

## Tesis de Posgrado

# Metabolismo de poliaminas en tripanosomátidos

Sanchez, Cecilia Palmira

1993

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Sanchez, Cecilia Palmira. (1993). Metabolismo de poliaminas en tripanosomátidos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2603\\_Sanchez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2603_Sanchez.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Sanchez, Cecilia Palmira. "Metabolismo de poliaminas en tripanosomátidos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2603\\_Sanchez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2603_Sanchez.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Metabolismo de poliaminas en  
tripanosomátidos.

Ornitina decarboxilasa de *Leishmania mexicana*.

Cecilia P. Sanchez

Director: Dr. Israel D. Algranati

Instituto de Investigaciones Bioquímicas-"Fundación Campomar"

Tesis realizada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas.

1993.

Tesis  
9603  
1/2

A Santi.  
Porque con su sonrisa enciende  
cada momento de mi vida.

Con todo mi amor.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Israel D. Algranati por su constante estímulo y sus consejos, su calidad humana, y por la confianza y dedicación que me brindó durante estos años.

A la Dra. Nélica González por su constante apoyo, el tiempo compartido y el afecto que me dedicó durante estos años.

A las autoridades del IIB-"Fundación Campomar" por haberme brindado la posibilidad de realizar este trabajo en el Instituto.

A mis compañeros de laboratorio, por los momentos compartidos.

A mis compañeros del Instituto y especialmente a mis amigos Vivian Alvarez, Daniel Bassi, Cristina Bertinetti, Olga Castro, Roberto Geremía, Oscar Marengo, Irma Mastronardi, Horacio Nastri, Alejandro Petroni y Adrián Vojnov.

A los Dres Roberto Couso, Luis Quesada y Ricardo Wolosiuk por sus consejos y ayuda en muchas ocasiones.

A Liliana Sferco, Juan Mucci, Mario Sakson, Marta Bravo y Alejandra Raimondi por brindarme la asistencia técnica.

A Federico Katzen por ayudarme en el uso de la computadora.

A mis amigas Claudia, Ellen, Sandra, Ruth y Verónica que me apoyaron a lo largo de estos años.

A Estela Moscoloni por su invaluable ayuda.

A todo el personal del Instituto sin cuya tarea y apoyo este trabajo no podría haber sido realizado.

A mis padres, hermanos, Rodrigo y Lautaro por haberme brindado el apoyo necesario que me permitió llegar al fin.

A Santi por brindarme su amor.

## ABREVIATURAS

AdoMetDC	S-adenosilmetionina decarboxilasa
ADC	Arginina decarboxilasa
$\alpha$ DFMO	$\alpha$ Difluormetilornitina
cad	Cadaverina
DAP	Diaminopropano
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
E-64	Trans-Epoxisuccinil-L-leucilamida (4-guanidino)butano
FPLC	Fast protein liquid chromatography
Hepes	N-(2-hidroxietyl)piperazina-N'-(2-ácido etanesulfónico)
MGBG	Metil glioxal bis(guanilhidrazona)
NP-40	Nonidet P-40
$\alpha$ MO	$\alpha$ Metilornitina
ODC	Ornitina decarboxilasa
PAP	Piridoxamina 5'-fosfato
PLP	Piridoxal 5'-fosfato
PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
put	Putrescina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
spd	Espermidina
spn	Espermina
TCA	Acido tricloroacético
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
V <sub>o</sub>	Volúmen de exclusión
V <sub>e</sub>	Volúmen de elución

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>10</b>
1. Características generales de las poliaminas.	10
2. Metabolismo de poliaminas.	13
3. Características generales de las enzimas de la biosíntesis de poliaminas.	16
3.1. Ornitina decarboxilasa.	16
3.1.1. Gen de ODC.	16
3.1.2. mRNA de ODC.	18
3.1.3. Características de la enzima.	18
3.1.4.1. Inhibidores reversibles de la ODC.	22
3.1.4.2. Inhibidores irreversibles de la ODC.	24
3.2. S-adenosilmetionina decarboxilasa.	26
3.2.1. Gen de AdoMetDC.	26
3.2.2. mRNA de AdoMetDC.	26
3.2.3. Características de la AdoMetDC.	27
3.2.4. Inhibidores de la AdoMetDC.	27
4. Regulación de la biosíntesis de poliaminas.	28
4.1. Regulación de la ODC.	29
4.2. Regulación de la AdoMetDC.	30
4.3. Mecanismos regulatorios que involucran a la SAT y a la poliamina oxidasa.	33

5. Funciones celulares y moleculares de las poliaminas.	3 4
5.1. Interacciones de las poliaminas y los ácidos nucleicos.	3 5
5.2. Interacciones de las poliaminas y la síntesis de proteínas.	3 7
5.3. Interacciones de las poliaminas y las proteín kinasas.	3 8
5.4. Poliaminas y diferenciación celular.	3 9
6. Poliaminas en protozoos.	3 9
7. Metabolismo de poliaminas en <i>T.brucei</i> .	4 2
8. Objetivos del presente trabajo.	4 5
<b>II. MATERIALES y METODOS.</b>	4 7
1. Descripción de las cepas.	4 7
2. Medios utilizados.	4 7
2.1. Medio de Warren ( modificado ).	4 7
2.2. Medio D-MEM.	4 8
2.3. Solución PBS.	4 8
3. Condiciones de cultivo.	4 8
4. Determinación del contenido de poliaminas.	4 9
4.1. Análisis por cromatografía en capa delgada.	4 9
4.2. Electroforesis en papel.	5 0
4.3. Cromatografía descendente en papel.	5 0

5. Captación y conversión <i>in vivo</i> de poliaminas y aminoácidos básicos.	5 1
5.1. Captación de poliaminas.	
5.2. Captación de aminoácidos básicos radiactivos.	5 1
5.3. Metabolismo de poliaminas y de aminoácidos básicos.	5 2
6. Síntesis de proteínas y determinación de la "vida media" de la ODC.	5 3
7. Determinación de la actividad de Ornitina decarboxilasa.	5 3
8. Determinación de la actividad de Arginina decarboxilasa.	5 5
9. Modificación de la actividad de ODC por la adición de diversos metabolitos a cultivos de <i>L.mexicana</i> .	5 6
10. Análisis cinéticos de la actividad de ODC.	5 6
10.1. Modulación de la actividad enzimática por poliaminas y análogos.	5 6
10.2. Inhibición de la actividad enzimática por análogos de la ornitina.	5 7
10.2.1. Inhibición por $\alpha$ DFMO.	5 7
10.2.2. Inhibición por $\alpha$ Metilornitina.	5 7
10.3. Preparación de la apoenzima de la ODC.	5 7
11. Purificación de la ODC de <i>L.mexicana</i> .	5 8
11.1. Preparación del extracto enzimático.	5 8
11.2. Fraccionamiento con solventes orgánicos.	5 9
11.3. Cromatografía de intercambio iónico.	5 9
11.4. Cromatografía de hidrofobicidad.	5 9
11.5. Cromatografía a través de tamiz molecular.	6 0
11.6. Cromatografía en fase reversa.	6 0



12. Análisis de la purificación de la ODC por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.	60
13. Determinación de la actividad de ODC en geles de poliacrilamida no desnaturizantes.	61
14. Determinación del peso molecular de la ODC.	62
15. Determinación del peso molecular de la subunidad de la ODC.	62
15.1. Unión específica a $\alpha$ DFMO radiactivo.	62
15.2. Disociación de la enzima nativa aislada por electroforesis no desnaturizante.	63
16. Inmunoprecipitación de la ODC de <i>L.mexicana</i> .	63
17. Determinación de la concentración de proteínas.	64
<b>III. RESULTADOS.</b>	
1. Contenido endógeno de poliaminas en <i>L.mexicana</i> y <i>T.cruzi</i> .	65
2. Captación de poliaminas por <i>L.mexicana</i> y <i>T.cruzi</i> .	67
3. Captación de aminoácidos básicos por <i>L.mexicana</i> y <i>T.cruzi</i> .	68
4. Caminos biosintéticos de poliaminas en <i>L.mexicana</i> y <i>T.cruzi</i> .	69
5. Detección y caracterización de la ODC de <i>L.mexicana</i> .	73
5.1. Detección de la enzima.	73
5.2. Estequiometría de la reacción catalizada por la ODC.	75
5.3. Requerimientos de la ODC de <i>L.mexicana</i> .	77

6. Propiedades cinéticas de la ODC de <i>L.mexicana</i> .	7 8
6.1. Determinación de la constante de afinidad para la ornitina.	7 8
6.2. Determinación de la constante de afinidad para el cofactor ( PLP ).	8 0
6.3. Modificación de la actividad de ODC de <i>L.mexicana</i> por el efecto de diversos metabolitos.	8 1
6.4. Determinación de la constante de inhibición para la putrescina.	8 2
6.5. Inhibición de la ODC de <i>L.mexicana</i> por análogos de la ornitina.	8 3
6.5.1. Inhibición por $\alpha$ DFMO.	8 3
6.5.2. Inhibición por $\alpha$ MO.	8 4
6.6. Efecto de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de la ODC.	8 5
6.6.1. Influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática	8 5
6.6.2. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la ODC.	8 6
7. Efecto de la eliminación del PLP de la ODC. Obtención de apoenzima y reconstitución de la holoenzima.	8 7
8. Purificación de la ODC de <i>L.mexicana</i> .	8 9
9. Pureza de la ODC de <i>L.mexicana</i> .	9 3
10. Determinación de la actividad de ODC en geles de poliacrilamida no desnaturizantes.	9 4
11. Determinación del peso molecular de la ODC de <i>L.mexicana</i> .	9 5
11.1. Determinación del peso molecular de la subunidad proteica.	9 5
11.2. Determinación del peso molecular	

de la holoenzima.	98
12. Inmunoprecipitación de la ODC de <i>L.mexicana</i> .	99
13. Regulación de la ODC de <i>L.mexicana</i> .	100
13.1. Actividad enzimática de la ODC de <i>L.mexicana</i> a lo largo de la curva de crecimiento del parásito.	100
13.2. Estimación de la "vida media" de la ODC y modificación de la actividad enzimática por el agregado de poliaminas.	101
13.3. Efecto del agregado de $\alpha$ DFMO a cultivos de <i>L.mexicana</i> : modificación de los niveles intracelulares de poliaminas y de la actividad de ODC.	104
<b>IV. DISCUSION.</b>	107
<b>V. CONCLUSIONES.</b>	115
<b>VI. BIBLIOGRAFIA.</b>	116

## RESUMEN

Las poliaminas son compuestos esenciales para el crecimiento y la proliferación celular; por este motivo se realizan grandes esfuerzos para la búsqueda de inhibidores selectivos de la biosíntesis de estas sustancias con el objeto de detener el crecimiento de células tumorales, así como de los microorganismos causantes de infecciones.

Estudios recientes han propuesto el empleo de inhibidores de la biosíntesis de putrescina como una herramienta terapéutica útil para controlar el crecimiento de parásitos intracelulares. Por esta razón se decidió estudiar el metabolismo de poliaminas en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana* con el fin de encontrar diferencias en la biosíntesis de estas poliaminas entre el protozoo y la célula del mamífero huésped con el objeto de encontrar blancos específicos que al ser inhibidos determinen el bloqueo de la proliferación permitiendo desarrollar nuevas estrategias quimioterápicas contra el Mal de Chagas y la Leishmaniasis.

Se ha observado que los niveles intracelulares de poliaminas en *T.cruzi* en su forma epimastigote correlacionan con la fase de crecimiento. La putrescina, espermidina, espermina y cadaverina alcanzan los valores máximos en la etapa logarítmica y luego disminuyen hacia la fase estacionaria de crecimiento. En *L.mexicana* se observó un resultado similar pero en este parásito sólo se detectó putrescina y espermidina.

La captación de poliaminas y sus probables precursores ( ornitina, arginina y lisina ) por *T.cruzi* y *L.mexicana*, como la conversión *in vivo* de dichos aminoácidos en poliaminas sugieren que en los tripanosomas la mayor parte de estas sustancias son transportadas al interior de las células desde el medio externo, mientras que en *Leishmania* parece prevalecer la biosíntesis de las poliaminas a partir de ornitina.

Se determinó que los extractos de *L.mexicana* poseen una alta actividad de Ornitina decarboxilasa ( ODC ). Se caracterizaron los requerimientos para la máxima actividad catalítica, así como

diferentes propiedades de la enzima en relación a su estructura y la regulación de su actividad.

La adición de cicloheximida y de poliaminas a los cultivos mostraron que la ODC de *L.mexicana* es estable y que su degradación no es regulada por poliaminas. La ODC es inhibida tanto *in vivo* como *in vitro* por la adición de  $\alpha$  DFMO.

Se observó que la actividad enzimática es fuertemente dependiente de la presencia de su coenzima, el piridoxal 5'-fosfato. La enzima preparada en presencia de concentraciones saturantes de PLP es más resistente a la inactivación por efecto de la temperatura y es menos sensible a la acción de inhibidores.

Por otra parte, se observó que la enzima obtenida en ausencia del cofactor contiene PLP endógeno, ya que la remoción total de la coenzima por tratamiento con hidroxilamina produce la apoenzima inactiva, la cual requiere PLP para recobrar su actividad enzimática mediante una unión que parece inducir cambios conformacionales de la proteína.

Probablemente, la ODC no presenta homología estructural en sus regiones antigénicas con la enzima aislada de células animales, ya que no se observó reacción cruzada cuando se inmunoprecipitó la ODC del parásito con un anticuerpo policlonal contra ODC de riñón de ratón.

La enzima se purificó parcialmente a partir de promastigotes de *L.mexicana* mediante la precipitación con acetona y cromatografías de intercambio iónico en DEAE Sepharosa, de hidrofobicidad en Phenyl Superosa, de exclusión molecular en Superosa 6 y en fase reversa con una columna C<sub>4</sub>, lográndose una purificación de 2300 veces.

Los análisis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y de cromatografía en Sephacryl S-200 indican que la subunidad proteica o el principal producto de su proteólisis tendría un peso molecular aparente de 60 kDa, mientras que el de la proteína nativa sería de aproximadamente 200 kDa. Estos resultados sugerirían que la ODC estaría formada por tres o cuatro subunidades.

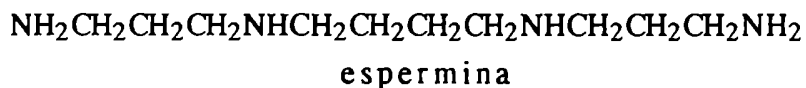
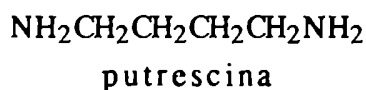
## I. INTRODUCCION

### 1. Características generales de las poliaminas

Las poliaminas son un grupo de compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular que se encuentran en casi todos los seres vivos.

Debido a la estructura química relativamente simple y a su naturaleza anfipática, estas bases orgánicas presentan una gran variedad de interacciones con los diferentes componentes celulares.

Las poliaminas más estudiadas y de mayor distribución en la naturaleza son (1,2):



La estructura policatiónica de estos compuestos determina que a pH neutro se encuentren cargados positivamente, lo que les permite unirse electrostáticamente a diversas macromoléculas como ácidos nucleicos, fosfolípidos y proteínas. Por otra parte pueden interaccionar hidrofóbicamente con estructuras como las membranas celulares.

Las poliaminas se encuentran generalmente en forma libre, pero también son halladas como derivados acetilados, formando parte de moléculas de alcaloides o unidos a macromoléculas.

Los principales derivados acetilados son (3,4):

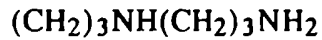
N<sup>1</sup>-acetil espermidina  
N<sup>8</sup>-acetil espermidina  
N-acetil putrescina  
N<sup>1</sup>-N<sup>8</sup> diacetil espermidina

Entre las poliaminas conjugadas a otros compuestos químicos se pueden mencionar: Glutathionil-espermidina que fue encontrada en *E.coli* cultivada hasta su fase estacionaria (5) y la Bis-glutathionil espermidina, aislada de *Crithidia fasciculata*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania mexicana*. Este compuesto llamado tripanotiona (6) funciona como cofactor en la reducción del glutatión.

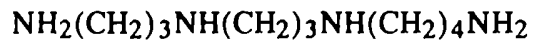
Las poliaminas también forman parte de antibióticos, como los aminoglicósidos bleomicina A5 y A6 (7) y las edeínas A y B que son oligopéptidos lineales conjugados a espermidina ( edeína A ) o a guanil espermidina ( edeína B ) (8).

También se han aislado poliaminas unidas covalentemente a macromoléculas: la putrescina unida a un residuo de lisina da lugar al aminoácido hipusina que se ha encontrado en una proteína ácida de peso molecular 18000 Da identificada como factor de iniciación de la síntesis proteica en eucariotes superiores (9); la putrescil timina es una pirimidina modificada que reemplaza el 50% de los residuos de timina en el DNA del bacteriófago W-14 (10).

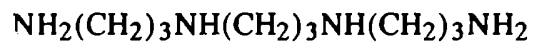
En diversas bacterias se han encontrado otras poliaminas como la hidroxiputrescina, aislada de *Pseudomonas* sp (11). Una variedad de nuevas poliaminas se encontraron en organismos termófilos como *Thermus thermophilus*. Entre ellas podemos mencionar (12-14):



Norespermidina



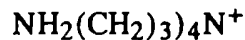
termoespermina



Termina



Tri( 3 aminopropil ) amina



Tetra( 3 aminopropil ) amonio

Las concentraciones relativas de estas poliaminas depende de la temperatura de crecimiento de las bacterias. Aunque se desconoce la función de estas aminas, se piensa que ellas podrían estabilizar el DNA o los ribosomas protegiéndolos de las altas temperaturas de crecimiento. Algunas de estas poliaminas también se han encontrado en bacterias mesófilas y en algunos eucariotes (15).

Se han realizado grandes esfuerzos para conocer las estructuras celulares específicas donde se localizan las poliaminas. Se ha observado que durante la ruptura celular estas poliaminas se redistribuyen formando complejos con los poliácidos intracelulares.

Estudios realizados *in vivo* empleando técnicas de resonancia magnética nuclear parecen indicar la asociación no covalente de poliaminas a estructuras de membrana o ribosomas (16). Se ha observado que existen aproximadamente 13 sitios de interacción entre la espermidina y la molécula de tRNA, de los cuales entre 2 a 4



moléculas de la poliamina están asociadas por uniones electrostáticas de alta afinidad, mientras que el resto serían uniones débiles del tipo puente hidrógeno (16).

En *Neurospora crassa* se ha demostrado que tanto la putrescina como su precursor, la ornitina, se encuentran localizados en la vacuola (17,18).

## 2. Metabolismo de poliaminas

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina se encuentran esencialmente en todos los tipos celulares eucarióticos estudiados. La mayoría de los microorganismos bacterianos son capaces de producir solamente putrescina y espermidina (19).

Aunque la función fisiológica específica de estas aminas aún no ha quedado totalmente aclarada a nivel molecular, estudios recientes muestran que la concentración de dichas sustancias está altamente regulada y que los procesos de proliferación y diferenciación celular requieren la continua síntesis de estas bases orgánicas (20).

En la Figura 1 se muestran los caminos biosintéticos de las poliaminas en microorganismos, plantas y organismos superiores (21).

El aminoácido ornitina, que puede ser tomado del plasma o sintetizado en la célula animal a partir de la arginina por la acción catalítica de la arginasa, es convertido en putrescina por la ornitina decarboxilasa ( ODC).

Esta poliamina da origen a la espermidina por la adición de un grupo aminopropilo mediante una reacción catalizada por una aminopropiltransferasa denominada espermidina sintetasa. Una segunda aminopropiltransferasa llamada espermina sintetasa agrega a la espermidina un nuevo grupo aminopropilo, originando la espermina.

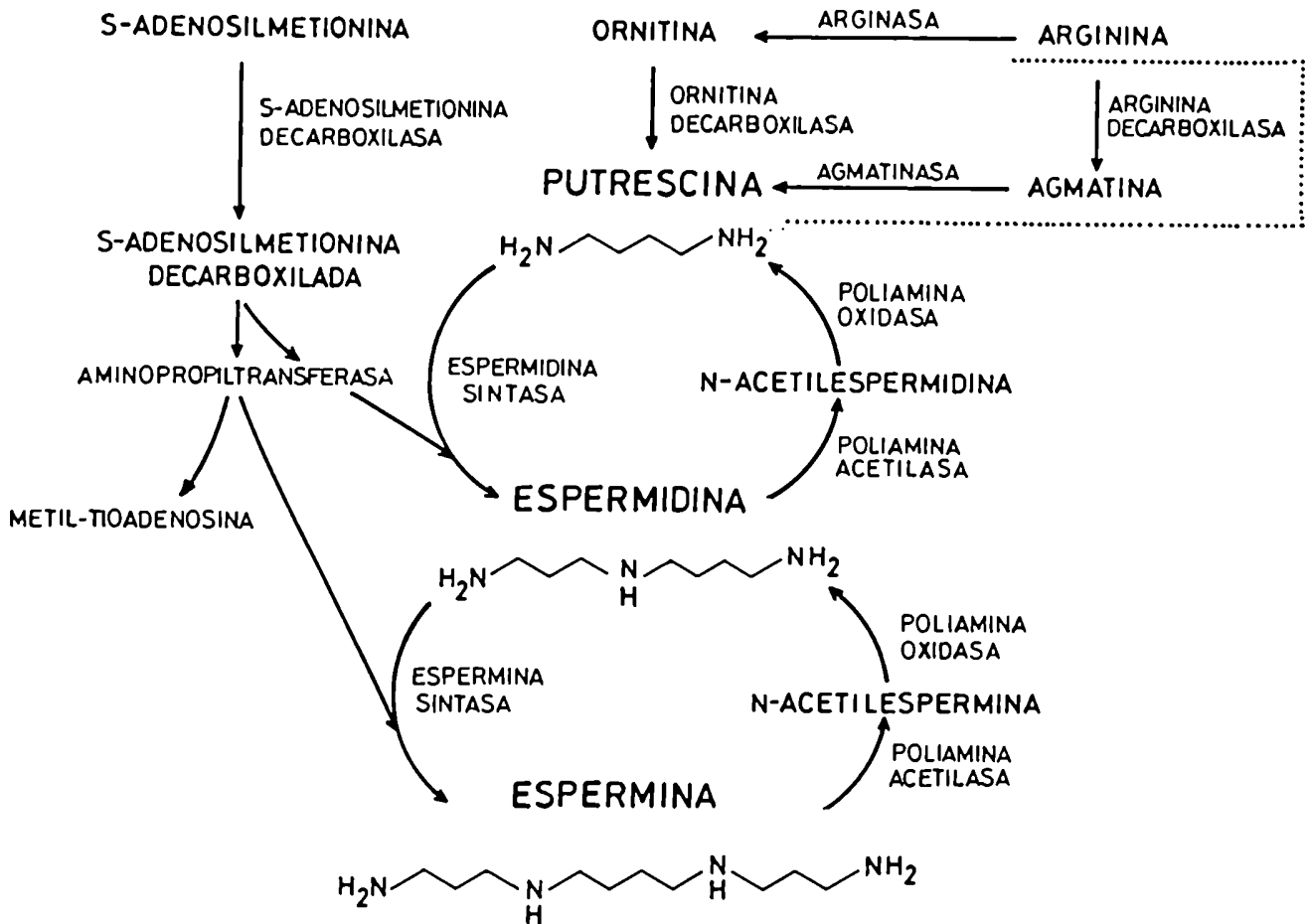


Figura 1: Caminos de biosíntesis de poliaminas en mamíferos, plantas y bacterias.

El compuesto dador de grupos aminopropilo es S-adenosilmetionina ( AdoMet ) decarboxilado, que se forma a partir de la S-adenosilmetionina por la acción de la S-adenosilmetionina decarboxilasa ( AdoMet DC ). En células animales el contenido de AdoMet decarboxilado es muy bajo y las actividades de las

aminopropiltransferasas son reguladas por la disponibilidad de este sustrato. La S-adenosilmetionina deriva del aminoácido metionina.

El otro producto de las reacciones catalizadas por las aminopropiltransferasas es 5' metiltioadenosina ( MTA ). Esta sustancia es hidrolizada por la acción de la MTA fosforilasa; la adenina que se forma retorna al "pool" de purinas de la célula y el compuesto 5' metiltioribosa-1-fosfato remanente es convertido en metionina.

Las reacciones enzimáticas catalizadas por las aminopropiltransferasas son irreversibles, pero tanto la espermidina como la espermina pueden ser convertidas en putrescina por la acción combinada de dos enzimas, espermidina/espermina-N-acetiltransferasa ( SAT ) y poliamina oxidasa ( enzima dependiente de FAD ). SAT cataliza la conversión de espermina en N-acetilespermina, siendo acetilCoA el dador del grupo acetilo. El compuesto N-acetilespermina es degradado por la acción de la poliamina oxidasa originando espermidina y 3-acetamidopropanal. Similarmente, la espermidina es sustrato para la SAT que origina N-acetilespermidina, cuya oxidación produce putrescina y 3-acetamidopropanal.

En organismos procarióticos (22) y en plantas (19) la putrescina puede ser sintetizada por dos vías: a partir de ornitina o de arginina. Este aminoácido es decarboxilado por la arginina decarboxilasa ( ADC ) dando origen a agmatina, y esta sustancia sufre posteriormente la eliminación de urea mediada por la agmatina ureohidrolasa ( agmatinasa ) y se convierte en putrescina.

Las enzimas claves para la regulación del camino biosintético en bacterias y plantas son ODC, ADC y AdoMetDC.

### *3. Características generales de las enzimas de la biosíntesis de poliaminas.*

#### *3.1. Ornitina decarboxilasa.*

##### *3.1.1. Gen de ODC.*

Numerosos estudios han demostrado que líneas celulares expuestas por largos períodos al compuesto  $\alpha$  DFMO ( que es un inhibidor irreversible y específico de la ODC ) responden a la disminución del contenido endógeno de poliaminas con la amplificación del gen de la ODC (23,24). Se observó un efecto similar en células mutantes deficientes en arginasa y cultivadas en un medio no suplementado con ornitina (19).

Los análisis por "Southern blot" del DNA genómico de ratón digerido con endonucleasas muestran numerosas bandas de hibridización con una sonda específica para ODC, lo que parece indicar la presencia de una familia de genes. Cuando se analiza el DNA aislado de células resistentes a  $\alpha$  DFMO se observa que solo el fragmento de 6 a 7 kb se encuentra altamente amplificado sugiriendo que en el genoma hay un gen activo y que el resto de las bandas corresponderían a pseudogenes (23-25).

Algunas de las líneas celulares resistentes  $\alpha$  DFMO contienen un elevado exceso de mRNA y en ellas la síntesis de ODC puede alcanzar un 20% del total de proteínas formadas.

La Figura 2 muestra la organización del gen de ODC de ratón (26).

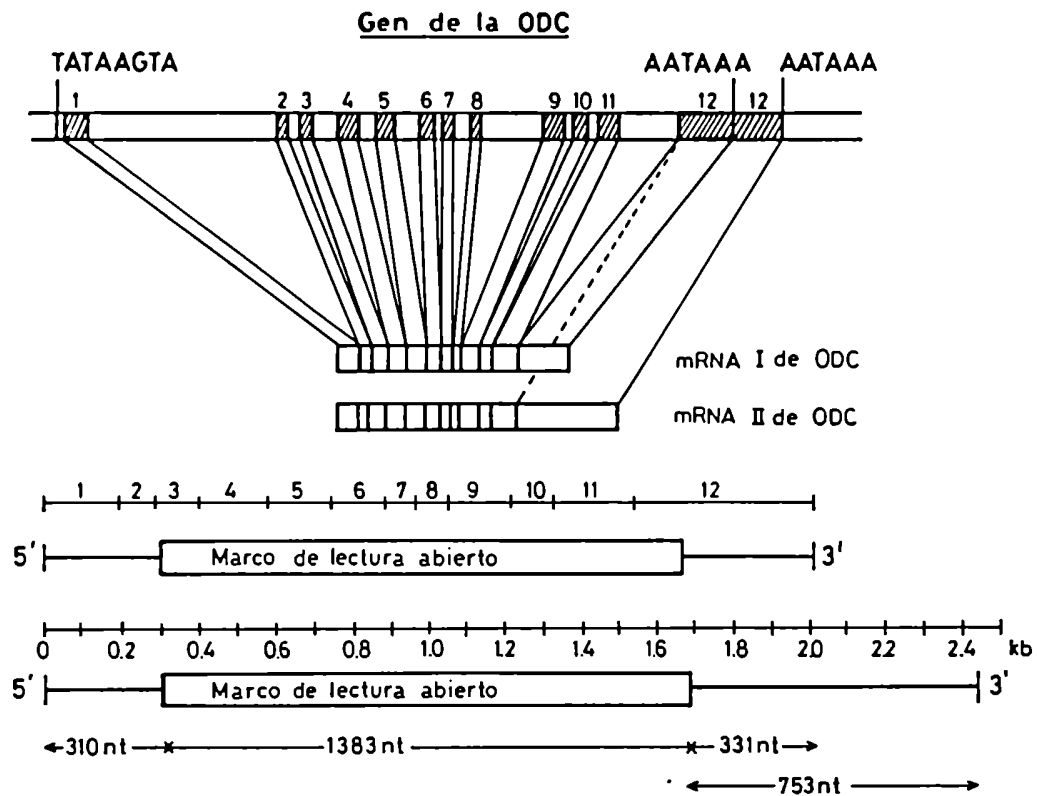


Figura 2: Estructura general del gen de la ODC de ratón y de los dos mRNA alternativos. Los transcritos primarios son procesados a mRNA que contienen regiones 5' y 3' no traducidas y un marco de lectura abierto que se traduce en una proteína de 461 aminoácidos.

