,2 x 120 cm)
- e: SE-30 3% en Chromosorb WAW-DMCS (80-100) (0,2 X 180 CM)
- f: SP-2330 en Chromosorb WAW-DMCS (80-100) (0,2 x 120 cm)
- g: OV-225 3% en Chromosorb WAW-DMCS (60-80) (0,2 x 180 cm)

En cada caso se indica la temperatura de la columna (Tc); la temperatura de inyección (Ti) y la temperatura del detector (Td) así como los tiempos de retención (Tr) de los picos de interés.

9.4.1. Preparación de derivados para c.g.l

a) Acetatos de alditoles

Se preparó según la técnica descrita por Torrello y col (206). Las fracciones de azúcares neutros y aminoazúcares de los hidrolizados se secaron a presión reducida, se redujeron con una solución fresca de BH_4Na en 1M NH_4OH (2mg/ml) durante 40 min a temperatura ambiente. El exceso de reductor se destruye por agregado de ácido acético glacial, gota a gota hasta pH 5. Luego de llevar a seco, se agregó 1 ml de una mezcla de metanol: benceno (5:1), y se calentó 5' a $90^\circ C$. Se llevó a seco. Para remover restos de ácido bórico se realizaron varios agregados de metanol (2 ml) y evaporaciones sucesivas.

Las mezclas de alditoles obtenidas se secaron en desecador al vacío y se acetilaron con anhídrido acético:piridina (1:1), calentando en tubos tapados, en estufa a $100^\circ C$ durante 1 hora. Posteriormente se eliminó el anhídrido acético y la piridina en exceso por destilación a presión reducida. La muestra seca se tomó en 1 ml de cloroformo y se extrajeron las sales con agua (3 x 1ml), la fase orgánica se secó sobre SO_4Na_2 anhidro, se filtró, se llevó a sequedad y se tomó en un volumen adecuado de cloroformo para su inyección en el cromatógrafo.

En una experiencia tipo las muestras de alditoles acetilados se cromatografiaron en la columna a empleando las siguientes condiciones:

Ti: 210°C; Td: 210°C; Tc 175°C; flujo de N₂ 29 ml/min.

Los tiempos de retención de los testigos de interés, en estas condiciones son:

Azúcar (alditol acetilado)	Tr (min)
Arabinosa	8,08
Manosa	21,95
Galactosa	26,08
Glucosa	29,41
mio inositol	37,40

b) Trimetilsilil esfingosinas

Las mezclas de bases esfingosínicas, previamente secadas sobre P205, se sililaron por el siguiente método: disolución en piridina y calentamiento con Tri-Sil (Pierce-Rockford) a 70°C durante 10 minutos.

c) Trimetilsilil éster-Trimetilsilil éteres de ácidos siálicos

La mezcla de ácidos siálicos, previamente secadas sobre P205 se sililó con una mezcla de hexametildisilano, trimetilcloro-silano, piridina (1:2:10 v/v/v) y se calentó a 50°C durante 10'

d) Esteres metílicos de ácidos grasos

Las mezclas de ácidos grasos se trataron con trifluoruro de boro 10% en metanol (8,6 ml) en baño de agua hirviente durante 2 minutos. Se llevó a seco y se eliminó el reactivo mediante sucesivos agregados de metanol, y evaporaciones. El residuo se tomó en éter etílico (5 ml) y se lavó con solución diluída de CO₃HNa (2 x 10 ml) y luego con agua hasta neutralidad. La fase orgánica final se secó sobre SO₄Mg anhidro y se concentró (235).

.4.2 Condiciones empleadas en las cromatografías gas-liquido

I.- Acetatos de alditoles parcialmente metilados: Se cromatografiaron empleando las fases a y g en las siguientes condiciones:

Ia.- Fase a Tc 170°C; Ti 210°C; Td 210°C; N₂: 23 ml/min

Ib.- Fase g Tc 170°C; Ti 210°C; Td 210°C; N₂ 25 ml/min

II.- Hexosaminas acetiladas: Se empleó una columna con fase g en las siguientes condiciones:

Tc 230°C; Ti 250°C; Td 250°C; N₂ 26 ml/min

III.- Ácidos grasos metilados: Se cromatografiaron empleando fases d y f en las siguientes condiciones

IIIa.- Fase d Tc 175°C; Ti 210°C; Td 210°C; N₂ 25 ml/min

IIIb.- Fase f Tc (programada) 150-260°C; 10°C/min; Ti 220°C

Td 220°C; He 25 ml/min.

IV.-Esfingosinas trimetilsililadas: Se cromatografiaron en fase c, usando algunas de las siguientes condiciones:

IVa.- Tc 190°C; Ti 230°C; Td 230°C; N₂ 30 ml/min.

IVb.- Tc (programada) 180-290°C 10°C/min; Ti 250°C ;

Td 250°C; He 30 ml/min.

V.-Trimetilsilésteres Trimetilsilil éteres de ácidos siálicos:Se cromatografiaron en una columna con fase b utilizando las siguientes condiciones:

Tc (programada): 120-290°C 10°C/min;Ti 260°C; Td 260°C;

He: 25 ml/min.

VI.- Trimetilsililéteres de alcoholes de cadena larga: Se cromatografiaron en una columna de fase e, utilizando las siguientes condiciones:

Tc (programada): 100-290°C, 6°C/min; Ti 250°C; Td 250°C;

He: 25 ml/min.

9.5. DETERMINACIONES CUANTITATIVAS

9.5.1 Determinación de azúcares totales

Se llevó a cabo empleando el método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico según la técnica decripta por Dubois y

col (236) . Se mezcló 0.5 ml de una solución que contenía entre 5 y 35 ug de azúcar con 0.5 ml de fenol 5% (p/v); los blancos se prepararon con 0.5 ml de agua destilada. Luego de agitar se agregaron 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado analítico, desde una bureta de buen flujo, y se dejó reposar 10 minutos. Se agitaron los tubos nuevamente y se dejaron 20 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 490 nm determinándose la cantidad de azúcar en las muestras por referencia a una curva patrón preparada simultáneamente (solución patrón de manosa/galactosa 0,5 mg/ml). Virtualmente todos los azúcares, incluyendo sus derivados, oligo y polisacáridos, pueden determinarse con esta técnica. Entre los no evaluables cabe mencionar a las hexosaminas y los inositoles. El error del método es de $\pm 2\%$.

9.5.2. Determinación de glucogeno

Se siguió el método de Huijing (134)

Alícuotas del homogenato se hidrolizaron a glucosa con una solución (200 ul) de glucoamilasa (50 ug/ml , Merck 50 U/mg) y α -amilasa (80 ug/ml Merck 170 U/mg), en buffer acetato de sodio 0,1 M pH 4,8. La incubación se realizó durante 1h a 30°C (G1). Se realizaron controles para la estimación de glucosa libre en el homogenato, agregando a las muestras respectivas el buffer acetato de sodio (200 ul), sin las enzimas glucogenolíticas men-

cionadas (G2). La glucosa presente en las alícuotas incubadas se determinó por agregado de un ml del reactivo de glucosa oxidasa-peroxidasa, según la técnica de Fleming- Pegler descrita a continuación. El contenido de glucógeno se determinó mediante los valores de G1- G2

9.5.2.1. Determinación de D-glucosa

Para la determinación cuantitativa y selectiva de D-glucosa se empleó el método propuesto por Fleming y Pegler (237).

Reactivo: Se disolvieron 60 mg de glucosa oxidasa, 6 mg de peroxidasa y 20 mg de o-dianisidina en 200 ml de solución tampón de Tris-ácido clorhídrico (pH 7,0) .El tampón se preparó disolviendo 15,25 g de Tris (2-amino-2(hidroximetil)propano-1,3-diol) en 21,5 ml de HCl 5N, se diluyó a 250 ml en un matraz aforado con agua destilada, se agregaron 165 ml de glicerina analítica y se ajustó el pH a 7.0 . El reactivo es estable durante un mes en la oscuridad a 4°C.

Procedimiento: Se mezcló 1 ml de solución de glucosa (1-100 ug) con 2 ml de reactivo y se incubó durante una hora a 25°C. Se agregaron 4 ml de H₂SO₄ 5N, se agitó y se leyó la absorbancia a 525 nm. Se utilizó una solución patrón de glucosa 1 mg/ml.

9.5.3 Determinación de hexosaminas

Las hexosaminas se cuantificaron mediante el método de Elson

y Morgan (238), siguiendo la técnica descrita por Svennerholm (239).

A 1 ml de solución que contenía entre 5 y 15 ug de hexosamina se agregó 0,5 ml de una solución de 2,4 pentanodiona 4% (v/v) en carbonato de sodio 1,25N. Los tubos se taparon en forma no hermética y se calentaron 1 hora en un baño de agua a 90°C. Luego se agregaron 4 ml de etanol y 0,5 ml de una solución de 1,6 g de N,N-dimetil-p-aminobenzaldehído en 60 ml de etanol-HCl(c) (1:1)

Los tubos se agitaron y se determinó la absorbancia a 530 nm. El color rojo aparece inmediatamente y es estable aproximadamente una hora.

Aunque las hexosas (2mg) y mezclas de aminoácidos (5 mg) no interfieren separadamente, la presencia simultánea de hexosas y algunos aminoácidos, particularmente L-lisina, da lugar a interferencia. Por esta razón las hexosaminas se separaron previamente de los hidrolizados correspondientes por cromatografía de intercambio iónico de acuerdo al método sugerido por Boas (240). Las muestras se sembraron en columnas de 5 ml de Dowex 50 W (H+) y se eluyó primero con agua (20 ml), y seguidamente con HCl 1N (20 ml). Los eluidos ácidos se concentraron y neutralizaron mediante sucesivos agregados de agua y evaporaciones y, sobre éstos se efectuó la colorimetría.

La curva patrón se obtuvo con una solución de 1 mg/ml de

glucosamina.

9.5.4 Determinación de ácido siálico

Se procedió según la técnica descrita por Aminoff (162)

Reactivos

- 1) Acido periódico 25 mM en H₂SO₄ 0,125N
- 2) Arsenito de sodio 2% en HCl 0,5N
- 3) Acido 2-tiobarbitúrico 0,1 M ajustado el pH a 9 con NaOH.
- 4) n-butanol con agregado de 5% HCl 2N.

Procedimiento

Las reacciones se llevan a cabo en tubos de centrífuga. Se agregaron 0,25 ml de la solución 1) a una solución acuosa que contenga 2-20 ug de Acido N-acetil Neuramínico. El período de oxidación es de 30 minutos a 37°C. Se agregan 0,2 ml de arsenito de sodio para destruir el exceso de periodato. Después de 2 minutos desaparece el color amarillo liberado por el iodo, y se agregan 2 ml del reactivo de acido tiobarbitúrico. La mezcla se calienta en un baño de agua hirviente 7 minutos y después se enfría en un baño de hielo. Se extrae el cromóforo por agitación con 5 ml de butanol. Se centrifuga 3 minutos a 3000 g y se lee la absorbancia a 549 nm. La curva patrón se obtuvo con una solución de Acido N-acetil neuramínico 1mM, disuelto en agua y ajustado el pH a 5 con bicarbonato de sodio. La solución se mantiene a 18°C.

9.5.5. Determinación de fósforo inorgánico

Las determinaciones de fósforo inorgánico se efectuaron según el método propuesto por Chen y col (241).

Reactivo: Se prepararon dos soluciones:

Solución a): Ácido ascórbico 10% : es estable un mes a 4°C.

Solución b) Molibdato de amonio 0,42% en ácido sulfúrico (28,6 ml de H₂SO₄(c) y 4,2 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O) se llevan a 1000 ml con agua).

El reactivo necesario se prepara mezclando un volumen de solución a) con 6 volúmenes de solución b). Este puede mantenerse durante un día en baño de hielo.

Procedimiento: Se agregaron 2,1 ml de reactivo a 0,9 ml de solución acuosa de fosfato (0,002-0,01 umoles) y se incubó 20 minutos a 45°C o 1 hora a 37°C. Se determinó la absorbancia a 820 nm; el color es estable durante varias horas y las lecturas son proporcionales a la concentración de fosfato hasta una densidad óptica de 1,8. Como solución patrón se utilizó fosfato monopotásico 0,5 umol/ml.

9.5.6 Determinación de fósforo orgánico

Se cuantificó el contenido total de fósforo según el método de Bartlett (242), eventualmente el fósforo orgánico se estimó como la diferencia entre el fósforo total y el inorgánico

determinado como se describió anteriormente.

Reactivos: a) Molibdato de amonio: Se disolvieron 4,4 g de molibdato de amonio tetrahidratado en 200-300 ml de agua, se agregó 14 ml de H₂SO₄ (c) grado analítico y se llevo a ll.

b) Agente reductor (Fiske y Subbarow) (243): Se mezclaron en mortero 30 g de bisulfito de sodio y 0,5 g de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico. La mezcla se disolvió en 250 ml de agua destilada, se dejó en reposo 3 horas en la oscuridad y se filtró

Esta solución es estable durante 6-8 semanas a 4°C en la oscuridad. Para preparar el agente reductor se diluyó 1:12 el reactivo de Fiske-Subbarow.

Procedimiento: Las muestras, que contenían hasta 0,15 umol de fósforo, se digirieron con 0,4 ml de ácido perclórico 70-72%. Luego de la digestión, se enfrió y se agregaron 2,4 ml de solución de molibdato de amonio y 2,4 ml de agente reductor. Se agitaron los tubos y se calentaron en baño de agua hirviente 10 minutos. Se enfrió y se leyó la absorbancia a 830 nm, las muestras con A > 0,800 pueden leerse a 735nm ($\epsilon_{735} = 1/2 \cdot \epsilon_{830}$). La curva patrón se realizó por duplicado con alícuotas de una solución de fosfato monopotásico 0,5mM.

9.5.7 Determinación de proteína:

El contenido proteico se estimó por el método de Lowry y col

(244), basado en la reacción de la proteína con cobre en medio alcalino y la posterior reducción del reactivo fosfomolibdato-fosfotungstato producida por los residuos tirosina y triptófano presentes en la proteína tratada.

Reactivos:a) Solución alcalina de cobre: Se prepararon dos soluciones: 1) carbonato de sodio 2% en NaOH 0,1N; 2) sulfato de cobre 0,5% en tartrato de potasio 1%. La solución alcalina de cobre se preparó en el momento mezclando 20 ml de 1) con 0,4 ml de 2). Esta solución es estable 24 horas.

b) Reactivo de Folin Ciocalteu: Se utilizó el reactivo comercial (Merck), diluido con agua 1:1.

Procedimiento: Se agregaron 3 ml de solución alcalina de cobre a 0,6 ml de muestras que contenían entre 60 y 300 ug de proteína; se mezcló, se dejó en reposo 10 minutos a temperatura ambiente, se agregó 0,3 ml del reactivo de Folin Ciocalteu y se volvió a mezclar. Luego de 30 minutos se determinó la absorbancia a 660 nm. Como solución patron se utilizó albúmina bovina 1 mg/ml.

Aunque la producción de color depende de cada proteína en particular, siendo ésta la principal desventaja del método, este es aproximadamente 20 veces más sensible que las medidas de absorbancia a 280 nm y 100 veces más sensible que la reacción del biuret.

9.5.8 Determinación de bases de cadena larga

Se procedió según el método de Lauter y Trams (245)

Reactivos:

- 1) Solución patrón de dihidroesfingosina (esfinganina en acetato de etilo)
- 2) Solución tampón de Acetato de sodio 0,01M, pH 3,6 lavado con acetato de etilo.
- 3) Solución de anaranjado de metilo. Se disuelven 250 mg del colorante en 50 ml de agua y la solución se lava con cloroformo.

Procedimiento: Se toman entre 0,02 y 0,15 umoles de bases de cadena larga en 5 ml de acetato de etilo, se agregan 2 ml de solución tampón de acetato de etilo y 0,1 ml de solución del colorante. Se agita, se centrifuga, se separa la fase orgánica de acetato de etilo y se lee la absorbancia de esta última a 415 nm.

9.6 CROMATOGRAFIA EN BIO GEL P2

Una columna (90x 1,3cm) de Biogel P-2, grado medio (Bio Rad) equilibrada con agua destilada, se empleó para desalar fracciones de glicoconjugados. El rango de trabajo, descrito para ésta es 100-1800 daltons. El volumen de exclusión era de 48 ml habiendo empleado azul dextrano (Pharmacia), para su determinación.

