
**ESTUDIO DE LA
SUPERÓXIDO DISMUTASA EN
TRYPANOSOMA CRUZI:
PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN
BIOQUÍMICA Y APLICACIONES
DIAGNÓSTICAS**

**TESIS DOCTORAL
2007**

**HÉCTOR MATEO CARRASCO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

Índice

I Introducción y Objetivos.....	I
II Antecedentes.....	X
II.I <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	XI
II.I.I Generalidades	
II.I.II Morfología y Ciclo de Vida	
II.I.III Caracterización de Cepas	
II.II La enfermedad de Chagas.....	XV
II.II.I Etiología, Transmisión y Sintomatología	
II.II.II Diagnóstico y Tratamiento	
II.III Química de los Radicales Libres.....	XIX
II.III.I Introducción y Características de los Radicales Libres	
II.III.II Efectos sobre las Células de los Radicales Libres	
II.III.III Toxicidad del Oxígeno en Protozoos	
II.III.IV Defensas Antioxidantes en Protozoos	
a Defensas Antioxidantes No Enzimáticas	
b Defensas Antioxidantes Enzimáticas	
b.1 Catalasa	
b.2 Glutati6n Peroxidasa y otros Sistemas Peroxidasa	
b.3 Super6xido Dismutasa	

III Material y Métodos.....	LI
III.I Material Biológico y Cultivo Celular.....	LII
III.II Obtención de las SODs.....	LIV
III.III Purificación Cromatográfica.....	LVI
III.IV Ensayos Bioquímicos: Caracterización SOD.....	LIX
III.IV.I Electroforesis en Geles de Poliacrilamida	
III.IV.II Revelado y Conservación de Geles	
III.IV.III Cuantificación	
III.IV.IV Determinación del pI y PM	
III.IV.V Estudios de Inhibición	
III.IV.VI Localización Subcelular	
III.IV.VII Tratamiento con Digitonina de Células Intactas	
III.V Inmunogenicidad de la SOD.....	LXXI
III.V.I Ensayos Inmunológicos en Ratones	
a. Obtención de Anticuerpos Policlonales	
b. Titulación de Sueros: ELISA y Western-Blot	
III.V.II Ensayos Inmunológicos en Humanos	
a. Sueros de Pacientes Chagásicos	
b. Ensayos con Formas Epimastigote: IFI	
c. Ensayos con Fracción Homogenado: ELISA	
d. Ensayos con Fracción Excretada: ELISA	

IV Resultados.....	LXXXI
IV.I Purificación y Caracterización de la Actividad SOD Total.....	LXXXII
IV.I.I Obtención y Purificación	
IV.I.II Caracterización Bioquímica de las SOD	
a. Determinación del Peso Molecular y el Punto Isoeléctrico	
b. Estudios de Inhibición	
c. Localización Subcelular y Tratamiento con Digitonina	
IV.II Purificación SODe.....	XCII
IV.II.I Obtención y Purificación	
IV.II.II Caracterización Bioquímica	
a. Determinación del Peso Molecular y el Punto Isoeléctrico	
b. Determinación del Cofactor Metálico y Localización	
IV.III Inmunogenicidad de la SODe.....	XCVIII
IV.III.I Ensayos en animales: Titulación de Sueros de Ratón	
a. ELISA	
b. Western-Blot	
IV.III.II Ensayos con Sueros Humanos: ELISA e IFI	
V Discusión.....	CIV
VI Conclusiones.....	CXIX
VII Bibliografía.....	CXXII

I INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

I Introducción y Objetivos

I.1 Introducción

Los tripanosomátidos constituyen un heterogéneo grupo de organismos unicelulares eucariotas ampliamente distribuidos por todo el mundo. Desde el punto de vista epidemiológico, son causantes de gran número de enfermedades, tanto en el hombre como en otros animales y en plantas, representando para muchos países uno de los principales problemas sanitarios, económicos y sociales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima en más de treinta millones los afectados en todo el mundo por enfermedades causadas por estos protozoos parásitos [Binder y col., 1999; OMS, 2002]. Además, la confluencia de una serie de factores (demográficos, pobreza, abandono de estrategias antivectoriales, aparición de resistencias, etc...) ha hecho que, lejos de ser erradicadas, sean en la actualidad infecciones reemergentes, detectadas incluso en regiones tradicionalmente no endémicas [James, 1997].