La secuencia codificante se encuentra interrumpida por 11 intrones. Dos de ellos están en la secuencia leader del extremo 5' que no es traducida. En esta región se han encontrado numerosos elementos asociados a la regulación genética: TATA box, CAAT box, secuencias consenso para la unión del cAMP, el factor de transcripción SP<sub>1</sub> y una zona rica en C-G. El último exón que no se traduce contiene dos secuencias consenso para poliadenilación ( AATAAA ). Se ha observado que este gen se encuentra metilado; sin

embargo aún no se ha determinado si este evento es importante para la regulación de la actividad del gen.

Recientemente se han analizado las secuencias genómicas del gen de ODC de *S.cerevisiae* (27), *Xenopus leavis* (28), *T.brucei* (29) y *Leishmania donovani* (30). Estos genes carecen de intrones.

### 3.1.2. mRNA de ODC.

Diversos estudios han mostrado que células de ratón, rata y hamster expresan dos tipos de mRNA correspondientes a ODC. La extensión de estas especies de RNA es de 2 a 2.4 kb y 2.6 a 2.7 kb (26). Se considera que esa heterogeneidad se debe a los dos sitios probables de poliadenilación ( Figura 2 ). En tejidos de humanos se encontró un solo tipo de mensajero cuya longitud es menor a 2 kb.

Los mRNA de ODC contienen en el extremo 5' una secuencia leader de 312-313 pb. Entre las posiciones -297 y -196, 85 de las 102 bases son G o C. Esta porción de RNA posiblemente forma estructuras secundarias estables. Algunos autores sugieren que esta formación podría modular la regulación de la traducción y que las poliaminas podrían afectar directa o indirectamente esta estructura (24,31-33).

Recientemente se ha observado que *L.donovani* expresa dos especies de mRNA de 4.8 y 6.5 kb. Estos mRNA comparten ciertas similitudes con los mensajeros de las células animales: poseen una secuencia "leader" en el extremo 5' capaz de formar estructuras secundarias estables y la diferente extensión de las especies estaría determinada por dos posibles sitios de poliadenilación (30).

### 3.1.3. Características de la enzima.

La secuencia de aminoácidos de la ODC de rata, ratón y células humanas se ha deducido a partir de la secuencia de nucleótidos del DNA genómico y del cDNA.

La proteína de células humanas contiene 461 aminoácidos. El peso molecular calculado de la subunidad proteica sería de 51 kDa. La enzima es un homodímero (26).

Recientemente se ha establecido la localización del sitio activo. Se observó que la secuencia comprendida entre los residuos 290 a 340 conforman un dominio fuertemente hidrofílico (26). Esta región se encuentra altamente conservada en las proteínas aisladas de rata, ratón, células humanas, *T.brucei* y *L.donovani*. Estudios de unión al  $\alpha$  DFMO radiactivo mostraron que este compuesto se une covalentemente a una cisteína ubicada en la posición 360 que está ubicada en el nonapéptido WGPTCDGL(I)D conservado en las diferentes ODC de los organismos eucariotas descritos. Por otra parte, Coffino y colaboradores (34) observaron que la proteína que contenía los primeros 423 aminoácidos mantenía la capacidad catalítica, en tanto que si se eliminaban 8 aminoácidos más la enzima se inactivaba.

La proteína contiene 12 cisteínas, lo que sería consistente con el requerimiento de tioles para la actividad enzimática. Esta dependencia estaría relacionada con el mantenimiento de las cisteínas en su forma reducida. Probablemente las cisteínas ubicadas en la vecindad del sitio activo ( en la posición 70, adyacente a la lisina que interaccionaría con el PLP, y en la posición 360 ) sean las candidatas para explicar el marcado requerimiento de agentes reductores de la actividad enzimática.

Por otra parte la lisina que formaría la base de Schiff reversible con el PLP se identificó como aquella ubicada en la posición 69. Este aminoácido está presente en las ODC aisladas de células animales, tripanosomas, hongos, etc., y se encuentra ubicado en el heptapéptido PFYAVKC que también está conservado en las diferentes ODC descritas (35).

La secuencia de la ODC de ratón contiene dos regiones ricas en prolina, ácido glutámico, serina y treonina ( denominas secuencias

PEST ) que serían importantes en el proceso de degradación de las proteínas con vida media corta (36). Estas regiones se encuentran ubicadas en la porción carboxi terminal de la proteína, y la más cercana al extremo estaría directamente relacionada con la inestabilidad de la enzima ( Figura 3 ).

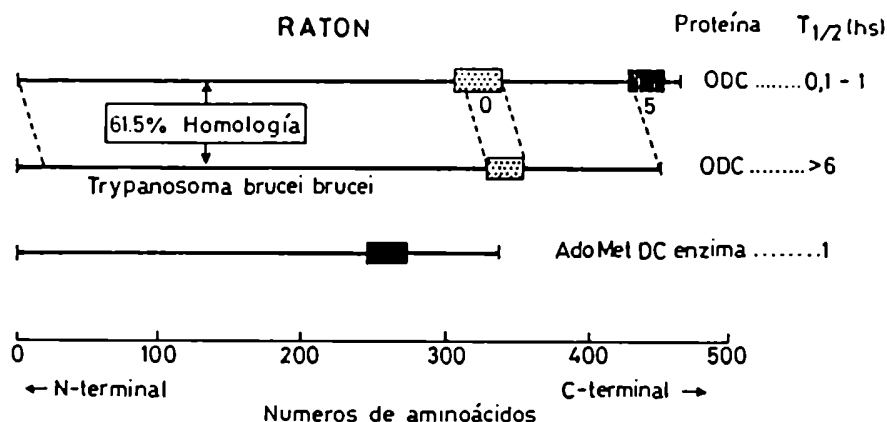


Figura 3: Ubicación de las regiones PEST en la ODC de ratón y tripanosoma y en la AdoMetDC de ratón y su relación con la velocidad de recambio ( $T_{1/2}$ ).

Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la serina de la posición 303, que se encuentra ubicada en la región PEST interna, se fosforila por la acción de la Caseín kinasa II ( esta enzima es activada por las poliaminas ). No existe evidencia concluyente del posible rol regulatorio de esta modificación post-traduccional sobre la actividad enzimática o la estabilidad proteica (37).

Recientemente, se ha deducido la secuencia peptídica de la ODC de *S.cerevisiae* (27), *X.leavis* (28), *T.brucei* (29) y *L.donovani* (30)

La secuencia peptídica de las enzimas de los organismos eucariotas muestran muy poca identidad con la secuencia de la ODC biosintética y biodegradativa de *E.coli* y de *Lactobacillus* sp 30a.



La proteína de la levadura muestra un 40% de identidad con respecto a la enzima de células animales. La subunidad proteica está formada por 466 residuos.

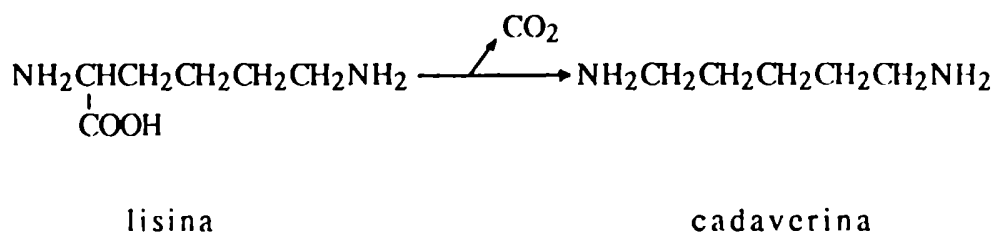
La ODC de *T.brucei* tiene un 61.5% de identidad respecto a la proteína aislada de células de ratón. Las mayores diferencias en la secuencia peptídica se encuentran en los extremos. El amino terminal se extiende 20 residuos aminoacídicos en tanto que el carboxi terminal se encuentra truncado ( faltan 36 aminoácidos ). Esta proteína carece de una de las secuencias PEST, que como se mencionó anteriormente parece importante en el mecanismo de degradación. Estudios recientes han mostrado que la ODC del parásito tiene una menor velocidad de recambio, con una vida media del orden de 6 hs (24).

La secuencia peptídica de la ODC de *L.donovani* deducida a partir del DNA genómico estaría formada por 707 aminoácidos correspondiendo a una molécula de 77 kDa. Esta proteína presenta una extensión de 200 aminoácidos en el extremo amino cuando se la compara con la ODC de otros organismos eucarióticos. Similarmente a lo observado para la ODC de *T.brucei* el extremo carboxi terminal de la enzima de *Leishmania* se encuentra truncado. La secuencia aminoacídica de la ODC de *L.donovani* exhibe un 40% de identidad con la secuencia de la proteína de ratón, tripanosoma y levadura (30).

Las diferentes enzimas descritas muestran alta especificidad por el sustrato, la L-ornitina. Los valores de Km de la ornitina para las enzimas aisladas de células animales son cercanos a 0.1 mM. Para la ODC de *E.coli* la Km para el sustrato es 2-3.6 mM, pero dicha constante se reduce notablemente cuando la reacción se realiza en presencia de GTP ( Km: 0.2-0.3 mM ) (38).

La ODC puede decarboxilar el aminoácido lisina con una menor eficiencia, originando como producto de la reacción otra poliamina, la cadaverina. En mamíferos no existe evidencia concluyente de una actividad de lisina decarboxilasa, en tanto que dicha actividad enzimática se ha observado en *E.coli*. Se piensa que la

aminopropilcadaverina podría reemplazar a la espermidina cuando las bacterias carecen de esta poliamina (39).



Todas las ODC descritas son dependientes de PLP como cofactor, aunque las enzimas obtenidas de células animales y de eucariotes primitivos tiene diferente afinidad por la coenzima. Por ejemplo, el Km para PLP de las enzimas de células de mamíferos es 0.25 mM mientras que dicho valor es 0.6 uM para la enzima de *S. cerevisiae*.

No se conocen activadores para la ODC de células animales normales, mientras que se ha descrito que las dos formas de la ODC de *E.coli* son estimuladas por nucleótidos, particularmente GTP y dGTP. Recientemente se ha observado que tanto la ODC aislada de tumores benignos epidérmicos de ratón y la de linfocitos T son activadas por GTP y por derivados no hidrolizables de guanina, respectivamente (40).

#### 3.1.4.1. Inhibidores reversibles de la ODC.

La reacción catalizada por la ODC puede ser inhibida mediante diferentes estrategias. El inhibidor puede ser una molécula que interacciona o se combina con el cofactor o un análogo estructural del sustrato o del producto (21,41-44).

Como se ha mencionado la ODC requiere PLP para su actividad catalítica. Este compuesto forma una base de Schiff reversible con el sustrato, siendo esta una reacción obligatoria para las aminoácido decarboxilasas. Inicialmente se pensó que las sustancias capaces de

interaccionar con el PLP podrían inhibir la actividad enzimática de la ODC (42).

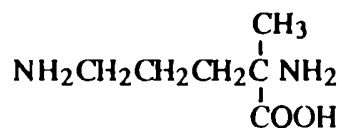
Uno de los primeros compuestos ensayados fue el análogo de la ornitina, la L-canalina (  $\alpha$  amino  $\gamma$  aminoxybutírico ), observándose una inhibición débil (  $IC_{50}$ : 0.1 mM ). En contraste, el análogo de la putrescina 1-aminoxy-3-aminopropano es un inhibidor potente de las ODC aisladas de riñón de ratón (  $K_i$ : 3.2 nM ) y de hígado de rata (  $K_i$ : 1.4 nM ).

El uso de este tipo de compuestos no se ha aplicado ampliamente debido a que conjuntamente con la ODC se inhiben inespecíficamente otras enzimas dependientes de PLP.

La efectividad de los inhibidores reversibles análogos al sustrato o al producto se basa en la mayor afinidad relativa de estos compuestos por la enzima.

Las primeras sustancias probadas como inhibidores fueron los derivados de la ornitina sustituidos en el nitrógeno como la  $\alpha$  hidrazinoornitina. Este compuesto es un potente competidor de la ODC aislada de células procariotes y eucariotes, pero se observó que el efecto inhibitorio podía ser revertido por concentraciones elevadas de PLP (43).

Por otra parte, Danzin y colaboradores (41) sintetizaron numerosos derivados de la ornitina sustituidos en la posición 2. De los 14 inhibidores ensayados sólo la  $\alpha$  metilornitina fue un inhibidor potente de la ODC aislada de próstata de ratón. Al agregar  $\alpha$  metilornitina a cultivo de células se estableció por primera vez la correlación entre la inhibición de la proliferación celular y la disminución del contenido endógeno de poliaminas.



$\alpha$  metilornitina

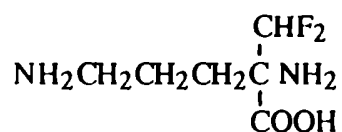
El hallazgo que la putrescina inhibía a la ODC generó la idea del uso de análogos de putrescina como posibles inhibidores. Los compuestos 1,3 diaminopropano y 1,3 diamino-2-propanol resultaron ser los inhibidores mas potentes de este tipo.

Si bien el agregado de estas sustancias a cultivos celulares disminuyó la producción de putrescina, estos inhibidores no se usaron ampliamente debido a que se observaron numerosos efectos secundarios no 'descados: la  $\alpha$  metilornitina y la  $\alpha$  hidrazinoornitina provocaron un aumento en la vida media de la enzima y en la cantidad de la proteína, mientras que los análogos de la putrescina activaron la enzima AdoMetDC y reemplazaron a las poliaminas naturales en algunas funciones intracelulares.

#### 3.1.4.2. *Inhibidores irreversibles de la ODC.*

La introducción del concepto de inhibidores irreversibles o suicidas permitió el diseño y la síntesis de compuestos específicos.

Uno de los primeros inhibidores irreversibles sintetizados fue  $\alpha$  DFMO, que es un análogo de la ornitina (45).



$\alpha$  difluormetilornitina

Este compuesto puede ser utilizado como sustrato por la enzima. El mecanismo de acción, que se describió a partir de estudios cinéticos de inactivación enzimática y por ensayos con  $\alpha$  DFMO marcado con  $^{14}\text{C}$  en posición 5 o en posición 1, involucra la decarboxilación del inhibidor originando un reactivo intermedio, por la eliminación de un anión fluoruro. Luego al reaccionar con un

residuo de cisteína ubicado cerca o en el sitio activo de la enzima queda covalentemente unido a la enzima produciendo la inactivación irreversible ( Figura 4 ).

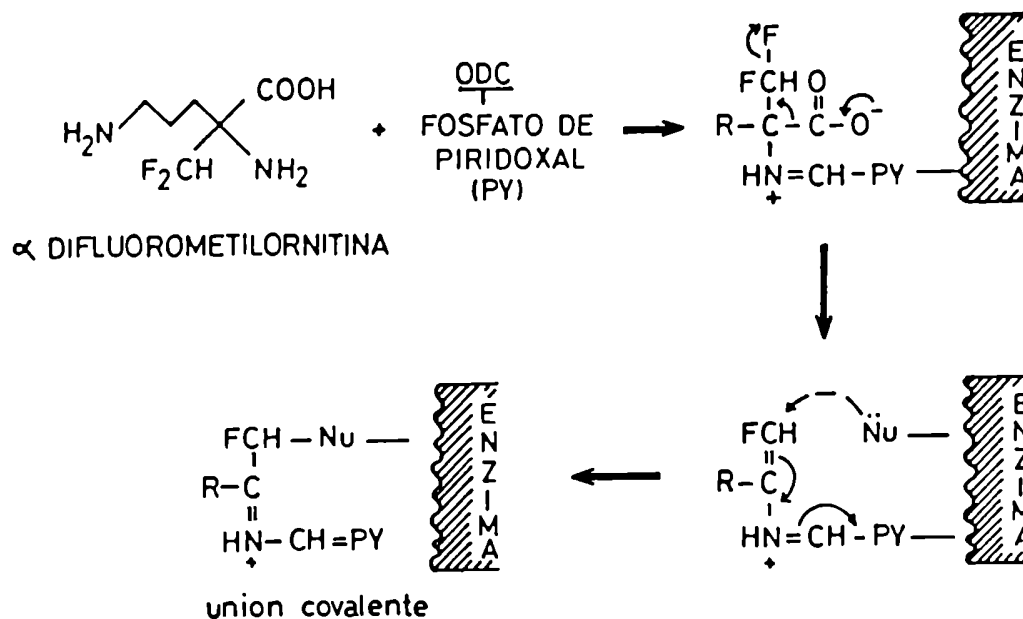


Figura 4: Mecanismo de acción de α difluormetilornitina.

La unión del compuesto α DFMO a la enzima es altamente específica, siendo el valor de la relación subunidad proteica:inhibidor de 1:1.

El uso de α DFMO radiactivo ha posibilitado los siguientes estudios:

i. la estimación en extractos celulares del número de moléculas de ODC nativa y la evaluación de la pureza de la preparación enzimática.

ii. la identificación de la subunidad proteica y del cambio de movilidad en geles de isoelectroenfoque luego de la fosforilación de la enzima.

iii. la determinación de la velocidad de recambio de la enzima.

iv. la localización subcelular de la ODC. Por medio de esta técnica se ha determinado que tanto en células de riñón de ratón y en el poliqueto *Ophyotrocha labronica* una fracción significativa se encuentra localizada en el núcleo.

v. la generación de un ligando con alta actividad específica para la detección por radioinmunoensayo y la selección de células productoras de anticuerpo monoclonal contra la ODC.

vi. estudios sobre los mecanismos de degradación de la ODC.

### 3.2. S-adenosilmetionina decarboxilasa.

#### 3.2.1. Gen de *AdoMetDC* (26).

Diversos autores han aislado clones de DNA genómico y de cDNA correspondientes a *AdoMetDC* a partir de varias células eucariotas. Aparentemente hay más de un gen para *AdoMetDC*, pero aún no se ha determinado cuantos de estos genes son funcionales.

#### 3.2.2. mRNA de *AdoMetDC* (26).

Los análisis por "Northern blot" de los RNA aislados de rata, ratón, bovinos y células humanas mostraron dos especies de mRNA de 1.7-2.4 y 3-3.6 kb de longitud que hibridizan con sondas específicas de *AdoMetDC*.

Similarmente a lo observado para los mensajeros de ODC se piensa que la heterogeneidad en la longitud está determinada por dos diferentes sitios de poliadenilación. Los dos RNA se expresan diferencialmente dependiendo de la especie, el tejido y las condiciones fisiológicas.

Estudios de "primer extension" revelaron la presencia de una secuencia no traducida de 320 nucleótidos en el extremo 5', que es rica en G y C. Esta porción de RNA puede formar estructuras secundarias estables. Aún no se ha establecido el posible rol regulatorio de estas regiones.

### 3.2.3. Características de la AdoMetDC (26,46).

La proteína se sintetiza como una proenzima inactiva de peso molecular 38 kDa, que es clivada en dos péptidos. El sitio de clivaje se encuentra entre los aminoácidos 67 y una serina ubicada en posición 68. El peso molecular de las dos subunidades resultantes es de 7.7 y 30.7 kDa. La enzima nativa estaría formada por dos subunidades pequeñas y dos grandes.

Similarmente a lo observado para la ODC, la AdoMetDC tiene una región PEST en el extremo carboxi terminal. La vida media de esta enzima es aproximadamente 20 minutos ( Figura 3 ).

La AdoMetDC ha sido purificada a homogeneidad a partir de *E.coli*, levadura, tejidos animales, plantas y *P.polycephalum*. Estas enzimas difieren en la estructura de la subunidad y en los requerimientos de cationes: la enzima aislada de las células animales es activada por putrescina, la AdoMetDC de *E.coli* es dependiente de  $Mg^{2+}$  para su actividad óptima, en tanto que la enzima aislada de *P. polycephalum* es sensible a putrescina y a los cationes metálicos. A diferencia de la ODC y otras decarboxilasas, la AdoMetDC no requiere PLP para su actividad. Esta enzima posee un piruvato unido covalentemente como grupo prostético, que sería indispensable para la actividad catalítica. El piruvato que se encuentra ubicado en el extremo amino de la subunidad mayor deriva de la serina en posición 68 del precursor.

### 3.2.4. Inhibidores de la AdoMetDC.

El compuesto MGBG fue uno de las primeras sustancias ensayadas, usándose en células animales y en levaduras (47). Se observó que este compuesto se comportaba como un inhibidor competitivo reversible.

Si bien las enzimas AdoMetDC aisladas de diversas fuentes poseen diferentes requerimientos de cationes, todas ellas muestran

una respuesta similar al inhibidor: el  $K_i$  para la enzima de células animales es menor a 1  $\mu\text{M}$ , en tanto que para la AdoMetDC bacteriana es de 13  $\mu\text{M}$  (48).

El tratamiento con MGBG produce un incremento en el contenido de putrescina, un descenso de espermidina y una marcada inhibición del crecimiento y la viabilidad de las células, acciones que en algunos casos pueden ser revertidas por la adición de espermidina. De todas maneras, estos estudios deben interpretarse con mucho cuidado ya que el MGBG no actúa solamente sobre la enzima AdoMetDC: esta sustancia es también un potente inhibidor de la diamino oxidasa y un inductor de la SAT. Además, se observó que interfiere con el sistema de transporte de poliaminas, provoca daños mitocondriales e indirectamente afecta la síntesis de macromoléculas, incluyendo la replicación del DNA. La inhibición *in vivo* de AdoMetDC por la acción de MGBG es transiente y se observó que esta sustancia estabiliza la enzima.

Se han descrito numerosos compuestos que inhiben AdoMetDC; los análogos del MGBG, Berenil y Pentamidina se han usado ampliamente como agentes contra las infecciones producidas por tripanosomátidos. Se ha observado que la inhibición por estos compuestos no se revierte por diálisis (44).

Por otra parte, se probaron análogos de AdoMet ( S adenosil-3-metilpropilamina y 5'(dimetilsulfo)-5'-deoxiadenosina ) observándose un fuerte efecto inhibitorio para las enzimas de *S.cerevisiae* y *P.polycephalum*. Estos inhibidores no han sido usados en estudios *in vivo*.

#### 4. Regulación de la biosíntesis de las poliaminas.

La regulación del camino metabólico de poliaminas en células de mamíferos está determinado por las actividades enzimáticas de ODC, AdoMet DC y SAT (20).



Las enzimas espermidina y espermina sintetasa y la poliamina oxidasa están presentes en forma constitutiva y en exceso, siendo reguladas por la disponibilidad de sustratos, particularmente del S-adenosilmetionina decarboxilado y de los derivados acetilados de poliaminas, respectivamente.

#### 4.1. *Regulación de la ODC.*

La ODC, que cataliza en forma irreversible la formación de la putrescina, parece ser la enzima limitante en la biosíntesis de las poliaminas. La ODC de células de mamíferos es una proteína citosólica, y es una de las enzimas más extensamente estudiadas pues presenta muy baja actividad que se incrementa cuando las células se exponen a diversos estímulos como hormonas, factores de crecimiento, inducción de regeneración, etc (49).

Cuando las células se estimulan y comienzan a dividirse la actividad de ODC aumenta cientos de veces. Aún así esta enzima sigue siendo un componente celular menor, que usualmente representa menos del 0.0001% del total de las proteínas celulares. En hígado de ratón estimulado por andrógenos esta enzima representa el 0.05% de la proteína soluble.

Se ha observado que el incremento rápido en la actividad enzimática se debe a un aumento en la transcripción y en la síntesis de proteínas, en tanto que el descenso en la actividad catalítica estaría asociado a un fenómeno post-transcripcional.

Los mecanismos regulatorios que se han propuesto son los siguientes (49):

- i. variaciones en la velocidad de la transcripción del mRNA de ODC.
- ii. variaciones en el proceso de la traducción del mRNA de la enzima.

iii. amplificación del gen estructural de ODC con el correspondiente incremento en la cantidad de mRNA y proteína (50).

iv. modificación de la enzima por la unión covalente de grupos fosfato o derivados de poliaminas.

v. interconversión de la proteína de un estado activo a una forma inactiva.

vi. inducción de una proteína inhibitoria denominada antizima que se une reversiblemente en forma no competitiva a la enzima y la inactiva, acelerando su degradación.

vii. cambios en la velocidad de recambio de la proteína

viii. la combinación de los efectos iv., vi. y vii. que contribuyen a aumentar la degradación.

Se ha descrito que la ornitina, la putrescina, la espermidina y la espermina (26) así como los nucleótidos de guanina y el cAMP ejercen funciones modulatorias sobre la ODC.

Russell (50) observó que la ODC puede ser inactivada por la unión de putrescina, reacción que sería catalizada por una transglutaminasa, pero este hecho no ha podido ser confirmado.

Recientemente se ha propuesto un mecanismo regulatorio reversible que involucraría la unión de la ODC a la membrana celular. Este proceso estaría mediado por el inositol.

La enzima aislada de células animales muestra una alta velocidad de recambio, con una vida media del orden de 10 a 20 minutos, que es una de las más cortas descritas para las enzimas aisladas de diferentes tejidos animales (51).

#### **4.2. Regulación de la AdoMetDC.**

Similarmente a lo observado para la ODC de células animales, la AdoMetDC presenta muy baja actividad que puede ser incrementada significativamente por numerosos estímulos que promueven el crecimiento (26).

Dicha enzima posee propiedades biológicas análogas a la ODC (49):

- i. es específica para la biosíntesis de poliaminas.
- ii. cataliza una reacción irreversible.
- iii. presenta una alta velocidad de recambio (  $T_{1/2}$ : 20 a 90 minutos )
- iv. es regulada negativamente por el producto de la reacción.
- v. es inducida por factores tróficos.

El incremento de la actividad enzimática está determinado por los siguientes mecanismos (49):

estabilización de la proteína por un aumento en la vida media.

- ii. incremento en la transcripción del mRNA.
- iii. aumento en la eficiencia de la síntesis de proteínas.

Los mecanismos implicados en el descenso de la actividad catalítica aún no han sido dilucidados. Hasta el momento no se ha descrito una proteína inhibitoria análoga a la antizima de la ODC.

La importancia de las poliaminas en el funcionamiento celular se refleja en el control estricto del contenido endógeno de estas sustancias (26).

Las poliaminas regulan su propia síntesis por un eficiente mecanismo de "feedback": cuando los niveles de estas aminas son muy bajos se inducen las actividades de ODC y AdoMetDC; en contraste, cuando las poliaminas están en exceso las actividades enzimáticas disminuyen.

En células animales el control puede ocurrir a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional ( Figura 5 ).

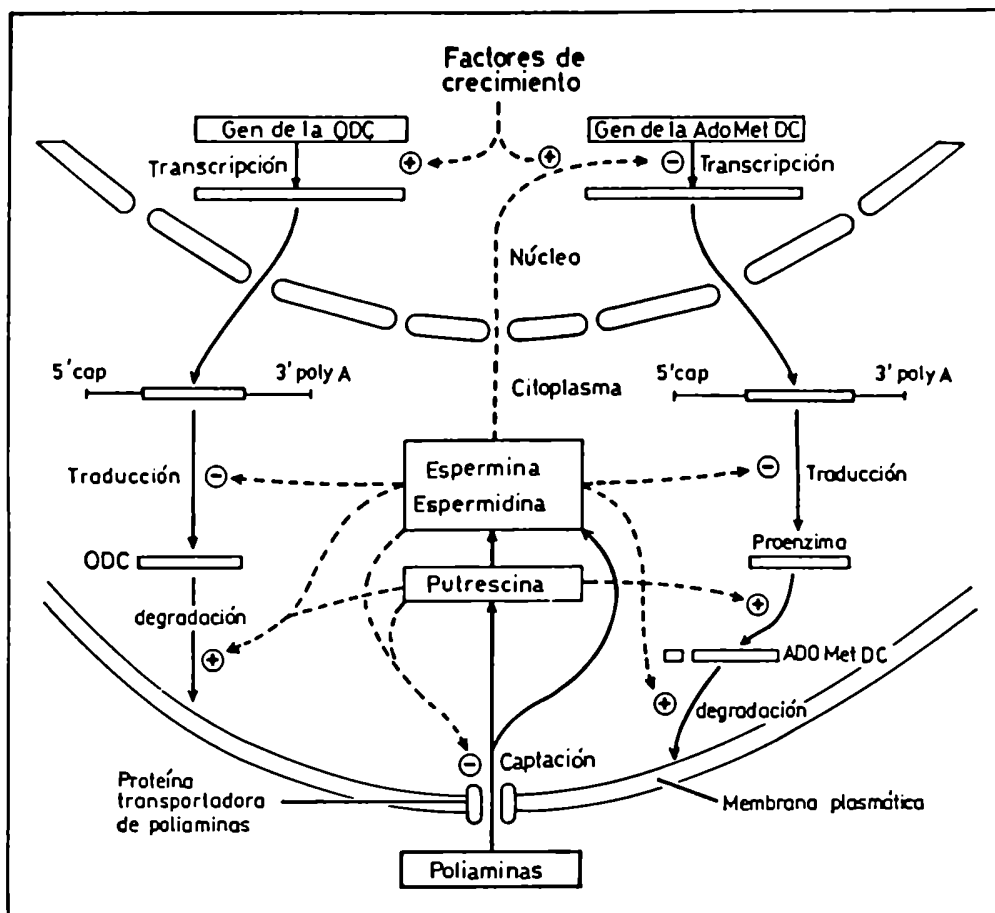


Figura 5: Regulación del contenido de poliaminas en células animales.

Las concentraciones de espermidina y espermina controlan la síntesis de la ODC y AdoMetDC. Como se ha mencionado los mRNA de estas proteínas tienen en el extremo 5' una larga secuencia "leader" que podría formar estructuras secundarias estables. Se ha especulado que las poliaminas podrían afectar directa o indirectamente dicha estructura secundaria. Debido a que el número de ribosomas unidos al mRNA de ODC no varía ante un exceso de espermidina o espermina, se piensa que además de un posible control a nivel de iniciación de la síntesis proteica existirían otros puntos de control.

La síntesis de la proenzima de la AdoMetDC también es inhibida por espermidina o espermina. Otro sitio probable de regulación por la putrescina sería la conversión de la proenzima en los dos polipéptidos.

La degradación de ODC y AdoMetDC también está sujeta al control de las poliaminas. La espermidina y la espermina estimulan

la degradación de ambas enzimas, mientras que la putrescina afecta además la degradación de la ODC.