9.7 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Las electroforesis de tipo disco en geles de poliacrilamida 15%, en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,2, en presencia de Sodio Dodecil Sulfato (SDS) 0,1% se realizaron siguiendo la técnica de Segrest y Jackson (246), empleándose tubos de vidrio de 8 x 0,6 cm.

Reactivos

solución A: 15 g de acrilamida y 0,6 g de bis (N,N-metilen-bis-acrilamida) se disuelven en 100 ml de buffer de corrida

Solución B: 150 mg de persulfato de amonio en 10 ml de agua

Solución C: N,N,N',N'-tetrametilendiamina 5% en agua.

Preparación de los geles: A 19 ml de la solución A se agrega 1 ml de solución B. Se deaerea y se agregan 0,2 ml de la solución C. Se colocan 2 ml de la solución resultante a cada uno de los tubos de electroforesis y se completa el volumen del tubo con agua cuidando de no remover la superficie del gel. Se dejan polimerizar a temperatura ambiente.

La muestra (20-70 ug de azúcar total) se disuelve en 50-100 ul de buffer fosfato de sodio 0,1M pH 7,2 0,1% en SDS, se agrega 10 ul de solución 0,4% de azul de bromofenol como indicador de corrida y 10-20 ul de glicerol, se calienta en baño de agua hirviente, y se siembra la solución resultante en la parte superior de los tubos. La electroforesis se lleva a cabo aplicando un voltaje constante tal que determine una corriente

de 6 mA por tubo. La experiencia se realizó a 15-20°C durante 3,5-4 h.

Coloración de los geles:

a) para azúcares: Los geles fueron fijados durante la noche en una solución de etanol (40% v/v), ácido acético (5% v/v) y agua (55% v/v). Se trataron luego con ácido periódico (0,7% en ácido acético 5%) durante 2-3 h y se lavaron con solución de metabisulfito de sodio 0,2% hasta desaparición del color amarillo. Los geles fueron coloreados por el agregado del reactivo de Schiff.

Reactivo de Schiff: Se disuelven 0,8 g de fucsina básica en 200 ml de solución 0,8% de metabisulfito de sodio, a la que se le ha agregado 2,1 ml de HCl (c). Agitar a temperatura ambiente 2h en la oscuridad. Agregar 1-2 g de carbon lavado con HCl. Filtrar y guardar en la heladera.

b) para proteínas: La coloración de proteínas se realizó siguiendo la técnica de Kurn y Wright (247). Los geles se fijaron en una solución de metanol (50% v/v), ácido acético (5% v/v) y agua (45% v/v) durante una noche. El proceso de coloración de los geles con Azul Coomassie R (Sigma) siguió la siguiente secuencia:

1) Inmersión durante una noche en solución 0,025% de Azul Coomassie (AC) en isopropanol, ácido acético, agua (25:10:65

v/v/v).

2) Inmersión durante 8 horas en solución 0,0025% de AC en isopropanol, ácido acético, agua (1:1:8 v/v/v).

3) Inmersión durante una noche en solución 0,0025% de AC en ácido acético, agua (1:9 v/v).

4) Inmersión en ácido acético, agua (1:9 v/v) hasta observar las bandas con claridad.

9.8. ELECTROFORESIS EN GRADIENTE DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Las electroforesis en capa de gradiente de geles de poliacrilamida se realizaron siguiendo la técnica de Studier y col (143).

Reactivos:

- Solución A: 30% (p/v) de acrilamida ; 0,8% de NN' metilen-bis-acrilamida (p/v), en agua. La solución se mantiene a 4°C.
- Solución B: 18,17 g de Tris y 2 ml de una solución de SDS 20%, se lleva a 100 ml con agua y se ajusta el pH a 8,8 con HCl 6N.
- Solución C: 30% (p/v) de acrilamida y 1,6% (p/v) de N,N'metilen-bis- acrilamida en agua. Se guarda a 4°C.
- Solución D: 6,06 g de Tris y 2 ml de SDS 20% (p/v) y se lleva a 100 ml con agua. Ajustar el pH a 6,8 con HCl 6N.
- Solución E: Persulfato de amonio (20mg/ml) en agua preparada en el momento de usar.
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina).
- Solución concentrada de buffer: 12,0 g de Tris y 57,6 g de glicina en 1 l de agua (pH 8,2). Para la corrida electroforética el buffer debe ser diluído 4 veces y agregar SDS 20% hasta una concentración final del 0,1 % (p/v).
- Buffer de la muestra: Mezclar 2,5 ml de Solución D, 2,5 ml de SDS 20%, 2 ml de glicerol , 0,1 ml de EDTA (0,1 ml en agua). Completar el volúmen a 18,5 ml con agua. En el momento de usar,

mezclar 1,85 ml del buffer de muestra con 0,05 ml de β -mercaptoetanol y 0,1 ml de azul de bromofenol (0,1% p/v) en agua.

- Solución fijadora: Metanol, ácido acético, agua (5:1:4 v/v/v)
- Solución de teñido para proteínas: 0,2% (p/v) de Comassie Blue R-250 en solución fijadora. Filtrar la solución antes de usar. Se usa 8-10 veces.
- Solución decolorante: Metanol, ac. acético, agua (10:7:83 v/v/v)

Procedimiento

- Preparación de la muestra : Un homogenato de los parásitos marcados o los glicoconjugados aislados, se suspenden en 50-100 μ l de buffer de muestra. La suspensión se mantiene durante 3 minutos en baño de agua.

- Armado del aparato: El gel se arma entre 2 placas de vidrio, que deben estar perfectamente limpias. Entre las placas se colocan 3 espaciadores de Plexiglas, en los costados y el fondo. Las placas y los espaciadores se unen con vaselina y todo el sistema se fija con broches. Las placas se colocan verticalmente en una superficie lisa.

- Preparación de los geles de corridas y precorrida

a) Geles de corrida: Para los geles de gradiente de poliacrilamida (PAA) (8-15%) se utiliza el siguiente procedimiento:

En dos kitsatos de 50 ml se preparan las mezclas I y II

	<u>I (8% PAA)</u>	<u>II (15% PAA)</u>
Agua (ml)	3,45	0,178
Solución <u>A</u> (ml)	3,00	5,75
Solución <u>B</u> (ml)	2,81	2,81
Solución <u>E</u> (ml)	0,17	0,17
Glicerol (ml)	0,13	0,66
Poliacrilamida 3% (ml)	1,9	1,9
TEMED (ul)	10	10

Las soluciones se deben deaerear independientemente antes de agregar el TEMED. Luego de agregar el TEMED, las soluciones se colocan en vasos comunicantes. La mezcla II se debe agregar al tubo más alejado de la salida. Se debe colocar un agitador magnético en el tubo que está conectado a una bomba peristáltica. La solución se deja fluir a las placas a baja velocidad hasta llenar el sistema, luego se cubre con una pequeña capa de agua.

- Gel de precorrida: El gel se prepara mezclando:

Agua (ml)	6,34
Solución C (ml)	1,00
Solución D (ml)	2,50
Solución E (ml)	0,15
TEMED (ul)	20

Se deaerea antes de agregar el TEMED. Se retira la capa de agua y se lava la superficie del gel de corrida con 2 ml de la solución de precorrida. Se inserta un peine (con varios dientes) y se llena con el gel de precorrida. La polimerización tiene lugar en 30 minutos.

- Corrida electroforética: Se remueve el peine y el espaciador inferior. Se ubica la placa en la cuba de electroforesis y se sujeta con broches. Se llena la cuba con el buffer de corrida y se elimina cuidadosamente todas las burbujas. Luego se aplican las muestras (10-15 ul) en cada cavidad con una microjeringa. Se conectan los electrodos a la fuente ,el ánodo es el electrodo inferior y el cátodo el superior. La electroforesis se corre primero a 15 mA hasta que el azul de bromofenol penetre el gel de corrida, luego a 20-25 mA 5-6 h hasta que el colorante llegue a 1 cm del borde inferior del gel. Al finalizar la corrida, se retiran las placas de la cuba, se sacan los espaciadores y la placa de vidrio y se marca el colorante.

- Fijación, teñido y coloración: Cuando se desea revelar para proteínas, se coloca el gel en la solución fijadora 30' , luego otros 30' en la solución de Coomasie y finalmente en la solución decolorante. La decoloración se acelera calentando el gel a 60°C con agitación en presencia de algún absorbente (lana, muselina, etc). En estas condiciones, los geles se decoloran en 2 horas.

- Preparación para autorradiografía: Los geles se pueden secar para guardarlos o para autorradiografía. Se coloca el gel en una hoja de papel Whatman 3MM húmedo y se transfiere a un aparato secador de geles. Se cubre el gel con una hoja de plástico y se seca. Después de secar, el gel se reduce a una capa delgada que permanece adherida al papel de filtro y se puede exponer fácilmente a placas de rayos X.

- Fluorografía: El gel se lava con agua y se coloca en una solución de salicilato de sodio 1M durante 45 minutos y luego se seca.

- Exposición de las placas: El gel seco se coloca sobre una placa de rayos X (Kodak X-AR para 3H), entre planchas de plomo, se cierra bien, y se deja 15-30 días a -70°C.

- Revelado de las placas: Las placas se dejan llegar a temperatura ambiente y se colocan durante 3-5 minutos en una solución de Revelador Rapido para Rayos X (Kodak), luego 3 minutos en una solución de Acido acético 5%(v/v) y 15 minutos en fijador para Rayos X (Romek).

9.9. FLUOROGRAFIA DE CROMATOGRAFIAS EN CAPA DELGADA

Esta metodología se utiliza para revelar las placas de sílica gel en que se han cromatografiado muestras marcadas con (³H)

Reactivo: Se funden 100 g de 2-metil naftaleno en un baño de agua caliente y se agrega 0,4 g de PPO (difeniloxazolona)

Procedimiento La solución se vuelca en una fuente caliente y las placas se sumergen durante 1 minuto, luego se mantienen en posición vertical hasta que drene el exceso de reactivo.

Cuando solidifica la solución, la placa se expone de igual manera que para geles (248)

9.10. MEDICION DE RADIOACTIVIDAD

La medición de radioactividad presente en los cromatogramas de papel se realizó cortando las tiras de 2cm de ancho en bandas de 1 cm, las que se contaron utilizando el líquido centellador A

Las determinaciones de radioactividad presente en soluciones acuosas fue realizada empleando el líquido centellador B.

Las determinaciones de radioactividad presente en soluciones orgánicas fue realizada empleando el líquido centellador A.

La medición de radioactividad en cromatogramas en capa delgada, fue realizada, cuando se especifica, cortando los cromatogramas en bandas de 0,5 cm y eluyendo la sílica de cada fracción de manera conveniente. La radioactividad se midió con líquido centellador A.

En los casos en que se hubiera realizado previamente una fluorografía, se procedió a extraer el 2-metil naftaleno con hexano (3 x 3 ml), previo a la extracción del producto radioactivo.

Reactivos:

Líquido centellador A: Disolver 2,5 g de difeniloxazolona (PPO, Sigma) y 0,1 g de 1,4-bis(2-(5-feniloxazolil))benceno (POPOP, Sigma), en 1 litro de tolueno.

Líquido centellador B: Disolver 50 g de naftaleno, 3,5 g de PPO y 0,15 g de POPOP en 500 ml de dioxano.

9.11. HIDRÓLISIS TOTALES

9.11.1. Acido clorhídrico 2N, 2h, 100°C.

Las muestras se disuelven en 1-2 ml de HCL 2N y se calientan

a 100°C durante 2h. Se evaporan luego repetidas veces con agregados de pequeñas porciones de agua hasta eliminar la mayor parte de la acidez. La acidez remanente se elimina colocando la muestra una noche en desecador al vacío con NaOH en lentejas como desecante.

9.11.2. Con resina catiónica

Se utilizó en los casos en que las muestras poseen mucha cantidad de proteínas.

Para 1 mg de azúcar se agrega 1,5 ml de agua, 0,1 g de resina Dowex 50 H+ y 0,02 ml de HCl 1N, se burbujea nitrógeno y se calienta 18 hs a 100°C. El hidrolizado se pasa por una columna de resina Dowex 50 H+ (6 x 10 mm) y se lava con agua (5 x 0,5 ml), se juntan los eluidos. Luego se eluyen las glicosaminas con HCl 4 N (95).

9.11.3. Acido clorhídrico 1N, 8h, 100°C

Se utilizó para hidrolizar gangliósidos (206)

Para 1 mg de muestra se agrega 1 ml de HCl 1N, y se calienta 8 h a 100°C. Se elimina el HCl como se describió anteriormente.

9.11.4 Acido clorhídrico 4N, 6h a 100°C.

Se utilizó para hidrolizar aminoazúcares. Para ello las muestras previamente hidrolizadas en las condiciones descriptas

en 9.11.1 o 9.11.3 se pasaron por una resina Dowex 50 H+. Se eluyeron los azúcares neutros con agua y las bases con HCl 1N. El eluido ácido se evaporó al vacío hasta eliminar la acidez y se disolvió en HCl 4N, se calentó a 100°C durante 6 h y el HCl se eliminó en la forma descripta anteriormente.

9.12. HIDROLISIS PARCIALES

9.12.1. Acido trifluoroacético 0,05 N, 2 h, 100°C (para hidrólisis de uniones furanósicas)

Las muestras (1-2 mg) se disuelven en 1 ml de TFA 0,05 N y se calientan a 100°C durante 2 h (141). Los restos de ácido se evaporan al vacío .

9.12.1. Acido sulfúrico 0,1 N , 1h, 80°C (para hidrólisis de ácidos siálicos).

Se disuelven 0,5-2 mg de muestra en 1 ml de H₂SO₄ 0,1 N, y se calientan 1h a 80°C. Luego se neutraliza con carbonato de bario y se centrifuga. El sobrenadante se seca por evaporación o liofilización.

9.12.2. Acido acético 2M, 4 h, 80°C.

Esta técnica fue descripta por Varki y col (176), para minimizar las pérdidas de O-acetilo u otros grupos , en los

resíduos de ácido siálico durante la hidrólisis.

Se disuelven 0,5-2 mg de la muestra en 1 ml de Acido acético 2 M y se calienta 4^oh a 80°C se lleva a sequedad en evaporador al vacío y se deja una noche en desecador. Luego se toma en buffer formiato de sodio (pH 5) (1 ml) y se extrae 3 veces con éter (3 ml). La fase acuosa se aplica a una resina Dowex 50 H+ (6 x 10 mm) y se eluye con 10 ml de agua , recogiendo en un tubo que contiene 40 ul de ácido fórmico 1 M. Se lleva a sequedad.

9.13. PREPARACION DEL ACIDO 5-ACETAMIDO-3,5-DIDESOXI L-ARABINO 2-HEPTULOSONICO(NANA7) (161)

Se utilizó el procedimiento descrito por Yu y Leeden (174).

A 20 mg de NANA, disuelto en 4 ml de metanol anhidro, se le agregó 50 mg de resina Dowex 50 H+. La reacción se llevó a cabo en tubo cerrado a 75°C durante 48 h, agitando ocasionalmente. La resina se filtró y lavó con metanol. El filtrado y los lavados se evaporaron al vacío.

La hidrólisis del éster metílico se llevó a cabo en 5 ml de NaOH 0,06 N. Despues de 2 h a temperatura ambiente, la mezcla se neutralizó y desionizó por pasaje a través de una resina Dowex 50 H+ (2 x 0,6 cm), y se liofilizó.

El 8- metil cetósido se oxidó con 1 ml de periodato de sodio

0,05 M, 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por agregado de una cantidad equimolecular de acetato de bario, y se filtró. El filtrado se concentró a un pequeño volumen y se redujo con 1 mg de borhidruro de sodio. La reducción se detuvo por agregado de ácido acético 1N hasta pH 4. El ac. bórico se eliminó como borato de metilo a presión reducida.

El NANA7 standard se obtuvo por hidrólisis del B -metil cetósido en agua, 1 h a 100°C.

9.14. PREPARACION DE MALTOOLIGOSACARIDOS

Se hidrolizan 150 mg de amilosa con 30 ml de H₂SO₄ 0,1N 1h a 100°C. Se agregan 150 ml del mismo ácido diluido y se continúa la hidrólisis durante 10 minutos. Se neutraliza con carbonato de bario, se centrifuga y el sobrenadante se concentra a presión reducida hasta 2-5 ml (249).