La **tabla 1** muestra algunos datos estadísticos relevantes acerca de las enfermedades producidas por los tripanosomátidos más importantes desde el punto de vista sanitario.

Género/ Especie	Afectados	Muertes Anuales (x10 ³)	Población en Riesgo (x10 ⁶)	Países Endémicos
<i>Trypanosoma brucei</i>	>300000	50	60	37 países subsaharianos
<i>Trypanosoma cruzi</i>	16-18 mill.	50	100	18 países del centro y sur de América
<i>Leishmania spp.</i>	12 mill.	80	350	Áreas tropicales y subtropicales: Sudamérica, Europa, Asia y África

Tabla 1: INCIDENCIA RELATIVA DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES HUMANAS PRODUCIDAS POR TRIPANOSOMÁTIDOS

Trypanosoma cruzi es un protozoo hemoflagelado sanguíneo perteneciente a la familia *Trypanosomatidae* y responsable del mal de Chagas, enfermedad de transmisión clásicamente vectorial [Prata, 2001], que afecta en su forma crónica a más de dieciocho millones de personas, casi exclusivamente en Latinoamérica, con una alta morbilidad y más de medio millón de nuevos casos anuales, la mayoría niños [Urbina y Docampo, 2004]. Además del importante problema sanitario, la tripanosomiasis americana supone unas cuantiosas pérdidas económicas, que en zonas endémicas se cifran por encima de los seis mil millones de euros anuales [Schofield y Dias, 1999].

La problemática terapéutica se hace asimismo patente, pues los agentes quimioterápicos de los que dispone la ciencia médica desde hace décadas, además de un efecto antichagásico discreto y restringido casi siempre a las fases tempranas de la enfermedad, han mostrado numerosas contraindicaciones y efectos adversos; por todo lo anterior, las únicas medidas que se han demostrado realmente eficaces hasta el momento han sido de tipo profiláctico (campañas masivas destinadas al control de la población de vectores) [Binder y col., 1999; Muelas y col., 2002; Urbina y Docampo, 2004].

Por otro lado, la clasificación taxonómica tradicional basada en criterios morfológicos presenta limitaciones y se muestra insuficiente a la hora de abordar la identificación y diferenciación de especies y cepas tanto a nivel clínico como de laboratorio [Podlipaev, 2001]. Desde este punto de vista, en los últimos años viene adquiriendo una creciente importancia entre los miembros de la comunidad científica la búsqueda de nuevas moléculas a partir de las cuales sea posible diseñar métodos capaces de resolver de manera expeditiva este dilema, prestando especial atención al diagnóstico diferencial entre *T. cruzi* y otros tripanosomátidos, cuya identificación fehaciente se ve dificultada por la existencia de fenómenos de solapamiento entre ambas infecciones en determinadas áreas geográficas; en este sentido, suscita un gran interés el diagnóstico discriminatorio con otros microorganismos, tanto

patógenos (*Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. o *Mycobacterium* spp.), como no patógenos (*T. rangeli*) [Levin y col., 1991; De Souza y col., 2005]. Hasta el momento, sólo la biología molecular ha aportado algo de luz a esta doble problemática terapéutica y diagnóstica, común a otras enfermedades producidas por tripanosomátidos, como las leishmaniasis o la tripanosomiasis africana, siendo muchos los investigadores que han dedicado su labor a profundizar en el conocimiento de los mecanismos y rutas bioquímicas de estos organismos, con el fin de encontrar y caracterizar nuevas moléculas que puedan ser utilizadas como marcadores específicos útiles a la hora de ofrecer un diagnóstico eficaz y fiable.