Los niveles celulares de las poliaminas están determinados por la velocidad de síntesis. Sin embargo, en presencia de inhibidores o ausencia de sustratos, las células pueden tomar las poliaminas del medio utilizando un sistema de transporte específico. La actividad de este sistema también parece estar regulado negativamente por las poliaminas.

#### *4.3. Mecanismos regulatorios que involucran a SAT y poliamina oxidasa.*

Como se ha mencionado, las reacciones catalizadas por espermidina y espermina sintetasas son irreversibles. La conversión de espermidina y espermina en putrescina ocurre *in vivo* por la acción secuencial e irreversible de dos enzimas: SAT y poliamina oxidasa (21).

La actividad de SAT es muy baja en células de mamíferos, pero una gran variedad de estímulos la incrementan significativamente. Entre estos factores podemos mencionar hepatotoxinas, hormonas, ácido fólico, MGBG y espermidina. En los sistemas estudiados, el aumento de la actividad catalítica se debe a un incremento en la cantidad de proteína y a una disminución en la velocidad de degradación (52).

Al igual que las enzimas anteriormente mencionadas, SAT tiene una alta velocidad de recambio con una vida media aproximada de 15 minutos (52).

Las reacciones descritas parecen tener un importante rol fisiológico ya que evitan la acumulación de espermidina y espermina hasta niveles tóxicos para la célula.

## *5. Funciones celulares y moleculares de las poliaminas.*

Numerosos estudios han mostrado la intervención de las poliaminas en diferentes procesos celulares como la proliferación celular (32,53-54), diferenciación celular (54), modulación hormonal (55), desarrollo embrionario (54) y resistencia a stress (56), aunque los mecanismos moleculares implicados aún no han sido aclarados totalmente.

La dificultad para dilucidar en detalle las funciones de las poliaminas se debe a que existen numerosos factores a considerar, como los mecanismos de biosíntesis, la regulación de los niveles intracelulares, la interconversión metabólica de la forma polar no acetilada en derivados acetilados menos polares y la exacta distribución y concentración de estas aminas (57).

Además, es importante tener en cuenta la distribución de las cargas positivas a lo largo de la molécula lo que confiere a las poliaminas propiedades diferentes a las observadas en los iones inorgánicos  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .

La influencia de las poliaminas sobre los procesos de proliferación y diferenciación celular puede ser directa o como consecuencia de procesos secundarios en los que podrían estar involucrados varios pasos metabólicos y/o regulatorios.

Los avances realizados han seguido diferentes estrategias:

i. Estudios en sistemas libres de células. Si bien mediante este tipo de enfoque se ha demostrado la participación de las poliaminas en distintos procesos biológicos (26,58-59), el análisis debe ser cuidadoso ya que es difícil concluir si lo observado es fisiológicamente importante o surge de la interacción inespecífica de las poliaminas con diferentes componentes celulares.

ii. El estudio en organismos que carecen o tienen muy disminuido el contenido endógeno de estas aminas. En años recientes se han aislado numerosas mutantes auxótrofas para distintas poliaminas; en otros casos se ha logrado disminuir el contenido

endógeno de estas polimeraciones por el uso de inhibidores específicos de distintas enzimas del camino de biosíntesis. Ambos métodos han permitido estudiar que funciones celulares se alteran en condiciones de ayuno de poliaminas.

En la proliferación celular se verifican dos procesos: el crecimiento de la masa celular y la división de esa masa celular, de las diferentes organelas subcelulares y de las macromoléculas, originando dos células idénticas. Diversos estudios indican la intervención de las poliaminas en ambos procesos, aunque aún no se han podido establecer completamente sus funciones *in vivo*. En general las poliaminas participan en una gran variedad de procesos biológicos como la síntesis de DNA, RNA y proteínas, la estabilidad de biomembranas, la regulación de proteínas quinasas, etc.

### **5.1. Interacciones de las poliaminas y los ácidos nucleicos.**

Durante los últimos años numerosos autores han descrito diversas interacciones entre las poliaminas y los ácidos nucleicos; dichas interacciones pueden resumirse en los siguientes casos (57):

i. Se ha observado que las poliaminas se asocian con los ácidos nucleicos aislados de virus, bacterias y células animales.

ii. Trabajando con sistemas libres de células se ha determinado que las poliaminas son capaces de precipitar ácidos nucleicos, incrementar la temperatura de disociación de las hélices de DNA y proteger al DNA contra el daño producido por acción enzimática, irradiación U.V. o el manipuleo mecánico.

iii. Las poliaminas promueven la agregación de las subunidades ribosomales protegiéndolas contra la disociación.

En base a su estructura química, se ha sugerido que las poliaminas contribuyen a la neutralización de las cargas negativas del

DNA (59-60). Por la distribución de las cargas de espermina ( 4 cargas por molécula ) se considera que este compuesto se asocia fuertemente a dos grupos fosfato ubicados en las hélices del DNA. La espermina estabilizaría esta estructura por la unión simultánea a ambas hélices.

Otros autores han descrito que la espermina causaría alteraciones en la conformación del DNA, induciendo la transición de la forma B a la forma Z (61). A este evento se le ha asignado el rol del control funcional de este ácido nucleico (62).

Las poliaminas también parecen estabilizar otras estructuras secundarias, como los "loops" en el RNA mensajero, ribosomal y de transferencia (57-62).

Los estudios pioneros de Cohen (63-65) mostraron que el tRNA aislado de bacterias y células animales estaba asociado a poliaminas y que la relación molar podía establecerse para condiciones específicas de crecimiento. En condiciones de exceso de poliaminas se determinó que la relación poliaminas:tRNA era 2-3:1. Análisis posteriores indicaron que dos moléculas de espermina asociadas a sitios específicos estabilizarían la estructura secundaria y terciaria del tRNA (66).

Existen evidencias de que la espermidina y la espermina contribuyen a la prevención de degradaciones enzimáticas y que estimulan la velocidad de aminoacilación del tRNA ( 67-68).

Otros autores trabajando con precursor de tRNA de levaduras han encontrado que la espermidina promueve la acción endonucleolítica de "splicing" (68).

Numerosos estudios realizados *in vivo* han contribuido a dilucidar la acción de las poliaminas en distintos organismos.

Geiger y Morris (69) trabajando con una cepa de *E.coli* que carece de poliaminas encontraron que diferentes compuestos estructuralmente homólogos a la espermidina agregados al medio de cultivo modificaban la velocidad de movimiento de la horquilla de replicación del DNA y la tasa de crecimiento de la bacteria. Estos autores no observaron un efecto sobre el proceso de iniciación de la



replicación. Este hecho sería poco frecuente ya que se ha descrito que la velocidad de duplicación del DNA estaría regulada por el proceso de iniciación (70). En el evento citado las poliaminas actuarían como cofactores en la síntesis del ácido nucléico (71) y no como moléculas regulatorias.

En cepas de *E.coli* auxótrofas para poliaminas la síntesis total de RNA disminuye en ausencia de estas aminos. Al agregarse alguna de estas sustancias se recupera primero la síntesis proteica y luego la síntesis de RNA (72). Las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  de la RNA polimerasa están entre las primeras proteínas cuya síntesis se induce por la adición de poliaminas (73).

### 5.2. *Interacciones de las poliaminas y la síntesis de proteínas.*

A partir de estudios realizados *in vivo* se sugirió que los ribosomas contienen poliaminas y que estas son esenciales para mantener la estructura de las partículas ribosomales y sus funciones (74-76).

Los ribosomas aislados de cepas de *E.coli* auxótrofas para poliaminas y cultivadas en ausencia de estas sustancias presentan un perfil alterado con una mayor disociación de sus subunidades (76). Estas partículas son menos efectivas para iniciar la traducción (77), tienen menor afinidad por la estreptomicina y muestran una elevada frecuencia de error al reconocer ciertos codones (78). Otros estudios realizados *in vivo* mostraron que en ausencia de poliaminas la síntesis proteica y la velocidad de crecimiento se encuentran disminuídas (79) y que la adición de putrescina al medio incrementa inmediatamente la síntesis proteica recuperándose posteriormente la de los ácidos nucléicos (72).

Cuando se incubaron células de mamífero HTC en presencia de  $\alpha$  DFMO se observó un bloqueo en la síntesis proteica (80).

Estudios realizados en sistemas libres de células mostraron que la velocidad de la síntesis de proteínas a una concentración óptima de  $Mg^{2+}$  puede ser incrementada si se disminuye el nivel de  $Mg^{2+}$  y se agrega poliaminas a la reacción (57). Estas aminos estimularían los procesos de iniciación y de elongación de los polipéptidos, ya que afectan la conformación del tRNA haciéndolo más activo en su capacidad aceptora de aminoácidos (81), inducen la asociación de las subunidades ribosomales (72,75-77,79-82) y del aminoacil tRNA a los ribosomas (101).

Por otra parte, se ha observado que concentraciones elevadas de poliaminas ejercen un efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas.

### *5.3. Interacciones de las poliaminas y las proteínas kinasas (83).*

Algunas respuestas celulares están mediadas por la interacción de factores extracelulares con receptores específicos que generan alteraciones en la concentración intracelular de cAMP, calcio, inositol polifosfato o diacilglicerol. Estos mensajeros intracelulares involucran frecuentemente la fosforilación de enzimas que catalizan reacciones limitantes de diversos caminos metabólicos, canales iónicos o proteínas kinasas.

Las proteínas kinasas dependientes de cAMP, de Calcio/fosfolípidos y de Calcio/calmodulina pueden ser modificadas por poliaminas, que ejercen un efecto inhibitorio. En contraste, las proteínas kinasas independiente de Calcio o cAMP ( ej. Caseína kinasa I y II ) son frecuentemente estimuladas por las poliaminas.

#### 5.4. Poliaminas y diferenciación celular.

Existe evidencia concluyente de la participación de las poliaminas en la diferenciación celular. Se ha observado que la diferenciación de fibroblastos en adipocitos requiere elevados niveles de estas poliaminas, en tanto que una reducción en los niveles de estas bases orgánicas sería necesaria para el proceso de diferenciación de células embrionales de carcinoma de ratón. Heby et al. (84) mencionan el rol de las poliaminas en procesos de diferenciación en policaetes, pollo, roedores, erizo de mar y en sistemas de órganos como el mesodermo del pollo, la glándula mamaria de ratón, la mucosa intestinal y el complejo hematopoyético de mamíferos.

#### 6. Poliaminas en protozoos

Una de las áreas en que actualmente se ha puesto un énfasis especial es el estudio de la bioquímica de poliaminas y su rol en el crecimiento de protozoos.

La Organización Mundial de la Salud ha dado prioridad en el Programa Especial para la Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales a seis enfermedades generadas por parásitos: enfermedad del sueño africana ( *T.brucei* spp ), enfermedad de Chagas ( *T.cruzi* ) malaria ( *Plasmodium* spp ), leishmaniasis del nuevo y viejo mundo ( *Leishmania* spp ), squistosomiasis y filariasis (85).

La importancia de estas enfermedades se debe al gran número de personas y animales domésticos infectados en todo el mundo, la frecuente carencia de una adecuada quimioterapia no tóxica y el desarrollo de la resistencia de los parásitos a las drogas.

Las infecciones en humanos por *Leishmania* son causadas por cinco organismos que si bien son morfológicamente iguales, difieren

en la especificidad del tejido atacado y en el grado de severidad de la infección que causan.

Las especies de *Leishmania* presentan un ciclo de vida digenético en el que existen dos formas morfológicamente distintas ( Figura 6 ).

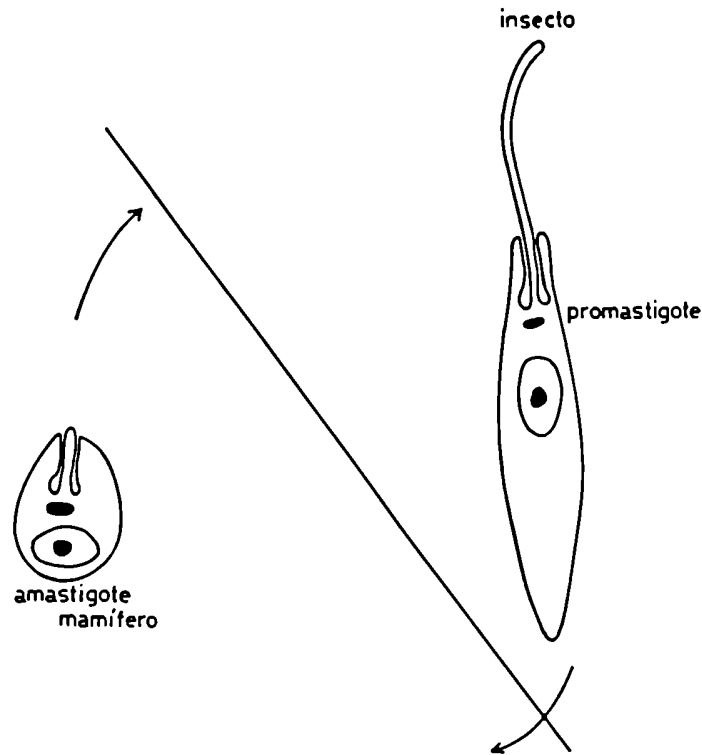


Figura 6: Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Los parásitos viven y se multiplican en un insecto vector de la familia Phlebotominae. Dentro del insecto las leishmanias son extracelulares y adquieren formas flageladas de gran movilidad que se denominan promastigotes.

Cuando los parásitos infectan a los huéspedes vertebrados por picadura de los insectos colonizan los macrófagos y se multiplican dentro de los fagolisosomas. Los protozoarios, adaptándose al ambiente intracelular, se diferencian adquiriendo una forma redondeada, pequeña y no flagelada llamada amastigote.

El ciclo de vida se completa cuando el insecto al alimentarse con sangre de los vertebrados incorpora los macrófagos infectados.

El parasitismo intracelular continúa como enfermedad crónica local o se distribuye a los diferentes tejidos.

Las Leishmaniasis pueden ser cutánea, mucocutánea o visceral dependiendo de la especie involucrada en la infección.

Anualmente se registran alrededor de 400.000 casos de nuevos pacientes. Los tratamientos terapéuticos con Pentostan, Glucantina o Amfotericina B no han sido exitosos debido a la toxicidad de las drogas y a la gran variabilidad de la actividad de estos compuestos en los pacientes. En los últimos años se han realizado grandes esfuerzos para diseñar nuevas estrategias quimioterápicas contra estos microorganismos (85).

El primer indicio de la importancia de las poliaminas en el metabolismo de parásitos fue el hallazgo de Bacchi et al. (86). Estos autores observaron el bloqueo de la proliferación de parásitos y la eliminación de la enfermedad cuando suministraron  $\alpha$  DFMO a ratas infectadas con *T.brucei*, causante del "nagana" en el ganado. En cambio, el tratamiento con el inhibidor  $\alpha$  MO no fue efectivo para la curación de la enfermedad.

El  $\alpha$  DFMO disminuye el contenido endógeno de poliaminas inhibiendo la replicación de numerosos protozoos como *Eimeria tenella*, *Giardia lamblia*, *Plasmodium falciparum*, *Pneumocystis carinii* y tripanosomas africanos como *T.congolense*, *T.b.gambiense* y *T.b.rhodesiense* (85). Dicha sustancia ha sido efectiva en el tratamiento de seres humanos infectados con *T.b.gambiense* y *T.b.rhodesiense* (87), parásitos que causan la enfermedad del sueño en África. La combinación de  $\alpha$  DFMO y el agente anticancerígeno bleomicina dió origen a un tratamiento terapéutico sinérgico exitoso siendo altamente efectivo en infecciones del sistema nervioso central. Clarkson et al. (88) mostraron que el tratamiento eliminó los parásitos del líquido cefalorraquídeo revirtiendo los síntomas de la enfermedad en su estado más avanzado.

Se observó que la acción del  $\alpha$  DFMO podía ser revertida por la inyección intraperitoneal de putrescina. Esto indicaría la especificidad

del inhibidor por la ODC y que el  $\alpha$  DFMO estaría interfiriendo con la biosíntesis de las poliaminas. La adición de cadaverina o diaminopropano no eliminó el efecto curativo del inhibidor (89).

Los parásitos aislados de ratas tratadas con  $\alpha$  DFMO mostraron numerosos cambios en el metabolismo (85): no se detectó actividad de ODC, el nivel de putrescina descendió al 10% del control y el de espermidina disminuyó entre el 50 al 70%. La captación de poliaminas exógenas se incrementó de 2 a 4 veces. La síntesis de proteínas, de DNA y de RNA disminuyeron entre el 50 al 80%. El  $\alpha$  DFMO también afectó el metabolismo respiratorio de las formas tripomastigotes; Griffin et al. observaron un descenso del 45 al 62% de la tasa respiratoria (90).

#### 7. *Metabolismo de poliaminas en T.brucei*

Los primeros estudios sobre el metabolismo de poliaminas en formas tripomastigotes de *T.brucei* revelaron la presencia de putrescina y de espermidina. Estos parásitos son capaces de sintetizar estas poliaminas ya que los extractos celulares muestran las actividades de ODC y AdoMetDC.

La AdoMetDC se caracterizó parcialmente y se observó que el Km para AdoMet ( Km: 30  $\mu$ M ) es similar al descrito para la enzima aislada de células animales.

Los requerimientos para la ODC de *T.brucei* son semejantes a los de enzimas de células animales: para su actividad óptima necesita ditiotreitól, EDTA y además PLP como cofactor (91). La Km aparente para la ornitina es 280  $\mu$ M y el peso molecular de la enzima nativa es 100 kDa. La enzima es un homodímero, siendo el peso molecular de la subunidad 45 kDa.

La inactivación por  $\alpha$  DFMO es dependiente del tiempo. El período medio de inactivación a una concentración infinita del inhibidor es 2.7 minutos en tanto que el Ki es 220  $\mu$ M (92). A

diferencia de lo observado para la enzima obtenida de células animales, la ODC del parásito no es regulada por poliaminas y posee una vida media mayor de 6 hs. Este valor se determinó midiendo la velocidad de pérdida de la actividad enzimática luego de inhibir la síntesis proteica con cicloheximida (24).

Se observó que la estabilidad intracelular de la enzima del parásito parece ser una propiedad de la enzima en sí y no del ambiente celular en el que se expresa, ya que esta proteína sigue siendo estable en células de mamíferos CHO deficientes en ODC. Cuando se sintetizó la ODC de ratón truncada a la que le faltaba la región carboxi terminal, la enzima fue estable en el mismo sistema. En cambio, la proteína formada por la porción amino terminal de la enzima de tripanosoma y la región carboxi terminal de la de ratón fue rápidamente degradada. Estas observaciones confirmarían la importancia de la secuencia PEST en la estabilidad de la proteína. Recientemente Wang y colaboradores (93) expresaron la ODC de ratón en *T.brucei* y contrariamente a lo esperado la enzima no fue degradada, observándose una vida media de 6 hs. Este resultado parecería indicar que la estabilidad de la ODC de *T.brucei* se debería a por lo menos dos factores: la falta de la secuencia PEST en la porción carboxi terminal y la ausencia de la maquinaria proteolítica capaz de degradar proteínas que contienen secuencias PEST como la ODC de ratón.

Como se ha mencionado anteriormente *T.brucei* posee el compuesto N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(glutathionil)espermidina al que se denominó tripanotiona. (6). Los tripanosomas africanos carecen de catalasa y glutatión peroxidasa y se supone que necesitan del glutatión reducido para eliminar los radicales libres producidos a partir del peróxido de hidrógeno y del anión superóxido. Como tampoco poseen la enzima glutatión reductasa, en estos parásitos el GS-SG como otros puentes disulfuros son reducidos en un proceso que involucra dos pasos sucesivos que requieren como intermediario a la tripanotiona (94): en la primera reacción la tripanotiona se reduce por la acción de la tripanotiona reductasa ( enzima que es dependiente de NADPH )

produciendo dihidrotriptanotiona. La segunda reacción no enzimática involucra la oxidación de este compuesto regenerando tripanotiona y la reducción de las uniones GS-SG u otros puentes disulfuros.



## *8. Objetivos del presente trabajo.*

Debido a la estricta correlación entre los niveles intracelulares de poliaminas y la proliferación o diferenciación celular se realizan numerosos estudios sobre la bioquímica y la biología celular de parásitos con el propósito de investigar las diferencias entre el metabolismo de poliaminas en protozoos y el de sus huéspedes mamíferos. Se realizan grandes esfuerzos para detectar posibles blancos específicos susceptibles a una quimioterapia selectiva que pueda controlar la multiplicación de los parásitos.

Las actividades de las enzimas de la biosíntesis de poliaminas varían dramáticamente de acuerdo al estado fisiológico de las células y a los niveles intracelulares de poliaminas y otros metabolitos. Dado que la actividad de la ODC está relacionada con el crecimiento celular se considera a esta enzima como uno de los posibles blancos cuyo ataque con inhibidores específicos puede provocar el bloqueo de la proliferación celular. Los tripanosomas africanos son extremadamente sensibles a estas drogas probablemente debido a la estabilidad de la ODC del parásito y a la corta vida media de la enzima de la célula huésped. Estas propiedades parecen explicar el efecto selectivo del  $\alpha$  DFMO sobre la proliferación, ya que el inhibidor posiblemente causa un bloqueo permanente en la biosíntesis de poliaminas en el protozoo, mientras en las células animales hay un rápido recambio de la ODC que provee la síntesis constante de nueva enzima.

Por otra parte, la acumulación de radicales libres es extremadamente tóxico para los parásitos. Este efecto se observó cuando se bloqueó la síntesis del glutatión con inhibidores de la enzima glutamylcysteinyl synthetase. La inhibición de la biosíntesis de poliaminas produciría un efecto fisiológico similar pues disminuiría el contenido de los conjugados glutatión-espermidina y los tripanosomas dependen de la tripanotona para controlar el balance redox celular.

Con el propósito de detectar posibles blancos específicos para el control de la Leishmaniasis y el Mal de Chagas se decidió investigar el metabolismo de poliaminas en *L.mexicana* y *T.cruzi*:

El presente trabajo abarca los siguientes aspectos:

i. la composición y abundancia relativa de las poliaminas en *T.cruzi* y *L.mexicana*.

ii. las vías metabólicas de la biosíntesis de poliaminas en *T.cruzi* y *L.mexicana*.

iii. La caracterización de la ODC de *L.mexicana* y el estudio de sus propiedades catalíticas y estructurales.

## II. MATERIALES y METODOS

### 1. Descripción de las cepas.

Para la realización de este trabajo se utilizaron los siguientes parásitos:

a. formas promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana* aislada originalmente por el Dr. Rodrigo Zeledón ( Universidad de Costa Rica ).

b. formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* ( cepa Tulahuén). Ambas cepas se obtuvieron a partir de stocks del Instituto Fatale Chabén ( Buenos Aires ) y fueron gentilmente cedidas por el Dr. J.J. Cazzulo.

### 2. Medios utilizados.

#### 2.1. Medio de Warren ( modificado ).

Composición:

	gr/litro
Brain-heart infusion	3 3
Triptosa	3
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4
ClK	0.4
Glucosa	0.3
Hemina.HCl	0.02
Suero fetal bovino (inactivado 45 minutos a 56 °C) 10 o 20% ( para los cultivos de <i>T.cruzi</i> o <i>L.mexicana</i> , respectivamente ).	
Estreptomina	100 mg/ml
Penicilina	100 U/ml

El medio se esteriliza por filtración a través de membrana Millipore con poro de 0.22 um de diámetro antes de agregar el suero fetal bovino.

### 2.2. Medio D-MEM.

Este medio contiene:

	gr/litro
Dulbecco modificado ( Eagle) (D-MEM)	1 0
NaHCO <sub>3</sub>	3.7
Dextrosa	1 5
Buffer Hepes-Na pH 7.3	40 mM
Purina	0.1 mM
Hemina.HCl	5 mg/litro
Suero fetal bovino ( inactivado 45 minutos a 56°C )	10 %.

### 2.3. Solución PBS.

NaCl	0.14 M
Buffer Fosfato de Sodio pH 7.2	0.01 M
KCl	3 mM

### 3. Condiciones de cultivo.

Los parásitos se cultivaron aerobícamente a 26 °C (*L.mexicana*) o a 28 °C (*T.cruzi*) en un incubador con agitación rotatoria.

El incremento en el número de organismos se determinó por conteo en cámara de Neubauer.

#### *4. Determinación del contenido de poliaminas*

Con el propósito de determinar el contenido de estas aminas en los parásitos, los extractos celulares se analizaron por cromatografía en placa delgada, electroforesis en papel o cromatografía descendente en papel.

##### *4.1. Análisis por cromatografía en capa delgada*

Las poliaminas extraídas con ácido se hicieron reaccionar con cloruro de dansilo. Los derivados dansilados se sometieron a una cromatografía en placa delgada y se detectaron por observación bajo luz ultravioleta; se extrajeron las manchas fluorescentes y se determinó el contenido de poliaminas por espectrofluorometría.

Los parásitos se cosecharon por sedimentación a 10.000 rpm durante 15 minutos. Después de lavar el precipitado con PBS, las células se sometieron a una extracción con ácido perclórico 0.2 N. El extracto se centrifugó 10 minutos a 10.000 xg y diferentes alícuotas del sobrenadante resultante se dansilaron usando 150 ul de cloruro de dansilo ( 10 mg/ml en acetona ) y  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  sólido hasta saturación. Después de dejar reaccionar durante toda la noche en la oscuridad a temperatura ambiente en tubos herméticamente cerrados, la reacción se detuvo con 100 ul prolina ( 100 mg/ml ) para eliminar el cloruro de dansilo libre remanente. A continuación, se realizó una extracción con 300 ul de tolueno. En estas condiciones solo pasan a la fase orgánica las aminas dansiladas, quedando en la fase acuosa los aminoácidos dansilados y otros compuestos químicos. En todos los análisis se incluyeron curvas de calibración del método con cantidades conocidas de soluciones standard de poliaminas y blancos de reactivos.

200 ul de la fase orgánica se evaporaron a sequedad en corriente de  $\text{N}_2$  y el residuo se resuspendió en 10 ul de tolueno. Las distintas muestras se analizaron por cromatografía en placa delgada (TLC) monodimensional, usando placas con Silica gel ( Merk Kieselgel

60 ), activadas previamente durante 30 a 60 minutos a 110°C. Como solvente de desarrollo se utilizó cloroformo:triethylamina (10:1). Las manchas fluorescentes bajo luz U.V. de 340 nm se rasparon de la placa, se extrajeron con metanol y se cuantificaron por espectrofluorometría ( longitud de onda de excitación: 360 nm, longitud de onda de emisión: 510 nm ).

#### *4.2. Electroforesis en papel.*

Los parásitos se lisaron con ácido perclórico 0.2 N y los extractos neutralizados con KOH 5 N se centrifugaron a 11.000 xg por 10 minutos. Los sobrenadantes resultantes se analizaron por electroforesis en papel Wathman 3 MM usando como buffer de corrida ( piridina:ácido acético:agua, 10:100:890, pH 3.2 ). La electroforesis se realizó a 600 voltios durante 3 horas. Los compuestos radiactivos se detectaron sobre el papel por monitoreo continuo con un "Scanner" y en algunos casos se eluyeron determinando la radiactividad con un contador de centelleo líquido después de agregar una mezcla que contenía tolueno PPO-dimetilPOPOP. Se utilizaron standard internos de poliaminas y aminoácidos básicos, que se revelaron con reactivo de ninhidrina.

#### *4.3. Cromatografía descendente en papel*

Los sobrenadantes perclóricos obtenidos después de la extracción de los parásitos se sometieron a cromatografía descendente sobre papel Wathman 1 por 18 hs utilizando como solvente de desarrollo butanol: ácido acético: piridina: agua ( 15:3:10:12 ) Los compuestos radiactivos se detectaron sobre el papel por monitoreo con un "Scanner", mientras que los standards internos se revelaron con reactivo de ninhidrina.

## 5. Captación y conversión "in vivo" de poliaminas y aminoácidos básicos.

### 5.1. Captación de poliaminas.

Se midió la captación de (U-<sup>14</sup>C)-putrescina y (U-<sup>3</sup>H)-espermidina tanto en *L.mexicana* como en *T.cruzi*.

Los parásitos se cosecharon en crecimiento exponencial, se lavaron dos veces con PBS, y se resuspendieron en el mismo buffer a una concentración de 5 a 10 x 10<sup>7</sup> células/ml. Se agregó (U-<sup>14</sup>C)-putrescina ( 4.7 mM, 104.6 mCi/mmol ) ó (U-<sup>3</sup>H)-espermidina ( 36 Ci/mmol, 2mM en los ensayos con *L.mexicana* y 0.08 mM en los ensayos con *T.cruzi* ). Después de distintos tiempos de incubación se tomaron alícuotas de 1 ml del cultivo que se diluyeron inmediatamente con 3 volúmenes de una solución de poliamina sin marcar ( 1 mM ) en PBS. La suspensión se filtró a través de membrana Millipore de 0.45 um de diámetro de poro, se lavó 3 veces con la misma solución de poliamina y los filtros se secaron al aire. La radiactividad incorporada por las células se determinó con un contador de centelleo líquido.

### 5.2. Captación de aminoácidos básicos radiactivos

La captación de (U-<sup>14</sup>C)-ornitina, (U-<sup>14</sup>C)-arginina y (U-<sup>14</sup>C)-lisina se determinó midiendo la incorporación de estos aminoácidos en células enteras de *L.mexicana* y *T.cruzi*.

Los parásitos en crecimiento exponencial se cosecharon y se lavaron como se describe en el caso anterior y se resuspendieron en el mismo buffer o en medio Dulbecco modificado sin arginina a una concentración de 5 a 10 x 10<sup>7</sup> células/ml agregándose los aminoácidos radiactivos ( 1 a 5 uCi/ml, 2 a 5 uM ). A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de 1 ml que se diluyeron con 3 volúmenes de una solución del aminoácido sin marcar ( 1 mM ) en PBS y las mezclas se filtraron por membrana Millipore de 0.45 um

de diámetro de poro. El filtro se lavó tres veces con la solución del aminoácido y se midió la radiactividad retenida en las células.