PARTE

EXPERIMENTAL

9.15. CULTIVOS

Se trabajó con dos tipos de cepas de formas epimastigote de T.cruzi:

Cepa Tulahuén: Fueron provistas por el Instituto "Fátala Chabén". Se suministraron 2 líneas: Línea Tul 0 (no infectante) y línea Tul 2 (infectante).

Los organismos fueron cultivados en un medio bifásico desarrollado por Martini (185), compuesto por:

a) Base de hígado en pasta (I.N.O.R.P.S.A,Arg) 5 g; proteolizado de corazón en pasta (I.N.O.R.P.S.A,Arg) 5 g; extracto de carne (MC6) (I.N.O.R.P.S.A.Arg) 3 g; hidrolizado ácido de caseína (MC7) (I.N.O.R.P.S.A.Arg) 10 g; NaCl 5g; KCl 0,4 g; Agar (Productos Soriano Arg.) 20 g ; fosfato disódico dihidratado 10 g ; sangre de conejo 100 ml; agua (d) c.s.p. 1 l.

b) Sobrenadante: Caldo triptosa fosfato (DIFCO E.E.U.U.) 30 g ; glucosa 10 g; hígado en pasta (I.N.O.R.P.S.A.Arg) 5 g; proteolizado de corazón en pasta (I.N.O.R.P.S.A.Arg) 5 g; agua (d) c.s.p. 1 l.

Se repicó en este medio de mantenimiento con intervalos de 7 días. La recolección se efectuó al quinto día, que corresponde a lo establecido como fase exponencial de crecimiento del cultivo. Para cosechar los parásitos se recolectó la fase líquida y se centrifugó a 1000 x g durante 15 minutos, el sedimento se lavó

tres veces con solución de sacarosa 0,25 M -KCl 5 mM.

Cepa Ypsilon: Fueron provistas por el laboratorio del Dr. W. Colli de la Universidad de San Pablo (Brasil). El medio de cultivo utilizado fué el LIT (Liver Infusion Tryptose), ideado por Yagger (9) , el cual presenta en su constitución sales minerales, glucosa, infusión de hígado, triptosa, suero bovino y hemoglobina.

Inicialmente se prepara una mezcla de los siguientes componentes: NaCl 0,4%; KCl 0,04%, Fosfato disódico 0,8%, glucosa 0,2 %; triptosa 0,5 % e infusión de hígado 0,5% en agua bidestilada (los porcentajes son en peso / volumen).

A esta mezcla se le adiciona 10% de suero bovino (v/v) ajustándose el pH a 7,2 y se incuba 1 h a 68°C, se deja enfriar a temperatura ambiente y se agrega una solución de hemoglobina para llegar a una concentración final del 2% (v/v).

Este medio se filtra por papel de filtro común y se esteriliza por pasaje a través de un filtro "Seitz (tipo EKS)", a presión reducida. El medio se distribuye en frascos y se mantiene a 4°C hasta su uso.

Las células son cultivadas en 50 ml de medio LIT en erlenmeyer de 250 ml, mantenidos en agitador rotatorio (New Brunswick) a 120 rpm y equilibrado a 28°C. A cada frasco de cultivo se le

adiciona penicilina hasta una concentración final de 50 ug/ml.

Después del inóculo de 20×10^6 células/ml, proveniente de cultivos de 3 o 4 días, los cultivos se mantuvieron en las condiciones descriptas hasta la fase exponencial tardía (4 días).

Para la recolección, las células se centrifugaban a $100 \times g$ (Sorwall model PC-5) y se lavaban 3 veces con solución de NaCl 0,9%. Después de éste último lavado las células se liofilizaban.

9.16. ESTUDIO DE FRACCIONES SUBCELULARES DE CELULAS EPIMASTIGOTE DE T. CRUZI, CEPA TULAHUEN 2. (TUL2.).

Las diversas fracciones subcelulares obtenidas según (124), fueron proporcionadas por el Instituto Nacional del Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr Mario Fatala Chabén", Buenos Aires.

Las fracciones, que se entregaron liofilizadas, corresponden a:

F1: citosol

F2: Particulado obtenido a 5000 g (mitocondrias).

F3: Particulado obtenido a 11.500 g (lisosomas).

F4: Particulado obtenido a 30.000 g

F5: Particulado obtenido a 105.000 g (microsomas).

F6: Flagelo (obtenida por centrifugación en gradiente de sacarosa a 24.500 rpm del sedimento a 1000 g) (78).

F7: Homogenato total obtenido con un desintegrador Sorvall Ribi.

F8: Homogenato total sonicado con inhibidor de proteasas.

9.16.1 Determinaciones realizadas sobre las fracciones

Las fracciones subcelulares, suspendidas en agua, fueron dializadas, previamente a las determinaciones químicas realizadas. Los contenidos de las bolsas se liofilizaron y se llevaron a 1 ml de agua.

a) Determinación de proteínas

Se determinaron proteínas totales por el método de Lowry y col (244). Se utilizó un patrón de albúmina bovina de 1mg/ml.

Alícuota	Absorbancia	ug proteína/ alícuota	mg proteína totales
Sol Patrón 10 ul	0,15	10	
Sol patrón 20 ul	0,28	20	
Sol patrón 40 ul	0,53	40	
Sol patrón 60 ul	0,79	60	
F1 10 ul	0,48	36	3,60
F2 10 ul	0,78	59	5,90
F3 10 ul	0,77	58	5,80
F4 10 ul	0,62	47	4,70
F5 5 ul	0,61	45	9,00
F6 20 ul	0,20	13,6	0,68
F7 5 ul	0,49	38,5	7,70
F8 5 ul	0,41	30,5	6,10

b) Determinación de azúcares totales

Se realizó la reacción de fenol-ácido sulfúrico (236), utilizando como solución patrón manosa-galactosa (3:2) 0,5 mg/ml

	Alícuota	Absorbancia	ug azúcar/ alícuota	mg azúcar totales
	Sol patrón 10 ul	0,10	5	
	Sol patrón 20 ul	0,22	10	
	Sol patrón 40 ul	0,44	20	
	Sol patrón 60 ul	0,64	30	
	Sol patrón 80 ul	0,86	40	
F1	100 ul	0,40	18	0,18
F2	100 ul	0,58	26	0,26
F3	100 ul	0,58	26	0,26
F4	100 ul	0,79	36	0,36
F5	30 ul	0,73	32,5	1,08
F6	200 ul	0,20	8	0,04
F7	100 ul	0,62	28	0,28
F8	100 ul	0,58	26	0,26

Se calculó la relación en peso Azúcar/ Proteína en cada una de las fracciones.

c) Determinación de los azúcares componentes de las fracciones 2,3,4,5,y 8

Se realizó un hidrólisis para determinar azúcares, empleando la técnica recomendada para muestras con alto contenido de proteínas (Sección 9.11.2.) sobre las fracciones 2,3,4,5 y 8 que contenían respectivamente 0,70; 0,62; 1,4 ; 0,50; y 0,60 mg de azúcares, según los dosajes efectuados por el método del fenol-ácido sulfúrico. El hidrolizado se pasó a través de una resina Dowex 50 H+, eluyendo con 5 ml de agua los azúcares neutros (AN) y con HCl 2N , las glicosaminas.

Los eluidos neutros liofilizados se procesaron según la técnica descrita en Métodos generales, para analizar los azúcares como acetatos de alditol por c.g.l.

d) Determinación de hexosaminas en las fracciones 2,3,4,5 y 8

Los eluidos ácidos de la resina se llevaron a sequedad y se procesaron según la técnica descrita en Métodos generales para analizar hexosaminas según la técnica de Elson Morgan (238)

	Alícuota	Absorbancia	ug aminoazúcar/ alícuota	mg aminoazú- car totales
Sol Patrón	5 ul	0,05	5	
Sol Patrón	10 ul	0,1	10	
Sol Patrón	15 ul	0,185	15	
Sol Patrón	20 ul	0,245	20	
Sol Patrón	25 ul	0,31	25	
F2	400 ul	0,075	7,5	37,5
F3	400 ul	0,03	3	15
F4	400 ul	0,18	15	75
F5	400 ul	0,075	7,5	37,5
F8	400 ul	0,04	3,5	17,5

e) Electroforesis en geles de poliacrilamida de las distintas fracciones subcelulares

Se llevó a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida 15%, en presencia de SDS , de las fracciones subcelulares siguiendo la técnica descrita en la sección (9.7).

Se tomaron alícuotas que contenían 200 ug de proteínas y se incubaron 2 h a 37°C con SDS 1%, β -mercaptoetanol 1%, para su disolución (250).

Los geles se colorearon con el reactivo de ácido periódico-Schiff y se realizaron densitometrías.

f) Análisis de la presencia de glucógeno

En la fracción mitocondrial (5000 g) y en el citosol se investigó la posible presencia de glucógeno, ya que estas fracciones eran las más ricas en glucosa. Se realizó la determinación por el método enzimático descrito en Métodos Generales, sobre 400 ug de azúcares totales. No se detectó la presencia de glucógeno en ninguna de estas fracciones

9.17. EXTRACCION DE GLICOPROTEINAS DE EPIMASTIGOTES DE T. CRUZI

9.17.1 Extracción de una glicoproteína de epimastigotes de T0

Se siguió la técnica utilizada por Waksman Y Lederkremer para la extracción de una glicoproteína de PM 45.000 (125)

Un homogenato de células epimastigote de la cepa Tul 0 (10 g en peso húmedo equivalente a 2×10^7 células aproximadamente), se sonicó en las condiciones descritas en métodos generales. Luego se agregó una solución de fenol, recientemente destilado, 88% en agua. La suspensión resultante (aproximadamente 44% en fenol), se agitó en erlenmeyer a temperatura ambiente durante 2 horas, empleándose un agitador mecánico. La suspensión se centrifugó a 2000 r.p.m. (International size 2, Model K (TEC)), durante 10 minutos, lográndose la separación de la fase acuosa (superior) y fenólica (inferior). La fase superior se removió

por aspiración y se repitió la extracción dos veces con igual volúmen de agua destilada en iguales condiciones.

Las fases acuosas se juntaron ,se agregó 4 volúmenes de etanol 96% y se dejó durante una noche en heladera. Se obtuvo un precipitado blanco que se separó por centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos a 5°C.

El precipitado se extrajo en un erlenmeyer con solvente 4 en una proporción de 20 ml de solvente por cada 100 mg de precipitado. La extracción se realizó a temperatura ambiente con agitación. Luego de 3 horas, el extracto se filtró al vacío y se repitió el procedimiento de extracción dos veces más. El insoluble se lavó con etanol 96% y se secó en desecador al vacío (INS I).

9.17.2 Cromatografía en DEAE Celulosa de la fracción INS I

La fracción INS I (20 mg), se disolvió en 2 ml de buffer Tris HCl 0,05 M, pH 8,0 y se cromatografió en una columna de DEAE celulosa Merck (0,5 x 20 cm). La columna se eluyó inicialmente con el mismo buffer (30 ml) y luego, sucesivamente con NaCl 0,4M (30 ml) y 1M (30 ml) en el buffer mencionado. La elución se monitoreó mediante el dosaje de azúcares por el método del fenol-ácido sulfúrico y la lectura de absorbancia de proteínas a 280 nm. Las fracciones A y B (Fig 12), se dializaron contra

agua destilada a 5°C dos días.

El análisis por electroforesis en discos de geles de poliacrilamida 15% en presencia de SDS 0,1 % de la fracción A mostró la presencia de una sola glicoproteína de $R_m=0,24$ (GP45) que revelaba con reactivo de Schiff y Coomassie.

9.17.3 Aislamiento del complejo glicoproteico ABC de cepa Y

El complejo glicoproteico ABC de cepa Y se aisló siguiendo básicamente el procedimiento descrito por Alves y col. (95-96).

Para ello se procedió en la forma descrita en la sección (9.17.1) utilizando células epimastigote de T.cruzi cepa Y.

El precipitado obtenido se disolvió en buffer fosfato de sodio 0,1 M -SDS 0,1%, se cromatografió en una columna de Bio-gel P-150 (1,5 x 80 cm) que se eluyó con el mismo buffer, se recolectaron fracciones de 2 ml en las que se analizó el contenido de azúcares por el método del fenol-sulfúrico y proteínas por lectura de absorbancia a 280 nm. Se recolectaron las fracciones adecuadas, las que ,después de dializar se analizaron por electroforesis en geles en la forma descrita para GP45.

9.18. MARCACION CON GALACTOSA OXIDASA-NAB³H4

9.18.1 Marcación de la membrana plasmática de T.cruzi

Aproximadamente 3×10^4 células epimastigote de T.cruzi (ce-

pas Tul 0 y Tul 2, respectivamente), se suspendieron en 300 ul de buffer fosfato de sodio 5 mM pH 8,0 (135) y se incubaron 90 minutos con galactosa oxidasa (0,3 UI) , disuelta en 300 ul de buffer fosfato de sodio 0,05 M , a temperatura ambiente. Se agregaron 60 ul de una solución de NaB³H₄ en NaOH 0,01 N, y después de 2 minutos , las células se lavaron dos veces con una solución de NaBH₄ en NaCl 7% en agua , centrifugando cada vez. Luego se rompieron las células en un desintegrador Sorvall Ribi a 0°C y el particulado se centrifugó a 7000 rpm , se suspendió en agua y se midió la radioactividad presente en las dos líneas. En Tul 0 se incorporaron $3,4 \times 10^7$ dpm y en Tul 2 $2,9 \times 10^7$ dpm.

9.18.2 Marcación de GP45 y ABC .

Para marcar GP45 y ABC (0,2 mg respectivamente), se utilizó la técnica descrita anteriormente para la marcación de la membrana plasmática. Las sales contaminantes se separaron por cromatografía en una columna de Biogel P-2 en las condiciones descritas en métodos generales.

9.18.3. Electroforesis en gradiente de geles de las membranas y glicoproteínas marcadas

Alícuotas adecuadas de las membranas y glicoproteínas marcadas que contenían alrededor de 10^8 dpm fueron incubadas con SDS 1%-

β -mercaptoetanol 1%, durante una noche a temperatura ambiente.

Luego se realizó una electroforesis en gradiente de geles y fluorografía, en las condiciones descritas en métodos generales

9.18.4 Determinación de incorporación de radioactividad en azúcares componentes de las glicoproteínas y membranas marcadas.

Alícuotas de las células marcadas, que contenían 10^6 dpm respectivamente, se liofilizaron. Luego se extrajeron 3 veces con 3 ml de solvente 1. Se midió la radioactividad de los extractos orgánicos. En Tul 0 se extrajo un 47% de la radioactividad original y en Tul 2 un 37%.

Los residuos de las extracciones se suspendieron en 1 ml de agua.

Las suspensiones acuosas de Tul 0 y Tul 2 y las glicoproteínas Gp45 y ABC se trataron según la técnica descrita en métodos generales para hidrolizar azúcares totales en presencia de alta proporción de proteína. Luego se realizó la separación de azúcares neutros de glicosaminas, y la posterior hidrólisis de las mismas según la técnica descrita anteriormente.

Las fracciones correspondientes a los azúcares neutros y aminoazúcares se analizaron por c.p. en solvente 5 y 8. Se contó la radiactividad en el papel como se describió en la sección (9.10).

9.19 DETERMINACION DE LOS AZUCARES COMPONENTES DE GP45 Y ABC

Se hidrolizaron 2 mg de GP45 y ABC, respectivamente con HCl 2N en las condiciones descritas en métodos generales. Se separaron los azúcares neutros de las hexosaminas y posteriormente se hidrolizaron éstas últimas según la técnica descrita anteriormente. Se determinaron hexosaminas por el método de Elson Morgan y azúcares totales por el método del fenol-ácido sulfúrico.

Los azúcares neutros se analizaron por c.g.l. como acetatos de alditoles en la forma descrita en Métodos Generales.