Sin embargo y a pesar del enorme esfuerzo realizado, a nivel clínico, la mayoría de los *kits* comerciales disponibles están basados en preparaciones antigénicas semipurificadas que contienen epítodos comunes a otras especies, lo que acarrea un pequeño pero significativo porcentaje de falsos positivos como consecuencia de fenómenos de reactividad cruzada, especialmente frente a especies del género *Leishmania* spp. [Telles y col., 2003].

Hasta la fecha, varias moléculas han sido postuladas con más o menos éxito como posibles marcadores moleculares de *T. cruzi*: una GP90 lectin-purificada [Schechter y col., 1983], una cistein proteinasa (GP57/51) liberada durante la metacicloogénesis [Ronaldo y col., 1991],

una proteína de choque térmico de 70 kDa [Krautz y col., 1998] y una ubiquitina altamente específica [Telles y col., 2003], además de un número considerable de moléculas recombinantes (rAgs), como una transalidasa de fase aguda [Frash, 1994] y varios antígenos de excreción-secreción [Umezawa y col., 1999, 2001; Franco da Silveira y col., 2001; Silveira-Lacerda y col., 2004]. Por su parte, desde el descubrimiento del antígeno k39 de *Leishmania chagasi* y su utilización en el serodiagnóstico de las leishmaniasis viscerales [Burns y col., 1993; Qu y col., 1994; Badaro y col., 1996], varias moléculas han sido propuestas en la detección e identificación de estas parasitosis: un antígeno de membrana de 32 kDa (P32) [Tebourski y col., 1994], dos antígenos hidrofílicos (k9 y k26) de *L. chagasi* [Bhatia y col., 1999], una fosfatasa ácida secretada [Ryan y col., 2002], un antígeno A2 [Carvalho y col., 2002], un antígeno excretado obtenido tras el cultivo del parásito en medio libre de proteínas y suero [Romero y col., 2004], dos proteínas de choque térmico (hsp 70 y 83) [Quijada y col., 1998; Celeste y col., 2004], una cistein proteínasa recombinante [De Souza y col., 2005], tres antígenos recombinantes (rH2A, KMP11 y Proteína Q) [Passos y col., 2005] y, recientemente, un antígeno excretado por formas amastigotes de *L. amazonensis* [Hernández-Chinea, 2007]. Además, nuestro grupo ha postulado el empleo de una superóxido dismutasa extracelular como fracción antigénica para la diagnosis de la enfermedad de Chagas [Villagrán y col., 2005] o la leishmaniasis canina [Marín y col., 2007].

Se sabe que, en presencia del parásito, el sistema inmune del hospedador pone en marcha toda una maquinaria defensiva humoral y celular destinada a repeler la infección, atacando al agente patógeno desde diversos frentes (procesos inflamatorios locales, producción de linfocitos citotóxicos y anticuerpos, etc...) [Valko y col., 2007]. Indiscutiblemente, uno de los mecanismos más destacados dentro de la estrategia inmunológica del organismo consiste en la producción de radicales libres (especies químicas altamente reactivas capaces de afectar a los distintos componentes celulares del parásito), como el radical superóxido, O_2^- . Éstos últimos, no obstante, son entes dinámicos capaces de neutralizar esta acción lítica gracias a la existencia de todo un arsenal de sistemas detoxificantes altamente efectivos, que le permiten evadir la respuesta inmune [Docampo, 1995]. Los tripanosomátidos son organismos carentes o extremadamente deficientes en catalasa y glutatión peroxidasa selenio-dependiente, las clásicas defensas antioxidantes en la mayoría de las células eucariotas [Boveris y Stoppani, 1980; Carnieri y col., 1993; Wilkinson y col., 2002b]. Sin embargo, sí han mostrado poseer superóxido dismutasa (SOD) y toda una red de sistemas antioxidantes, dentro de la cual el sistema dependiente de tripanotión (un conjunto de peroxidasas asociadas a un factor de glutatión-espermidina) parece jugar un papel fundamental [Aboagye y col., 1992]. Resulta evidente, por tanto, que para estos organismos la SOD constituye la primera y probablemente más

importante línea de defensa frente a la dañina acción de los radicales libres [Fairlamb y Cerami, 1985; Flohe y col., 1999; Schmidt y Krauth-Siegel, 2002; Krauth-Siegel y col., 2003].