En los ensayos de competencia, los parásitos (  $2$  a  $4 \times 10^7$  células/ml ) se incubaron en presencia de un aminoácido radiactivo (  $0.5$  uCi/ml,  $2$  a  $5$  uM ) y de un aminoácido no marcado (  $100$  uM ) durante  $15$  minutos. Las muestras se procesaron como se mencionó anteriormente.

### *5.3. Metabolismo de poliaminas y de aminoácidos básicos.*

Para el estudio de diferentes reacciones metabólicas del camino de biosíntesis de poliaminas los parásitos en crecimiento exponencial se incubaron con un precursor radiactivo y los productos formados se analizaron por electroforesis en papel, cromatografía en placa delgada o descendente en papel.

Las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en el mismo buffer a una concentración de  $5$  a  $10 \times 10^7$  parásitos/ml y se agregó (U- $^{14}$ C)-putrescina, (U- $^{14}$ C)-ornitina , (U- $^{14}$ C)-arginina o (U- $^{14}$ C)-lisina. Luego de incubar por  $60$  minutos con los aminoácidos radiactivos o durante  $8$  horas con (U- $^{14}$ C)-putrescina, los parásitos se centrifugaron y se lavaron dos veces con PBS. Las células se lisaron con ácido perclórico  $0.2$  N y después de neutralizar con hidróxido de potasio los extractos celulares se centrifugaron a  $10.000$  xg por  $10$  minutos. La fracción soluble se analizó por electroforésis en papel o por cromatografía en placa delgada.

Por otra parte se estudió el efecto de inhibidores específicos de la biosíntesis de poliaminas. Con este propósito, los parásitos en crecimiento exponencial se cosecharon y los extractos se analizaron como en el caso anterior.



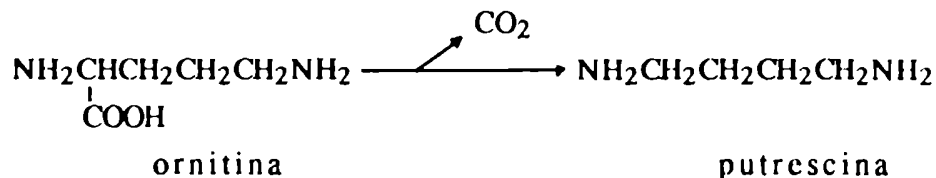
## 6. Síntesis de proteínas y determinación de la "vida media" de la ODC.

Con el propósito de estudiar la velocidad de recambio de la ODC de *L.mexicana* los parásitos en crecimiento logarítmico se incubaron en presencia de un inhibidor de la síntesis proteica. El cultivo se dividió en dos alícuotas y a una de ellas se agregó cichoheximida ( 50 ug/ml ). Después de incubar por distintos períodos se tomó muestras de ambas porciones que se centrifugaron y lavaron con PBS. Los parásitos se lisaron y se determinó la actividad de ODC como se describe más adelante.

La cinética de la síntesis de proteínas en cultivos en desarrollo exponencial se siguió por incorporación de (<sup>35</sup>-S)-metionina ( 10 uCi/ml, 0.1 uM ) en la fracción precipitable con 10% de ácido tricloroacético. Los cultivos de parásitos se incubaron a 26 °C con metionina radioactiva en presencia o ausencia de cichoheximida. A distintos tiempos se tomó alícuotas y se precipitó las proteínas por el agregado de ácido tricloroacético ( a una concentración final de 10% ). Después de mantener las suspensiones a 0 °C durante 30 minutos se filtraron a través de discos de fibra de vidrio Whatman GF/C. La radioactividad incorporada en el material insoluble se midió con un contador de centelleo líquido.

## 7. Determinación de la actividad de Ornitina Decarboxilasa.

Como ya se mencionó en la Introducción esta enzima cataliza la decarboxilación de la ornitina liberando CO<sub>2</sub> y formando putrescina que es la primera diamina del camino de biosíntesis de poliaminas.



La actividad enzimática se determinó midiendo la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de ornitina marcada en el  $\text{C}_1$  ( carboxilo ). El  $^{14}\text{CO}_2$  liberado durante la reacción enzimática se retiene sobre un trozo de papel de filtro impregnado en álcali.

Los cultivos de *L.mexicana* en crecimiento exponencial se cosecharon por sedimentación a 10.000 xg durante 5 minutos, se lavaron con un volumen de PBS y se resuspendieron a una concentración final de  $1 \times 10^9$  parásitos/ml en buffer A ( Tris-HCl 50 mM pH 7, DTT 1mM , EDTA 0.5 mM , PMSF 1mM , en presencia o ausencia de piridoxal-5'-fosfato 0.1 mM ) Las células se lisaron por congelamiento en  $\text{N}_2$  líquido y descongelamiento en baño de agua a  $10^\circ\text{C}$  ( este procedimiento se realizó 3 veces ), seguido de 3 períodos de 10 segundos de sonicación ( Branson Sonic Power, Co ). Los extractos se centrifugaron a 20.000 xg durante 30 minutos. La fracción soluble se utilizó como fuente de enzima, conservándose a  $-70^\circ\text{C}$ . Esta preparación enzimática es estable, al menos, durante 6 meses.

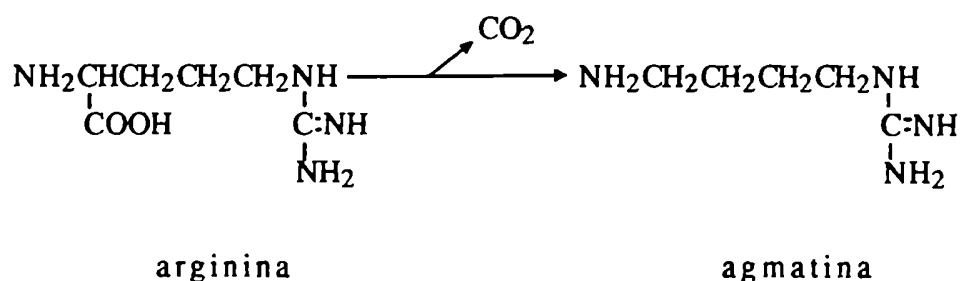
La mezcla de la reacción enzimática contiene:  $1\text{-}^{14}\text{C}$  L-ornitina 1 mM ( 3.46 Ci/mol ), Hepes-Na 50mM pH 7, DTT 1 mM, EDTA 0.5 mM, la concentración indicada en cada caso de PLP y el extracto celular en un volumen final de 50 ul. La incubación se realizó por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en un vial de vidrio ( de 20 ml de capacidad ) hermeticamente cerrado, que contenía un trozo de papel Wathman 3 MM de 2 x 2 cm impregnado en KOH 0.2 N y un tubo plástico eppendorf abierto con la mezcla de reacción. La reacción se detuvo mediante la adición rápida de 50 ul de ácido perclórico 0.2 N, volviéndose a cerrar el vial inmediatamente. Se incubó por 15 minutos adicionales para permitir que todo el  $^{14}\text{CO}_2$  producido se libere, y la radiactividad retenida en el papel se midió con un contador de centelleo líquido.

Una unidad de ODC se define como la cantidad de enzima que cataliza el desprendimiento de 1 nmol de  $^{14}\text{CO}_2$  por hora.

Para la caracterización de los productos formados y el estudio de la estequiometría de la reacción se utilizó (U-<sup>14</sup>C)-ornitina ( 0.5 mM, 8 uCi ) como sustrato. La incubación se detuvo con el agregado de un volumen de ácido perclórico 0.2 N. El <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> liberado se midió como se indicó anteriormente. El extracto ácido se neutralizó con KOH 5N y se centrifugó a 11.000 xg por 10 minutos. El sobrenadante obtenido se analizó por electroforesis en papel o cromatografía en placa delgada. Los compuestos radiactivos se detectaron por monitoreo en "Scanner" y las manchas correspondientes se eluyeron, determinándose su radiactividad con un contador de centelleo líquido.

### 8. Determinación de la actividad de Arginina decarboxilasa

Esta enzima cataliza la decarboxilación de la arginina produciendo agmatina, que luego se transforma en putrescina por acción de la agmatina ureohidrolasa.



La actividad enzimática se determina midiendo el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> liberado en forma análoga a la descrita para la ODC. Como sustrato se utilizó (U-<sup>14</sup>C)-arginina. La mezcla de reacción contiene: el extracto celular, L-(U-<sup>14</sup>C)-arginina ( 1 mM, 0.2 uCi ), Tris-HCl 50 mM pH 7.5, DTT 1 mM, EDTA 0.5 mM y PLP 0.1 mM en un volumen de 0.05 ml.

## *9. Modificación de la actividad de ODC por la adición de diversos metabolitos a cultivos de L.mexicana.*

Los cultivos de parásitos en crecimiento logarítmico se desarrollaron durante diferentes tiempos en presencia de putrescina 10 mM, espermidina 0.1 mM o  $\alpha$  DFMO 5 mM, respectivamente. Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron con PBS. Se prepararon extractos libres de células y en ellos se midió la actividad de ODC.

Cuando el cultivo se realizó en presencia de  $\alpha$  DFMO, el control correspondiente pero incubado en ausencia del inhibidor se dividió en dos alícuotas iguales y a una de ellas se agregó  $\alpha$  DFMO 5 mM inmediatamente antes de la cosecha. Los cultivos se centrifugaron y los parásitos se lavaron y lisaron como se describe anteriormente.

## *10. Análisis cinéticos de la actividad de ODC*

### *10.1. Modulación de la actividad enzimática por poliaminas y análogos.*

Con el propósito de estudiar la regulación de la actividad enzimática por el agregado de poliaminas y otros compuestos estructuralmente relacionados, el extracto celular obtenido en presencia de PLP 0.1 mM se usó para medir la actividad enzimática en presencia de diferentes cantidades de putrescina, espermidina, espermina, cadaverina, diaminopropano y ácido aminooxiacético (AOA). La reacción se detuvo con la adición de un volumen de ácido perclórico 0.2 N, midiéndose el  $^{14}\text{CO}_2$  liberado.

## **10.2. Inhibición de la actividad enzimática por análogos de la ornitina.**

### **10.2.1. Inhibición por $\alpha$ DFMO.**

Los extractos libres de células obtenidos en ausencia o en presencia de 0.1 mM PLP se preincubaron a 30 °C con distintas concentraciones de  $\alpha$  DFMO. A los tiempos indicados en cada experimento, se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ l que se agregaron a la mezcla de incubación sin ornitina radiactiva, manteniéndose en hielo. La reacción enzimática se inició con el agregado del sustrato radiactivo, en un volumen final de 200  $\mu$ l. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 37 °C. De esta manera el inhibidor está presente en la reacción enzimática a una concentración 20 veces menor que las usadas durante la preincubación. Los controles, mantenidos en hielo hasta el comienzo de la reacción, se realizaron agregando las cantidades correspondientes de  $\alpha$  DFMO. Con este procedimiento se puede medir la inhibición producida durante los períodos de preincubación.

### **10.2.2. Inhibición por $\alpha$ Metilornitina.**

Los extractos libres de células obtenidos en ausencia o en presencia de PLP 0.1 mM se incubaron con diferentes cantidades del inhibidor. La reacción se inició con el agregado del extracto enzimático y se incubó durante los tiempos indicados.

## **10.3. Preparación de la apoenzima de la ODC.**

La ODC requiere PLP para su actividad enzimática óptima. Con el propósito de remover completamente esta sustancia, las preparaciones enzimáticas se dializaron contra buffer que contenía hidroxilamina (95). Este compuesto reacciona con el PLP liberando a la enzima del cofactor.

Los cultivos de parásitos en crecimiento exponencial se cosecharon y los parásitos se lisaron en ausencia o en presencia de

PLP 0.1 mM. Los extractos enzimáticos se dializaron durante 1 hora a 4 °C contra 100 volúmenes de buffer B ( buffer A más Brij 35 0.02% ) que contenía hidroxilamina 10 mM. Las preparaciones enzimáticas tratadas con esta sustancia se dializaron nuevamente durante 16 hs a 4 °C contra 100 volúmenes de buffer B . Al cabo de este período los extractos se centrifugaron a 20.000 xg durante 15 minutos, descartándose el precipitado. La recuperación de la actividad de ODC se determinó en presencia de cantidades crecientes de PLP, realizando la reacción enzimática de acuerdo a lo descrito anteriormente.

## 11. Purificación de la ODC de *L.mexicana*.

### 11.1. Preparación del extracto enzimático.

El extracto enzimático se obtuvo a partir de cultivos de *L.mexicana* en crecimiento exponencial. Los parásitos se cosecharon por sedimentación a 10.000 xg durante 5 minutos, se lavaron con PBS y se resuspendieron a una concentración final de  $2 \times 10^9$  células/ml en buffer C ( HEPES-Na 50 mM pH 7, DTT 1 mM, EDTA 0.5 mM, piridoxal 5'-fosfato 0.1 mM ) con el agregado de PMSF 1 mM, leupeptina 0.1 mM, E-64 10 uM, 0.5% Nonidet P-40. Las células se mantuvieron durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, la suspensión se sonicó ( 3 períodos de 10 segundos ) y el extracto se centrifugó a 20.000 xg durante 30 minutos. El pellet obtenido se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 100.000 xg durante 60 minutos. La fracción soluble se utilizó como fuente enzimática.

Todas las operaciones que se describen a continuación se realizaron en presencia de PLP 0.1 mM y a 4 °C.

### 11.2. *Fraccionamiento con solventes orgánicos*

La fracción enzimática colocada en un baño de hielo y NaCl a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  se mezcló lentamente con 0.5 volúmenes de acetona previamente enfriada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( concentración final de 35% ). La suspensión se agitó por 15 minutos adicionales. Al cabo de este período el extracto se centrifugó a 20.000 xg por 15 minutos a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  , descartándose el precipitado.

### 11.3. *Cromatografía de intercambio iónico.*

Todas las etapas de cromatografía se realizaron en un aparato de FPLC ( Pharmacia ).

La fracción soluble obtenida luego de la precipitación con acetona se sembró sobre una columna de DEAE Sepharose "fast flow" ( Pharmacia/LKB Biotechnology, Inc., Piscataway, N.J. ) ( 1 x 10 cm ). equilibrada con buffer D ( buffer C con 0.02% Brij 35 ) que contenía ClNa 0.1 M. La muestra se lavó con 5 volúmenes del buffer de equilibrio, eluyéndose con un gradiente lineal de ClNa de 0.1 M a 0.5 M ( 5 volúmenes de columna ). Se recogieron fracciones de 2 ml.

Las fracciones con mayor actividad se juntaron y dializaron durante 3 hs contra 200 volúmenes de buffer D.

### 11.4. *Cromatografía de hidrofobicidad.*

La solución de enzima obtenida en la etapa anterior a la que se agregó ClNa hasta 1.8 M se sembró en una columna de resina Phenyl Superosa FPLC ( Pharmacia/LKB Biotechnology, Inc., Piscataway, N.J. ) previamente equilibrada con buffer D que contenía ClNa 1.8 M, lavándose con buffer de equilibrio. La enzima se eluyó con un gradiente lineal decreciente de ClNa de 1.8 M a 0.05 M en buffer D, recogiendo fracciones de 1 ml.

Las fracciones activas se juntaron y dializaron durante 3 hs contra 200 volúmenes de buffer D. A continuación, la muestra se concentró 5 a 10 veces con Microconcentrador Centricon-100 ( Amicon ).

### 11.5. *Cromatografía a través de tamiz molecular.*

Una columna de Superosa 6 FPLC ( Pharmacia/LKB Biotechnology, Inc., Piscataway, N.J. ) se equilibró con buffer D que contenía 50 mM ClNa. Una alícuota del extracto enzimático concentrado a la que se agregó ClNa 50 mM se sembró en la columna de Superosa que se desarrolló con el mismo buffer recogiendo fracciones de 0.5 ml.

La misma columna se calibró con ferritina ( 440 kDa ), aldolasa ( 158 kDa ), albumina bovina ( 67 kDa ) y ribonucleasa A ( 13.7 kDa ). El volumen de exclusión se determinó con blue dextran 2.000.

### 11.6. *Cromatografía en fase reversa.*

La preparación enzimática se sembró sobre una columna de Aquapore BU 300 ( C<sub>4</sub> ) ( Rainin Instruments, Inc ) de 2.1 x 30 mm que se había equilibrado con buffer fosfato de potasio 10 mM pH 6.5, DTT 1 mM, piridoxal 5' fosfato 0.1 mM. La muestra se lavó con el buffer de equilibrio y se eluyó con un gradiente lineal de 2-propanol 0 a 50 % en el buffer de equilibrio.

### 12. *Análisis de la purificación de la ODC por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.*

Alícuotas de los diferentes pasos de la purificación de ODC de *L.mexicana* se analizaron por electroforesis en geles de 12.5% de poliacrilamida- 0.1% SDS y un gel concentrador de 5% de acrilamida, ambos conteniendo urea 6 M (96).

En casos de preparaciones enzimáticas diluídas o de las que se quería eliminar el  $\alpha$  DFMO radiactivo soluble se agregó 20 ug de Citocromo C como "carrier" y luego 4 volúmenes de cloroformo: metanol (1:2). Después de 30 minutos a 4 °C se obtuvo una precipitación cuantitativa de las proteínas. Las muestras se



centrifugaron a 10.000 xg durante 15 minutos. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en 60 ul de buffer de ruptura y se calentaron a 100 °C por 3 minutos.

El buffer de ruptura contiene:

Urea	6 M
Glicerol	10%
Tris HCl, pH 6.8	0.025 M
SDS	2%
β Mercaptoetanol	0.13 M
Azul de bromo fenol	0.01 %

El buffer de electroforesis contenía Trizma base 0.025 M, glicina 0.2 M y SDS 0.1 % ( pH 8.2 ). Al finalizar la electroforesis después de 15 hs a corriente eléctrica constante de 6 mA el gel se fijó y se tiñó con una solución de Coomassie Blue R 250 (0.1 %) en metanol 50%:ácido acético 7.5%. Luego de 20 minutos se eliminó la solución colorante y el gel se decoloró con una solución de metanol 20%:ácido acético 7.5 % lavándose luego durante 16 hs con agua. En algunos casos los geles se tiñeron con reactivo de plata (97).

### *13. Determinación de la actividad de ODC en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes.*

Alicuotas de la preparación enzimática obtenida después de la cromatografía por hidrofobicidad en Phenyl Superosa se analizaron en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes. Se utilizaron geles separadores de 8% de acrilamida y un gel concentrador de 3.75% de acrilamida que contenían piridoxal 5'-fosfato 0.1 mM (98).

Se utilizó el mismo buffer de corrida que en el caso anterior pero con el agregado de PLP 0.1 mM en vez de SDS. Una vez finalizada la electroforesis una parte del gel se tiñó con Coomasie blue con el propósito de ubicar las bandas proteicas y los standards de peso molecular mientras que otra se cortó en segmentos de

1.5 mm de ancho para la determinación de la actividad enzimática. Esta se eluyó de cada segmento del gel homogeneizándolo con 0.2 ml de buffer D que contenía PLP 0.1 mM y 10 ug de albúmina bovina. Después de 1 hora a 4 °C se inició la reacción enzimática con el agregado de la ornitina radiactiva, incubándose 60 minutos a 37 °C

#### *14. Determinación del peso molecular de la ODC.*

El peso molecular de la ODC se determinó por cromatografía en Sephacryl S-200 ( Pharmacia ) empleando una columna de 1 x 90 cm. La columna se equilibró con buffer A que contenía 50 mM o 350 mM de ClNa en ausencia o presencia de PLP 0.1 mM.

La columna se calibró con aldolasa ( 150 kDa ), fosfatasa alcalina tipo III de *E.coli* ( 80 kDa ), albúmina bovina ( 67 kDa ), ovoalbúmina de pollo ( 43 kDa ) y citocromo C ( 12.5 kDa ). El volumen de exclusión se determinó con Blue dextran 2000.

El extracto enzimático obtenido en ausencia o en presencia de PLP 0.1 mM se sembró en la columna que se eluyó con buffer A que contenía ClNa 50 mM ó 350 mM y en ambos casos con o sin PLP 0.1 mM.

#### *15. Determinación del peso molecular de la subunidad de la ODC.*

##### *15.1. Unión específica al $\alpha$ DFMO radiactivo.*

Diferentes alícuotas de preparaciones de enzima obtenidas después de cromatografía de hidrofobicidad en Phenyl Superosa se incubaron con (3,4-<sup>3</sup>H)-DFMO. Se utilizó este método debido a que el DFMO se une covalente y específicamente a la enzima activa.

La mezcla de reacción contiene: Hepes-Na 50 mM pH 7, DTT 1 mM, EDTA 0.5 mM, PLP 0.1 mM, leupeptina 0.1 mM, E-64 0.1 mM,

(3,4-<sup>3</sup>H)-DFMO ( 33.3 mCi/umol, 2.65 uM ) y la enzima parcialmente purificada ( 40 ug ). Después de incubar durante 2 horas a 37 °C para completar la reacción, las proteínas se precipitaron con 4 volúmenes de cloroformo:metanol (1:2) dejando la mezcla a -20 °C durante 30 minutos. La suspensión resultante se centrifugó a 10.000 xg durante 15 minutos y el precipitado se resuspendió en 30 ul de buffer de ruptura.

Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS ( 12.5 % acrilamida , urea 6 M ) en las condiciones ya descriptas.

El gel se fijó y tiñó con Coomassie blue R 250. A continuación, se trató con salicilato de sodio 1M durante 60 minutos, se secó y se puso en contacto con una placa radiográfica Kodak X-0 Mat AR durante 3 meses a -70 °C.

### *15.2. Disociación de la enzima nativa aislada por electroforesis no desnaturizante.*

Inicialmente la ODC se localizó por tinción con Coomassie blue o por actividad enzimática en calles paralelas de geles de poliacrilamida no desnaturizantes. La porción de gel conteniendo la enzima teñida se cortó, llevó a sequedad con N<sub>2</sub> gaseoso y se resuspendió en 60 ul de buffer de ruptura, calentando 3 minutos a 100 °C. A continuación la muestra se sometió a una electroforesis en geles desnaturizantes en las condiciones ya descriptas.

### *16. Inmunoprecipitación de la ODC de L.mexicana*

Con el propósito de estudiar el grado de homología estructural entre la ODC de *L.mexicana* y la enzima de células de mamíferos ( fibroblastos de ratón BPA31 ), ambas preparaciones enzimáticas se incubaron con diferentes cantidades de antisuero preparado contra ODC de riñón de rata, cedido gentilmente por el Dr. Lo Persson ( Departamento de Fisiología de la Universidad de Lund, Suecia ).

Las células BPA 31 se cultivaron en monocapa en cajas de Petri con medio MEM en una atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub> y a 35 °C. Las células se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron a una concentración de 5 x 10<sup>6</sup> células/ml en Tris HCl 5 mM pH 7.5, DTT 2 mM, PMSF 0.5 mM y PLP 0.08 mM. Luego se lisaron por congelamiento con N<sub>2</sub> líquido y descongelamiento en baño a 10 °C ( 3 ciclos ), seguido de 2 períodos de 10 segundos de sonicación. El extracto se centrifugó a 10.000 xg durante 30 minutos, utilizándose la fracción soluble como fuente de enzima, que se conservó a -70 °C.

La mezcla para los ensayos de inmunoprecipitación contiene: Tris HCl 25 mM pH 7.3, EDTA 0.05 mM, diferentes diluciones del anticuerpo y extracto enzimático de células BPA 31 o de *L.mexicana* . El anticuerpo contra ODC de riñón de rata se diluyó en Tris HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 0.1 mM. Para los ensayos control se utilizó suero no inmune de conejo, que fue donado por el Dr. Carlos Frasch.

Después de incubar durante 60 minutos a 0 °C, el complejo antígeno-anticuerpo se precipitó con proteína A ( IgG sorb, 5 mg ), manteniéndose 60 minutos adicionales a 0 °C. A continuación, la suspensión se centrifugó durante 15 minutos a 10.000 xg y se determinó la actividad residual de ODC en la fracción soluble.

#### 16. *Determinación de la concentración de proteínas.*

Las concentraciones de proteínas presentes en las muestras se determinaron utilizando el método descripto por Lowry y colaboradores (99), modificado por Peterson (100) o por el descripto por Bradford (101).

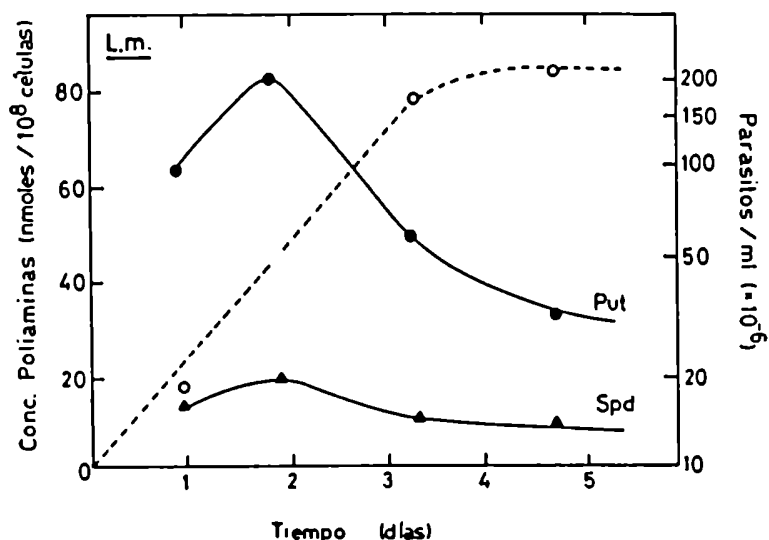
### III. RESULTADOS

#### 1. Contenido endógeno de poliaminas en *L.mexicana* y *T.cruzi*

Las poliaminas son compuestos esenciales para el desarrollo y la multiplicación celular. En células de mamíferos, levaduras y hongos las poliaminas más abundantes son putrescina, espermidina y espermina, mientras que la mayoría de las bacterias y los protozoarios carecen de espermina.

Para estudiar la composición y el contenido endógeno de poliaminas en parásitos, las formas promastigotes de *L.mexicana* se cultivaron en medio axénico y se cosecharon en distintos momentos de su curva de desarrollo. El contenido de poliaminas de los extractos obtenidos se analizó por cromatografía en placa delgada de sus derivados dansilados.

Figura 7: Contenido endógeno de poliaminas en *L.mexicana*.

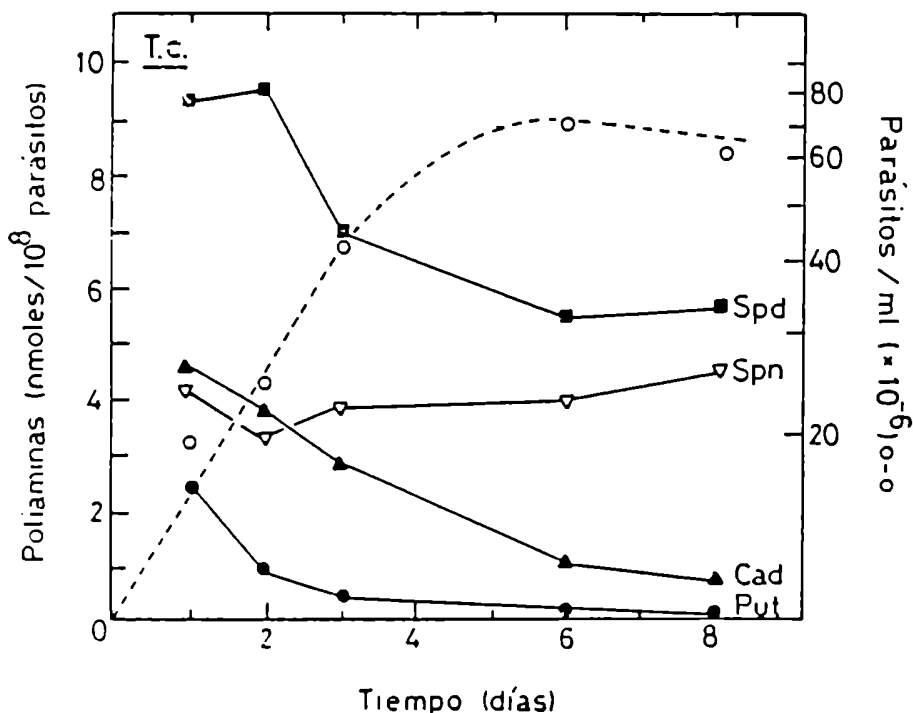


Células de *L.mexicana* se extrajeron con ácido perclórico y los extractos se sometieron a dansilación y posterior análisis por cromatografía en placa delgada. Los derivados dansilados se cuantificaron por fluorometría.

En este parásito sólo se detectó putrescina y espermidina, en una relación de 4 a 1. Los valores máximos de putrescina se observaron en fase temprana o mitad de la fase logarítmica de crecimiento.

Por otra parte en cultivos de *T.cruzi* se encontró putrescina, espermidina, espermina y cadaverina. Mientras que el nivel de espermina presenta cambios moderados a lo largo de la curva de crecimiento, el contenido de putrescina, espermidina y cadaverina disminuye marcadamente en la fase estacionaria del desarrollo. Contrariamente a lo que ocurre en otros parásitos la putrescina es la poliamina menos abundante en *T.cruzi*.

Figura 8: Niveles intracelulares de poliaminas en *T.cruzi*



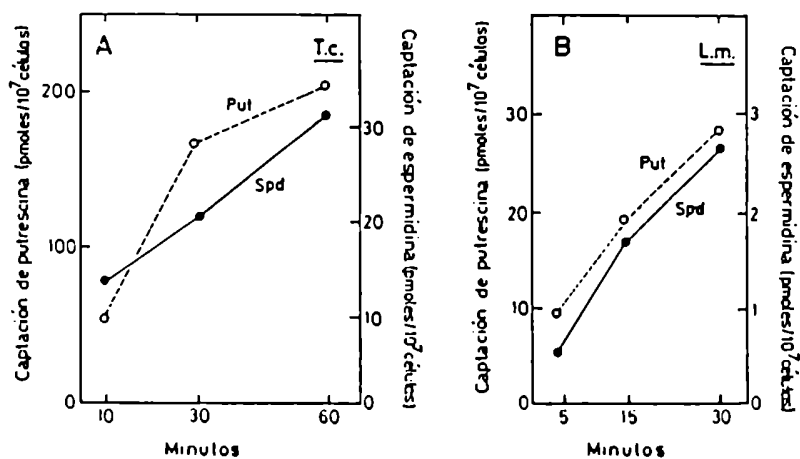
El análisis de las poliaminas endógenas se realizó en forma análoga a la descrita en la Figura 7.