9.20. DEGRADACION ALCALINA SUAVE DE LAS GLICOPROTEINAS AISLADAS

Las glicoproteínas aisladas de Tul0 y Tul 2 marcadas según la técnica de galactosa oxidasa- NaB^3H_4 , se trataron con NaOH 0,1M y NaBH_4 0,3M (en total 1,5 ml), 6 h a 45°C , condiciones de β -eliminación . Luego se neutralizaron con ácido acético y se separaron los productos de la degradación por filtración en un Biogel P-6 (1 x 80 cm), recogiendo fracciones de 2,5 ml. Se midió la radioactividad presente en cada una de las fracciones

9.20.1 Estudio de los productos de la degradación alcalina

Se realizó una cromatografía en papel utilizando solvente 6

durante 18 h, de los picos II , III y IV de la fig 15 y II y III de la fig 16 . Juntamente se corrió un testigo de maltooligosacáridos preparados según la técnica descrita en métodos generales (Sección 9.14)

Se midió la radioactividad en el papel como se describió en la sección (9.10)., y se graficó. Los picos IV de la Fig 15 y III de la Fig 16, corresponden a sales radiactivas pues se retuvieron en resinas de intercambio.

Por otra parte, los picos II y III (Fig 15) y II (Fig 16), se analizaron por cromatografía líquida de alta presión en un cromatógrafo Hewlett Packard 1084 B, utilizando una columna Lichrosorb amino 10 um (Merck) flujo 1 ml/min, con detector de índice de refracción a temperatura ambiente. El solvente usado fue acetonitrilo-agua 65:35 (v/v). Para ello, se cocromatografiaron con testigos de maltooligosacáridos, recogiendo las fracciones correspondientes a cada uno de los oligosacáridos.

Las fracciones se evaporaron en estufa al vacío a 40°C y se contó la radioactividad.

9.21. GLICOLIPIDOS DE CELULAS EPIMASTIGOTE DE T. CRUZI (CEPA Y)

9.21.1. Extracción de glicolípidos

Células epimastigote de T. cruzi cepa Y liofilizadas, (15,7 g, aproximadamente $1,7 \times 10^{12}$ células) se suspendieron en 17 volúmenes (ml/g) de solvente 1 (cloroformo: metanol 2:1). Se sonicaron

2 minutos y luego se extrajeron durante 30 minutos en un agitador mecánico a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de agitación se centrifugó a 2000rpm empleándose una centrífuga sin refrigeración (International Sive 2, model K (IEC)), durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se repitió la extracción 2 veces utilizando 17 volúmenes de solvente 2, cada vez. Se juntaron los sobrenadantes y se evaporaron. El extracto se tomó en solvente 1 (5 volúmenes ml/g) y se filtró a través de vidrio sinterizado. El filtrado seco, se pesó. En una extracción tipo se obtiene aproximadamente el 30% del peso total de las células (5 g).

9.21.2 Determinaciones realizadas sobre el extracto

a) Azúcares totales: Se determinó el porcentaje de azúcares totales por el método del fenol-ácido sulfúrico.

Se hidrolizaron 10 mg del extracto con HCl 2N en las condiciones anteriormente descritas y luego se extrajeron los lípidos con éter (2 x 2 ml). La fase acuosa se procesó en la forma descrita en métodos generales para analizar los azúcares por c.g.l. como acetatos de alditos.

b) Acido siálico: Se hidrolizaron 50 mg del extracto seco con ácido sulfúrico 0,1 N, en las condiciones descritas en Métodos

generales. El hidrolizado se pasó primero a través de una columna Dowex 50 (H+) (0,5 x 2cm) y el eluido acuoso a través de una columna de resina Dowex 1 (formiato, 0,5 x 2 cm). Se eluyeron los azúcares neutros con 10 ml de agua, y los azúcares ácidos con 10 ml de ácido fórmico 0,3N. El eluido ácido se liofilizó y se determinó el porcentaje de ácido siálico por el método del Acido Tiobarbitúrico (162).

Alícuota	Absorbancia	ug NAN
Sol patrón 10 ul	0,09	5
Sol patrón 20 ul	0,19	10
Sol patrón 30 ul	0,30	15
Sol patrón 40 ul	0,39	20
Extracto (50 mg)	0,17	9

c) Cromatografía en capa delgada: La cromatografía en capa delgada del extracto, en solvente 10, mostró dos componentes que revelaban con reactivo de Resorcinol/Cu (163) de Rf 0,35 y 0,62.

9.22. MARCACION CON NaIO_4 - $\text{NaB}^{10}\text{H}_4$ DE EPIMASTIGOTES DE T. CRUZI

Células epimastigote de T. cruzi, cepa Y (8×10^4), se marcaron con periodato de sodio- $\text{NaB}^{10}\text{H}_4$, según la técnica descrita por Zingales y col (1980).

Las células se suspendieron en buffer fosfato de sodio pH 7,2 0,1% y se incubaron a temperatura ambiente con 50 ug/ml de $\text{NaB}^{10}\text{H}_4$ durante 30 minutos. Luego se lavaron dos veces con exceso de buffer y se incubaron en oscuridad 20 minutos a temperatura ambiente con periodato de sodio 20 mM, disuelto en el mismo buffer. La oxidación se detuvo por dilución de las células con buffer frío, luego se lavaron con buffer dos veces y se suspendieron en 0,2ml de buffer que contenía 0,017 mg de $\text{NaB}^{10}\text{H}_4$ y se incubaron a temperatura ambiente 30 minutos. Después de la reducción las células se lavaron dos veces con el buffer, se resuspendieron en un pequeño volumen y se lisaron por repetidos congelamientos. El material se liofilizó y se extrajo 2 veces con C:M 2:1, durante 1 hora.

Una alícuota de C:M 2:1 se fraccionó con 0,1 N KCl en la forma descrita en la sección 9.23. Se llevó a cabo una electroforesis de las distintas fracciones en gradientes de geles de poliacrilamida, y posteriormente una fluorografía del gel, en las condiciones descritas en Métodos generales.

9.22.1. Fraccionamiento de los glicolípidos marcados

Un extracto C:M (2:1) marcado en la forma descrita más arriba y que contenía $1,8 \times 10^4$ dpm se fraccionó por pasaje a través de una columna de sílica gel H (Merck) (1 x 15 cm) ,bajo una suave corriente de nitrógeno,utilizando como solvente mezclas de polaridad creciente de cloroformo:metanol . Se recogieron fracciones de 3 ml y se midió la radioactividad en cada una de ellas.

Las fracciones radioactivas A y B (Fig 27), se evaporaron y se trataron con neuraminidasa en la forma descrita en la sección (9.23).La reacción enzimática se detuvo por agregado de igual volumen de solvente 1, y la extracción se repitió 2 veces.

La fase acuosa se liofilizó y se analizó por cromatografía en papel en solvente 7.Se utilizó como testigo NANA7, preparado en la forma descrita en Métodos Generales.

Las fases orgánicas se secaron y se rehidrolizaron con TFA 0,05 N en la forma ya descrita , luego se extrajo con 1 volumen de solvente 1 y se analizaron las fases acuosas por c.p. en solvente 5 .

Otro extracto marcado se extrajo con solución 0,1 N KCl como se describe abajo, se fraccionó en glicolípidos neutros y ácidos mediante el uso de una resina de DEAE-Sephadex y posterior purificación de los glicolípidos ácidos por pasaje a través de una columna de Unisil (sección 9.24). Se determinó la incorporación

de la radioactividad en las distintas fracciones.

9.23 EXTRACCION DE SIALOGLICOLIPIDOS

Se llevó a cabo utilizando el método recomendado por Dittmer (164), para la extracción de gangliósidos. Para ello un extracto C:M(2:1) de $1,3 \times 10^{11}$ células evaporado y disuelto en 6 ml, se extrajo con 2 ml de KCl 0,1 N. Se separó la fase superior y se reextrajo la inferior 3 veces con 3 ml de solvente 4. Las fases superiores se evaporaron y dializaron 24 hs contra agua destilada en sistema cerrado (FSKCl). Se analizó FSKCl por c.c.d en solvente 10, revelándose con el reactivo de Resorcinol/Cu dos sustancias de Rf 0,62 y 0,35.

9.23.1 Análisis realizados sobre FSKCl

a) Determinación de ácido siálico

Una alícuota de FSKCl se hidrolizó con ácido sulfúrico 0,1 N como se describió en métodos generales. Se analizó el contenido de ácido siálico por el método del Acido Tiobarbiturico (162) Por cromatografía en papel del hidrolizado en solvente 7 se revelaron con el reactivo de Acido tiobarbitúrico (231), una sustancia de R_{NAM}1,22 y otra tenue de R_{NAM}1.

Otra alícuota se hidrolizó con Neuraminidasa de C. Perfringens (Sigma), a 37°C durante 24 h, en presencia de bu-

ffer acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5 (1 ml). La reacción enzimática se detuvo por agregado de un volumen igual de C:M 2:1. Se extrajo con este solvente tres veces la fase acuosa, se liofilizó y se analizó el contenido de ácido siálico por el método del Acido Tiobarbitúrico

b) Composición del extracto FSKCl

La fase orgánica, proveniente de la hidrólisis enzimática, se trató con HCl:Metanol:Agua 3:29:4 a 78°C 18 h, se evaporó el metanol a presión reducida y se extrajeron los ácidos grasos con 2 ml de hexano 3 veces. La fase superior se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, evaporó y se procesó como se indica en Métodos generales para el análisis de ácidos grasos como ésteres metálicos, por c.g.l, utilizando las condiciones III a.

La fase inferior se llevó a pH 8,5 con NaOH 1M y se extrajo 3 veces con 2 ml de cloroformo. La fase inferior se secó y se dosaron bases de cadena larga por el Método de Lauter y Trans.

La fase superior se secó y se analizaron los azúcares componentes como acetatos de alditoles por c.g.l.

9.24 INCORPORACION IN VIVO DE (³H) ACIDO PALMITICO Y

(³H) GALACTOSA

9.24.1 Células

Formas epimastigote de T.cruzi se cultivaron en medio LIT como fue descrito anteriormente. Las células se recogieron durante el crecimiento exponencial (50-60 hs) por centrifugación a 1000 xg a 4°C, se lavaron y resuspendieron en medio Boné y Parent's (11) conteniendo 25 ug /ml de estearato de sodio. Las células se incubaron en este medio durante 24 h antes de agregar los precursores radioactivos.

9.24.2. Marcación de trypanosomas

a) Acido palmítico: El ácido palmítico (9,10(n-³H)500 mCi/mmol) que se obtuvo originalmente de Amersham disuelto en tolueno, se secó bajo corriente de nitrógeno en un erlenmeyer. El material seco se resuspendió en el mínimo volumen (20 ul) de cloroformo:etanol 1:1 (v/v) y se le agregó una suspensión de 6-8 x 10⁷ parásitos/ml, con agitación. La incubación se llevó a cabo 12 hs a 28°C, siendo la radioactividad final 20 uCi/ml.

b) Galactosa: Una suspensión de 6-8 x 10⁷ parásitos/ml se dejó 24 h en medio Boné y Parent's conteniendo 1 mg/ml de glucosa. Luego se agregó D-(1-³H) galactosa (Amersham, 10,4 Ci/mmol; 58mCi/mg; 1mCi/ml) y se dejó 12 h a 28°C, (radioactividad

final 20 uCi/ml). En ambos casos, después de la incubación, las células se lavaron 3 veces con una solución 150 mM NaCl, conteniendo 10 mM de fosfato de sodio pH 7,2 (PBS) y las células se congelaron a -20°C.

Esta marcación in vivo fue realizada en el laboratorio del Dr. Walter Colli, San Pablo, Brasil.

9.24.3 Cinética de incorporación

Para seguir la cinética de incorporación se agregaron 100 uCi de cada precursor marcado a 5 ml de una suspensión de 4×10^8 epimastigotes. Se tomaron alícuotas de 1 ml después de 4, 7, 11 y 24 h.

9.24.4 Fraccionamiento de glicoconjugados

Las células congeladas, suspendidas en agua, se sometieron a cinco ciclos de congelamiento y descongelamiento y se liofilizaron. El material seco se extrajo una vez con 6 ml de solvente 1 y dos veces con 6 ml de solvente 2, filtrando cada vez con lana de vidrio.

El material insoluble se secó en desecador y se extrajo después con 2 ml de fenol 44% a temperatura ambiente 30 minutos. Después de centrifugar a 11.000 rpm 30 minutos se retiró la fase acuosa, se agregó al fenol 0,5 ml de agua, se agitó nuevamente

30 minutos a temperatura ambiente. Luego de centrifugar en iguales condiciones, se juntó la fase acuosa a la anterior, se precipitó con 10 volúmenes de etanol 96% y se dejó una noche en heladera a 4°C. Luego se centrifugó a 6000 rpm y se separó el sedimento.

Las diversas fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis en gradiente de geles y fluorografía (Fig 31)

9.24.5. Fraccionamiento de gangliósidos

Se adoptó el método descrito por Leeden y col (185) para la purificación de gangliósidos.

Se preparó una resina DEAE-Sephadex (Acetato) A-25. Para ello se equilibraron 0,5 g de resina durante varios minutos con 10 ml de metanol:cloroformo: acetato de sodio 0,8M (60:30:8 v/v/v, Solvente B). El proceso se repitió 4 veces y se dejó toda la noche en el mismo solvente.

Luego se reemplazó el sobrenadante por 10 ml de metanol, cloroformo:agua (60:30:8 v/v/v) (Solvente A) y la resina se lavó tres veces con este solvente. A continuación se armó una columna de 0,5 x 4 cm y se lavó con 30 ml de solvente A.

Los extractos C:M provenientes de las incorporaciones de (³H) palmítico y (³H) galactosa se llevaron a seco se tomaron en 1 ml de solvente A y se sembraron en la columna de resina.

En cada caso se eluyeron los lípidos neutros con 30 ml de

solvente A y los lípidos acídicos se obtuvieron por elución con 30 ml de solvente B. Esta última fracción se evaporó y se solubilizó en 4 ml de NaOH 0,1 M en metanol, para saponificar. Después de 1 h a 37°C la solución se evaporó a la mitad de volumen y se agregó 3 ml de agua y 0,65 ml de EDTA 0,8M. Se dializó 16 hs contra agua destilada y el material retenido en la bolsa se liofilizó. El residuo se disolvió en 2 ml de C:M 8:2 (v/v), con sonicación y se aplicó a una columna de 1 g de ácido silícico (Carlo Erba), previamente lavada con cloroformo. La elución fue llevada a cabo secuencialmente con 35 ml de C:M 8:2, 75 ml de C:M: 1:1 y finalmente con 10 ml de metanol. En todos los casos se midió la radioactividad obtenida después de cada paso de purificación. Las fracciones eluidas con C:M 8:2 se analizaron por c.p.d. en solvente 14 (Fig 32) y las eluidas con C:M 1:1 con solventes 10 y 11 (Fig 33 y 34).

9.24.6. Análisis de aminoalcoholes de cadena larga

El pico I (Fig 33), de la c.c.d. de la incorporación con ácido palmítico, se extrajo de la sílica por el siguiente método: La sílica se suspendió en 0,2 ml de agua, se sonicó 5 minutos y luego se agregó 2 ml de solvente 2, se agitó 60 minutos se centrifugó y se separó el sobrenadante. La extracción se repitió 2 veces. Los sobrenadantes se juntaron y se llevaron a seco. Luego se purificó por c.c.d. bidimensional, utilizando

solvente 16 en la primera dirección y solvente 17 en la segunda dimensión . Se realizó una fluorografía (Fig 35).

Las dos sustancias detectadas (X e Y, Fig 35), se eluyeron de la placa como se explicó anteriormente. Previamente la sílica se extrajo con hexano (3 x 1 ml) para remover el 2-metilnaftaleno proveniente de la fluorografía.

Los glicolípidos extraídos se hidrolizaron con 1 ml de HCl:Metanol:agua (3:29:4) a 78°C 18 h. El hidrolizado se alcalinizó con NaOH diluído y se extrajo 2 veces con 1 ml de éter etílico. En los extractos etéreos se analizaron esfingosinas por c.c.d en solvente 13 (doble desarrollo ,Fig 36).

9.24.7 Hidrólisis con neuraminidasa

Los glicoesfingolípidos X e Y, provenientes de la incorporación con ácido palmítico se trataron con neuraminidasa como se describió en la sección (9.23). Las glicoesfingolípidos se analizaron por c.c.d. en solvente 10 (Fig 37).

9.25. FRACCIONAMIENTO DE GLICOLIPIDOS ACIDICOS

Se utilizó básicamente el procedimiento descrito en la sección 9.24 , para el fraccionamiento de glicolípidos provenientes de incorporaciones de precursores tritiados.