I. II Objetivos

El aislamiento, purificación y caracterización bioquímica exhaustiva de la(s) SOD de *T. cruzi*, conjuntamente con el estudio de sus propiedades inmunogénicas y sus posibles aplicaciones diagnósticas (identificación y diferenciación de cepas, obtención de un método sencillo y fiable de determinación, incluso cuantitativa, de la enfermedad, etc...)

II ANTECEDENTES

II Antecedentes

II.1 *Trypanosoma cruzi*

II.1.1 Generalidades

Fue el médico brasileño Carlos Chagas, en 1909, quien describiera por primera vez en la sangre contenida en el intestino de *Panstrongylus megistus* (un hematófago que habitaba las chozas de algunas personas del estado de Minas Gerais, en Brasil) la presencia de un flagelado hasta el momento desconocido al que denominó *Schizotrypanum*, asociándolo a una enfermedad que sufrían los hombres y animales de la zona y constatando además experimentalmente su transmisión a monos del género *Callithrix* que habían sido mordidos por el insecto infectado. El descubrimiento de Chagas permaneció no obstante “desterrado” hasta que, dos décadas más tarde, el médico argentino Salvador Mazza redescubriera la enfermedad, definiendo por primera vez las etapas clínicas de su evolución en humanos.

La clasificación taxonómica comúnmente aceptada de *Trypanosoma cruzi* [Levine y col., 1980; Corliss, 1994] encuadra a este parásito como se detalla a continuación.

Subreino *Protozoa*

Phylum *Sarcomastigophora*

Subphylum *Mastigophora*

Clase *Zoomastigophorea*

Orden *Kinetoplastida*

Familia *Trypanosomatidae*

Género *Trypanosoma*

Subgénero *Schizotrypanum*

Sección *Stercoraria*

Especie *T. cruzi*

II.I.II Morfología y Ciclo de Vida

Se trata de un pequeño parásito unicelular que, en sangre, aparece como una forma alargada y terminada en punta de unos 20 μm , provista de un flagelo y una membrana ondulante, estructuras que permiten su desplazamiento dentro del fluido sanguíneo. El estudio detallado de su ultraestructura [Hoare, 1972] revela asimismo la existencia de un núcleo bien visible y una única mitocondria, alargada, en cuyo extremo posterior aparece un nuevo orgánulo con valor taxonómico llamado kinetoplasto, que contiene alrededor del 30 % del material nuclear de la célula. Otras estructuras, como los glicosomas, con una función metabólica semejante a la que desempeñan en otros eucariotas los peroxisomas, son sólo visibles al microscopio electrónico.

El parásito presenta un ciclo heteroxeno, que requiere la presencia de un hospedador invertebrado en el que se desarrollan varias fases de su ciclo biológico. Se trata de hemípteros hematófagos de las especies *Triatoma infestans*, *T. dimidata*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus*, entre otros [Vargas, 2005]. El parásito penetra en el hospedador definitivo (el hombre u otro mamífero doméstico o selvático) a través de las heces contaminadas con las formas **tripomastigotes metacíclicos**, comportamiento característico de los parásitos pertenecientes a la sección *Stercoraria*. En el nuevo hospedador, las formas metacíclicas pueden invadir inmediatamente las células en la puerta de entrada o ser diseminados por la circulación linfática hasta otras localizaciones, transformándose en **amastigotes**, redondeados y con un flagelo externo muy corto o inexistente. Los amastigotes se multiplican intracelularmente, y sufren una nueva transformación hasta **tripomastigotes**, que ocasionan la lisis de la célula, permitiendo su salida al torrente sanguíneo. Los tripomastigotes encontrados en la sangre circulante presentan todas las características morfológicas descritas anteriormente, con flagelo libre, un kinetoplasto voluminoso (terminal o subterminal) y un gran núcleo redondeado en posición central. Estos tripomastigotes pueden infectar otras células colindantes, pero carecen de capacidad multiplicativa, ya que la única forma replicativa en el vertebrado es la forma amastigote intracelular. Los triatominos nacen libres de infección, infectándose al alimentarse de