## 2. Captación de poliaminas por *L.mexicana* y *T.cruzi*.

El medio de cultivo utilizado para el desarrollo de *L.mexicana* y *T.cruzi* contiene cantidades apreciables de espermidina, espermina y cadaverina pero no de putrescina ( contenido de poliaminas en nmol/ml en el medio fresco: putrescina 0.1, cadaverina 5.3, espermidina 27, espermina 16.7 ). Con el propósito de estudiar si las poliaminas detectadas en los parásitos son tomadas del medio de cultivo o se sintetizan en los parásitos, se determinó la captación de estas poliaminas en cultivos de *L.mexicana* y *T.cruzi* agregando poliaminas marcadas y midiendo la radiactividad retenida por las células.

Como se observa en la Figura 9 ambos parásitos son capaces de captar las poliaminas del medio, siendo el transporte de putrescina 10 veces mayor que el de espermidina. Además en *T.cruzi* la captación de poliaminas es marcadamente superior que la observada en *L.mexicana*.

Figura 9: Captación de poliaminas radiactivas por células de *L.mexicana* y *T.cruzi*.



Los parásitos se incubaron en PBS con putrescina o espermidina radiactivas durante los tiempos indicados. Las muestras se filtraron a través de membrana Millipore y la radiactividad retenida se midió en contador de centelleo líquido.

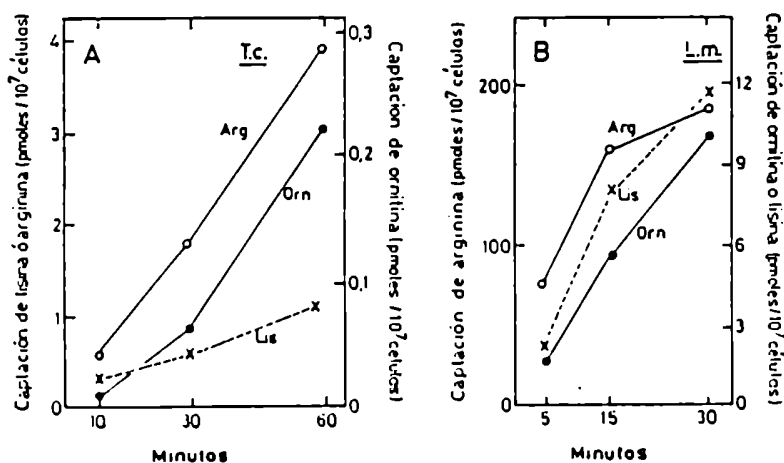
### 3. Captación de aminoácidos básicos por *L.mexicana* y *T.cruzi*.

Las células procariotas y eucariotas sintetizan las poliaminas utilizando como sustratos ornitina, arginina o lisina ( ver Introducción ). Con el objeto de investigar si los parásitos en estudio son capaces de captar estos aminoácidos del medio, cultivos en crecimiento exponencial se incubaron con los aminoácidos marcados determinándose la radiactividad incorporada por las células.

Como se observa en la Figura 10 tanto *L.mexicana* como *T.cruzi* son capaces de tomar los aminoácidos del medio. Para *L.mexicana* la captación de estos compuestos es marcadamente mayor que la observada en *T.cruzi*. En este parásito la entrada de ornitina es muy baja, mientras que la de arginina y lisina es relativamente apreciable.

Los estudios de competencia para la entrada de estos aminoácidos en *Leishmania* han mostrado que la arginina ( pero no la lisina ) disminuye el transporte de ornitina; en cambio este aminoácido no altera la entrada al parásito de cualquiera de los otros dos.

Figura 10: Captación de aminoácidos básicos radiactivos por cultivos de *L.mexicana* y *T.cruzi*.



Los parásitos se incubaron con ornitina, arginina o lisina radiactivas durante los tiempos indicados. Las muestras se diluyeron y filtraron a través de membrana Millipore. La radiactividad retenida se midió en contador de centelleo líquido.

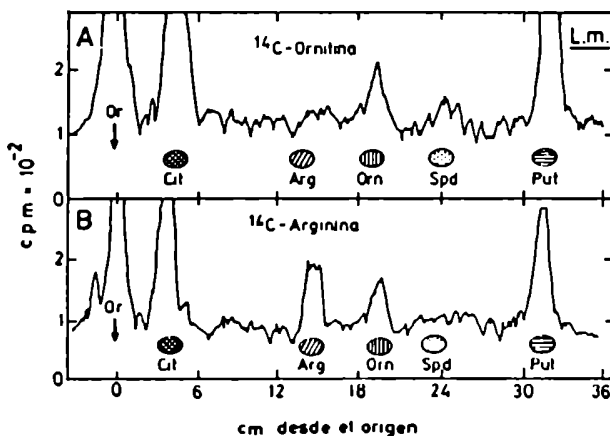


#### 4. Caminos biosintéticos de poliaminas en *L. mexicana* y *T. cruzi*

La biosíntesis de poliaminas ha sido estudiada en diferentes organismos procarióticos y eucarióticos. Con el propósito de investigar el metabolismo de poliaminas en los parásitos, cultivos de *L. mexicana* y *T. cruzi* se incubaron con los aminoácidos radiactivos ornitina, arginina o lisina, que son los posibles precursores de putrescina y cadaverina, y con (U- $^{14}\text{C}$ )-putrescina, precursor de la espermidina. Las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron con PBS y se resuspendieron en el mismo buffer. Luego de la incubación con los precursores los parásitos se lisaron según se describe en Materiales y Métodos. Los extractos perclóricos se analizaron por electroforesis en papel, cromatografía en placa delgada de los derivados dansilados y cromatografía descendente en papel.

Como se muestra en la Figura 11 los cultivos de *L. mexicana* incubados con ornitina o arginina radiactivas sintetizan putrescina y otros compuestos no caracterizados de baja movilidad electroforética.

Figura 11: Conversión *in vivo* de aminoácidos básicos en poliaminas en promastigotes de *L. mexicana*.



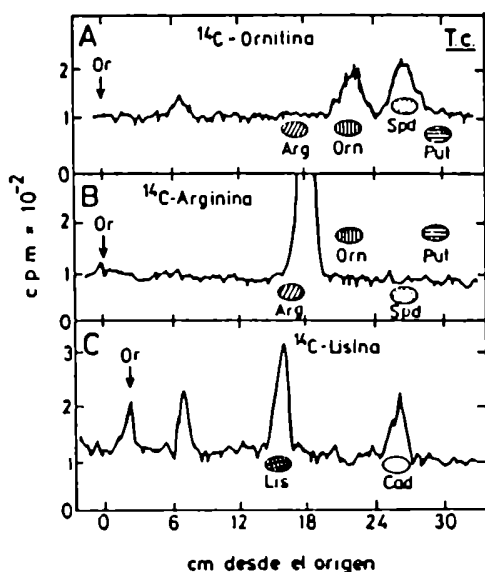
Los parásitos se incubaron durante 1 hora con ornitina (panel A) arginina radiactiva (panel B). Los extractos celulares se analizaron por electroforesis en papel, detectándose la radiactividad mediante el uso de un "Scanner".

Cuando los parásitos se incubaron con (U-<sup>14</sup>C)-arginina también se detectó ornitina radiactiva (Figura 11 B). Esto podría indicar que la putrescina observada se originaría a partir de la actividad enzimática de ODC, la que utilizaría como sustrato a la ornitina, siendo este último aminoácido formado por la actividad enzimática de arginasa sobre la arginina.

Por otra parte, como se observa en la Figura 12 A cuando los cultivos de *T.cruzi* se incubaron con ornitina radiactiva no se observa la formación de putrescina. En contraste, las células sintetizaron un componente que comigra con el standard de espermidina y otro compuesto no identificado. La primera sustancia luego de su elución, dansilación y posterior análisis por cromatografía en placa delgada no se comportó como espermidina.

Cuando los parásitos se incubaron con arginina o lisina radiactivas no se observó la formación de poliaminas ( Figura 12 B y C ). Si bien los parásitos incubados con (U-<sup>14</sup>C)-lisina sintetizaron un compuesto que comigra con el standard de cadaverina, esta sustancia no se comportó como cadaverina luego de su elución, dansilación y posterior cromatografía en placa delgada.

Figura 12: Conversión *in vivo* de aminoácidos básicos en epimastigotes de *T.cruzi*.

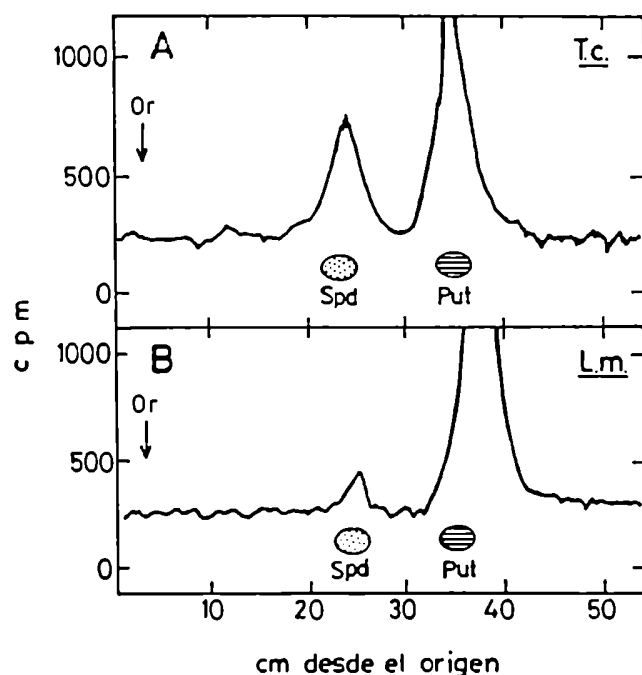


Los parásitos se incubaron con ornitina (A), arginina (B) o lisina (C) radiactivas durante 2 horas. Los extractos celulares se analizaron de manera análoga a la descripta en la figura 11.

Por otra parte, cuando los cultivos de *L. mexicana* se incubaron con (U-<sup>14</sup>C)-putrescina se observó la transformación parcial en espermidina. Esta sustancia se eluyó y se caracterizó como espermidina por cromatografía descendente en papel y por cromatografía en placa delgada luego de la dansilación.

Esta conversión también se observó en *T. cruzi*, siendo la transformación de putrescina en espermidina marcadamente mayor en este parásito que en *L. mexicana*.

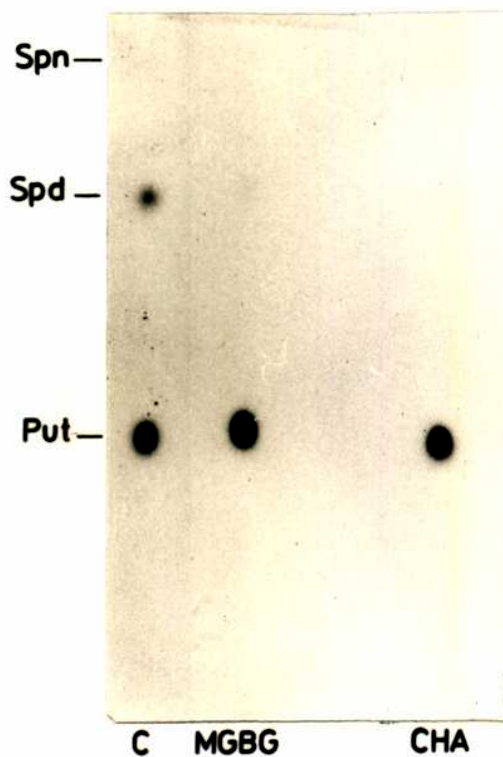
Figura 13: Conversión *in vivo* de putrescina en espermidina en *T. cruzi* y *L. mexicana*.



Los parásitos se incubaron durante 8 horas con putrescina radiactiva. Los extractos celulares se analizaron por cromatografía descendente en papel. La radiactividad se detectó con un "Scanner".

Se observó que la transformación de putrescina en espermidina tanto en *L.mexicana* como en *T.cruzi* puede bloquearse específicamente por inhibidores de la S-adenosil metionina decarboxilasa ( el MGBG ) o de la espermidina sintetasa ( la ciclohexilamina ) ( Figura 14 ).

Figura 14: Inhibición de la biosíntesis de espermidina en *L.mexicana* y *T.cruzi*.



Los parásitos se incubaron durante 16 horas con putrescina radiactiva sin (C) o con el agregado de MGBG ( 2 uM ) o ciclohexilamina ( 1 uM, CHA ). Las poliaminas se dansilaron y los derivados correspondientes se analizaron en cromatografía sobre placa delgada. Los productos se detectaron por radioautografía.

Estos resultados parecen indicar que *L.mexicana* sintetizaría sus poliaminas a partir de la ornitina y arginina endógenas o que ingresan del medio, en tanto que *T.cruzi* necesitaría captar directamente la putrescina del medio de cultivo.

## 5. Detección y caracterización de ODC en *L.mexicana*.

### 5.1. Detección de la enzima

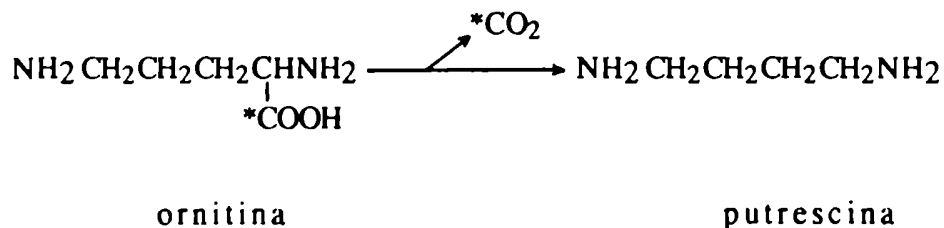
Como se ha mencionado anteriormente los cultivos de *L.mexicana* sintetizan putrescina cuando se incuban con ornitina o arginina. También, se observó la formación de ornitina radiactiva cuando la incubación se realiza en presencia de (U-<sup>14</sup>C)-arginina. Este hecho indicaría la presencia de una actividad enzimática de arginasa que, al convertir arginina en ornitina proporciona el sustrato adecuado a la ODC que finalmente lo transformaría en putrescina.

Numerosos estudios mostraron que en bacterias y en células eucariotas la síntesis de putrescina es catalizada por la ODC que utiliza ornitina como sustrato.

Con el objetivo de estudiar si los extractos libres de células de *L.mexicana* son capaces de sintetizar putrescina, se ensayó las actividades de ODC y ADC en lisados de parásitos cosechados durante su crecimiento exponencial.

Se observó una elevada actividad enzimática de ODC ( 60 a 100 nmol/h/mg proteína ), en tanto que sólo se detectó un bajo nivel de actividad de ADC ( 1 a 1.5 nmol/h/mg proteína ).

La actividad de ODC se determina midiendo el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> liberado a partir de ornitina marcada en el carboxilo 1.

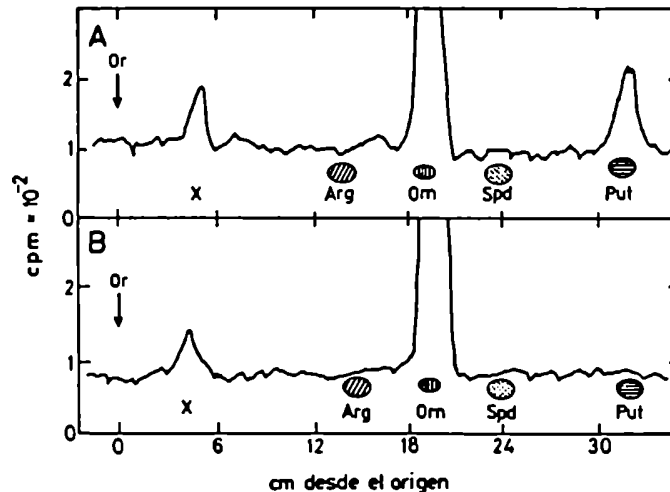


La ornitina puede ser sustrato alternativo de una decarboxilación oxidativa ( que genera CO<sub>2</sub> y 4 aminobutamida (102) o dar origen a glutamato (103) y CO<sub>2</sub> por la acción secuencial de

varias enzimas de la vía de ornitina-2-oxoácido aminotransferasas ). Por lo tanto para poder identificar si el  $^{14}\text{CO}_2$  liberado era el producto de una verdadera actividad de ODC el extracto celular se incubó con ornitina uniformemente marcada durante 60 minutos caracterizándose luego los productos formados por electroforesis en papel. A continuación las manchas radiactivas se eluyeron y se cuantificaron por centelleo líquido.

Como se observa en la Figura 15 A, los extractos libres de células sintetizan putrescina ( la que se caracterizó por dansilación y posterior análisis en cromatografía en placa delgada ) y otra sustancia ( denominada X ) no identificada aún que comigró con el standard de citrulina, mientras que parte de la ornitina radiactiva queda sin utilizar.

Figura 15: Análisis electroforético de los productos obtenidos por la incubación de un extracto libre de células de *L.mexicana* con ornitina radiactiva.



Panel A: Extractos celulares se incubaron durante 1 hora a 37°C en presencia de L-(U- $^{14}\text{C}$ )-ornitina. La reacción se detuvo con el agregado de un volúmen de ácido perclórico; el extracto ácido se neutralizó y se centrifugó, y los productos radiactivos del sobrenadante se analizaron por electroforesis en papel. La radiactividad se detectó con el uso de un "Scanner". El panel B muestra los productos obtenidos cuando la incubación se realiza en presencia de  $\alpha$  DFMO 1 mM.

Como se ha mencionado el  $\alpha$  DFMO es un potente inhibidor específico de la ODC. Como se ve en la Figura 15 B cuando la reacción enzimática se realiza en presencia de este inhibidor se observa un bloqueo completo de la formación de putrescina, mientras, el compuesto X se sintetiza aún, aunque en menor cantidad.

Por otra parte, estudios con sistemas animales han mostrado que bajas concentraciones de ácido oxiacético ( AOA ) inhiben la liberación de CO<sub>2</sub> producido por la decarboxilación oxidativa de la ornitina catalizada por la enzima mitocondrial ornitina-2-oxo-ácidoaminotransfera (103). En nuestro sistema, el agregado de AOA no produjo inhibición de la actividad enzimática.

	Actividad de ODC ( % respecto al control )
Ornitina 1 mM	100
Ornitina 1 mM + AOA 20 $\mu$ M	105

### 5.2. Estequiometría de la reacción catalizada por la ODC.

Con el objeto de estudiar la estequiometría de la reacción enzimática catalizada por la ODC de *L.mexicana* los extractos libres de células se incubaron en presencia de (U-<sup>14</sup>C)-ornitina durante 60 minutos. Otra mezcla de reacción idéntica se trató a tiempo 0 con un volumen de ácido perclórico 0.2 N ( blanco de reacción ). El <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> liberado en ambos casos se midió como se describe en Materiales y Métodos, mientras que los otros productos formados se analizaron por electroforésis en papel, detectándose los compuestos radiactivos con el uso de un "Scanner". Las sustancias marcadas se eluyeron y se determinó su radiactividad por centelleo líquido.

Como se observa en la Tabla 1, el descenso en la cantidad de ornitina durante la reacción es equivalente a la formación de putrescina ( o a la liberación de  $^{14}\text{CO}_2$  ) más el compuesto X. Para calcular el número de nmoles sintetizados del compuesto X se ha considerado que dicha sustancia contiene todos los átomos radiactivos que provienen de la ornitina, dado que la cantidad de X no varía si se utiliza (1- $^{14}\text{C}$ )-ornitina, (2,3- $^3\text{H}$ )-ornitina o (5- $^3\text{H}$ )-ornitina como sustrato. Esto indicaría una correcta relación estequiométrica entre los sustratos y los productos de la reacción enzimática catalizada por la ODC.

Tabla 1: Estequiometría de las reacciones enzimáticas catalizadas por el extracto celular de *L.mexicana*.

	Variación de sustratos y productos ( nmoles/hora )			
	orn	put	CO <sub>2</sub>	X
Experimento 1	-0.16	+0.14	+0.12	+0.03
Experimento 2	-0.29	+0.21	+0.20	+0.08

La reacción enzimática se realizó de manera análoga a la descrita en la Figura 15. El  $^{14}\text{CO}_2$  liberado se cuantificó por centelleo líquido. La cantidad de cada compuesto que desaparece o se forma se calculó en base al blanco de reacción a tiempo 0. Los signos (-) y (+) representan el descenso o el incremento en las cantidades de los compuestos indicados, respectivamente.

Los resultados descriptos parecen indicar que los extractos libres de células de *L.mexicana* catalizan dos reacciones enzimáticas independientes. Ambos procesos enzimáticos utilizarían a la ornitina como sustrato, y uno de ellos estaría catalizado por la ODC. La otra reacción daría lugar al compuesto X.



### 5.3. Requerimientos de la ODC de *L.mexicana*

Como se muestra en la Tabla 2 cuando el PLP y/o DTT no se incluyen en la preparación del extracto libre de células y en la mezcla de incubación, la actividad de ODC se reduce marcadamente. Este comportamiento es similar al observado para la enzima de *T.brucei* y de células animales.

Por otra parte la ausencia de EDTA o un exceso de  $Mg^{2+}$  o nucleótidos no modifican la actividad enzimática.

Tabla 2: Requerimientos para una actividad enzimática óptima.

Mezcla de reacción	Actividad de ODC nmoles/hora/mg proteína
Sistema completo	57.7 ( 100% )
Piridoxal 5'-fosfato	18.3 ( 31.7 % )
- DTT	44.1 ( 76.4 % )
+ $Mg^{2+}$ 4 mM	56.4 ( 97.8 % )
+ GTP 0.8 mM	60.5 ( 105 % )
+ ATP 0.6 mM	62.3 ( 108 % )

La reacción enzimática descripta como sistema completo se realizó de manera análoga a la indicada en la Figura 15. Los valores son el promedio de experimentos realizados por duplicado.

La velocidad de la reacción es lineal al menos por 60 minutos y es proporcional a la cantidad de proteína del extracto de *L.mexicana* hasta 150 ug.

El pH óptimo para la actividad enzimática se determinó usando buffer Tris HCl para el rango de 6.8 a 9.1 y buffer Imidazol de pH 5.5 a 6.4. La máxima actividad de la enzima en presencia del cofactor se observó a pH 6.9.

La enzima muestra un alto grado de selectividad por el sustrato: la L-ornitina. La L-lisina, un aminoácido con alta homología estructural, puede ser descarboxilada con una menor eficiencia por la ODC aislada de hígado de rata (104) o de riñón de ratón (105), generando cadaverina como producto de la reacción enzimática. En nuestro sistema y en las condiciones experimentales mencionadas para el ensayo, la lisina no es descarboxilada por la ODC de *L.mexicana*.

		Actividad de ODC ( % respecto al control )
(1- <sup>14</sup> C)-Ornitina	1 mM	100
(U- <sup>14</sup> C)-Lisina	1 mM	0
(U- <sup>14</sup> C)-Lisina	10 mM	0

Por otra parte, los estudios de competencia mostraron que la lisina prácticamente no inhibe la descarboxilación de la ornitina.

		Actividad de ODC ( % respecto al control )
Sistema completo		100
Sistema completo + lisina	1 mM	95
Sistema completo + lisina	10 mM	84

## 6. *Propiedades cinéticas de la ODC de L.mexicana.*

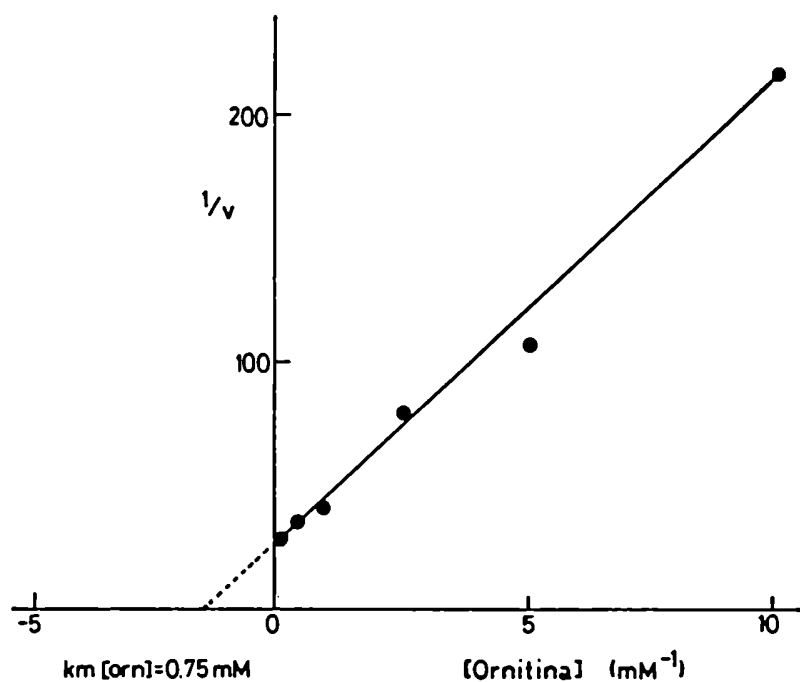
### 6.1. *Determinación de la constante de afinidad para ornitina.*

El Km aparente para la ornitina correspondiente a la reacción catalizada por el extracto enzimático obtenido e incubado en presencia de PLP es de 0.75 mM, mientras que el valor obtenido para dicho parámetro cinético es de 0.71 mM cuando el ensayo se realiza con extracto preparado y ensayado en ausencia del cofactor.

Estos valores son 2.5 veces mayores que los obtenidos para la enzima aislada de *T.brucei* (92).

La velocidad máxima para la reacción enzimática realizada en presencia o ausencia de PLP es 1.88 y 0.73 nmol/min/mg proteína, respectivamente.

Figura 16: Determinación del  $K_m$  aparente para ornitina y de la velocidad máxima de la reacción correspondiente a la ODC de *L.mexicana*.

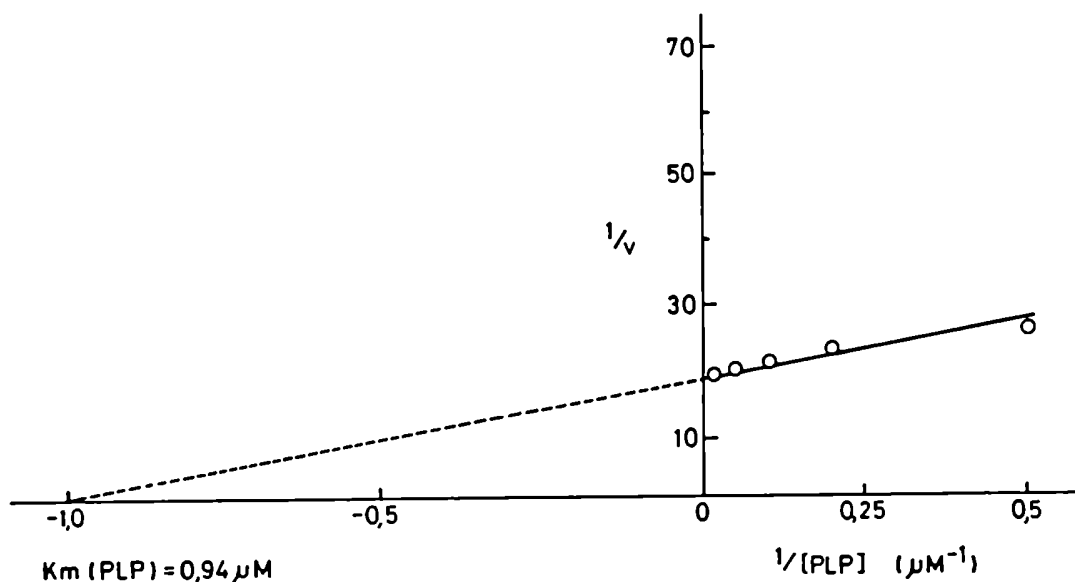


Velocidad de reacción en función de la concentración de ornitina.

## 6.2. Determinación de la constante de afinidad para el cofactor ( PLP ).

Como se muestra en la Figura 17 cuando se uso un extracto celular preparado en ausencia de PLP se obtuvo un valor muy pequeño correspondiente a la  $K_m$  aparente del cofactor ( $K_m=0.94 \mu\text{M}$ ). Este valor es semejante al observado con la ODC biosintética de *E.coli*.

Figura 17: Determinación de la  $K_m$  aparente para el PLP.



Velocidad de reacción catalizada por ODC versus concentración de PLP.

Por otra parte, el valor obtenido de  $K_m$  para el PLP de la enzima previamente dializada contra hidroxilamina ( ver más adelante ) fue  $25 \mu\text{M}$ , considerablemente superior al observado para la preparación enzimática anteriormente mencionada.