Células epimastigote de T.cruzi ($1,7 \times 10^{12}$, 15,7 g de células liofilizadas), se extrajeron una vez con 400 ml de solvente

1, a temperatura ambiente, con agitación, y dos veces con igual volumen de solvente 2. Se juntaron los extractos orgánicos y se evaporaron (6,1 g). El residuo se sonicó con 50 ml de solvente 2 se filtró y secó (4,8 g). El extracto se suspendió en 15 ml de solvente A, se filtró y la solución límpida se cromatografió a través de una resina DEAE Sephadex A-25 (8 g). Los lípidos neutros se eluyeron con 400 ml de solvente A (3,4 g), y los lípidos ácidos con 500 ml de solvente B (0,4 g). Esta última fracción se saponificó y dializó en iguales condiciones que en la sección 9.20., el residuo seco pesaba 200 mg.

Este residuo se fraccionó en una columna de Unisil (12 g) (Clarkson chemical Company Inc. , 200-325 mesh), eluyendo primero con 200 ml de C:M (8:2) (CM 82, 32 mg) y luego con 300 ml de C:M: (1:1) (CM 11 ,14 mg)

9.26. ANALISIS DE CM 82

CM 82 se analizó por c.c.d en solvente 14 y se reveló con reactivo de α -naftol . Se determinaron azúcares totales por el método de fenol-ácido sulfúrico y aminoazúcares por el método de Elson Morgan. Una alícuota (5,2 mg), se hidrolizó con 1 ml de HCl 6N, 24 h a 105°C, se eliminó el HCl a presión reducida y se llevó a 1,2 ml.

Se determinó fosfato total por el método de Fiske-Subbarrow(243)

y fosfato total por el metodo de Chen y col (244) . Para ambas determinaciones se utilizó una solución patrón de NaPO_4H_2 0,5mM

La presencia de aminoalcoholes fué analizada en este hidrolizado por c.p. en solvente 9.

Determinación de fosfato total

Alícuota	Absorbancia	umol Fosfato/alícuota
Sol patrón 20 ul	0,05	0,01
Sol patrón 50 ul	0,13	0,025
Sol patrón 100 ul	0,26	0,05
Sol patrón 150 ul	0,35	0,075
Sol patrón 200 ul	0,45	0,10
CM 82 50 ul	0,26	0,05

Se calculó 0,23 umol de fosfato total en 1 mg de CM 82

Determinación de fosfato inorgánico

Alícuota	Absorbancia	umol fosfato/ alícuota
Sol patrón 20 ul	0,12	0,01
Sol patrón 50 ul	0,25	0,025
Sol patrón 100 ul	0,52	0,05
Sol patrón 150 ul	0,73	0,075
CM 82 50 ul	0,51	0,05

Se calculó 0,23 umol de fosfato inorgánico en 1 mg de CM 82.

Otra alícuota (1 mg) se trató con HCl:metanol:agua 3:29:4 y se procesó como se describió en la sección 9.23.1 b) para aislar los ácidos grasos y esfingosinas.

Los ácidos grasos se trataron en la forma indicada en Métodos generales para analizar sus ésteres metílicos por c.g.l. en columna d y por c.g.l-e.m en columna f (Condiciones III a y III b, respectivamente)

Las bases de cadena larga se dosaron colorimétricamente por el método de Lauter-Trans. Se utilizó una solución patrón de dihidroesfingosina (DHE) en acetato de etilo (1mg/ml)

Alícuota	Absorbancia	ug de BCL/ alícuota
Sol patrón 5 ul	0,09	5
Sol patrón 10 ul	0,18	10
Sol patrón 15 ul	0,26	15
Sol patrón 20 ul	0,37	20
CM 82 100 ul	0,13	7,5

Se calculó 75 ug de bases de cadena larga en 1 mg de CM 82. Los azúcares componentes de CM 82 se determinaron por c.g.l. como acetatos de alditoles luego de hidrolizar esta fracción con HCL 1N como se describió en métodos generales.

9.27. PURIFICACION DE LOS GANGLIOSIDOS.

CM 11 se recromatografió en una columna de 2 g de Unisil (Clarkson Chemical Company Inc., 200-325 mesh), eluyendo

primero con 50 ml de C:M 8:2 y luego con 100 ml de C:M 1:1, recogiendo, con este último solvente, fracciones de 5 ml.

La elución se siguió por c.c.d. en solvente 12, revelando con el reactivo de Resorcinol/Cu. Se juntaron las fracciones en que eluía el componente de $Rf 0,42$ (G2TC) y las que contenían el componente de $Rf 0,50$ (G1TC). Las cuales se secaron y pesaron

Se obtuvieron 1,3 mg de G2TC y 3,2 mg de G1TC

9.27.1 Composición de G1TC y G2TC

En ambos compuestos se dosaron colorimétricamente azúcares totales, aminoazúcares, fósforo total, bases de cadena larga y ácido siálico como fue descrito en Métodos Generales

9.27.2 Azúcares componentes de G1TC y G2TC

Para la hidrólisis de ácidos siálicos se siguió la técnica recomendada por Varki (176). Luego de secar la muestra sobre P205 al vacío durante 1 día, se analizó por c.g.l-e.m. como trimetilsilil éter-trimetilsilil éster en las condiciones V, como se describió en Métodos generales.

La hidrólisis de los azúcares totales se llevó a cabo en las condiciones recomendadas para gangliósidos (206). Luego de la cual se separaron los aminoazúcares de los azúcares neutros a través de una resina Dowex 50 H+. La fracción de aminoazúcares se rehidrolizó con HCL 4N, 6h a 100 C y al igual que los

azúcares neutros, se procesaron para ser analizados como acetatos de alditol por c.g.l en las condiciones adecuadas.

9.27.3 Análisis de la ceramida de G1TC y G2TC.

Los ácidos grasos y las bases de cadena larga de G1TC y G2TC se hidrolizaron y aislaron siguiendo la técnica descripta para CM 02 .

Los ácidos grasos fueron analizados como ésteres metílicos por c.g.l en las condiciones III a y por c.g.l. e.m. en las condiciones III b. Por otra parte, las bases de cadena larga se analizaron por c.g.l.-e.m. como trimetilsililderivados en las condiciones IV b.

9.27.4 Hidrólisis enzimáticas realizadas sobre G1TC y G2TC

Alícuotas de G1TC y G2TC conteniendo 200 ug de azúcares neutros, se incubaron con neuraminidasa como ya fue descripto

La reacción se detuvo por agregado de solvente 1, posteriormente se extrajo dos veces más con este solvente . En las fases acuosas se determinó el contenido de ácido siálico.

La fase orgánica de G2TC se secó y se redisolvió en 1 ml de solvente 1 conteniendo 1 mg de Tritón X-100, se secó y se suspendió en 25 ul de buffer citrato-fosfato pH 4,3 ,se agregó 5,4 uI de β -galactosidasa y se llevó a 100 ul con agua.

La mezcla se incubó 20 hs a 37°C y luego se detuvo la reacción

por extracción con solvente 1, las fases acuosas se procesaron para analizar azúcares como acetatos de alditoles por c.g.l.

9.27.5. Marcaciones específicas realizadas sobre G1Tc y G2Tc

9.27.5.1. Marcación con NaIO₄- NaB¹⁰H₄

Alícuotas de G1Tc y G2Tc conteniendo 20 ug de azúcar total se suspendieron en 1 ml de Buffer Fosfato de sodio 0,1 M pH 7,2 y se marcaron siguiendo la técnica descrita en la sección 9.22.

Luego de la oxidación con NaIO₄ 0,02 M , la reacción se detuvo por agregado de 5 ul de etilenglicol, se agitó , y después de 10 minutos se agregó 10 ul de una solución de NaB¹⁰H₄ en NaOH₄ (pH 9), se dejó 1,5 h y se adicionó 0,2 ml de NaBH₄ (0,02 mg/ml), y luego de 30' se llevó a pH 6 con ácido acético 10%, se dializó una noche , se liofilizó , se tomó en 1 ml de C:M (1:1) y se contó la radioactividad. Los gangliósidos marcados (20.000 c.p.m de G1Tc y 25.000 c.p.m. de G2Tc), se analizaron por c.c.d. en solvente 12.

Se realizó una hidrólisis con H₂SO₄ 0,1N , en las condiciones descritas en métodos generales sobre alícuotas de G1Tc y G2Tc conteniendo respectivamente 20.000 y 10.000 c.p.m.. Paralelamente, alícuotas de la misma actividad se trataron con neuraminidasa como se describió anteriormente. Los hidrolizados se liofilizaron , se tomaron en 1 ml de solvente 1 y se extrajeron con agua, las fases acuosas se dializaron y se midió la

radioactividad presente en las aguas de dialisis.

Los extractos orgánicos provenientes de las hidrólisis enzimáticas se marcaron usando la técnica de galactosa oxidasa- NaB^3H_4 , como se describió en la sección 9.18.2. Paralelamente se marcó un testigo de GM1, provisto por el Dr. F. Bennun. Los asialoglicolípidos y GM1 marcados se extrajeron con 1 ml de solvente 1 y se analizaron por c.c.d en solvente 12.

9.27.5.2 Marcación con galactosa oxidasa- NaB^3H_4 de G1Tc y G2Tc.

Un extracto C:M 1:1 proveniente de una columna de Unisil (Sección 9.25), se marcó con galactosa oxidasa NaB^3H_4 , como se describió mas arriba. El extracto marcado (30.000 c.p.m), se cromatografió en una columna de Unisil (0,5 x 6 cm), eluyendo primero con 20 ml de C:M (8:2) y luego con 60 ml de C:M (1:1), recogiendo fracciones de 2ml. Se midió la radioactividad presente en cada una de las fracciones. Los picos correspondientes a G1Tc y G2Tc, se hidrolizaron con HCL 1N 8 h a 100°C, como se describió en los Métodos generales. Los hidrolizados se cromatografiaron a través de una resina Dowex 50 H+ (0,5 x 2 cm), eluyendo primero con 10 ml de agua y después con 20 ml de HCL 1N. Se determinó la radioactividad presente en los eluidos neutros y ácidos, los que se analizaron por c.p. en solvente 5.

9.27.6. Oxidación con Periodato de sodio de G1Tc.

Una alícuota de G1Tc, que contenía 100 ug de azúcares totales se disolvió en 200 ul de buffer Acetato de sodio 0,2 M pH 4, y se oxidó con NaIO₄ 0,05 M (30 ul), durante 48 h a 4°C (251). Luego de destruir el exceso de reactivo con 50 ul de etilenglicol durante 3 h, el producto de oxidación de G1Tc se redujo con NaBH₄ 9% disuelto en NaOH 0,2 N y se desaló por pasaje a través de una columna de Biogel P-2. El polialcohol se hidrolizó con HCl 2N, 2 h a 100°C, se extrajeron los ácidos grasos con hexano (2 x 2 ml) y se procesó para el análisis de los acetatos de alditoles por c.g.l.

9.28. AISLAMIENTO DE PLASMALOGENOS DE T.CRUZI

Se utilizó la técnica descrita por Farquar (222). Para ello un extracto Cloroformo :metanol (2:1) (1g) de epimastigotes de T.cruzi (cepa Y), se extrajo con KCl en la manera descrita anteriormente. La fase inferior, se llevó a seco con corriente de nitrógeno, y se dejó en desecador una noche.

El residuo se pasó a través de una columna de Unisil, (Clarkson Chemical Company Inc, 200-325 mesh), activada previamente, armada con éter etílico (10 x 1 cm).

Se eluyeron los lípidos no polares con Eter etílico (100 ml) y luego los lípidos polares y fosfolípidos con 150 ml de metanol

Esta última fracción se llevó a seco (120 mg) y se analizó en placa delgada de sílicagel en solvente 15. Con el reactivo descrito por Rietsema, para revelar plasmalógenos (221), se reveló una sustancia de $R_f = 0,55$.

Con el reactivo de ninhidrina se detectaron en esta fracción dos sustancias de $R_f 0,55$ y $0,25$, y finalmente con el reactivo descrito por Barrow y col , para fósforo, se detectaron 5 sustancias de $R_f 0,05$; $0,15$; $0,25$; $0,35$ y $0,55$.

Luego se realizó una separación en placa de sílica gel (20 x 20 x 0,250 cm) de 30 mg de la fracción eluída con metanol, utilizando el solvente 15. Se extrajo el plasmalógeno de la zona de $R_f 0,55$. Para ello, la sílica se suspendió en 3 ml de C:M:H₂O:Ac. acético (25:15:4:2), se sonicó durante 1 minuto y se agitó 10 minutos a 40°C. Se dejó decantar, se separó el sobrenadante y se repitió el procedimiento 2 veces mas. Los sobrenadantes se juntaron, se evaporaron a presión reducida y se analizó su pureza por c.c.d. en solvente 15. Se obtuvieron 4,5 mg del producto puro. (PLTc)

9.28.1. Estudios degradativos realizados sobre PL Tc

PL Tc se trató siguiendo la técnica recomendada por Rouser (252), para separar los aldehídos de cadena larga. Para ello, 2,25 mg de PLTC se incubó con 1 ml de Acido acético 90% a 37°C bajo nitrógeno, durante 18 hs. La reacción se detuvo por

dilución con nueve volúmenes de Cl_4C , y se evaporó a sequedad .

El residuo se disolvió en Cloroformo:Metanol 4:1 (2 ml) y se pasó por una columna de 2 g de ácido silícico. Los aldehídos se eluyeron con cloroformo:metanol (4:1) (AlPLTc), y los lisofosfátidos con Cloroformo :metanol (1:1) a (1:3) (LfPLTc).

La fracción AlPLTc se llevó a sequedad , luego se disolvió en 0,5 ml de metanol, y se agregó 30 mg de $NABH_4$ 0,5N, disuelto en 0,5 ml de agua y una gota de $NaOH$ 0,5N. La mezcla se dejó 30 minutos a temperatura ambiente, se acidificó con HCl y se agregó 0,5 ml de agua, 0,3 ml de metanol y 1,6 ml de cloroformo. Se separó la capa inferior y se reextrajo la superior con 2 ml de C:M (1:1) (253)

Una alícuota se secó sobre P205 y se trató con 20 μ l de una mezcla de HMDS:TMCS:Piridina (1:2:5), como reactivo siliante. Luego de calentar 10 minutos a $50^{\circ}C$ se analizó por c.g.l.-e.m utilizando fase ϕ , en las condiciones descritas en métodos generales.

La fracción eluída con C:M (1:1) a (1:3) (LfPLTc), se llevó a seco y a continuación se saponificó con 2 ml de KOH 2N en etanol 95% durante 2 horas a temperatura ambiente, se acidificó con HCl diluído y se extrajo con 5 ml de éter etílico 2 veces. Los extractos etéreos se juntaron, se secaron y se procesaron par analizar ácidos grasos como sus ésteres metílicos por

c.g.1, de la manera descripta en los métodos generales en las condiciones II a.

Por otra parte se hidrolizaron 2 mg de PLTc con HCl 6N, durante 24 h a 105°C, se eliminó el ácido a p.r. El residuo se disolvió en agua, se llevó a pH 8 con NH₄OH diluido, se extrajo con éter etílico (2 x 1 ml) y se llevaron a seco las fases acuosa y orgánica.

La fase acuosa se disolvió en 100 ul de agua y se tomaron 2 alícuotas de 10 ul cada una, para dosar colorimétricamente fósforo total y fósforo inorgánico. Otra alícuota se cromatografió en papel, utilizando solvente 9, durante 24 h, revelándose con ninhidrina una sustancia de movilidad igual a la de un testigo de etanolamina.

RESUMEN

El presente trabajo de tesis tuvo por objetivo principal , la identificación y caracterización de glicoconjugados, en especial sialoglicolípidos del trypanosomatideo Trypanosoma cruzi. Este protozoario es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas.