hospedadores infectados. Los tripomastigotes migran al intestino medio del insecto, donde se transforman en **epimastigotes**, flagelados anchos, muy móviles, con el kinetoplasto entre el núcleo y el flagelo libre. Allí se multiplican por fisión binaria un gran número de veces, dando lugar nuevamente a tripomastigotes metacíclicos, que migran al intestino posterior, desde donde son excretados con las heces en el momento de la picadura, comenzando de nuevo el ciclo [Stevens y col., 1999, 2001].

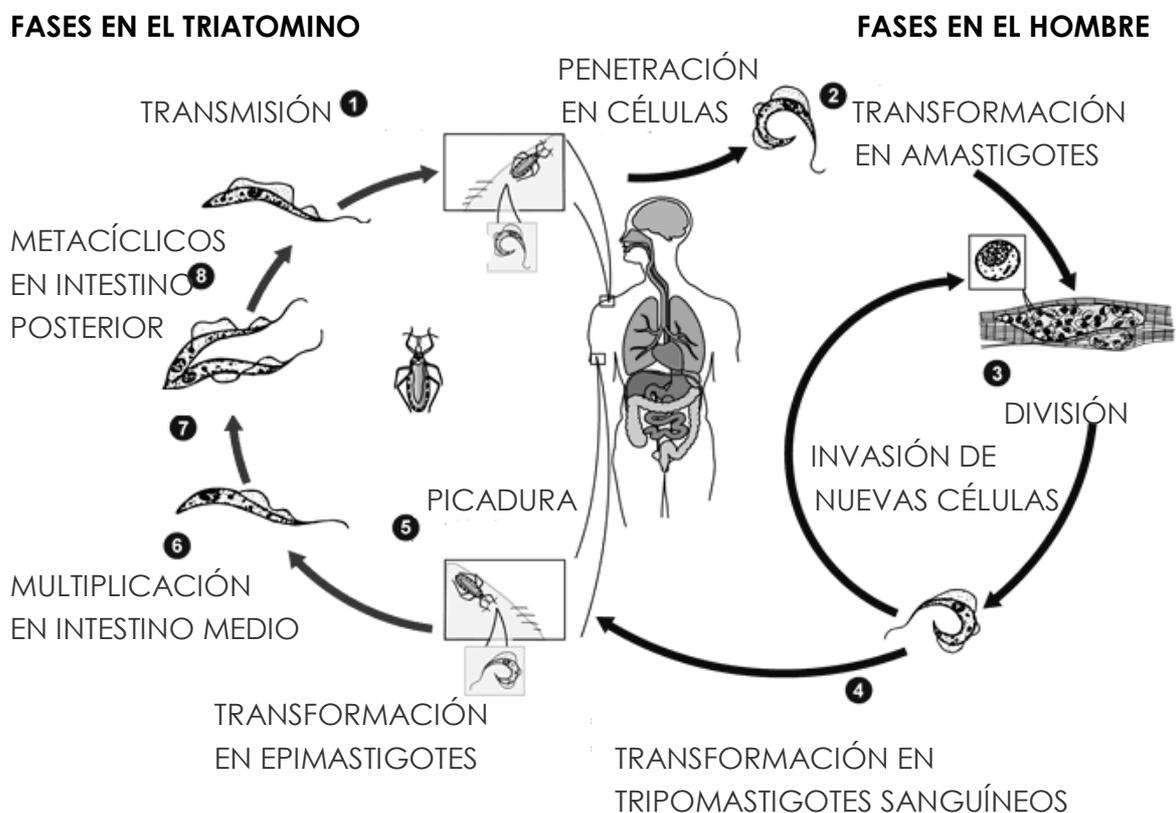


Fig.1: DETALLE DEL CICLO BIOLÓGICO DE *T. cruzi*. Fuente: [CDC, 2005].