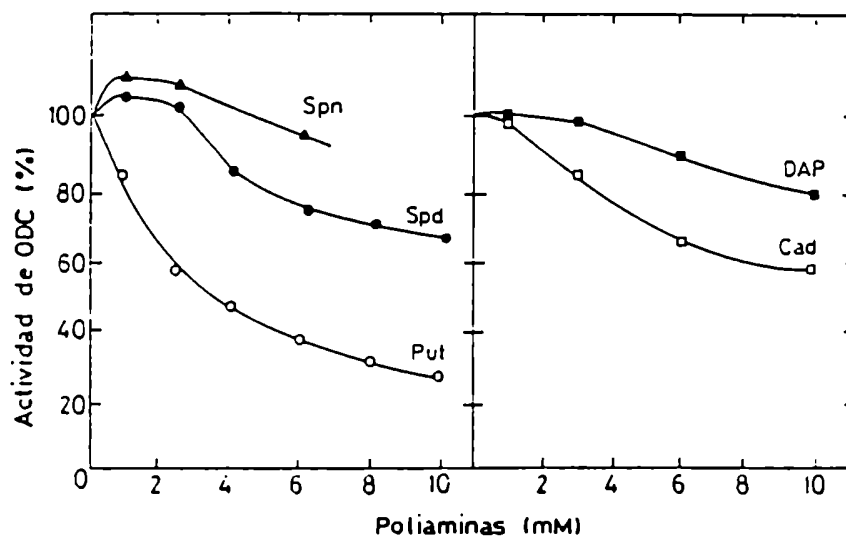
### 6.3. Modificación de la actividad de ODC de *L.mexicana* por el efecto de diversos metabolitos.

Estudios previos mostraron que los niveles de ODC en células animales son regulados negativamente por putrescina, el producto de la reacción, y que tanto la espermidina como la espermina son inhibidores competitivos débiles.

Con el propósito de estudiar el efecto de la putrescina y de otras poliaminas sobre la actividad de ODC de *L.mexicana*, extractos enzimáticos obtenidos en presencia de PLP 0.1 mM se incubaron con diferentes cantidades de los compuestos mencionados.

Como se observa en la Figura 18 la putrescina es un potente inhibidor de la enzima. Espermidina, espermina y el diaminopropano ejercen, a bajas concentraciones, un leve efecto estimulador que desaparece a concentraciones mayores de 4 mM. Por el contrario, espermidina y cadaverina a altas concentraciones ejercen un moderado efecto inhibitorio.

Figura 18: Efecto del agregado de diversas poliaminas sobre la actividad de ODC de *L.mexicana*.



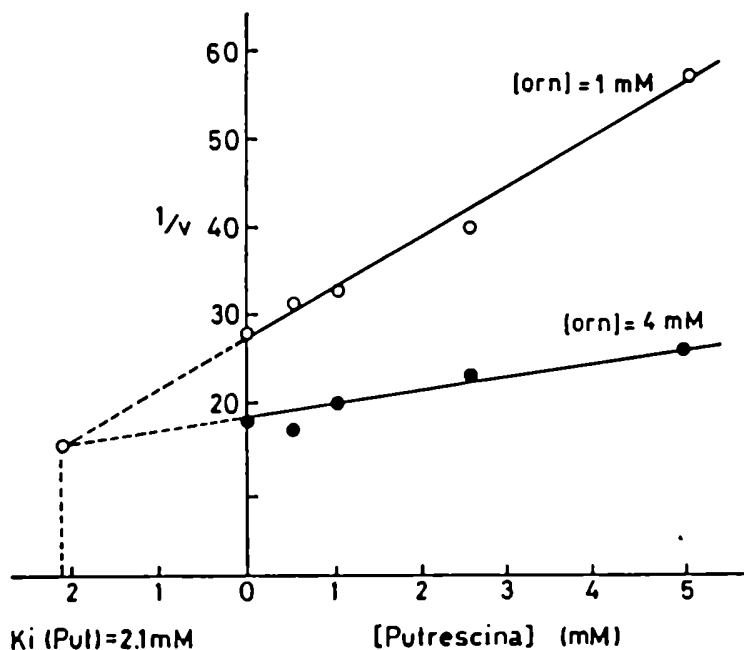
El extracto celular se incubó durante 30 minutos a 37°C en presencia de cantidades crecientes de diferentes poliaminas.

#### 6.4. Determinación de la constante de inhibición para la putrescina.

Con el objeto de estudiar si la putrescina es un inhibidor competitivo de la ODC de *L. mexicana* el extracto enzimático se incubó con cantidades crecientes de putrescina a dos concentraciones distintas de ornitina determinándose el valor de la constante de inhibición por el método gráfico de Dixon (106).

El valor de  $K_i$  para la putrescina con el extracto celular obtenido y ensayado en presencia de PLP es de 2.1 mM ( Figura 19 ). Este valor es 3 veces mayor que el obtenido para la  $K_m$  aparente de la ornitina. Si la preparación enzimática y la reacción se realiza en ausencia del cofactor, la constante de inhibición para la putrescina es de 1.5 mM.

Figura 19: Determinación de la constante de inhibición para la putrescina.



Extractos obtenidos en presencia de PLP 0.1 mM se ensayaron con cantidades crecientes de putrescina en presencia de ornitina 1 o 4 mM.

## 6.5. Inhibición de la ODC de *L.mexicana* por análogos de la ornitina.

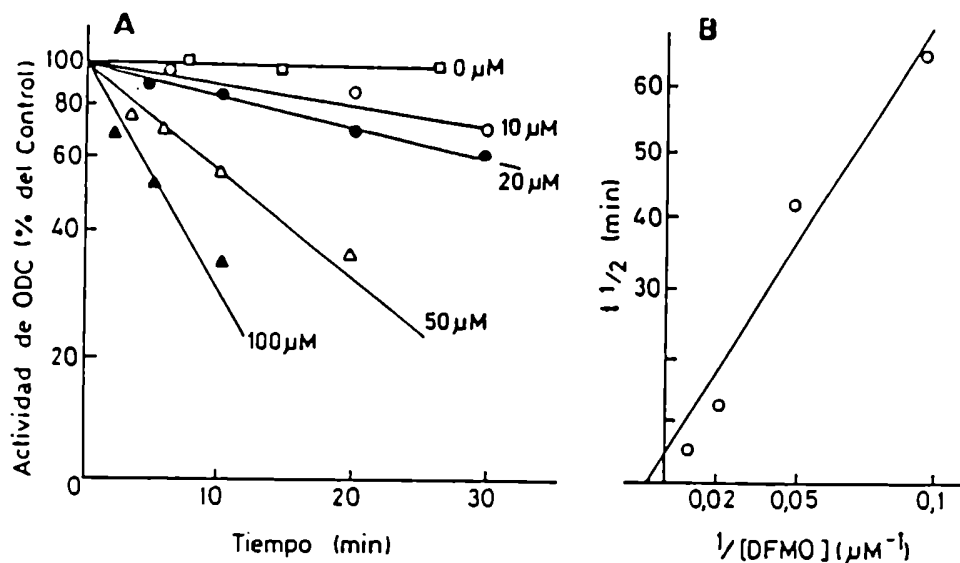
### 6.5.1. Inhibición por $\alpha$ DFMO.

Numerosos estudios han mostrado que el compuesto  $\alpha$  DFMO es un potente inhibidor irreversible y específico de la ODC aislada de células animales, hongos y plantas, en tanto que la enzima de *E.coli* es insensible a este compuesto.

El mecanismo inhibitorio involucra una descarboxilación enzimática del  $\alpha$  DFMO originando un compuesto intermedio que inactivaría a la enzima por la formación de una unión covalente a una cisteína ubicada en el sitio activo o cerca de él.

La Figura 20 muestra las curvas de inhibición de la ODC preincubada por diferentes períodos con varias concentraciones del inhibidor. La inactivación por  $\alpha$  DFMO de la enzima obtenida y ensayada en presencia de PLP 0.1 mM es dependiente del tiempo. La constante de inhibición se calculó por el método de Kitz y Wilson (107). El  $K_i$  aparente para el  $\alpha$  DFMO resultó ser 0.2 mM, mientras que el tiempo medio de inactivación obtenido por extrapolación a concentraciones saturantes de  $\alpha$  DFMO es aproximadamente 3 minutos. Los valores observados son similares a los descritos para *T.brucei* ( $K_i$ : 220  $\mu$ M;  $T_{1/2}$  inactivación: 2.7 minutos ).

Figura 20: Inactivación de la ODC de *L.mexicana* por  $\alpha$  DFMO.



La reacción enzimática se realizó como se describe en Materiales y Métodos. Panel A:  $\ln(V/V_0)$  versus tiempo de inactivación (minutos).  $V$  es la velocidad de reacción a distintos tiempos y  $V_0$  es la velocidad de reacción a tiempo 0. Panel B: tiempo de vida media de la enzima durante la inactivación con  $\alpha$  DFMO versus  $1/\text{concentración}$  de  $\alpha$  DFMO.

### 6.5.2. Inhibición por $\alpha$ Metilornitina.

Algunos autores han descrito que los  $\alpha$  metil aminoácidos pueden servir como sustratos alternativos para aminoácido decarboxilasas. Abdel-Monem et al. (108) observaron que el compuesto  $\alpha$  metilornitina es un inhibidor competitivo y reversible de la ODC de células de mamíferos y *Lactobacillus* 30 a, en tanto que Brauley y Ferro (109) mostraron que dicha sustancia disminuía la velocidad de crecimiento y el contenido de poliaminas en *S.cerevisiae*.

Con el objeto de estudiar si la ODC de *L.mexicana* es sensible a la inhibición por la  $\alpha$  metilornitina, extractos enzimáticos obtenidos y



ensayados en ausencia o en presencia de PLP 0.1 mM se incubaron con diferentes concentraciones del inhibidor.

La enzima obtenida y ensayada en ausencia de PLP es más susceptible a la inhibición por  $\alpha$  metilornitina (  $K_i$ : 0.3 mM ), mientras que el  $K_i$  aparente para  $\alpha$  MO de la enzima preparada en presencia del cofactor es de 1.1 mM.

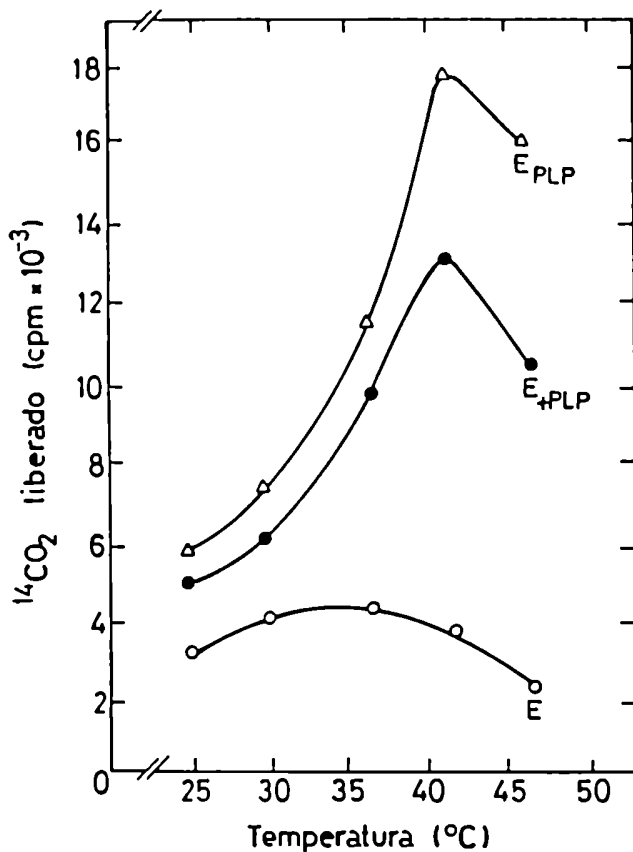
#### *6.6. Efecto de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de la ODC*

##### *6.6.1. Influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática.*

Numerosos estudios han mostrado que el PLP confiere a ciertas decarboxilasas un fuerte efecto estabilizante y que la actividad catalítica de la enzima es afectada por la presencia del cofactor durante la obtención y/o incubación de la proteína.

En la Figura 21 se observa que la variación de la actividad enzimática con la temperatura depende de la presencia de PLP en la mezcla de reacción: la ODC preparada y ensayada en ausencia del cofactor exhibe una marcada disminución de su actividad respecto a la enzima obtenida en presencia del cofactor. La actividad óptima para la preparación sin PLP se observa a 37 °C, inhibiéndose a temperaturas mayores. Esta enzima muestra un 30% de la actividad de la ODC obtenida en presencia de PLP. La actividad catalítica se recupera parcialmente con el agregado de la coenzima a la mezcla de reacción. En este caso la temperatura óptima para la actividad enzimática es 42 °C y la curva obtenida es similar a la observada con la enzima preparada en presencia del cofactor, aunque la actividad enzimática es levemente menor.

Figura 21: Efecto de la temperatura sobre la actividad de ODC de *L.mexicana*.



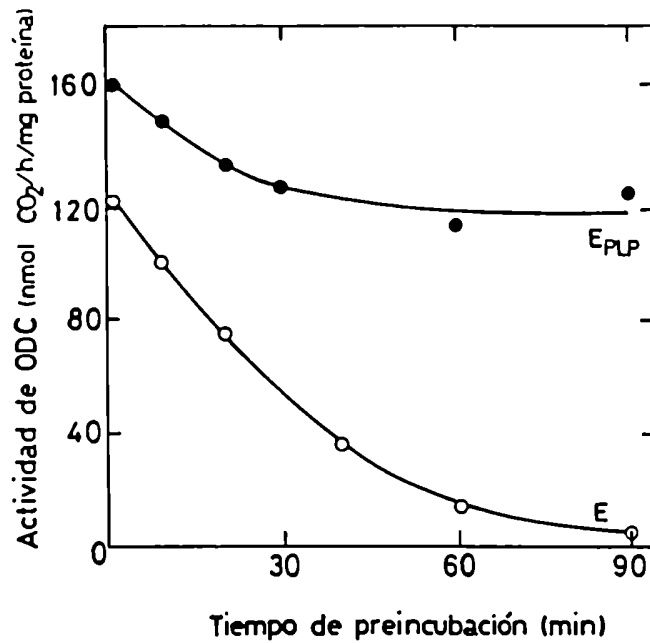
Extractos enzimáticos obtenidos en ausencia (E) o en presencia (E<sub>PLP</sub>) de PLP 0.1 mM se incubaron con (+PLP) o sin el cofactor durante 30 minutos a las diferentes temperaturas indicadas.

#### 6.6.2. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la ODC.

Con el propósito de estudiar la influencia de la temperatura sobre la proteína ODC, las preparaciones enzimáticas obtenidas en presencia o en ausencia de PLP se preincubaron durante tiempos variables a  $37^{\circ}\text{C}$ . A continuación se determinó la actividad enzimática como se describe en Materiales y Métodos.

Estos estudios mostraron que la enzima preparada en ausencia de PLP se inactiva rápidamente, mientras que la proteína preparada en presencia del cofactor es estable, observándose sólo un leve descenso de la actividad catalítica.

Figura 22: Efecto de la presencia de PLP sobre la estabilidad de la ODC.



Extractos celulares de *L. mexicana* preparados con (E<sub>PLP</sub>) o sin PLP (E) se preincubaron a 37 °C durante los tiempos indicados. Al finalizar este período se midió la actividad enzimática durante 30 minutos a 37 °C.

### 7. Efecto de la eliminación del PLP de la ODC. Obtención de apoenzima y reconstitución de la holoenzima.

Numerosos estudios muestran que las Ornitina decarboxilasas aisladas de células animales, plantas, protozoos y levaduras requieren PLP para la actividad catalítica.

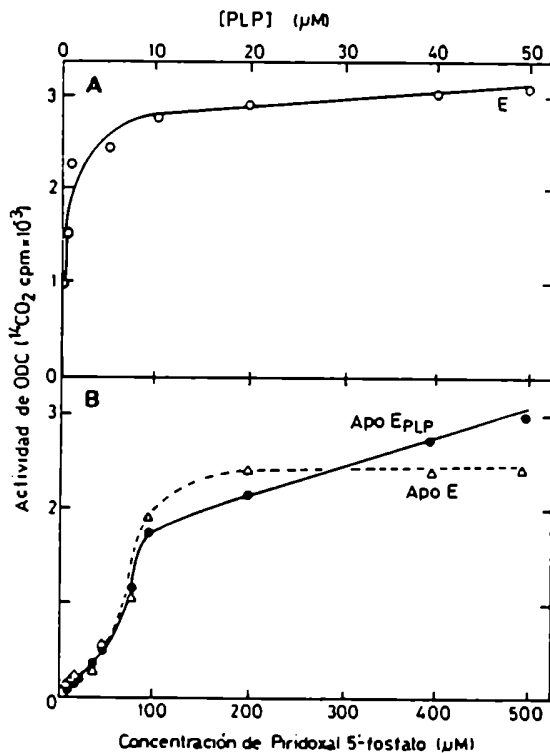
Se ha observado que diferentes decarboxilasas tratadas con hidroxilamina o cisteína pierden el cofactor liberando la apoenzima.

Con el propósito de analizar la posibilidad de obtener la apoenzima de la ODC de *L. mexicana*, los extractos enzimáticos se dializaron contra buffer que contenía hidroxilamina durante 60

minutos. A continuación, se eliminó la hidroxilamina de las preparaciones por una segunda diálisis contra buffer.

Como se observa en la Figura 23 la ODC muestra una dependencia absoluta de la presencia de PLP: la actividad enzimática se restaura casi totalmente a concentraciones saturantes de la coenzima. El gráfico que muestra la reconstitución de la actividad en función de concentraciones crecientes de PLP es una curva sigmoidea.

Figura 23: Reconstitución de la actividad de ODC de *L.mexicana* a diversas concentraciones de PLP.



Panel A: Actividad de ODC preparada en ausencia de PLP e incubada con cantidades crecientes del cofactor durante 30 minutos a 37 °C.

Panel B: Actividad enzimática del extracto libre de células obtenido en ausencia (Apo E) o en presencia de PLP 0.1 mM (Apo E<sub>PLP</sub>) tratado con hidroxilamina 10 mM y ensayado en presencia de cantidades crecientes del cofactor. La actividad se mide después de incubar 30 minutos a 37 °C.

La actividad de ODC preparada con PLP es 3 veces mayor que la del extracto obtenido en ausencia del cofactor. La enzima obtenida en esta condición probablemente contiene cierta cantidad de PLP endógeno ya que es parcialmente activa. La disminución de la actividad catalítica se revierte por el agregado de PLP exógeno. Estos resultados parecen indicar que la diferencia en la actividad se debe a la disponibilidad de la coenzima. La diálisis contra hidroxilamina disminuye la actividad enzimática a valores cercanos a 0 en ambos casos, siendo este un método óptimo para la extracción total del PLP.

Ambas preparaciones de apoenzima se saturan a concentraciones de PLP de 200  $\mu\text{M}$  y muestran curvas similares con igual  $V_{\text{max}}$ .

### 8. Purificación de la ODC de *L.mexicana*.

La ODC de *L.mexicana* se purificó aproximadamente 2300 veces con un 4% de rendimiento. La actividad específica de la enzima purificada es  $71 \times 10^3$  unidades enzimáticas (Tabla 3).

Tabla 3: Purificación parcial de la ODC de *L.mexicana*.

Fracción	Proteína mg	Actividad total $\text{U}^a \times 10^3$	Actividad específica $\text{U} \times 10^3 \text{m g}^{-1}$	Purif. Veces	Rendim. %
1. Sobrenadante 20.000 xg	549	17.2	0.030	1	100
2. Sobrenadante 100.000 xg	468	17.8	0.038	1.2	103
3. Sobrenadante acetónico	167	16.8	0.1	3.3	98
4. DEAE-Sepharosa	2.37	6.7	2.8	93	39
5. Fenil Superosa concentrado	0.15	3.1	20.4	680	18
6. Superosa 6	0.044	1.2	27.7	924	7
7. Columna C <sub>4</sub>	0.01	0.7	70.8	2360	4

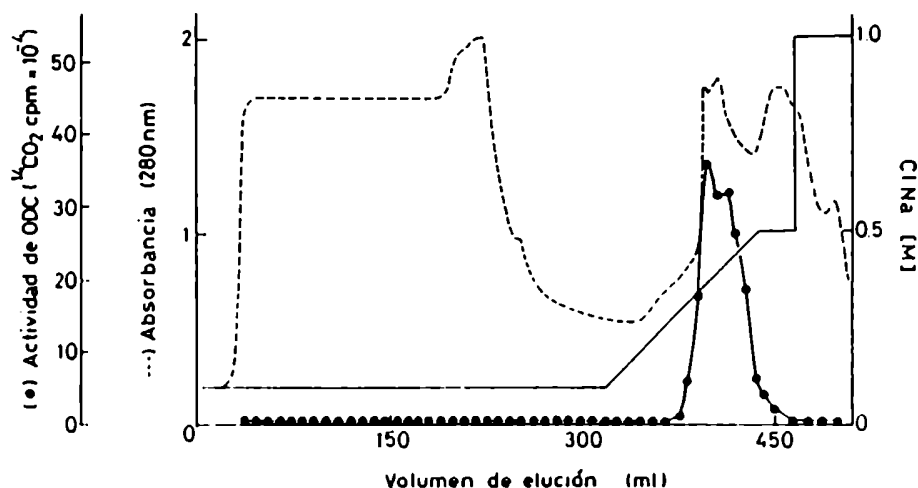
<sup>a</sup> Una unidad se define como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 nmol de  $\text{CO}_2$ /hora/mg de proteína en las condiciones del ensayo que se describen en Materiales y Métodos.

Para la purificación de la ODC se utilizó el extracto enzimático crudo obtenido a partir de la homogenización de las células por tratamiento con Nonidet P-40 y la posterior centrifugación a 20.000 xg durante 30 minutos y luego a 100.000 xg durante 60 minutos. La fracción soluble obtenida se sometió a diferentes pasos de purificación:

1. fraccionamiento con acetona. Con este paso se eliminó el 70% de las proteínas luego de la centrifugación de la suspensión. Este resultado parece indicar que la ODC es una proteína hidrofóbica ya que es soluble a una concentración de acetona del 35%.

2. la fracción proveniente de la etapa anterior se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharosa "Fast Flow"). Esta cromatografía permite además eliminar la acetona de la fracción enzimática y concentrar la muestra. La actividad enzimática que se une totalmente a la columna a una concentración 0.1 M de ClNa, se eluye a una concentración de 0.3 a 0.4 M de ClNa ( Figura 24 ).

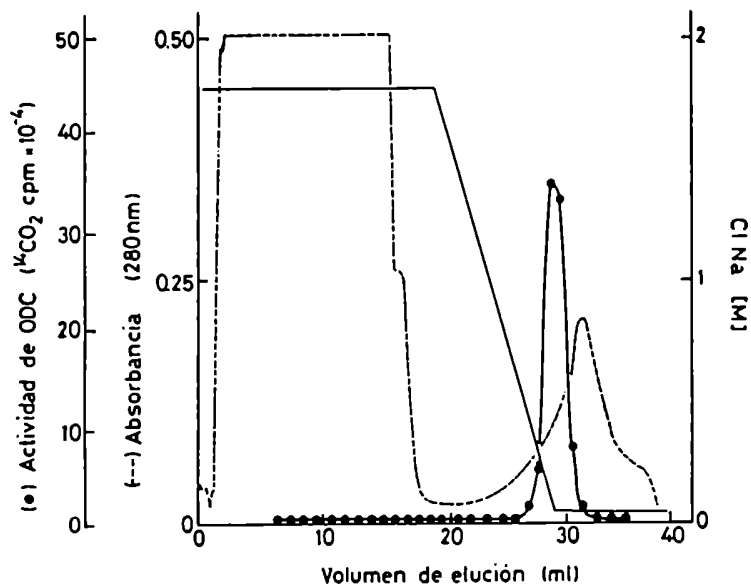
Figura 24: Cromatografía en DEAE-Sepharosa "Fast Flow".



La fracción acetónica se siembra en la columna a un flujo de 2 ml min<sup>-1</sup>. Se recogen fracciones de 2 ml en las que se mide la actividad de ODC ( $^{14}\text{CO}_2$  cpm  $\times 10^4$ ) y las proteínas totales como absorbancia a 280 nm. Las fracciones de mayor actividad se reúnen y se dializan contra el buffer C.

3. Después de agregar ClNa hasta una concentración de 1.8 M a la preparación enzimática obtenida de la columna de DEAE-Sepharosa, esta fracción se sembró sobre una columna Phenyl Superosa eluyéndose, con un gradiente lineal decreciente de 1.8 a 0.05 M de ClNa en el bufer de equilibrio. La actividad enzimática apareció a una concentración de 0.1 a 0.05 M de ClNa ( Figura 25 ).

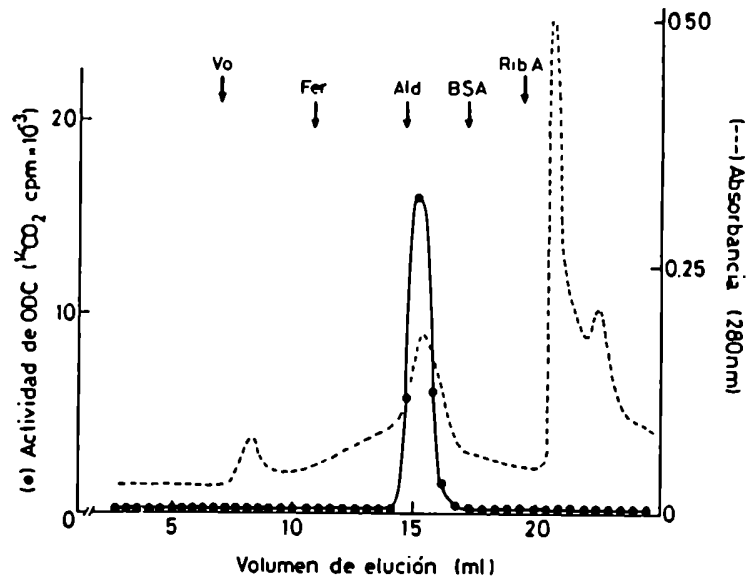
Figura 25: Cromatografía en una columna Phenyl Superosa.



El material eluido de la columna de DEAE-Sepharose se siembra en la columna a un flujo de  $0.5 \text{ ml min}^{-1}$ . Se recogen fracciones de 1 ml en las que se determina la actividad de ODC ( $^{14}\text{CO}_2$  cpm  $\times 10^{-4}$ ) y proteínas totales como absorbancia a 280 nm. Las fracciones activas se juntan, se dializan contra el buffer C y se concentran con Microconcentrador Centricon-100.

4. La muestra concentrada se sometió en una cromatografía de exclusión molecular en Superosa 6 ( FPLC, rango de inclusión: 5 a  $5 \times 10^3$  kDa ). La enzima eluyó en un volumen correspondiente a un peso molecular aproximado de 150 kDa ( Figura 26 ).

Figura 26: Cromatografía de exclusión molecular en Superosa 6.



La muestra se siembra y la columna se eluye a un flujo de  $0.5 \text{ ml min}^{-1}$  y se recogen fracciones de 0.5 ml en las que se mide la actividad de ODC ( $^{14}\text{CO}_2$  cpm  $\times 10^{-3}$ ) y proteínas totales como absorbancia a 280 nm. Las flechas indican la posición de elución de los estándares de Ribonucleasa A ( Rib A, 13.5 kDa ), albúmina bovina ( BSA, 67 kDa ), aldolasa ( Ald, 158 kDa ), ferritina ( Fer, 440 kDa ). El volúmen de exclusión ( Vo ) se mide con Blue dextran 2000.

Por otra parte, cuando la enzima se cromatografía en una columna de exclusión molecular de Superosa 12 ( FPLC, rango de inclusión 1 a 300 kDa ) en condiciones similares a la cromatografía en Superosa 6, se observa que la actividad eluye como una molécula de peso aparente de 170 kDa.

5. La muestra obtenida a partir de la columna de tamizaje molecular se cromatografía en una columna cuyo grupo reactivo es una cadena de 4 carbonos bajo condiciones de fase reversa. La cromatografía se desarrolla con un gradiente lineal de 2-propanol en el buffer de equilibrio. La ODC eluye a 30 % de 2-propanol.

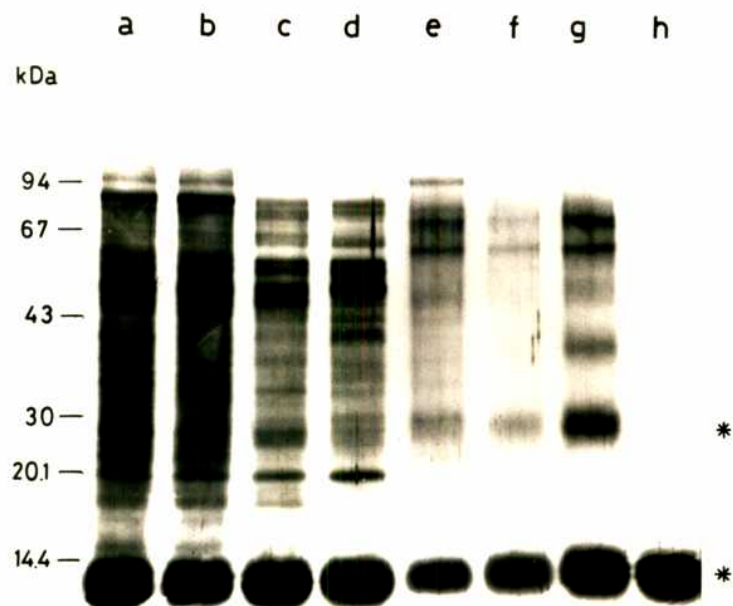


En experimentos separados se probaron diferentes resinas ( Dye Resin Test Kit # RDL-9 de Sigma, Hydrophobic Chromatography Test Kit # DAA-8 de Sigma, Alkyl Superosa de Pharmacia, Mono Q de Pharmacia, Butyl-agarosa de Sigma, Hidroxiapatita de Sigma y BioRad ) en condiciones de intercambio iónico, hidrofobicidad, afinidad por el cofactor o fase reversa. En ningún caso se observó un incremento en la pureza de la ODC. Cuando se intentó purificar la ODC de *L.mexicana* por cromatografía de afinidad con una columna de Affigel-10 ( Bio Rad ) o CNBr- agarosa ( Sigma ) unida al posible ligando específico piridoxamina-5'-fosfato (PAP) (110) se observó que tanto la enzima preparada en ausencia de PLP o tratada previamente con hidroxilamina 10 mM no se unió al ligando: la ODC eluyó con el buffer de lavado. A diferencia, las enzimas de *T.brucei*, *Plasmodium falciparum* y de células de mamíferos, según indicado por otros autores, quedan retenidas por Affigel-10 acoplado a la PAP y luego se eluyen con PLP lográndose una gran purificación de las preparaciones. Nuestros resultados podrían indicar una diferente interacción entre la ODC de *L.mexicana* y el cofactor en comparación a lo observado con enzimas de otros organismos.