Se presentan:

- 1) Una introducción referida a la clasificación general de los protozoarios, y en particular a los de la familia *Trypanosomatidae*. Se reseñan las características morfológicas del T. cruzi y su ciclo de vida, así como la forma en que se cultiva axénicamente el parásito.
- 2) Un resumen sobre la estructura, ocurrencia , función y biosíntesis de los glicoesfingolípidos y gangliósidos de animales vertebrados y una referencia sobre los que se han encontrado últimamente en invertebrados.
- 3) Los estudios realizados sobre los glicoconjugados componentes de membrana de formas epimastigote de T.cruzi.
- 4) Los antecedentes que evidenciaban la presencia de ácido siálico en T.cruzi
- 5) La interpretación y discusión de los resultados que incluye

A) La diferenciación de las distintas fracciones subcelulares de epimastigotes de T.cruzi (cepa Tulahuén) en base a:

- i) el análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida de los glicoconjugados presentes en las mismas
- ii) Las características químicas, que incluyen la determinación de proteína y azúcar, la composición de monosacáridos y la determinación de la ausencia de glucógeno en las mismas, el cual se ha descrito como material de reserva para otros protozoarios

B) La marcación exógena de la membrana plasmática de dos líneas de la cepa Tulahuén (Tul Ø y Tul 2). Se determinó la diferente composición de glicoconjugados de membrana para las dos líneas, la cual difiere también de la cepa Y. En Tul Ø la marca se incorpora principalmente en la glicoproteína de 45 kDa (Gp45) mientras que en Tul 2, se incorpora también en una glicoproteína de 25 kDa.

C) Estudios estructurales comparativos realizados sobre Gp45 de Tul Ø y el complejo glicoproteico ABC, de cepa Y. Para ello se aislaron las glicoproteínas de extractos fenol-agua y se determinaron los monosacáridos componentes .

Se realizó una hidrólisis alcalina en condiciones de β -eliminación, de las glicoproteínas previamente marcadas con galacto-

sa oxidasa $\text{NaB}^{14}\text{H}_4$, y se determinó que en Gp45 y en el complejo ABC, existen oligosacáridos de 4 a 7 unidades de azúcar unidos a través de unión O-glicosídica a la proteína, y que poseen galactosa como uno de sus componentes. Además se determinó la presencia de cadenas unidas a la proteína por otro tipo de unión, aunque no se confirmó la naturaleza de la misma.

D) Se realizó un extracto lipídico de las células epimastigote de T. cruzi, el cual se reextrajo con KCl. En este último extracto se determinó la presencia de por lo menos dos componentes que revelaban con reactivo de gangliósidos. Se dosaron 10^4 moléculas de ácido siálico / célula, que se liberan del extracto por acción de neuraminidasa. Se determinó también la presencia de azúcar, esfingosina y ácidos grasos en la misma.

E) El análisis por EGPA, de epimastigotes marcados con la técnica de NaIO_4 - $\text{NaB}^{14}\text{H}_4$, mostró la incorporación de la radioactividad en dos glicoconjugados, el LPPG (Banda D) y en una banda de alta movilidad (Banda E). Esta última se extrajo con solvente para lípidos, y con KCl. Por fraccionamiento con columna de sílica gel H, de un extracto C:M (2:1) marcado, se obtuvieron dos fracciones A y B. En la fracción A se liberó un 30% de la radioactividad por la acción de la neuraminidasa, mientras que en la B, la marca se incorporaba como arabinosa, lo que sugiere la pre

sencia de galactofuranosa en la misma.

F) Se llevó a cabo una incorporación metabólica de (^3H)ácido palmítico y (^3H)-galactosa a las células. Se aislaron dos glicolípidos que incorporan ambos precursores (G1Tc y G2Tc).

El ácido palmítico se incorporó en una esfinganina en G1Tc y en una esfingenina en G2Tc.

Ambos glicolípidos cambiaban su movilidad en c.c.d. por la acción de la neuraminidasa, por lo que se trata de sialoglico-esfingolípidos.

Se demostró la naturaleza endógena de los mismos así como también la de los glicoconjugados A, B, C y D.

G) Se aislaron los glicoesfingolípidos G1Tc y G2Tc de un extracto C:M (2:1) de 10^{12} células. Para ello se utilizó en primer lugar una resina DEAE-Sephadex en la que se separaron los lípidos neutros de los ácidos. Estos últimos se fraccionaron por columna de Unisil, recogiendo las fracciones que eluían con C:M (8:2) y C:M (1:1). Esta última se recromatografió en una columna de características similares, obteniéndose los dos gangliosidos.

H) En la fracción C:M (8:2), se analizaron los ácidos grasos, los azúcares, y las esfingosinas presentes. No se detectó ácido

siálico.

Del análisis de las distintas c.c.d realizadas sobre extractos provenientes de las marcaciones con ácido palmítico, galactosa, IO₄-NaB³H₄ y de las reveladas con reactivos para fósforo y glicolípidos se dedujo que en la misma están presentes por lo menos un glicolípido que se marca con IO₄-NaB³H₄ por poseer galactofuranosa, un fosfoglicolípido y fosfolípidos.

1) Se analizó la composición de los gangliósidos

Para G1Tc se determinó que la relación azúcares neutros: aminoazúcares: ácido siálico: esfingosina es: 4:1:1:1, mientras que para G2Tc la relación es Azúcares neutros: ácido siálico: esfingosina 5:1:1.

Se realizaron hidrólisis ácidas específicas sobre la cadena del oligosacárido de G1Tc. Se determinó que está compuesta por Glucosa:manosa:arabínosa:galactosamina:ácido siálico en relación 2:1:1:1:1. Esta composición es distinta a la de todos los gangliósidos conocidos. Por otra parte éste es el primer informe sobre la presencia de galactosamina en T.cruzi.

Los componentes de la ceramida de G1Tc se aislaron por metanólisis y extracción de los ácidos grasos y las esfingosinas, las que se analizaron por c.g.l-e.m.

Se determinó que la base de cadena larga presente en G1Tc

es una metil esfingánina ramificada de 19 átomos de carbono, la cual se halla esterificada por ácidos grasos en cuya composición se encuentran principalmente ácido 2-metil esteárico (44%), Ac. esteárico (31%), ac. 2-metil palmítico (6,3%), Ac. palmítico (7,3%) y ac. oleico (4,6%). Los ácidos 2-metil ramificados no habían sido informados como componentes de extractos lipídicos de T.cruzi

Por marcación con galactosa oxidasa $\text{NaB}^{14}\text{H}_4$, se determinó que la radioactividad se incorpora en galactosamina en G1Tc y en galactosa en G2Tc, lo que descarta también la unión de ambos monosacáridos por el C-6 al oligosacárido respectivo.

Asimismo se marcaron los dos gangliósidos con $\text{IO}_4^- \text{NaB}^{14}\text{H}_4$. La radioactividad liberada por hidrólisis ácida y enzimática, fue la misma en ambos casos, por lo que se concluye que el ácido siálico se encuentra terminal. La movilidad de los gangliósidos marcados es similar a la del gangliosido GM1, lo cual confirma que son monosialilgangliósidos. También se ratificó el cambio en el R_f de los mismos, cuando son tratados con neuraminidasa.

Se llevó a cabo una oxidación con periodato de G1Tc. Por c.g.l. se determinó la presencia de sorbitol: glicerol y treitol en relación 2;1:0,25, lo que indica que la glucosa no fué oxidada. La presencia de treitol podría deberse a residuos de galactosamina no N-acetilada unida en posición 4.

Por metilación de G1Tc se determinó que la manosa se halla

2-O-sustituida, confirmando la relación en que se encuentran el glicerol con el sorbitol (1:2), en el análisis de los productos de la oxidación con periodato.

Se analizó la composición de la ceramida de G2Tc, utilizando las mismas técnicas que para G1Tc. Se determinó la presencia de esfingosina unida a ácidos grasos en cuya composición se encuentran principalmente ácido 2-metil palmítico (27,1%), ac. 2-metil esteárico (22,6%), Ac. 2-metil araquídico (9,6%), , Ac. esteárico (13,3%) y ac. palmítico (9,7%)

Los monosacáridos componentes de G2Tc son arabinosa, manosa, galactosa y glucosa.

El tratamiento con β -galactosidasa de G2Tc desializado liberó galactosa, indicando que el ácido siálico terminal se encuentra unido a galactosa, como es común en gangliósidos animales

J) Del extracto lipídico total se aisló un plasmalógeno, por pasaje a través de columna de Unisil y posterior separación de los lípidos más polares por c.c.d. preparativa.

El plasmalógeno (PLTc) se hidrolizó con ac. acético y se separó el aldehído del lisofosfolípido por columna de Unisil. Por c.g.l.-e.m. del aldehído reducido al alcohol se determinó la presencia de hexadecanal. El lisofosfolípido se saponificó y se analizaron los ácidos grasos

Por hidrólisis fuerte del plasmalógeno y análisis por c.p. se

determinó la presencia de etanolamina. A su vez se dosó el contenido de fosfato en PLTc, que corresponde a un mol de fosfato por mol de plasmalógeno. La movilidad en c.c.d. es similar a la informada para plasmalógenos derivados de fosfatidiletanolamina, por lo que se concluyó que la estructura de PLTc es la representada en la fig 47.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- D.H. Molineux y R.W. Ashford (1983) The biology of Trypanosoma and Leishmania, Taylor y Francis Eds., Londres, 3.
- 2.- I.R. Baker (1901) Exp. Parasitology, 13, 219.
- 3.- C. Hoare y G. Wallace (1966) Exp. Parasitol.,212, 1385 .
- 4.- G. Riou y R. Pautrizel (1969) J. Protozool.,16, 509 .
- 5.- C. Hoare (1979) " The trypanosomes of mammals. A zoological monograph", Blackwell Scientific Publications,Oxford , 60.
- 6.- J. Engel,J. Dvorak ,E. Segura y M. Crane (1982)J.Protozool.,29, 555
- 7.- V. Bongetz , J. Dvorak (1983) Am. J. Trop. Med. Hyg., 32,716.
- 8.- F. Novy y W. Mc Neal (1904) J. Inf. Diseases, 1,1.
- 9.- A. R. Taylor y J. R. Baker (1978) "The cultivation of parasites "in vitro", Blackwell Scientific Publications, Oxford, 377.
- 10.- N. Citri y N.Grossowics (1955) J. Gen. Microbiol., 13,273-
- 11.- G.J. Bone y G. Parent's (1963) J. Gen. Microbiol.,31, 261.
- 12.- S.J. Anderson y S.M. Krassner (1975) J. Parasitol.,61,144.
- 13.- H. Azevedo y I. Roitman (1978) "Methods of cultivating parasites "in vitro",eds A.R. Taylor y J.R. Baker, Acad. Press. Londres, 68.
- 14.- N. W. Andrews y W. Colli (1982) J. Protozool., 29, 264.
- 15.- IUPAC.IUB Commision on Biochemical Nomenclature (1967) Lipids,12,455.
- 16.- S. Hakomori y R.W.Jeanloz (1964) J. Biol. Chem., 238,3606.

- 17.- A. Gardas (1976) Eur. J. Biochem, 68,177.
- 18.- A.Solimany y B. Solimany (1977) Biochem. Biophys. Acta ,
486,531.
- 19.- T. Hori, M. Sugita, J. Kanabayashi y O. Itasaka (1977) J.
Biochem (Tokyo), 81 ,107.
- 20.- O. Itasaka y T. Hori (1979) J. Biochem (Tokyo),85,1469.
- 21.- E.Klenk (1935) Z.Physiol. Chem., 235,24.
- 22.- V.Vaskovsky, E.Kostelsky, V.Svetshev, I.Zhukova y G.Smirnova
(1970) Comp. Biochem. Physiol, 34,163.
- 23.- N.Kochetkov, G.Smirnova y N.Chekareva (1976) Biochim.
Biophys. Acta, 424,274.
- 24.- N.Kochetkov, I.Zhukova, G.Smirnova y I.Glukhoded (1973)
Biochim. Biophys. Acta, 326, 74.
- 25.- M.Hoshi y Y.Nagai (1975) Biochim. Biophys. Acta, 388,152
- 26.- M.Sugita (1979) J.Biochem (Tokyo),86,1765.
- 27.- N.Kochetkov, G.Smirnova y I. Gluckhoded (1982) Biochim.
Biophys. Acta, 712,650.
- 28.- R.W. Leeden y R.K. Yu (1976) en "Biological roles of sialic
acids" ,eds A.Rosenberg y L.Shengrund , Plenum N.Y. pag. 1.
- 29.- M.Chien, B.W.Agrenof (1972) J.Neurochem, 19,2307.
- 30.- R. Ghidoni, S. Sonnino, G. Tettamanti, N. Baumann, G.Reuter
y R. Schauer (1985) J. Biol. Chem. ,255, 6990.
- 31.- S. Hakomori y T. Saito (1969) Biochemistry, 8, 5082.
- 32.- B.Warren (1964) Biochim. Biophys. Acta, 264, 83.

- 33.- N.Kochetkov, O.Chizhov ,V.Kadentsev, G.Smirnova y I.Zhukova (1973) Carbohydr. Res, 27, 237.
- 34.- M. Suzuki, A. Suzuki, T.Yamakawa, E.Matsunaga (1985) J. Biochem, 97, 509.
- 35.- J.Chien y E.Hogan (1980) Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol., pg. 2183.
- 36.- S. Ando y R.K. Yu (1979) J. Biol. Chem., 254, 12224.
- 37.- S. Ando, K. Kon, M. Isobe y T. Yamakawa (1973) J. Biochem. (Tokyo), 73, 893.
- 38.- T. Yamakawa y S.Suzuki (1951) J. Biochem.(Tokyo),38, 199.
- 39.- J. Mansson, M. Vanier y L. Svennerholm (1978) J. Neurochem. 30, 273.
- 40.- H. Rauvala (1976) J. Biol. Chem, 251, 7517.
- 41.- T.Seyfried, S.Ando y R.K. Yu (1978) J.Lipid Res., 19,538.
- 42.- R. Brady, D. Mari, E.Snell (1968) J. Biol. Chem.,244,491.
- 43.- W. Stoffel, D. Le Kim, G. Sticht (1968) Z. Physiol. Chem., 349, 1637.
- 44.- S. Basy, J.R. Mosal, D. Garden (1976) en Ganglioside function, biochemical and pharmacological implication, eds. G.Porcellati, G. Tettamanti, Plenum N.Y. , p.45.
- 45.- P.H. Fishman (1974) Chem. Phys. Lipids., 13, 305.
- 46.- R.G. Spiro (1970) Ann. Rev. Biochem.,39, 599.
- 47.- S. Roseman (1970) Chem. Phys. Lipids, 5, 270.
- 48.- T.W. Keenan, D.J. Morre, D. Bassu (1974) J. Biol.Chem.

249, 310.

49.- H. Den, B. Kaufman, E. Mc.Guise, S. Roseman (1975) J.Biol. Chem., 250, 739.

50.- K. Watanabe, S.Hakomori, M. Powell, M.Yokota (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun., 92, 638.

51.- Y. Tonegawa y S. Hakomori (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., 76,19.

52.- J. Finne, T. Krusius, H. Rauvala, K. Hemminsky (1977) Eur. J. Biochem., 77,319.

53.- P. Mandel, H. Dreyfus, A. Yusufi, K. Sarlieve, J. Robert , S. Hart y G. Rebel (1980) Adv. Exp. Med. Biol., 125, 515.

54.- T.W. Keenan, D.J. Morre (1975) FEBS. Lett., 55, 8.

55.- S. Hakomori (1970) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 67,1741.

56.- R. Narimsham, J. Hay, M. Greaves, R. Murray (1976) Biochim. Biophys. Acta, 431, 578.

57.- E. Ginsburg, D. Salomon, T.Sreevalson y E. Freese (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 6049.

58.- J. Simmons, P. Fishman, E. Freese, R. Brady (1975) J. Cell. Biol, 66, 414.

59.- P. Fishman y E. Atikkan (1979) J. Biol. Chem., 254, 4342.

60.- S. Hakomori y W. Murakami (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 59, 54.

61.- S. Hakomori (1981) Ann. Rev. Biochem.,50, 733.

62.- P. Fishman, R. Brady (1976) Science, 194, 906.