II.1.III Caracterización de Cepas

La identificación, caracterización y diferenciación actual de *T. cruzi* obedece a criterios moleculares. Así, se han venido utilizando diferentes técnicas, como ensayos de densidad de ADN, aglutinación por lectinas, detección de la actividad sialidasa-transaminasa o ensayos de lisis de complemento [Baker y col., 1978; Molyneux, 1991; D'Alessandro y Saravia, 1992; Medina-Acosta y col., 1994]. Los métodos más aceptados, sin embargo, incluyen análisis de isoenzimas y amplificación de ADN polimórfico (RAPD) [Miles y col., 1978; Tibayrenc y col. 1986; Tibayrenc, 1995; Barnabé y col., 2000; Brisse y col., 2000a, 2000b, 2003], análisis de genes de mini-exon [Nunes y col., 1997; Fernández y col., 1998, Brisse y col., 2001], análisis de ARN ribosomial [Stevens y col., 1999b; Kawashita y col., 2001; Brisse y col.; 2001], secuenciación de nucleótidos de genes nucleares y mitocondriales aislados [Robello y col., 2000; Kawashita y col., 2001; Machado y Ayala, 2001; Brisse y col., 2003], empleo de microsatélites o análisis del ADN del kinetoplasto [Macedo y Penna, 1998], entre otros.

Siguiendo esta línea, nuestro grupo ha puesto a punto diferentes técnicas de caracterización de cepas a través de perfiles isoenzimáticos, aglutinación con lectinas y PCR [Marín y col., 2002; Rodríguez-González, 2007].

La **tabla 2** muestra un resumen de los distintos iniciativas de clasificación de cepas de *T. cruzi*.

Criterio	Autor/es	Clasificación
Isoenzimas y RAPD	Miles y col., 1978	Zimodemas (Z1, Z2, Z3)
	Tibayrenc y col., 1986	Linaje I (contiene a Z1)
	Brisse, 2001	Linaje II (contiene a Z2 y Z3) y se subdivide en cinco grupos (IIa-...- IIe)
	Machado-Ayala, 2001	
Mini-exon genes	Nunes y col., 1997	Linaje I, que contiene 2 subgrupos: Grupo 1, formado por: IIb, IIc y IIe Grupo 2, formado por IIa y IIc
	Fernández y col., 1998	
	Brisse, 2001	
ARNr	Kawashita y col., 2001	Linaje I
	Brisse, 2001	Linaje II
	Souto y col., 1999	

Tabla 2: RESUMEN DE CLASIFICACIÓN DE CEPAS DE *T. cruzi*

En un esfuerzo por armonizar los distintos intentos de clasificación de *T. cruzi* [Anónimo, 1999], se ha establecido la división de todos los aislados en dos grandes linajes o grupos de referencia: el grupo ***T. cruzi I***, que agrupa a los aislados pertenecientes al Z1-L1 (isoenzima/RAPD)-L2 (ADNr/miniexon) y el grupo ***T. cruzi II***, que agrupa a las cepas caracterizadas como Z2-L2b (isoenzima/RAPD)-L1 (ADNr/miniexon).

II.II La Enfermedad de Chagas

II.II.I Etiología, Transmisión y Sintomatología

T. cruzi es el agente etiológico del mal de Chagas, también conocida como de Chagas-Mazza o tripanosomiasis americana, parasitosis de pronóstico muy grave que se da en la práctica totalidad del centro y sur del continente americano, desde el sur de Estados Unidos y México hasta el centro de Argentina, generalmente asociada a condiciones socioeconómicas e higiénicas deficitarias que favorecen la proliferación de los chinches hematófagos vectores y donde en la actualidad se estima que más de dieciocho millones de personas están infectadas. Además, a causa de la inmigración, aproximadamente medio millón de personas en los E.E.U.U. padecen asimismo la enfermedad [Binder y col., 1999; OMS, 2002].

La vía de transmisión de la enfermedad de mayor repercusión desde el punto de vista epidemiológico es la vectorial, sin embargo han sido también descritas la transmisión transplacentaria, la transfusional y, más raramente, la asociada a la lactancia [Prata, 2001].