#### 9. Pureza de la ODC de *L.mexicana*

El análisis de las preparaciones de ODC a lo largo de los diferentes pasos de la purificación se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida que contenían SDS. En la Figura 27 se observa un enriquecimiento en dos bandas proteicas correspondiente a 71 y 60 kDa. Si bien esta preparación enzimática se encuentra enriquecida en actividad de ODC no es homogénea ya que en los perfiles electroforéticos aparecen otras bandas de proteínas contaminantes.

Figura 27: Análisis electroforético de las preparaciones obtenidas en los sucesivos pasos de purificación de la ODC de *L.mexicana*.



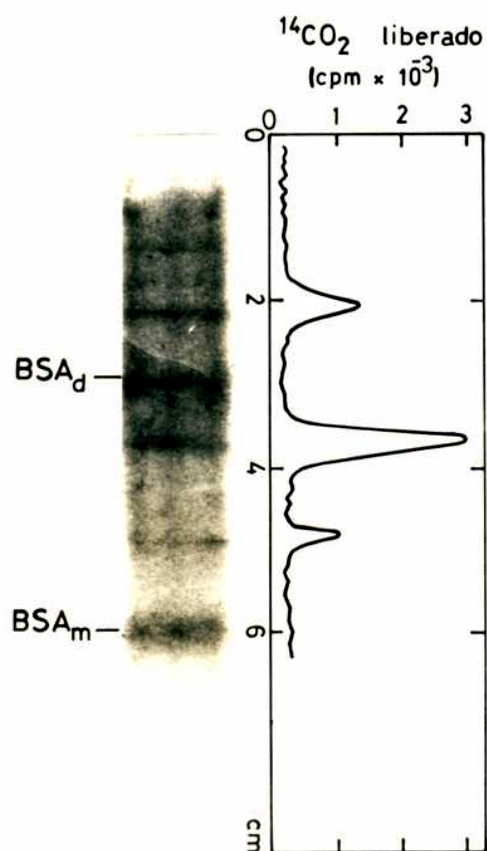
Alícuotas de las diferentes fracciones (10ug) se analizaron por electroforesis en geles de 12.5 % de poliacrilamida-SDS, tal como se describe en Materiales y Métodos. Las muestras se precipitaron con  $\text{CH}_3\text{Cl}$ :metanol (1:2) en presencia de Citocromo C ("carrier") y se resuspendieron en buffer de ruptura. Calles: a: Sobrenadante de 20.000 xg; b: Sobrenadante de 100.000 xg; c: Sobrenadante acetónico; d: Eluido de DEAE-Sepharose "fast flow"; e: Eluido de Phenyl Superosa; f: Eluido de Superosa 6; g: Eluido de  $\text{C}_4$ ; h: Citocromo C. Los asteriscos (\*) indican la posición correspondiente al Citocromo C ( 12.5 y 25 kDa ).

#### 10. Determinación de la actividad de ODC en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes.

Alícuotas de la enzima eluida de la columna de Phenyl Superosa se analizaron en geles nativos de poliacrilamida. Una vez finalizada la electroforesis el gel se cortó en segmentos de 1.5 mm y cada uno de ellos se usó para medir la actividad de ODC. Los

resultados indican ( Figura 28 ) que existirían tres bandas proteicas con actividad enzimática.

Figura 28: Perfil electroforético de las preparaciones de ODC en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida.



Las muestras proteicas que contenían glicerol 10%, azul de bromo fenol 0.1% y Tris-HCl 0.2M pH 7 se sembraron en geles nativos de 8% de poliacrilamida. Una vez realizada la electroforesis, el gel se cortó en segmentos y se determinó la actividad de ODC en cada una de las porciones procediendo como se indicó en Materiales y Métodos.

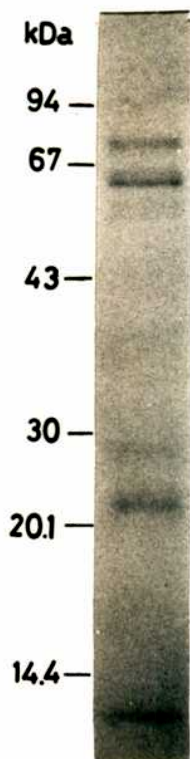
## 11. Determinación de peso molecular de la ODC de *L.mexicana*.

### 11.1. Determinación del peso molecular de la subunidad proteica.

Para la determinación del peso molecular de la subunidad de la ODC de *L.mexicana* se utilizó la propiedad de la enzima de unirse irreversible y específicamente al inhibidor  $\alpha$  DFMO.

Con este propósito preparaciones enzimáticas obtenidas a partir de la cromatografía por hidrofobicidad en Phenyl Superosa se incubaron con 3,4-(<sup>3</sup>H)-DFMO analizándose los productos obtenidos en geles de poliacrilamida que contenían SDS. Las bandas radiactivas se revelaron por fluorografía ( Figura 29 ).

Figura 29: Análisis de ODC unida a  $\alpha$  DFMO radiactivo.

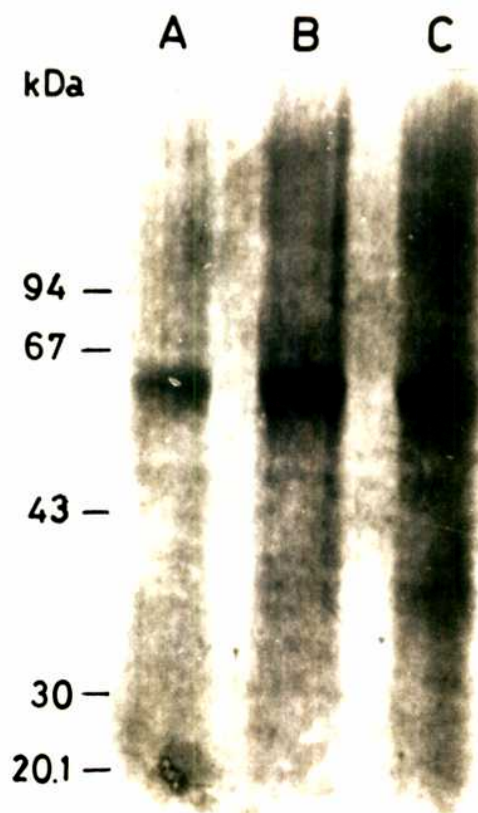


Alicuotas de la preparación enzimática (40ug) se incubaron con 3,4-(<sup>3</sup>H)-DFMO durante 2 horas a 37 °C. Las muestras se precipitaron con Cl<sub>3</sub>CH:metanol (1:2) en presencia de Citocromo C ("carrier"), se resuspendieron en buffer de ruptura y se sembraron en el gel de poliacrilamida-SDS. Luego de finalizar el desarrollo de la electroforesis el gel se coloreó para detectar los standards de peso molecular, se secó, se intensificó con salicilato de sodio y se expuso durante 3 meses a -70°C sobre la placa radiográfica.

En la Figura 29 se observa que aparecen marcadas dos bandas proteicas con un peso aparente de 71 y 60 kDa. Además, se visualizan otras bandas radiactivas poco intensas de menor peso molecular aparente.

Por otra parte, las porciones de gel no desnaturizante que contenían las bandas proteicas con actividad de ODC ( página 95 ) se cortaron, se secaron con N<sub>2</sub> gaseoso, se resuspendieron en buffer de ruptura y se desarrollaron en geles de poliacrilamida-SDS, para determinar su peso molecular aparente ( Figura 30 ). En este caso se observa una sola banda en cada una de las calles que tiene una movilidad electroforética similar correspondiente a un peso molecular aparente de 60 kDa.

Figura 30: Perfil electroforético en condiciones desnaturizantes de las proteínas activas extraídas de geles nativos.



Las porciones de geles secas y resuspendidas en buffer de ruptura se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS. Calles: A, B, y C corresponden a las bandas proteicas de menor a mayor movilidad, respectivamente, aisladas de los geles nativos.

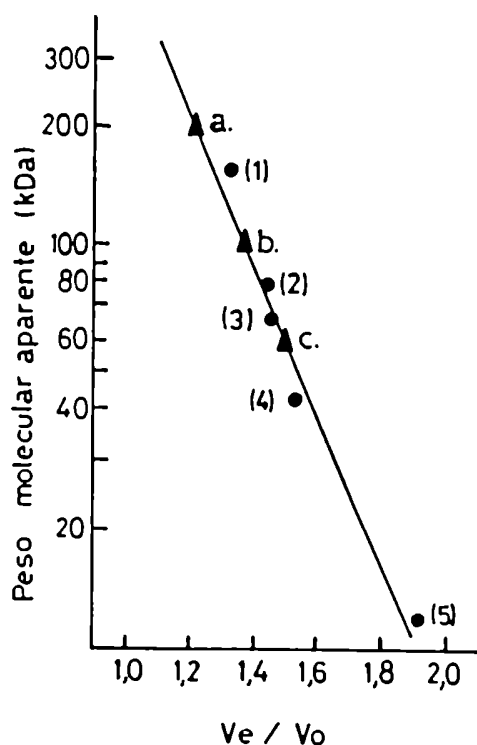
## 11.2. Determinación del peso molecular de la holoenzima.

El peso molecular de la ODC nativa de *L.mexicana* se determinó por cromatografía de tamizaje molecular en Sephacryl S-200 ( Pharmacia ).

Como se observa en la Figura 31 el extracto enzimático preparado sin PLP y eluido con buffer que contenía NaCl 50 mM mostró un pico de actividad correspondiente a un peso molecular de 200 kDa. Cuando el extracto enzimático se eluyó con buffer que contenía NaCl 350 mM se observaron tres picos de actividad correspondientes a pesos moleculares de 70, 100 y 200 kDa.

Por otra parte, la enzima obtenida en presencia de PLP y sometida a la misma cromatografía con buffer que contenía ClNa 50 o 350 mM y PLP eluyó como un solo pico en la zona correspondiente a 200 kDa de peso molecular.

Figura 31: Cromatografía en Sephacryl S-200 del extracto enzimático de *L.mexicana* obtenido en ausencia o en presencia de PLP 0.1 mM utilizando buffer suplementado con ClNa 50 o 350 mM.



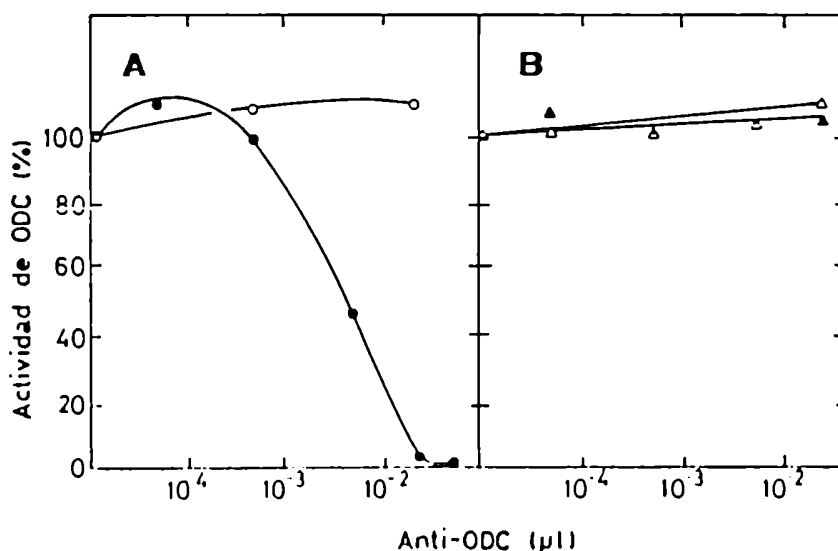
El extracto enzimático se sembró en una columna de Sephacryl S-200 (1 x 90 cm). La columna se eluyó con Tris-HCL 50 mM pH 7, DTT 1mM, EDTA 0.5 mM, sin o con PLP 0.1 mM y ClNa 50 o 350 mM, respectivamente. Los números indican la posición de elución de Aldolasa (#1, 158 kDa); Fosfata alcalina de *E.coli* Tipo III (#2, 80 kDa); Albúmina bovina(#3, 67 kDa); Ovoalbúmina (#4, 43 kDa); Citocromo C (#5, 12.5 kDa). Los ▲ señalan las posiciones en que eluyó la ODC (a: 200 kDa; b: 100 kDa; c: 70 kDa).

## 12. Inmunoprecipitación de la ODC de *L.mexicana*.

El grado de homología estructural entre la ODC de *L.mexicana* y la enzima de células animales se determinó a partir de estudios de pérdida de la actividad catalítica de la ODC de *L.mexicana* y de células de fibroblastos de ratón BPA 31 luego de la inmunoprecipitación de estas enzimas con antisuero policlonal contra ODC de riñón de ratón. Después de la precipitación con proteína A del complejo Antígeno-Anticuerpo, la actividad remanente de ODC se midió en la fracción soluble luego de eliminar el inmunoprecipitado por centrifugación.

Como se observa en la Figura 32 el anticuerpo policlonal precipita la actividad de ODC de las células BPA 31, en tanto que este suero no reduce la actividad del sobrenadante en el caso de preparaciones de ODC del parásito.

Figura 32: Actividad de la ODC de *L.mexicana* y de fibroblastos de ratón en la fracción soluble luego de la inmunoprecipitación con anticuerpo contra ODC de riñón de ratón.



Extractos enzimáticos de células BPA 31 (A) y *L.mexicana* (B) se incubaron con anticuerpo contra riñón de ratón (●, ▲) o con suero normal (○, △) durante 60 minutos a 0 °C y luego con proteína A como se describió en Materiales y Métodos. Después de centrifugar, la actividad de ODC se determinó en la fracción soluble.

Este resultado indicaría que la ODC de *L.mexicana* no presenta determinantes antigénicos similares a los observados en las ODC aisladas de diferentes células de mamíferos.

### **1 3. Regulación de la ODC de *L.mexicana*.**

#### **13.1. Actividad enzimática de la ODC de *L.mexicana* a lo largo de la curva de crecimiento del parásito.**

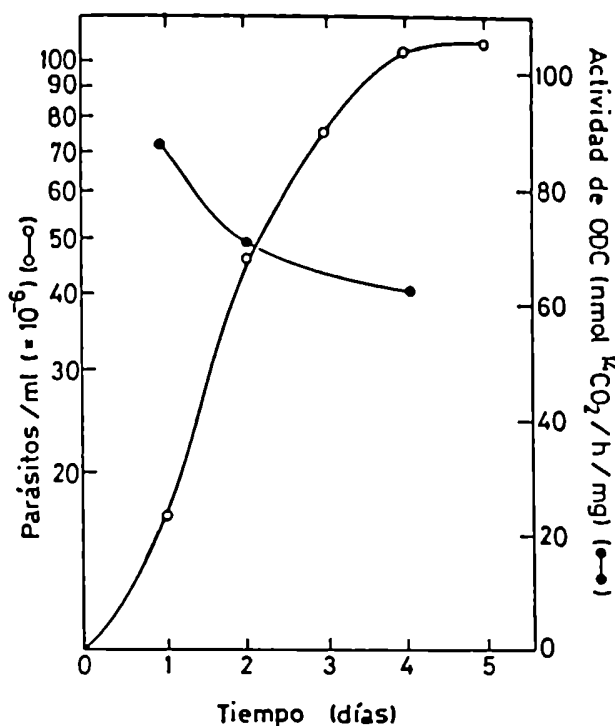
Las poliaminas parecen tener un papel importante en el ciclo celular de organismos eucarióticos ya que la actividad de ODC sufre variaciones a lo largo de dicho ciclo, con un máximo al final de la fase G<sub>1</sub> y otro al final de G<sub>2</sub>. El aumento en la concentración endógena de poliaminas podría preparar a la célula para entrar en fase S. Por otra parte, estos policationes estarían involucrados en la división celular, ya que algunas células animales tratadas con inhibidores de la biosíntesis de poliaminas no pueden llevar a cabo la mitosis, observándose un gran porcentaje de células binucleadas. Ya se ha mencionado además, que la ODC y otras enzimas de la biosíntesis de poliaminas alcanzan un máximo de actividad cuando proliferan activamente.

Con el fin de estudiar los niveles de la actividad enzimática de ODC durante el crecimiento celular, los cultivos de parásitos se cosecharon en diferentes fases de crecimiento y se midió la actividad de ODC en cada caso.

Como se observa en la Figura 33 los niveles de ODC fluctúan en función del tiempo de crecimiento del microorganismo. La ODC muestra máxima actividad en la fase temprana de crecimiento, para luego decrecer paulatinamente en los estadios más avanzados hasta llegar a los niveles de la fase estacionaria.



Figura 33: Actividad de ODC a lo largo de la curva de crecimiento de *L.mexicana*.



Alicuotas de los cultivos se centrifugaron a los tiempos indicados; los parásitos se lavaron con PBS, resuspendieron y se lisaron según se describe en Materiales y Métodos, determinándose la actividad de ODC en las fracciones solubles (●).

El perfil de los valores de actividad enzimática es similar al obtenido en el dosaje del contenido endógeno de poliaminas, coincidiendo el óptimo de la actividad catalítica con el valor máximo de los niveles de putrescina ( Figura 7 ).

### 13.2. Estimación de la "vida media" de la ODC y modificación de la actividad enzimática por el agregado de poliaminas.

La velocidad de recambio de la ODC de *L.mexicana* se estimó a partir de la medición de la actividad específica de la enzima obtenida

de cultivos de parásitos incubados con un inhibidor de la síntesis de proteínas como la cicloheximida.

La Figura 34 A muestra que en presencia del antibiótico ( a una concentración de 50 ug/ml ) se bloquea totalmente la síntesis proteica. En la Figura 34 B se observa que la actividad de ODC del parásito solo se afecta levemente a lo largo del período de incubación. Este resultado indicaría que la ODC del parásito muestra una vida media mayor a 8 hs.

Figura 34: Estimación de la "vida media" de la ODC de *L.mexicana*.

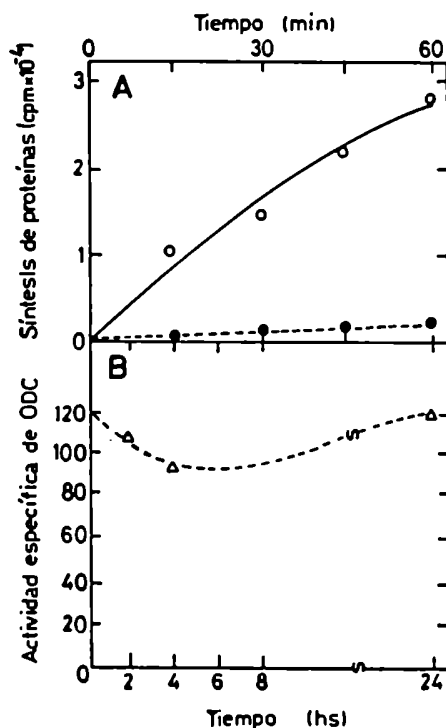


Figura 34 A: Incorporación de (<sup>35</sup>S)-Metionina en el material precipitable con TCA obtenido a partir de la incubación de parásitos intactos de *L.mexicana* en presencia (●) o en ausencia (○) de cicloheximida. Figura 34 B: Variación de la actividad específica de ODC de *L.mexicana* en presencia de cicloheximida.

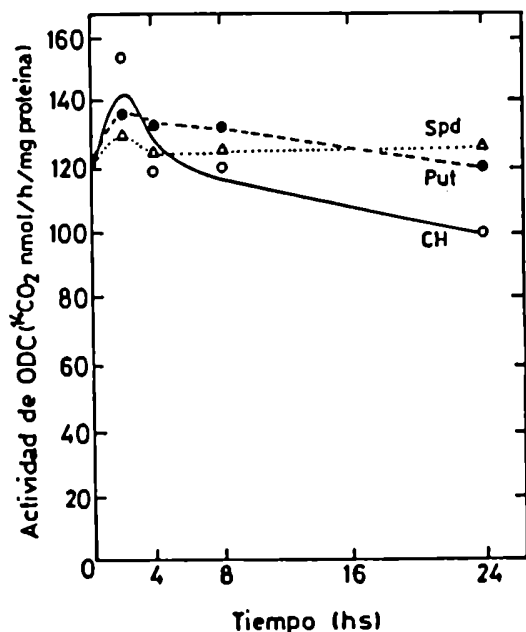
Estudios previos han demostrado que la ODC de células de mamíferos tienen una vida media muy corta ( menor a 30 minutos ) y que la adición de putrescina estimula la degradación de la proteína, regulando negativamente la actividad de la enzima.

Con el objeto de estudiar si la ODC de *L.mexicana* también se regula por el producto de decarboxilación, los cultivos de parásitos se incubaron en medio suplementado con putrescina 10 mM y después de diferentes períodos se determinó la actividad específica de la enzima.

Como se observa en la Figura 35, la actividad de ODC de *L.mexicana* no es regulada negativamente por la putrescina: el agregado de esta poliamina al medio no modifica la vida media de la enzima.

Por otra parte, el agregado de espermidina 0.1 mM al medio de cultivo tampoco afectó la velocidad de recambio de la ODC.

Figura 35: Estabilidad de la ODC de *L.mexicana* en diferentes condiciones.



Los parásitos se incubaron durante diferentes tiempos en presencia de putrescina 10 mM (put), espermidina 0.1 mM (spd) o 50 ug/ml de cicloheximida (CH). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se trataron según se describe en Materiales y Métodos y se determinó la actividad de ODC.

La vida media mayor a 8 horas de la ODC de *L.mexicana* y su insensibilidad a la regulación por el agregado de poliaminas al medio de cultivo, son propiedades similares a las descriptas para la enzima de *T.brucei*.

### 13.3. Efecto del agregado de $\alpha$ DFMO a cultivos de *L.mexicana*: modificación de los niveles intracelulares de poliaminas y de la actividad de ODC.

Como ya se ha mencionado, el agregado de  $\alpha$  DFMO a las preparaciones enzimáticas produce la pérdida irreversible de la actividad de ODC. La inhibición de la enzima de *T.brucei* es uno de los hechos de mayor significancia farmacológica, ya que la enfermedad del sueño causada por este microorganismo se está tratando en forma efectiva con este inhibidor. Además, el  $\alpha$  DFMO podría ser usado como agente terapéutico en otras enfermedades causadas por otros parásitos y en aquellas que involucran la proliferación celular anormal, incluyendo al cancer.

Con el propósito de estudiar si el agregado de  $\alpha$  DFMO a cultivos de *L.mexicana* provocaba la inhibición de la ODC y disminuía el contenido intracelular de poliaminas, los parásitos se incubaron en medio suplementado con DFMO 10 mM durante 24 hs. Al cabo de este período se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la actividad enzimática y para la medición del contenido de poliaminas ( Tabla 4 ).

Tabla 4: Efecto del  $\alpha$  DFMO sobre la actividad de ODC y sobre los niveles endógenos de poliaminas en *L.mexicana*.

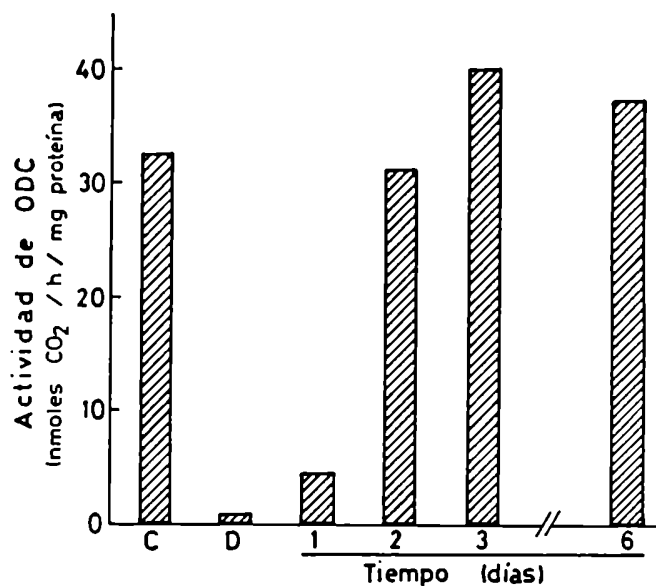
	ODC	Poliaminas	
	act. específica <sup>a</sup>	nmol/10 <sup>8</sup> células put	spd
Control	80.7	54.8	17.9
Cultivo con $\alpha$ DFMO	3.3	24.2	14.3

Los cultivos se desarrollaron durante 24 horas en ausencia (control) o en presencia de  $\alpha$  DFMO 10 mM. Los parásitos se cosecharon, lavaron y lisaron. La actividad de ODC y el contenido endógeno de poliaminas se determinaron según lo descrito en Materiales y Métodos (<sup>a</sup>nmol <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>/hora/mg proteína).

Si bien la velocidad de crecimiento de los cultivos no tratados es similar a la observada en los cultivos desarrollados en presencia del inhibidor, la actividad enzimática de ODC se encuentra fuertemente inhibida en el último caso, en tanto que los niveles intracelulares de putrescina y espermidina se reducen un 56 y 20% respectivamente.

Por otra parte, si se remueve el inhibidor de los cultivos previamente tratados con el  $\alpha$  DFMO se observa que la actividad de ODC se incrementa marcadamente, alcanzando los valores normales luego de 48 horas, período que corresponde a 4 tiempos de duplicación ( Figura 36 ). Después de este período en ausencia de inhibidor casi toda la ODC de los parásitos debiera corresponder a proteínas sintetizadas "de novo" que ya no contiene  $\alpha$  DFMO unido.

Figura 36: Efecto de la remoción del inhibidor  $\alpha$  DFMO sobre la actividad de ODC de *L. mexicana*.



Los parásitos se cultivaron en medio no definido de Warren en ausencia (C, control) o en presencia de  $\alpha$  DFMO 10 mM (D) durante 24 horas. Alícuotas de los cultivos tratados se centrifugaron, los parásitos se lavaron para eliminar el inhibidor y se cultivaron nuevamente en medio fresco sin  $\alpha$  DFMO. A los tiempos indicados, se cosecharon fracciones del cultivo y después de lavar y lisar los parásitos se determinó la actividad de ODC de los extractos.

#### IV. DISCUSION

Las poliaminas desempeñan roles fundamentales tanto en células procariotas como en eucariotas debido a su participación en los procesos de proliferación y diferenciación. Estas sustancias intervienen en la biosíntesis de DNA, RNA y proteínas.

Estudios previos realizados con diferentes protozoos mostraron que las poliaminas endógenas tienen funciones similares a las descritas para otros tipos celulares y que la putrescina, espermidina y espermina se sintetizan utilizando las mismas vías metabólicas conocidas para células de mamíferos ( ver Introducción ), que involucran como primera enzima a la ODC.

Se ha observado que la inhibición irreversible y específica de la ODC por  $\alpha$  DFMO provoca la disminución del contenido endógeno de poliaminas y de la proliferación celular en diferentes protozoos y en las células de animales que hospedan a los parásitos. Por esta razón se estudió en forma más detallada el metabolismo de poliaminas en *T.cruzi* y *L.mexicana* con el objeto de detectar diferencias bioquímicas entre estos parásitos y las células animales que podrían ser útiles para el diseño de nuevas estrategias quimioterápicas contra la Leishmaniasis y el Mal de Chagas.

En *T.cruzi* se detectaron putrescina, espermidina, espermina y cadaverina. En la *Leishmania* sólo se encontró putrescina y espermidina, siendo el nivel de putrescina 4 veces mayor al observado para espermidina. El contenido endógeno de putrescina de éste parásito es significativamente mayor que en *T.cruzi*.

Los niveles intracelulares de poliaminas se encuentran altamente controlados. Los mecanismos regulatorios involucran la biosíntesis, la interconversión y degradación y el sistema de transporte. Debido a que no se ha detectado la degradación o la conversión de espermidina en putrescina ( y de espermina en espermidina ) en *T.cruzi* ni en *L.mexicana* (111-112), estos parásitos

regularían el contenido de sus poliaminas solamente a través de la biosíntesis y el transporte de las mismas.

Tanto *L.mexicana* como *T.cruzi* poseen sistemas de captación para los aminoácidos básicos precursores y para las poliaminas. Aunque la captación de putrescina es aproximadamente 10 veces mayor que la de espermidina para ambos parásitos, los valores observados en *T.cruzi* son marcadamente superiores a los determinados para *L.mexicana*. Contrariamente, *T.cruzi* presenta una muy baja captación de ornitina, arginina y lisina, mientras que la entrada de estos aminoácidos básicos es apreciablemente mayor en *Leishmania*. Es interesante señalar que el contenido intracelular relativo de las diferentes poliaminas en *T.cruzi* es muy similar a los del medio de cultivo. Esto no ocurre en *Leishmania*, ya que en todas las fases de su crecimiento la concentración de putrescina es superior a la de espermidina. Estos hechos y la capacidad de captación de las poliaminas y de los aminoácidos precursores en los dos parásitos parecen indicar que en *T.cruzi* el contenido endógeno de poliaminas depende de su captación del medio externo y en *Leishmania* está determinado por su biosíntesis.

Los estudios *in vivo* para determinar los posibles caminos biosintéticos de las poliaminas indicaron que en *T.cruzi* no se detectó putrescina cuando los cultivos se incubaron con ornitina, arginina o lisina radiactivas, sugiriendo la ausencia de las correspondientes actividades descarboxilantes de ODC y ADC. Este resultado sería diferente al descrito por Majumder et al. (113) que detectaron putrescina luego de incubar los tripanosomas con arginina radiactiva. Además estos autores midieron una muy pequeña actividad de ADC de 12 pmol/hr/mg proteína en extractos libres de células.