- 63.- B.Mullin, P.Fishman, G.Lee, S.Alloj, F.Laley, R.Winnard ,L. Kohn y R.Brady (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 842.
- 64.- H. Wiegandt (1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 354, 1049.
- 65.- T. Itoh, Y. Li y R. Yu (1981) J. Biol. Chem., 256, 165.
- 66.- E. Klenk y W .Gielen (1963) Hoppe-Zeyler's Z.Physiol. Chem. 330, 218.
- 67.- S. Sonnino, R. Ghidoni, G. Galli y G. Tettamanti (1978) J. Neurochem., 31, 947.
- 68.- R.Yu y S. Ando (1980) Adv. Exp. Med. Biol.,125, 33.
- 69.- I. Ishizuka y H. Wiegandt (1972) Biochim. Biophys. Acta , 260, 279.
- 70.- G.Van Dessel, A.Lagrou, H.Hilderson, W.Dierick y W.Lawers (1979) J. Biol. Chem., 254, 9305.
- 71.- Y. Hirabayashi, T. Taki y M. Matsumoto (1979) FEBS. Lett. , 100, 253.
- 72.- M. Pereira, M.Loures, F. Villalta y A.Andrade (1980) J. Exp Med., 152, 1375.
- 73.- N. Nogueira, S. Chaplan, J. Tydings, J. Unkeless y Z. Cohn (1981) J. Exp. Med., 153, 629.
- 74.- B. Zingales, C. Carniol, P. Abrahamsohn y W. Colli (1979) Biochim. Biophys. Acta, 550, 233.
- 75.- M. Pereira, S. Timm, S. Costa, M. Rebello y W. De Souza (1979) Exp. Parasitol.,40, 225.

- 76.- J. Da Silveira, P. Abrahamsohn y W. Colli (1979) Biochim. Biophys. Acta, 550,222.
- 77.- M. Ferguson, A. Allen y D. Snary (1982) Biochem. J. , 207, 171.
- 78.- E. Segura, C. Vazquez, A. Bronia, J. Campos, J.Cerisola, S. Gonzales Cappa (1977) J. Protozool, 24, 540.
- 79.- B. Zingales, N. Andrews, V. Kuwayima y W. Colli (1982) Mol. Biochem. Parasitol, 6, 111
- 80.- D. Snary y L. Hudson (1979) FEBS Lett, 100,166.
- 81.- W. De Souza y H. Meyer (1975) Z. Parasitenkd, 43, 179.
- 82.- M.J. Alves, J. Da Silveira, C. De Paiva, C. Tanaka y W. Colli (1979) FEBS Lett., 99, 81.
- 83.- A. Katzin y W. Colli (1983) Biochim. Biophys. Acta, 727 403.
- 84.- R. Neal y P. Johnson (1977) Acta Trop., 34, 87.
- 85.- R. Ribeiro dos Santos, J. Marquez, C. Von Gal Furtado, J. De Ramos A. Martin, F. Koberle (1979) Tropenmed. Parasitol., 30,19.
- 86.- J.N. Wood, L. Hudson, T.M. Jessell, M. Yamamoto (1982) Nature, 296, 34.
- 87.- M. Scott y D. Snary (1979) Nature, 282,73.
- 88.- A. Parodi y L. Quesada Allue (1982) J. Biol. Chem., 257, 7637.
- 89.- J. Engel y A. Parodi (1985) J. Biol. Chem., 260, 10105.

- 90.- A. Parodi, G. Lederkremer y D. Mendelzon (1983) J. Biol. Chem., 258, 5589.
- 91.- D. Snary, M. Ferguson, M. Scott, A. Allen (1981) Mol. Biochem. Parasitol., 3, 343.
- 92.- D. Snary (1983) Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 77, 126.
- 93.- A. Sher y D. Snary (1982) Nature, 300, 639.
- 94.- M. Pereira, A. Andrade, M. Ribero (1981) Science, 211, 597.
- 95.- M. Alves y W. Colli (1975); FEBS Lett. 52, 188.
- 96.- R. Lederkremer, M. Alves, G. Fonseca y W. Colli (1976) Biochim. Biophys. Acta, 444, 85.
- 97.- R. Lederkremer, C. Tanaka, M. Alves y W. Colli (1977) Eur. J. Biochem., 74, 263.
- 98.- R. Lederkremer, O. Casal, C. Tanaka y W. Colli (1978), Biochem. Biophys. Res. Commun., 85, 1268.
- 99.- R. Lederkremer, O. Casal, A. Couto y W. Colli (1985) Eur. J. Biochem., 144, 1.
- 100.- B. Zingales, N. Martin, R. Lederkremer y W. Colli (1982) FEBS Lett., 142, 238.
- 101.- M. Gottlieb (1977) J. Immunol., 4, 65.
- 102.- D. Repka, I. Camargo, E. Santana, W. Cunha, O. De Souza, J. Sakurda, H. Rangel (1980) Tropenmed. Parasitol., 31, 239.
- 103.- N. Andrews, A. Katzin y W. Colli (1984) Eur. J. Biochem., 140, 599.

- 104.- M. Alves, G. Abuin, V. Kuwayima y W. Colli (1986) Mol. Biochem. Parasitol., 21, 75.
- 105.- B. Zingales, A. Katzin, M. Arruda y W. Colli (1985) Mol. Biochem. Parasitol., 16, 21.
- 106.- D. Snary (1985) Curr. Trop. Microbiol. Immunol., 117, 75.
- 107.- J. Scharfstein, M. Rodrigues, C. Alves, W. De Souza, W. Previato, J. Mendonça-Previato (1987) J. Immunol., 131, 972.
- 108.- A. Couto, A. Katzin y W. Colli (1984) IV Congreso PAABS Bs. As. Argentina.
- 109.- G. Blix, A. Gottschalk y E. Klenk (1957) Nature, 179, 1088.
- 110.- A. Gottschalk (1951) Nature 167, 845.
- 111.- E. Klenk y G. Uhlenbruck (1957) Z. Physiol. Chem., 307, 266
- 112.- G. Blix y E. Lindberg (1960) Acta Chem. Scand., 14, 1809.
- 113.- R. Schauer (1982) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 40, 131.
- 114.- L. Warren (1963) Comp. Biochem. Physiol., 10, 153.
- 115.- R. Schauer, G. Reuter, H. Muhlpfordt, A. Andrade y M. Pereira, (1983) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 364, 1053.
- 116.- J.F. da Silveira y W. Colli (1981) Biochim. Biophys. Acta, 644, 341.
- 117.- T. Souto-Padron y W. de Souza (1985) Biochim. Biophys. Acta, 814, 163.
- 118.- T. Kipnis, J.R. David, C.A. Alper, A. Sher y W. Dias Da Silva (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 602.
- 119.- A.S. Couto, B. Zingales, R.M. de Lederkremer y W. Colli

(1985) *Experientia*, 4, 736.

120.- J.O. Previato, A.F. Andrade, M.C. Pessolani y L.M. Previato
(1985) *Mol. Biochem. Parasitol.*, 16, 85.

121.- L. Warren (1959) *J. Biol. Chem.*, 234, 1971.

122.- H.P. Buscher, J. Casals, S. Stenzel y R. Schauer (1974) *Eur. J. Biochem.*, 50, 71.

123.- A. Gottschalk (1960) *The Chemistry and biology of sialic acids and related substances*, University Press, Cambridge, 4.

124.- E. Segura, E. Cura, I. Paulone, c. Vazquez y J.A. Cerisola
(1974) *J. Protozool.*, 21, 571.

125.- R.M. Lederkremer, N. Waksman, G.J.W. Martini y E. Segura
(1982) *Chem. Biochem. Physiol.*, 72B, 313.

126.- R.M. Lederkremer, O.L. Casal, E. Segura (1980) *Medicina*, 40, 245.

127.- M. Gottlieb (1978) *Exp. Parasitol.*, 45, 200.

128.- R.M. Lederkremer, O.L. Casal, M.J.M. Alves y W. Colli (1985)
Biochem. International, 10, 89

129.- A.N. Confalonieri, B. Zingales, N.F. Martin, W. Colli y R.M.
Lederkremer (1983) *Biochem. International*, 2, 215.

130.- R. Lopetegui, C. Sosa Miatello, M.I. La Via (1980) *Medicina*, 40, 91.

131.- A.M. Ruiz (1983) Tesis doctoral de la Universidad de
Buenos Aires (Bs.As).

132.- P.A. Gorin, E.M. Barreto-Bergter, F.S. Da Cruz (1981)

Carbohydr. Res., 88 , 177.

133.- A.M. Liddle y D.J. Manners (1957) J. Chem. Soc., 3432 .

134.- F. Huijing (1970) Clinica Chimica Acta, 30, 567.

135.- J. M. Gonçalves y T. Yamaha (1969) Am. Trop. Med. Hyg. ,
22, 39.

136.- T.L. Steck y G. Dawson (1974) J. Biol. Chem.,249, 2135.

137.- P. Plackett (1967) Biochemistry, 6, 2746.

138.- W. Jack y R.J. Sturgeon (1976) Carbohydr. Res., 49, 335.

139.- G. Avigad, D Amaral , C. Asensio y B. Horecker
(1962) J. Biol. Chem, 237,2736.

140.-A. Maradufu y A.S. Perlin (1974) Carbohydr. Res., 32, 93.

141.- R.M. Lederkremer, O.L.Casal, M.J.M.Alves y W. Colli (1980)
FEBS Lett., 116, 25.

142.- E.Segura, A.Katzin, C.Engel, E. Subias, E.D.de Isola, M.
E. Esteva, E. Lamel, A.M. di Rissio, S.M. Gonzalez Cappa
(1980) Medicina, 40 ,256.

143.- F.W.Studier (1973) J. Mol. Biol., 79, 237.

144.- J.P. Chamberlain (1979) Anal. Biochem., 98, 132.

145.- W. Colli, R.M. Lederkremer (comunicación personal)

146.- L.Mendonça-Previato, P.A.Gorin, A.F.Braga , J.Scharfstein
y J.O.Previato (1983) Biochemistry, 22, 4980.

147.- N.S. Gonzalez , D.O. Sanchez, A.C. Frasch y I.D. Algranati
(1984) Mol. Cell. Biochem., 63, 157.

148.- J.P. Mc. Daniel, P.H. Howard y J.A. Dvorak (1986) Mol.

Biochem. Parasitol., 19, 183.

149.- M.A.J. Ferguson ,D. Snary y A. Allen (1985) Biochim. Biophys. Acta, 842, 39.

150.- N. Sharon (1986) Glycoconjugate J., 3, 123.

151.- B. Anderson, N. Seno , P. Sampson , J.G. Riley ,P. Hoffman y K. Meyer (1964) J. Biol. Chem., 239, 2716.

152.- K. Tanaka y W. Pigman (1965) J. Biol. Chem., 240, 1487.

153.- R.G. Spiro (1972) Methods in Enzymology, 28,3.

154.- R. Means (1971) J. Biol. Chem.,246, 831.

155.- J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane, S. Stanley (1957) J. Biol. Chem., 226, 497

156.- M.M. Oliveira, S.L. Timm y S.C.J. Costa (1977) Comp. Biochem. Physiol., 58(B), 195.

157.- S.L. Timm, A.D. Pereira Netto, M.M. Oliveira (1982) Comp. Biochem. Physiol. 71(B), 397.

158.- D.I. Bronia, E.E. Montamat, E. Aeberhard y E.L. Segura (1976) Medicina,36, 294.

159.- D.I. Bronia, E.E. Montamat, E. Aeberhard y E.L. Segura (1978) Medicina ,38,255.

160.- J. Barreto Bergter, A.B. Vermelho, L. Hogge y P.A. Gorin (1985) Comp. Biochem. Physiol., 80(B) , 543.

161.- T.H. Liao, P.M. Gallop y O.O. Blumenfeld (1973) J. Biol. Chem., 248,8247.

162.- D. Aminoff (1961) Biochem. J., 81, 381.

- 163.- L. Svennerholm (1957) Biochim. Biophys. Acta, 24, 960.
- 164.- J.C. Ditmer y M. Wells (1969) Methods in Enzymology, 14, 514.
- 165.- G.W. Sullivan y B.E. Volcani (1974) Arch. Biochem. Biophys 163, 29.
- 166.- T.M. Seed, M. Aikava, C. Sterling y J. Rabbege (1974) Infection and Immunity, 9, 750.
- 167.- P. Rautenberg, E. Reinwalt y H. Risse (1981) Mol. Biochem. Parasitol., 4, 750.
- 168.- J.W. Fong, R. Leeden , S.Kundu y S.W. Brostoff (1976) J. Neurochem .,26, 157.
- 169.- A.Rosenberg y N. Stern (1966) J. Lipid Res., 7,1966.
- 170.- H.C.Berg (1969) Biochim. Biophys. Acta , 183, 65.
- 171.- D.R. Phillips y M. Morrison (1971) Biochemistry ,10,1766
- 172.- C.F. Wolfenson Band (1985) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, (Bs.As)
- 173.- N. Kawamura y T, Taketomi (1977) J. Biochem. ,81 ,1217.
- 174.- K. Yu y R. Leeden (1969) J. Biol. Chem 244,1366.
- 175.- H.P. Buscher, J. Casals-Stenzel y R. Schauer (1974) Eur. J. Biochem., 50,71.
- 176.- A. Varki y S. Diaz (1984) Anal. Biochem. ,137, 236.
- 177.- L.F.Wiggins (1950) Adv. Carbohydr. Chem., 5,191.
- 178.- M.R. Lifely y F.H. Cotee (1982) Carbohydr.Res.,107, 187.

- 179.-G.J. Weggin, J.P. Kammerling, F.G.J. Vlegenthart (1984)
Carbohydr. Res., 129, 149.
- 180.- R. Schauer, C. Schroder y A. Shulka (1984) Adv. Exp. Med.
Biol., 174 ,75.
- 181.- R. Caputto, H. Maccioni, A. Arce y F.A. Cumar (1976) Adv.
Exp. Med. Biol., 71, 27.
- 182.- C.M. Eppler, D.J.Morre y T.W. Kienan (1970) Biochim.
Biophys. Acta, 619, 318.
- 183.- H. Miller Podraza, R.Badley y P.H. Fishman (1982)
Biochemistry ,21, 3260.
- 184.- O. Castellani, L.V.Ribeiro y J.F. Fernandes (1967) J.
Protozool., 14, 447.
- 185.- R.W. Leeden y R. K. Yu (1973) J. Neurochem, 21, 829.
- 186.- W. Colli , N.W. Andrews, B. Zingales (1981) International
Cell Biology, H.G. Schweiger ,S. B. Heidelberg Eds. N.Y., 1980.
- 187.- F.W. Mc Lafferty (1963) Mass spectrometry of Organic Ions,
ed. F.W. Mc Lafferty, Acad. Press NY, 321.
- 188.- J.A.Mc. Closkey (1970) Topics in Lipid Chemistry Vol I
Eds. F.D. Gunstone Logos Press (N.Y.), 369.
- 189.- R.W.Leeden y R.W.Yu (1982) Methods in Enzymology, 83,139.
- 190.- K.A. Karlsson (1965) Acta Chem. Scand., 19, 2425.
- 191.- J.Seibl (1973) Espectrometría de masas, Ed. Alhambra
(Madrid), 148.
- 192.- A.J.Polito, J.Naworal y C.Sweeley (1969) Biochemistry,

8, 1811.

193.- K.A. Karlsson (1970) Lipids, 5, 878.

194.- D.C. White, A.N. Tucker y C. Sweeley (1969) Biochim. Biophys. Acta, 187, 527.

195.- H.E. Carter y R.C. Graver (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun., 29, 886.

196.- H.E. Carter, R.C. Graver y R.W. Yu (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun., 22, 316.

197.- G. Mc. Reynolds (1970) J. Chromatogr. Sci., 8, 685.

198.- R. Ruhage y E. Stenhagen (1960) Ark. Kemi, 15, 291.

199.- J. Erwin y K. Block (1963) J. Biol. Chem., 238, 1618.

200.- S. Buckner, P.E. Kolattukandy y L. Rogers (1978) Arch. Biochem. Biophys., 186, 152.

201.- J. Jurgen (1975) Hoppe Seyler's Z. Physiol Chem., 356, 1823.

202.- R. Noble, R. Steyerholm, D. Mercier y E. Lederer (1963) Nature, 199, 600.

203.- G. Reuter y R. Schauer (1986) Analyt. Biochem., 152, 39.

204.- B. Lindberg (1972) Methods in Enzymology 28, 178.

205.- D.C. De Jongh, T. Rodford, J.D. Hirbar, S. Hanessian, M. Bieber, G. Dawson y C.C. Sweeley (1969) J. Am. Chem. Soc., 91, 1728.