La enfermedad presenta un cuadro clínico variable en el que se aprecian dos fases bien diferenciadas: la fase aguda o temprana es de duración breve (quince o veinte días) y suele cursar de manera asintomática. En algunos casos, fundamentalmente en niños, tras la

primoinfección puede aparecer una lesión característica denominada chagoma (pequeña inflamación y enrojecimiento en el lugar de la picadura). A medida que los parásitos son dispersados por la circulación linfática, puede producirse inflamación en otras localizaciones, como párpados (signo de Romana), ganglios linfáticos y tejidos adyacentes, junto a fiebre y malestar general. Raras veces se produce hepato y esplenomegalia. La enfermedad, por acción de la respuesta inmune, disminuye su intensidad después de la fase aguda, permaneciendo asintomática durante un período variable, por lo general de diez o quince años, transcurrido el cual, en un porcentaje que ronda el 15 % de los casos, reemerge bajo un cuadro clínico de cardiomiopatía grave (insuficiencia cardíaca, arritmias...) que cursa con palpitaciones, disnea, dolores cardíacos y/o hepáticos y alteraciones del electrocardiograma que, de permanecer sin tratamiento, suele tener consecuencias fatales para el paciente. Además, el flagelado puede originar una serie de trastornos digestivos (megaesófago y megacolon, dificultad para deglutir, desnutrición, dolor abdominal y estreñimiento), musculares y nerviosos [Reina- San Martín y col., 2000].

II.II.II Diagnóstico y Tratamiento

En las etapas tempranas de desarrollo de la enfermedad suelen utilizarse métodos de diagnóstico directo, fundamentalmente la observación al microscopio óptico de un frotis de sangre periférica, el xenodiagnóstico (que requiere la disponibilidad de triatominos libres de infección cultivados en laboratorio) y el hemocultivo. El diagnóstico en la fase crónica es algo más complejo y para ello se suele recurrir a técnicas inmunológicas (que detectan la presencia de anticuerpos frente al parásito) como la IFI o la ELISA, o bioquímicas (que detectan ciertas moléculas del parásito como indicadores de la infección), además de otros métodos de uso más complejo y menos extendido, como el test de fijación de complemento, la hemaglutinación indirecta o la PCR. Los falsos positivos debidos a la existencia de reacciones cruzadas con otros protozoos, fundamentalmente con *Trypanosoma rangeli* y con especies pertenecientes a los géneros *Leishmania* spp. y *Plasmodium* spp., representan las principales desventajas de estos métodos, especialmente cuando el paciente procede de una región geográfica en la que existe concomitancia de infecciones. Otros inconvenientes son su fiabilidad, sobre todo en casos en los que la parasitación es baja o la infección muy reciente, su coste y su lentitud [Punukollu y col., 2007].

Los fármacos de elección para el tratamiento de la tripanosomiasis americana son el nifurtimox (NFX) y el benznidazol (BZN). No obstante, además de presentar numerosos efectos adversos, su eficacia en la fase tardía es baja. En los últimos años se ha utilizado el itraconazol (ITR) con mejores resultados. En la fase crónica, conjuntamente al tratamiento etiológico, es recomendable realizar un tratamiento sintomático de las alteraciones cardíacas e intestinales. Aproximadamente el 30 % de las personas infectadas sin tratamiento desarrollarán mal de Chagas crónico [Bestetti y Muccillo, 1997].

II.III Química de los Radicales Libres

II.III.I Introducción y Características de los Radicales Libres

Con la instauración en la Tierra de la atmósfera actual y la aparición de los primeros organismos fotosintéticos, se produjo en el metabolismo de los primeros pobladores del planeta un cambio drástico que condicionó la supervivencia y selección natural de los organismos que fueron capaces de adaptarse a este nuevo entorno aerobio. El uso del oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena oxidativa permitió a dichos organismos desarrollar rutas metabólicas mucho más ventajosas energéticamente y que sin duda, supusieron un punto de inflexión dentro del proceso evolutivo, restringiendo a los organismos anaerobios a pequeños nichos ecológicos que persisten dentro de un ambiente aerobio. A pesar de las obvias ventajas energéticas, la presencia del oxígeno como parte esencial del metabolismo celular presenta inconvenientes asociados al estrés metabólico causado por las especies químicas derivadas de este gas paramagnético, que pueden ser letales; es por ello que los organismos aerobios han desarrollado paralelamente una serie de defensas antioxidantes destinadas a eliminar dichas especies, neutralizando o minimizando así el daño oxidativo por ellas inducido y permitiendo de esta manera la supervivencia de la célula.