Los cultivos de *L.mexicana* sintetizan putrescina cuando se incuban con ornitina radiactiva, indicando la presencia de la actividad de ODC en este protozoo. Cuando los parásitos se incubaron con arginina radiactiva se observó la formación de ornitina y putrescina marcadas. Esta transformación se inhibió por el agregado de  $\alpha$  DFMO u ornitina no radiactiva que diluye el "pool" de este aminoácido. Estas observaciones indicarían que la arginina se



convertiría por acción de la arginasa en ornitina, y que esta sustancia sería posteriormente descarboxilada por la ODC originando la putrescina. Por otra parte, en este parásito también se detectó la formación de espermidina.

En nuestros experimentos tanto en *T.cruzi* como con *Leishmania* se observó la formación de espermidina a partir de putrescina radiactiva, lo que sugiere la presencia de las actividades ADOMet DC y espermidina sintetasa en ambos protozoarios. La transformación de putrescina en espermidina fue bloqueada por inhibidores específicos de la ADOMet DC (MGBG) y la espermidina sintetasa (ciclohexilamina).

Todos nuestros resultados indicarían que el principal mecanismo de obtención de poliaminas utilizado por *L.mexicana* sería a través de la biosíntesis de putrescina a partir de la ornitina en una reacción catalizada por la ODC, en tanto que la espermidina se formaría a partir de la putrescina sintetizada previamente. En *T.cruzi*, si bien recientemente se ha descrito la presencia de una muy baja actividad descarboxilante de la arginina, las poliaminas parecen provenir fundamentalmente del medio exterior a través de un activo mecanismo de captación.

A partir de los estudios en *L.mexicana* de conversión *in vivo* de ornitina ( y arginina ) en putrescina, se decidió determinar si los extractos libres de células presentaban actividad de ODC y ADC. Estas actividades enzimáticas se miden por la liberación de  $^{14}\text{CO}_2$  obtenido a partir del aminoácido precursor. En las preparaciones enzimáticas se detectó una elevada producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ )-ornitina ( 60-100 nmol/h/mg proteína ). Esta actividad es superior a la de los extractos obtenidos a partir de *T.brucei* o *P.falci-parum*. Por otra parte, los extractos de *Leishmania* tenían una muy baja actividad de ADC ( 1-1.5 nmol/h/mg proteína ). Debido a que la ornitina puede generar  $^{14}\text{CO}_2$  a través de una descarboxilación oxidativa con la concomitante producción de 4-aminobutamida o por la acción secuencial de varias enzimas mitocondriales que involucra la vía de la ornitina-2-oxoácido aminotransferasa, se intentó determinar si el  $^{14}\text{CO}_2$  liberado era producido exclusivamente por ODC, o se formaba además por alguna otra actividad. Se observó que

la reacción enzimática no era afectada por AOA, un típico inhibidor de la decarboxilación mitocondrial, y que la producción de putrescina era equivalente a la formación de  $^{14}\text{CO}_2$ . Por otra parte, la reacción era inhibida específicamente por la presencia de  $\alpha$  DFMO. Estos resultados permitieron confirmar que la formación de putrescina en *L.mexicana* se debe a la acción de la enzima ODC. Con el propósito de caracterizar esta enzima se estudiaron los requerimientos para su óptima actividad y sus propiedades cinéticas.

Se determinó que la actividad enzimática requiere la presencia de un agente reductor y de PLP en la mezcla de reacción.

Debido a que el PLP confiere a diferentes decarboxilasas un fuerte efecto estabilizador también se estudió las propiedades cinéticas y estructurales de la ODC obtenida en ausencia o en presencia del cofactor.

Los valores de  $K_m$  aparente para ornitina de la enzima preparada y ensayada en ausencia o en presencia de PLP son similares, mientras que la  $V_{max}$  es 2.5 veces mayor para la enzima preparada en presencia del cofactor. Se observó que la ODC obtenida en ausencia del cofactor es más sensible a la acción inhibitoria del  $\alpha$  MO, putrescina y  $\alpha$  DFMO.

El compuesto  $\alpha$  DFMO provoca la inhibición irreversible de la ODC de *L.mexicana*. Este efecto es similar al observado para la enzima aislada de células de mamíferos y de *T.brucei*. El valor para la constante de inhibición se obtuvo a partir de las curvas de inactivación de la enzima incubada por distintos períodos en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor. El valor obtenido de  $K_i$  para el  $\alpha$  DFMO fue  $0.20 \pm 0.04$  mM, en tanto que el tiempo medio de inactivación fue de 3 minutos. Estos valores son similares a los descriptos para la ODC de *T.brucei*.

El PLP parece estabilizar a la ODC protegiéndola de la inactivación térmica o del efecto de preincubaciones en ausencia del sustrato. Los extractos enzimáticos preparados sin cofactor pierden rápidamente su actividad. El PLP no sólo participaría en la reacción catalítica sino que también contribuiría a mantener la enzima en la conformación necesaria para su máxima actividad.

Los extractos enzimáticos obtenidos en ausencia de PLP contienen, probablemente, cofactor endógeno unido a la ODC ya que estas preparaciones son parcialmente activas y tienen un  $K_m$  para PLP de alrededor de 1  $\mu\text{M}$ .

La remoción completa del cofactor obtenida luego de dializar contra hidroxilamina confirmó la necesidad absoluta de la coenzima para la actividad decarboxilante. Las preparaciones libres de PLP por tratamiento con hidroxilamina tienen un  $K_m$  para el cofactor de aproximadamente 25  $\mu\text{M}$ . Este hecho y la necesidad de una cierta temperatura mínima para regenerar la holoenzima ( resultados preliminares de nuestro laboratorio ) sugerirían que la presencia del cofactor promueve la reactivación de la enzima a través de un proceso de cambios conformacionales necesarios para lograr una total recuperación de la actividad enzimática.

La acción del PLP es específica ya que un compuesto análogo como la piridoxamina 5'-fosfato no es eficiente como coenzima ni para reconstituir la holoenzima.

Se realizó una serie de experimentos para determinar el peso molecular aparente de la holoenzima y de su subunidad proteica. Estos estudios involucraron la filtración a través de tamices moleculares ( Sephacryl S-200, Superosa 6 y 12 ) de la enzima nativa y de la proteína posiblemente dissociada por el agregado de  $\text{ClNa}$  350 mM. Además se aisló la proteína activa a partir de geles de poliacrilamida no desnaturizantes y se analizó posteriormente por electroforesis en geles desnaturizantes. Los resultados indican que el peso molecular aparente de la enzima nativa es aproximadamente 200 kDa. Aunque los valores obtenidos por filtración por Superosa 6 o 12 son menores ( de 150 a 170, kDa ), la columna de Sephacryl S-200 tiene mayor poder de resolución y posiblemente permita una estimación más aproximada del tamaño molecular. Los análisis por electroforesis en geles desnaturizantes después de la marcación con  $\alpha$  D<sup>14</sup>MO radiactivo o del aislamiento de la ODC activa de geles nativos mostraron una banda proteica con un peso molecular de alrededor de 60 kDa. Estos resultados podrían indicar que la ODC de *L.mexicana* sería un polímero formado por subunidades de peso molecular aparente de 60 kDa, aunque no se puede descartar que la subunidad

sea mayor y que la proteína de 60 kDa sea un producto de proteólisis. En este sentido es interesante destacar que después de la marcación con (<sup>3</sup>H)-DFMO se detectaron varias bandas marcadas que varían entre 70 y 12 kDa ( Figura 29 ), y que sólo en presencia de inhibidores de proteasas el perfil obtenido con  $\alpha$  DFMO radiactivo se puede reducir a dos bandas principales de 70 y 60 kDa, siendo esta última la más abundante. Las diferentes ODCs descritas aisladas de células animales poseen una subunidad de alrededor de 55 kDa de peso molecular. Recientemente se ha caracterizado la ODC de *Trichomonas vaginalis* como un tetrámero de 210 kDa constituido por cuatro subunidades de 55 kDa (114), y en el DNA de *L.donovani* se ha identificado un marco de lectura abierto que codificaría para una proteína de 77 kDa de peso molecular (30). En el caso de *L.mexicana* parece probable que la ODC pueda sufrir cambios post-traduccionales, mediante los cuales perdería parte de la cadena polipéptica correspondiente a la subunidad proteica.

En el presente trabajo hemos purificado la ODC de *L.mexicana* aproximadamente 2300 veces con respecto a las proteínas totales contenidas en el extracto libre de células. La enzima purificada posee una actividad específica de  $71 \times 10^3$  nmol/hr/mg proteína.

La purificación consiste en una precipitación con acetona y sucesivas cromatografías: de intercambio iónico en DEAE Sepharosa "fast flow", de hidrofobicidad en Phenyl Superosa, en fase reversa en Columna C<sub>4</sub> y de exclusión molecular en Superosa 6.

El hecho que la ODC de *L.mexicana* sea totalmente soluble a una concentración de acetona de 35% y que en estas condiciones mantenga su actividad enzimática podría indicar que es una proteína hidrofóbica. Esta observación estaría de acuerdo con la propiedad de la enzima de unirse a la matriz de Phenyl Superosa en condiciones de hidrofobicidad y de ser eluida de la columna de C<sub>4</sub> con 2-propanol al 30%.

Por otra parte, se ha observado que la ODC de *L.mexicana* se inhibe y/o inactiva drásticamente cuando se intenta purificarla por fraccionamiento salino con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o en presencia de moderadas concentraciones de ClNa, ClLi o ClK. Este hecho contribuiría a la pérdida de la actividad enzimática a lo largo del proceso de

purificación, ya que algunos de sus pasos involucran un aumento en la fuerza iónica de la solución de elución.

Teniendo en cuenta que la ODC es una proteína muy minoritaria de los extractos celulares y ante la dificultad de obtener una purificación mayor de la enzima se intentó utilizar columnas de afinidad con un análogo del cofactor, la piridoxamina 5'-fosfato, unida a Affigel-10 o a agarosa activada con bromuro de cianógeno. Este procedimiento había resultado exitoso en la purificación de la ODC de *T.brucei* y de células de mamíferos. Las preparaciones enzimáticas de *L.mexicana* obtenidas tanto en ausencia del cofactor como aquellas dializadas contra hidroxilamina no quedaron retenidas en estas columnas y eluyeron con el buffer de lavado. Este resultado podría indicar que la interacción entre la ODC de *Leishmania* y su cofactor difiere de la que sucede con ODC de *T.brucei* y de otros organismos. También se analizó el comportamiento de la ODC de *L.mexicana* con resinas unidas a cadenas carbonadas de diferente extensión o con diversos ligandos coloreados. En ninguna de las condiciones ensayadas se pudo incrementar la purificación de la ODC. Por la combinación de las cromatografías indicadas se obtuvo una preparación altamente enriquecida de la enzima. La electroforesis en condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS y urea mostró 4 bandas proteicas principales. La banda más intensa correspondería a la subunidad de ODC o al producto mayoritario de su proteólisis con un peso molecular aparente de 60 kDa.

La ODC de *L.mexicana* tiene una vida media mayor a 8 hr. Los experimentos con cicloheximida podrían indicar una vida media considerablemente mayor, pero las incubaciones muy prolongadas en presencia del inhibidor de la síntesis proteica pueden no tener significación fisiológica debida a la alta toxicidad del antibiótico. La adición de putrescina o espermidina no afectó la velocidad de degradación de la enzima. Estas observaciones son comparables a las descritas para la ODC de *T.brucei* que presenta una vida media de 6 hr y es insensible a la acción de las poliaminas exógenas. Contrariamente, la ODC de células animales tiene una alta velocidad de recambio que se regula por las poliaminas. Lo observado para la

ODC de *L.mexicana* indicaría un mecanismo de regulación diferente al de las células de su huésped animal.

Con el fin de estudiar el grado de homología estructural entre la ODC de *L.mexicana* y la enzima aislada de células animales, se intentó precipitar la ODC del parásito con anticuerpos policlonales preparados contra la enzima aislada de células de mamíferos. Los resultados indicaron que la ODC de *L.mexicana* no presenta determinantes antigénicos comunes con los encontrados en la enzima de células de animales, ya que la proteína del parásito no inmunoprecipita aún usando altas concentraciones de suero que contiene anticuerpo policlonal contra la ODC de riñón de ratón.

La adición de  $\alpha$  DFMO bloquea la proliferación de los parásitos cuando estos se cultivan en medio sintético pero no cuando se desarrollan en medio rico (115). En estas condiciones se observó la inhibición de la actividad de ODC pero los niveles intracelulares de putrescina y espermidina sólo disminuyeron en forma parcial debido, probablemente, a la captación de las poliaminas del medio de cultivo. Estos hechos sugieren que los estudios del metabolismo de poliaminas en parásitos complementados con los de los mecanismos de transporte de estas sustancias pueden permitir el diseño de quimioterapias antiparasitarias efectivas.

## V. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estudió el metabolismo de poliaminas de *T.cruzi* y *L.mexicana*.

A partir de los experimentos realizados se puede concluir que *T.cruzi* tomaría la mayor parte de las poliaminas del medio de cultivo, en tanto que *L.mexicana* sintetizaría la putrescina a partir de la ornitina o arginina por decarboxilación de ornitina.

En los extractos de *Leishmania* se detectó una alta actividad de ODC que depende en forma absoluta de la presencia de su coenzima. La ODC se purificó parcialmente y se estudiaron diversos parámetros cinéticos y estructurales, así como también su posible significación fisiológica para lograr el bloqueo de la proliferación del parásito.

C. Sanchez

J. Alvarez

## VI. BIBLIOGRAFIA

- 1- Cohen Seymour, S. (1971). Introduction to the Polyamines, Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- 2- Bachrach, U. (1973). Function of Naturally Occurring Polyamines, Academic Press Inc., N.Y.
- 3- Tabor, C.W. y Tabor, H. (1976). *Ann.Rev. of Biochem.* 4 5: 285.
- 4- Bachrach, U. (1973). Function of Naturally Occurring Polyamines. pp: 29-35. Academic Press Inc., N.Y.
- 5- Tabor, C.W. y Dobbs, L.G. (1967). *J.Biol.Chem.* 2 4 5: 2086.
- 6- Fairlamb, A.H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B. y Cerami, A. (1985). *Science* . 2 2 7: 1485.
- 7- Umezawa, H. (1983). Advances in Polyamine Research, Vol 4 ( Bachrach, U.; Kaye, A. y Chayen, R. eds. ). pp 1. Raven Press, N.Y.
- 8- Rosano, C.L.; Brunce, S.C. y Hurwitz, C. (1983) *J.Bacteriol.* 1 5 3: 326.
- 9- Cooper, H.L.; Park, M.H. y Folk, J.E. (1982). *Cell* 2 9: 791.
- 10- Kropinski, A.M.B.; Bose, J. y Warren, R.A.J. (1973). *Biochemistry* 1 2: 151.
- 11- Kullnig, R.; Rosano, C.L. y Hurwitz, C. (1970) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 3 9: 1145.
- 12- Oshima, T. (1983). *Methods in Enzymol.* 9 4: 401.
- 13- Oshima, T. (1983). Advances in Polyamine Research, Vol. 4 ( Bachrach, U.; Kaye, A. y Chayen, R. eds. ). pp 479-487. Raven Press, N.Y.
- 14- Oshima, T.; Hamasaki, N.; Usawa, T. y Friedman, S.M. (1990). The Biology and Chemistry of Polyamines ( Goldemberg, S.H. y Algranati, I.D. eds. ) pp 1-10. IRL Press, Oxford.
- 15- Fujihara, S. y Harada, Y. (1989) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1 6 5: 659.



- 16- Frydman, B.; de los Santos, C. y Frydman, R.B. (1990). *J.Biol.Chem.* **2 6 5**: 20874.
- 17- Paulus, T.J.; Cramer, C.L. y Davis, R.H. (1983) *J.Biol.Chem.* **2 5 8**: 8608.
- 18- Paulus T.J. y Davis, R.H. (1982). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **1 0 4**:228.
- 19- Tabor, C.W. y Tabor, H. (1985). *Microbiol. Rew.* **4 9**: 81.
- 20- Inhibition of Polyamine Metabolism. Biological significance and basis for new therapies. (1987).( Mc Cann, P.P.; Pegg, A.E. y Sjoerdsma, A. eds. ). Academic Press, Orlando Fl.
- 21- Pegg, A.E. (1988). *Cancer Res.* **4 8**: 759.
- 22- Morris, D.R. y Pardel, A.B. (1966). *J.Biol.Chem.* **2 4 1**: 3129.
- 23- Kahana, C. (1989). En ODC: Biology, Enzimology y Molecular Genetic ( Hayashi, S. ed. ) pp. 127-133. Pergamon Press, N.Y.
- 24- Coffino, P. (1989). En ODC: Biology, Enzimology y Molecular Genetic ( Hayashi, S. ed. ) pp. 135-144. Pergamon Press, N.Y.
- 25- Pohjanpelto, P.; Hölta, E.; Jänne, O.A.; Knuutila, S. y Alitalo, K. (1985). *J.Biol.Chem.* **2 6 0**: 8532.
- 26- Heby, O. y Persson, L. (1990). *Trends.Biochem.Sci.* **1 5**: 153.
- 27- Fonzi, W.A. y Sypherd, P.S. (1987). *J.Biol.Chem.* **2 6 2**: 10167.
- 28- Bassez, T.; Paris, J.; Omilli, F.; Dorel, C. y Osborne, H.B. (1990). *Development* . **1 1 0**:955.
- 29- Phillips, M.A.; Coffino, P. y Wang, C.C. (1987). *J.Biol.Chem.* **2 6 2**: 8721.
- 30- Hanson, S.; Adelman, J. y Ulman, B. (1992). *J.Biol.Chem.* **2 6 7**: 2350.
- 31- Grens, A. y Scheffler, I.E. (1990). *J.Biol.Chem.* **2 6 5**: 11810.
- 32- Manzella, J.M. y Backshear, P.J. (1990). *J.Biol.Chem.* **2 6 5**: 11817.

- 33- Ito, K.; Kashiwagi, K.; Watanabe, S.; Kameji, T.; Hayashi, S. y Igarashi, K. (1990). *J.Biol.Chem.* 2 6 5: 13036.
- 34- Ghoda, L.; van Daalen Wetters, T; Macrae, M.; Ascherman, D. y Coffino, P. (1989). *Science.* 2 4 3:1493.
- 35- Poulin, R.; Lu, L.; Ackermann, B.; Bey, P. y Pegg, A.E. (1992). *J.Biol.Chem.* 2 6 7:150.
- 36- Rogers, S.; Wells, R. y Rechsteiner, M. (1986). *Science.* 2 3 4: 364.
- 37- Meggio, F.; Flamigni, F.; Caldarera, C.M.; Giarnieri, C. y Pinna, L.A. (1984). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1 2 2: 997.
- 38- Tabor, C.W. y Tabor, H. (1989). En ODC: Biology, Enzimology y Molecular Genetic ( Hayashi, S. ed. ) pp. 97-106. Pergamon Press, N.Y.
- 39- Igarashi, K.; Kashiwagi, K.; Hamasaki, H.; Miura, A.; Kakegawa, T.; Hirose, S. y Matsuzaki, S. (1986). *J.Bacteriol.* 1 6 6: 128.
- 40- Pegg, A.E. (1989). En ODC: Biology, Enzimology y Molecular Genetic ( Hayashi, S. ed. ) pp. 21-34. Pergamon Press, N.Y.
- 41- Bey, P.; Danzin, C. y Jung, M. (1987). Inhibition of Polyamine Metabolism. Biological significance and basis for new therapies.( Mc Cann, P.P.; Pegg, A.E. y Sjoerdsma, A. eds. ). pp. 1-31. Academic Press, Orlando Fl.
- 42- Jänne, J. y Alhonen-Hongisto, L. (1989). En ODC: Biology, Enzimology y Molecular Genetic ( Hayashi, S. ed. ) pp. 59-86. Pergamon Press, N.Y.
- 43- Pegg, A.E. (1987). Inhibition of Polyamine Metabolism. Biological significance and basis for new therapies. ( Mc Cann, P.P.; Pegg, A.E. y Sjoerdsma, A. eds. ). pp. 107-120. Academic Press, Orlando Fl.
- 44- Pegg, A.E. (1989). The Physiology of Polyamines ( Bachrach, U. y Heimer, Y.M. eds. ) pp. 303-314. CRC Press, Inc., Boca Ratón Fl.
- 45- Metcalf, B.W.; Bey, P.; Danzin, C.; Jung, M.J.; Casara, J. y Vevert, J.P. (1978). *J.Am.Chem.Soc.* 1 0 0: 2551.
- 46- White, M.W. y Morris, D.R. (1989). The Physiology of Polyamines ( Bachrach, U. y Heimer, Y.M. eds. ) pp. 331-343. CRC Press, Inc., Boca Ratón Fl.

- 47- Willians-Ashman, H.G. y Schenone, A. (1972). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 4 6: 288.
- 48- Pegg, A.E. (1987). Inhibition of Polyamine Metabolism. Biological significance and basis for new therapies. ( Mc Cann, P.P.; Pegg, A.E. y Sjoerdsma, A. eds. ). pp. 33-48. Academic Press, Orlando Fl.
- 49- Porter, C.W. y Bergeron, R.I. (1987) *Advances in Enzyme Regulation* ( Weber, G. ed. ) pp: 27: 57. Pergamon Press, N.Y.
- 50- Hayashi, S. (1989). En ODC: Biology, Enzimology y Molecular Genetic ( Hayashi, S. ed. ) pp: 35-45. Pergamon Press, N.Y.
- 51.- Pegg, A.E. (1986). *Biochem.J.* 2 3 4: 249.
- 52- Seiler, N. (1989). The Physiology of Polyamines ( Bachrach, U. y Heimer, Y.M. eds. ) 1: 160-176. CRC Press, Inc., Boca Ratón Fl.
- 53- Tabor, C.W. y Tabor, H. (1984). *Ann.Rev.Biochem.* 53:749.
- 54- Heby, O. (1981). *Differentiation.* 1 9: 1.
- 55- Russel, D.H. (1989). The Physiology of Polyamines ( Bachrach, U. y Heimer, Y.M. eds. ) 1: 256-279. CRC Press, Inc., Boca Ratón Fl.
- 56- Miret, J.J.; Nainudel, S. y Goldemberg, S.H. (1986). *FEBS Lett.* 2 0 0: 117.
- 57- Marton, L.J. y Morris, D.R. (1987). Inhibition of Polyamine Metabolism. Biological significance and basis for new therapies. ( Mc Cann, P.P.; Pegg, A.E. y Sjoerdsma, A. eds. ). pp. 79-105. Academic Press, Orlando Fl.
- 58- *Advances in Polyamine Research* (1981). (Bachrach, U.; Kaye, A. y Chayen, R. eds. ). Vol. 3. Raven Press, N.Y.
- 59- Kaiser, D.; Tabor, H. y Tabor, C.W. (1963). *J.Mol.Biol.* 6: 141.
- 60- Bloomfield, V.A. y Wilson, R.W. (1981). Polyamine in Biology and Medicine ( Morris, D.R. y Marton, L.J. eds. ). pp. 183-206.
- 61- Behe, M. y Felsenfeld, G. (1981) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 7 8: 1618.
- 62- Nordheim, A. y Rich, A. (1983). *Nature.* 3 0 3: 674.

- 63- Cohen, S.S. (1971). Introduction to the Polyamines. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- 64- Pochon, F. y Cohen, S.S. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47: 720.
- 65- Sakai, T.T. y Cohen, S.S. (1973). Polyamines in Normal and Neoplastic Growth ( Russell D.H. ed. ). pp. 41-54.
- 66- Takeda, Y. y Igarashi, K. (1969). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37: 917.
- 67- Loftfield, R.B.; Eigner, E.A. y Pastuszyn, A. (1981). Polyamine in Biology and Medicine ( Morris, D.R. y Marton, L.J. eds. ). 8: 207.
- 68- Peebles, C.L.; Gegenheimer, P. y Abelson, J. (1983). *Cell.* 32: 525.
- 69- Geiger, L.E. y Morris, D.A. (1980). *J. Bacteriol.* 141: 1193.
- 70- Cooper, S. y Helmstetter, C.E. (1968). *J. Mol. Biol.* 31: 519.
- 71- Record, M.T.jr; Mazur, S.J.; Melanon, P.; Roe, J.M.; Schurr, S.L. y Unger (1981). *Annu. Rev. Biochem.* 50: 997.
- 72- Young, D.V. y Srinivasan, P.R. (1972). *J. Bacteriol.* 112: 30.
- 73- Mutsui, K.; Ohniski, R.; Hirose, K. e Iragashi, K. (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 528.
- 74- Echandi, G. y Algranati, I.D. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67: 1185.
- 75- Goldemberg, S.H y Algranati, I.D. (1981). *Eur. J. Biochem.* 117: 251.
- 76- García Patrone, M.; González, N.S. y Algranati, I.D. (1977). *Biochem. Biophys. Acta* 395: 373.
- 77- Echandi, G. y Algranati, I.D. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62: 131.
- 78- Nastri, H.G. (1991). Tesis doctoral UBA.
- 79- Morris, D.R. y Jorstad, C.M. (1973). *J. Bacteriol.* 113: 271.
- 80- Rudkin, B.B.; Mamont, P.S. y Seiler, N. (1984). *Biochem. J.* 217: 731.

- 81- Cohen, S.S. (1970). *Am.N.Y.Acad.Sci.* 17 1: 869.
- 82- Abraham, A.K.; Olsnes, S. y Phil, A. (1979). *FEBS Lett.* 10 1: 93.
- 83- Morgan, D.M.L. (1990). *Biochemical.SocietyTansations.* 18: 1080.
- 84- Heby, O.; Luk, G.D. y Schindler, J. (1987). Inhibition of Polyamine Metabolism. Biological significance and basis for new therapies. ( Mc Cann, P.P.; Pegg, A.E. y Sjoerdsma, A. eds. ). pp. 165-186. Academic Press, Orlando Fl.
- 85- Bacchi, C.J. y Mc Cann, P.P. (1987). Inhibition of Polyamine Metabolism. Biological significance and basis for new therapies. ( Mc Cann, P.P.; Pegg, A.E. y Sjoerdsma, A. eds. ). pp. 317-344. Academic Press, Orlando Fl.
- 86- Bacchi, C.J.; Nathan, H.C.; Hutnar, S.H.; Mc Cann, P.P. y Sjoerdsma, A. (1980) *Science.* 210: 332.
- 87- Sjoerdsma, A. y Schechter, P. (1984). *Clin.Pharmacol.Ther.* 35: 287.
- 88- Clarkson, A.B.; Bacchi, C.J.; Mellow, G.H.; Nathan, H.C.; Mc Cann, P.P. y Sjoerdsma, A. (1983). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 80: 5729.
- 89- Nathan, H.C.; Bacchi, C.J.; Hutner, S.H.; Rescigno, D.; Mc Cann, P.P. y Sjoerdsma, A. (1981). *Biochem.Pharmacol.* 30: 3010.
- 90- Griffin, B.f.; Mc Cann, P.P.; Bitonte, A.J. y Bacchi, C.J. (1986b). *J.Protozool.* 33: 238.
- 91- Garofalo, J.; Bacchi, C.J.; Mc Laghlin, S.D., Mockenhaupt, D.; Trueba, G. y Hutner, S.H. (1982). *J.Protozool.* 29: 389.
- 92- Phillips, M.; Coffino, P. y Wang, C.C. (1988) *J.Biol.Chem.* 263: 17933.
- 93- Bass, K.E.; Sommer, J.M.; Cheng, Q. y Chang, C.C. (1992). *J.Biol.Chem.* 267: 11034.
- 94- Walsh, C.; Bardley, M y Nadeau, K. (1991). *TrendsBiochem.Sci.* 16: 305.
- 95- Balasundaram, D. y Tyagi, A.K. (1989). *Eur.J.Biochem.* 183: 339.
- 96- Laemnli, U.K. (1970). *Nature.* 227: 680.

- 97- Oakley, B.R.; Kirsh, D.R. y Morris, N.R. (1980). *Anal.Biochem.* 105: 361.
- 97- Gel electrophoresis of protein. A practical approach (1987). ( Hames, B.D. y Rickwod, D. eds. ) IRL Press, Oxford.
- 98- Lowry, O.H.; Rosebrought, A.; Far, A.L. y Randall, R.J. (1951). *J.Biol.Chem.* 193: 265.
- 100- Peterson, G.L. (1983). *Methods in Enzymol.* 91: 95.
- 101- Bradford, 'M.M. (1976) *Anal.Biochem.* 72:248.
- 102- Smith, T.A. y Marshall, J.H.: (1988). *Phytochemistry.* 27(3): 716.
- 103- Murphy, B.J. y Brosnan, M.E. (1976) *Biochem.J.* 157:33.
- 104- Pegg, A.E. y Mc Gill, S. (1979). *Biochem.Biophys.Acta.* 568: 416.
- 105- Persson, L. (1977) *Acta Physiol.Scand.* 100: 424.
- 106- Dixon, M. y Webb, E.C. (1964). *Enzymes.* pp. 54-165. Logmans Press, London.
- 107- Kitz, R. y Wilson, I.B. (1962). *J.Biol.Chem.* 237: 3245.
- 108- Abdel-Monen, M.M.; Newton, N.E.; Ho, B.C. y Weeks, C.E. (1975) *J.Med.Chem.* 18: 600.
- 109- Brawley, J.V. y Ferro, A.J. (1979). *J.Bacteriol.* 140: 214.
- 110-Boucek, R.J. y Lembach K.J. (1977). *Arch.Biochem.Biophys.* 184: 408.
- 111- Seiler, N.; Bolkenius, F.N. y Rennert, Q.M. (1981). *Med.Biol.* 59: 337.
- 112- Balana Fouce, R.; Escribano, M.I. y Alunda, J.M. (1991). *Mol.Cell.Biochem.* 107:127.
- 113- Majumder, S.; Withr, J.J.; Bitonte, A.J.; McCann, P.P. y Kierszenbaum, F. (1992). *J. Parasitol.* 78(2): 371.
- 114- Yarlett, N.; Goldberg, B.; Moharrami, M.A. y Bacchi, C.J. (1993 ). *Biochem.J.* 293: 487.

115- Gonzalez, N.S.; Sanchez, C.P.; Sferco, L. y Algranati, I.D. (1991).  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**(2): 797.