206.- L.A. Torello, A.S. Yates y D.K. Thompson (1980)

Chromatographia, 13, 240.

207.- J. Lonngren y S. Svensson (1974) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 29, 41.

208.- D.C. De Jongh (1965) J.Org. Chem., 30, 453.

209.- T. Ariga, M. Sekine, R.W. Yu y T. Miyakate (1982) J. Biol. Chem., 257, 2230.

210.- D. Snary (1985) Brit. Med. Bull., 41, 144.

211.- J.G. Johnson y G.A. Cross (1977) J. Protozool., 24, 587.

212.- J.M. Bobbit (1956) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 11, 1.

213.- S. Hakomori (1964) J. Biochem. (Tokyo), 55, 205.

214.- I. Iwamoni y J. Nagay (1978) J. Biol. Chem., 253, 8328.

215.- R.C. Graver y C.C. Sweeley (1966) J. Am. Chem. Soc. 88, 3643.

216.- R. Schauer (1978) Methods in Enzymology, 50, 64.

217.- J.J. Distler, G.W. Jourdan (1973) J. Biol. Chem., 248, 6772

218.- A. Savage, R. Geyer, S. Strim, E. Reinwald y H.J. Risse (1984) Mol. Biochem. Parasitol. (1984) 11, 309.

219.- M. Carroll y P. McCrorie (1986) Comp. Biochem. Physiol. (1986), 83(B), 647.

220.- B. Zingales, C. Carniol, R.M. Lederkremer y W. Colli (1986) Mol. Biochem. Parasitol. (en prensa).

221.- R.A. Reitsemá (1964) Anal. Chem., 36, 90.

222.- K. Owens (1966) Biochem. J., 100, 354.

223.- J.H. Farquar (1962) Biochim. Biophys. Acta., 60, 81.

- 224.- E. Klenk y H. Debusch (1963) Progress in the Chemistry of fats and other lipids, 5, 1.
- 225.- D. Shah y J. Schulman (1965) J. Lipid Res., 6, 341.
- 226.- G. Colacicco y M. Rapport (1966) J. Lipid. Res., 7, 258.
- 227.- Y. Antoku, T. Sakai, K. Tsukamoto, I. Gato, H. Iwashita, Y. Kuroiwa (1985) J. Neurol. Chem., 44, 1667.
- 228.- V. Achterberg, H. Fricke y G. Gercken (1986) Chemistry and Physics of lipids , 41, 137.
- 229.- W.E. Trevelyan, D.P. Procter y J.S. Harrison (1950) Nature 166, 444
- 230.- G. Toennis y J.J. Kolls (1951) Anal. Chem., 23, 823.
- 231.- Warren W. (1970) Nature, 168, 237.
- 232.- S. Burrow , F.S. Grill y J.S. Harrison (1952) Nature, 170 800.
- 233.- L. Svennerholm (1956) J. Neurochem, 1, 42.
- 234.- W.J. Esselman, R.A. Laine y C.C. Sweeley (1972) Methods in Enzymology, 28, 140 .
- 235.- L.D. Matcalfe, A.A. Schmitz y J. R. Pelka (1966) Anal. Chem. 38, 514 (1966).
- 236.- M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith (1956) Anal Chem , 28, 350.
- 237.- I.D. Fleming, H. F. Pegler (1963) Analyst, 88, 967.
- 238.- L.A. Elson, W.T. Morgan (1930) Biochem J., 27, 1824.
- 239.- L. Svennerholm (1956) Acta Soc. Med. Uppsalienses, 61, 287

- 240.- N.F. Boas, (1953) J. Biol. Chem., 204, 553.
- 241.- P.S. Chen, T.Y. Toribara y H. Warren (1956) Anal. Chem., 28, 1756.
- 242.- G.R. Bartlett (1959) J. Biol. Chem, 234, 466.
- 243.- C.H. Fiske y Y. Subbarow (1925) J. Biol. Chem., 66, 375.
- 244.- O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A. J. Farr y R.J. Randall (1951) J. Biol. Chem., 193, 265.
- 245.- C.J. Lauter, E.G. Trams (1962) J. Lipid Res., 3, 136.
- 246.- J.P. Segrest y R.L. Jackson (1972) Methods in Enzymology , 28, 402.
- 247.- E.D. Korn y P.L. Wright (1973) J. Biol. Chem., 248, 439.
- 248.- W.M. Bonner y J.D. Stedman (1978) Anal. Biochem. 89, 247.
- 249.- N.H. Behrens y E. Tabora (1978) Methods in Enzymology , 50, 402.
- 250.- J. Hudson y S. Spiro (1972) J. Biol. Chem , 247, 4229.
- 251.- R. Ando y J. Yu (1977) J. Biol. Chem. , 252, 6247.
- 252.- P.G. Rouser, G. Kritchevisky, C. Galli y D. Heller (1965) J. Am. Oil Chem. , 42, 215.
- 253.- G.M. Gray (1969) Methods in Enzymology, 14, 678.

Rundstedt

Boas

INDICE

INTRODUCCION

-Capítulo 1 : " <u>Trypanosoma cruzi</u> : taxonomía y morfología"	1
1.1. Introducción	1
1.2. Clasificación general de los trypanosomatídeos	1
1.3. <u>Trypanosoma cruzi</u>	5
1.4. Ciclo evolutivo del <u>Trypanosoma cruzi</u>	8
1.5. Estructura del <u>Trypanosoma cruzi</u>	11
1.6. Aislados de <u>T.cruzi</u>	14
1.7. Cultivo axénico de <u>T.cruzi</u>	14
-Capitulo 2 : "Glicoesfingolípidos y gangliósidos"	
2.1. Glicoesfingolípidos	16
2.2. Gangliósidos	18
2.2.1. Estructura	21
2.3. Biosíntesis de gangliósidos	27
2.3.1. Biosíntesis de bases esfingosínicas	27
2.3.2. Biosíntesis de oligosacáridos	28
2.4. Función de los gangliósidos	30
2.4.1. Organización celular	30
2.4.2. Interacción celular y diferenciación	31
2.4.3. Regulación de crecimiento celular	32
2.4.4. Transformaciones oncogénicas	32
2.4.5. Interacción con factores bioactivos	33
-Capitulo 3 : "Glicoconjugados en <u>Trypanosoma cruzi</u> "	
3.1. La membrana del <u>T.cruzi</u>	35
3.2. Glicoproteína de 90 kDa	38
3.3. Glicoproteína de 72 kDa	39
3.4. El complejo de glicoconjugados ABCD	42
3.5. Estudios realizados en otros estadíos	46
-Capitulo 4 : "Acido siálico en <u>Trypanosoma cruzi</u> "	48
4.1. Presencia de ácido siálico en la naturaleza	48
4.2. Sialoglicoconjugados en <u>T.cruzi</u>	51
DESCRIPCION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS	
-Capitulo 5 : "Análisis de glicoconjugados de cepas Tulahúen y Ypsilon en formas epimastigote de <u>T.cruzi</u> "	57
5.1. Fracciones subcelulares de células epimastigote de	

	Pag
<u>T. cruzi</u> , cepa Tulahuén 2	57
5.2. Características químicas de las fracciones subcelulares	65
5.3. Marcación de la membrana plasmática de epimastigotes de <u>T. cruzi</u> , cepas Tuahuén Ø (Tul Ø) y Tulahuén 2 (Tul 2)	66
5.4. Estudios comparativos realizados sobre la glicoproteína Gp45 de Tul Ø y ABC aisladas de cepa Y	76
5.4.1. Purificación de Gp45 y ABC, respectivamente	76
5.4.2. Composición de azúcares de Gp45 y ABC	79
5.5. Estudios de las uniones de los oligosacáridos y la porción peptídica de Gp45 y ABC	80
-Capítulo 6: "Estudios sobre glicolípidos de formas epimastigote de <u>T. cruzi</u> "	90
6.1. Lípidos totales	90
6.2. Sialoglicolípidos en <u>T. cruzi</u>	93
6.2.1. Extracción con cloruro de potasio	94
6.3. Marcación con periodato- NaB^3H_4 de células epimastigote	99
6.4. Incorporación <u>in vivo</u> de Acido palmítico y galactosa en glicolípidos de <u>Trypanosoma cruzi</u>	109
6.4.1. Cinética de incorporación de precursores marcados	109
6.4.2. Extracción de glicoconjugados de las células marcadas	111
6.4.3. Extracción de glicolípidos acídicos marcados	114
6.4.4. Análisis de los productos de incorporación del ácido palmítico	119
6.4.5. Hidrólisis con neuraminidasa	122
-Capítulo 7: "Purificación y composición de los glicolípidos acídicos de <u>T. cruzi</u> (epimastigote)"	125
7.1. Fraccionamiento de glicolípidos acídicos	125
7.1.1. Análisis de la fracción CM 82	125
7.2. Purificación de los gangliósidos	131
7.2.1. Composición de G1Tc y G2Tc	132
7.3. Análisis de la ceramida de G1Tc	133
7.3.1. Bases de cadena larga de G1Tc	134
7.3.2. Acidos grasos de la ceramida de G1Tc	137
7.4. Composición del oligosacárido de G1Tc	144
7.4.1. Análisis de ácido siálico	144
7.4.2. Análisis de los azúcares componentes de G1Tc	154
7.5. Marcaciones específicas realizadas sobre los componentes de los oligosacáridos de G1Tc y G2Tc	160
7.5.1. Marcación con periodato de sodio- NaB^3H_4	160
7.5.2. Marcación con galactosa oxidasa- NaB^3H_4	163
7.6. Estudios de oxidación con metaperiodato de sodio	

de G1Tc	pag
	167
7.7. Metilación de G1Tc	168
7.8. Composición de G2Tc	169
7.8.1. Análisis de la ceramida	169
7.8.2. Composición del oligosacarido de G2Tc	173
7.9. Conclusiones	175

-Capítulo 8: "Purificación y composición de un plasmalógeno de <u>T. cruzi</u> (epimastigote)	183
---	-----

8.1. Análisis de un plasmalógeno de epimastigotes de <u>T. cruzi</u>	183
8.2. Estudios degradativos realizados sobre PLTc	184

METODOS EXPERIMENTALES

-Capítulo 9: "Materiales y métodos"	191
-------------------------------------	-----

9.1. Consideraciones generales	191
9.2. Solventes empleados	193
9.2.1. Extracciones	193
9.2.2. Cromatografía en papel	193
9.2.3. Cromatografía en capa delgada	194
9.3. Metodos cromatográficos	195
9.3.1. Cromatografía en papel	195
9.3.2. Cromatografía en capa delgada	197
9.4. Cromatografía gas líquido	198
9.4.1. Preparación de los derivados para c.g.l.	199
9.4.2. Condiciones empleadas en c.g.l.	201
9.5. Determinaciones cuantitativas	202
9.5.1. Determinación de azúcares totales	202
9.5.2. Determinación de glucógeno	203
9.5.3. Determinación de hexosaminas	204
9.5.4. Determinación de ácido siálico	206
9.5.5. Determinación de fósforo inorgánico	207
9.5.6. Determinación de fósforo orgánico	207
9.5.7. Determinación de proteína	208
9.5.8. Determinación de bases de cadena larga	210
9.6. Cromatografía en biogel P-2	210
9.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida	211
9.8. Electroforesis en gradiente de geles de poliacrilamida	214
9.9. Fluorografía de cromatografías en capa delgada	219
9.10. Medición de radioactividad	219
9.11. Hidrólisis totales	220
9.12. Hidrólisis parciales	222

9.13. Preparación del ácido 5-acetamido-3,5 didesoxi <u>L</u> -arabino 2-heptulosónico (NANA7)	223
9.14. Preparación de maltooligosacáridos	224
"Parte experimental"	225
9.15. Cultivos	225
9.16. Estudio de fracciones subcelulares de células epimastigote de <u>T.cruzi</u> , cepa Tulahúen 2	227
9.16.1. Determinaciones realizadas sobre las fracciones	228
9.17. Extracción de glicoproteínas epimastigotes de <u>T.cruzi</u>	232
9.17.1. Extracción de una glicoproteína de epimastigotes de Tul Ø	232
9.17.2. Cromatografía en DEAE celulosa de la fracción INS I	233
9.17.3. Aislamiento del complejo glicoproteico ABC de cepa Y	234
9.18. Marcación con galactosa oxidasa- NaB^3H_4	234
9.18.1. Marcación de la membrana plasmática de <u>T.cruzi</u>	234
9.18.2. Marcación de Gp45 y ABC	235
9.18.3. Electroforesis en gradiente de geles de las membranas y glicoproteínas marcadas	235
9.18.4. Determinación de la incorporación de la radioactividad en azúcares componentes de las glicoproteínas y membranas marcadas	236
9.19. Determinación de azúcares componentes de Gp45 y ABC	237
9.20. Degradación alcalina suave de las glicoproteínas aisladas	237
9.20.1. Estudio de los productos de la degradación	237
9.21. Glicolípidos de células epimastigote de <u>T.cruzi</u> (cepa Y)	238
9.21.1. Extracción de glicolípidos	238
9.21.1. Determinaciones realizadas sobre el extracto	239
9.22. Marcación con NaIO_4 - NaB^3H_4 de epimastigotes de <u>T.cruzi</u>	240
9.22.1. Fraccionamiento de los glicolípidos marcados	242
9.23. Extracción de sialoglicolípidos	243
9.23.1. Análisis realizados sobre FSKCl	243
9.24. Incorporación <u>in vivo</u> de (^3H) ácido palmítico y (^3H) galactosa	245
9.24.1. Células	245
9.24.2. Marcación de trypanosomas	245
9.24.3. Cinética de incorporación	246
9.24.4. Fraccionamiento de glicoconjugados	246
9.24.5. Fraccionamiento de gangliósidos	247
9.24.6. Análisis de aminoalcoholes de cadena larga	248

	pag
9.24.7. Hidrólisis con neuraminidasa	249
9.25. Fraccionamiento de glicolípidos acídicos	249
9.26. Análisis de CM 82	250
9.27. Purificación de los gangliósidos	252
9.27.1. Composición de G1Tc y G2Tc	253
9.27.2. Azúcares componentes de G1Tc y G2Tc	253
9.27.3. Análisis de la ceramida de G1Tc y G2Tc	254
9.27.4. Hidrólisis enzimáticas realizadas sobre G1Tc y G2Tc	254
9.27.5. Marcaciones específicas realizadas sobre G1Tc y G2Tc	255
9.27.6. Oxidación con periodato de sodio de G1Tc	257
9.28. Aislamiento de plasmalógenos de T.cruzi	257
9.28.1. Estudios degradativos realizados sobre PLTc	258
RESUMEN	261
BIBLIOGRAFIA	269

ABREVIATURAS

Abs: Absorbancia .
Ac: Acido.
APS: Acido periódico-Schiff.
C:M: Cloroformo: Metanol.
c.c.d.: Cromatografía en capa delgada .
Cer: ceramida .
c.g.l.: Cromatografía gas líquido .
c.g.l.-e.m.: Cromatografía gas líquido acoplado a espectrometría de masa.
c.p.m.: Cuentas por minuto.
Fig: Figura.
Fuc: Fucosa .
Gal: Galactosa .
GalNH₂: Galactosamina .
Glc: Glucosa .
GlcNH₂: Glucosamina .
Inos: Inositol.
LPPG: Lipopeptidofosfoglicano .
Mr: Peso molecular relativo .
Mx: Maltooligosacárido de x unidades de glucosa .
NANA: Acido N-acetil neuramínico .
NANA7: Acido 5-acetamido 3,5-didesoxi L-arabino 2-heptulosónico.
Neu NAc: Acido N-Acetil neuramínico .
Neu NGc: Acido N-glicolil neuramínico .
n.i.: no identificado .
PAA: Poliacrilamida .
Rm: movilidad relativa .
Rf: Relación de frente .
TFA: Acido trifluoroacético .
Tr': Tiempo de retención de sustancias patrones .
Tul Ø: Tulahuén Ø .
Tul 2: Tulahuén 2 .
Y: Ypsilon .

pag. 135 donde dice

354 $(M + 1 - Me_3 SiOH) + \quad - 1$

debe decir

356 $(M + 1 - Me_3 SiOH) + \quad - 1$

pag. 170 donde dice

103 $(CH_2 SiMe_3) + \dots\dots\dots$

debe decir

103 $(CH_2O SiMe_3) + \dots\dots\dots$