Los radicales libres (**R•**) son especies químicas orgánicas o inorgánicas que poseen al menos un electrón desapareado en su último orbital, hecho que les confiere una altísima inestabilidad y reactividad desde el punto de vista químico [Fang y col., 2002]. Los **R•**, dada esta particular configuración electrónica *en capas abiertas*, tienen una gran afinidad por captar o robar un electrón de otra molécula. Dichas especies participan en multitud de reacciones que se dan en la naturaleza, siendo muchas las fuentes externas de radicales libres (el humo del tabaco, el CO₂ industrial, los pesticidas o las radiaciones ultravioletas, por citar sólo unos pocos). Algunos ejemplos de radicales libres muy comunes en la naturaleza son: el átomo de hidrógeno (H⁺), el anión superóxido (O₂⁻), el radical hidroxilo (OH⁻) o el óxido nítrico (NO), entre otros. Además de las fuentes externas, como ya hemos mencionado, los radicales libres se producen de manera endógena a consecuencia del metabolismo mitocondrial y, en ocasiones, como respuesta de los organismos superiores frente a ciertos agentes infecciosos [Gilbert, 2000; Evans y Halliwell, 2001].

Las reacciones que afectan a los radicales libres se dividen normalmente en tres categorías: iniciación, propagación y terminación [Breen y Murphy, 1995].

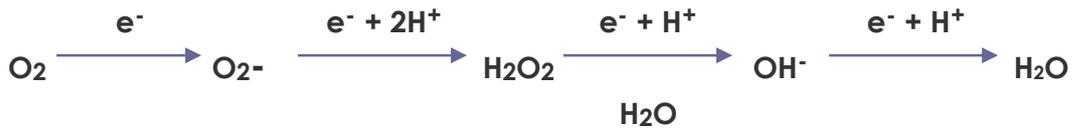


Fig.2: ESQUEMA DE LA FORMACIÓN DEL RADICAL SUPERÓXIDO: A excepción del H_2O_2 , el resto de intermediarios formados tiene una vida media muy corta y no pueden acumularse en los seres vivos [Czapski, 1971].

II.III.II Efectos sobre las Células de los Radicales Libres

Las especies reactivas del oxígeno (**EAO**), y dentro de éstas, el H_2O_2 y los aniones O_2^- y OH^- son producidos fisiológicamente en los procesos celulares destinados a la obtención de energía (respiración y combustión). Aunque algunos autores han sugerido en los últimos años que el papel de los radicales libres va más allá de su participación en los procesos de oxidación y envejecimiento celular, proponiendo su función como mensajeros químicos [Darley-Usmar y Starke-Reed, 2000], está demostrado que su acúmulo puede tener un efecto muy perjudicial sobre los componentes celulares [García y col., 2004]. Se estima que entre el 1 y 3 % del oxígeno que respiran nuestras células al oxidar sus sustratos se transforma en **EAO**.

Los ácidos grasos poliinsaturados, constituyentes fundamentales de los fosfolípidos de membrana, son componentes muy lábiles a la acción de los $R\bullet$, dada la alta afinidad de estos últimos por captar un átomo de hidrógeno de los dobles enlaces que constituyen su esqueleto policarbonado, originando su disociación [Dekkers y col., 1996]. En un intento por estabilizar la molécula, tras el ataque inicial, tiene lugar un reajuste intramolecular que origina dienos conjugados, muy sensibles a la acción de otros radicales, como el O_2^- , con los que reaccionan para formar peróxidos, a su vez capaces de robar un electrón a una nueva molécula de fosfolípido, propagando así el efecto [Halliwell y Gutteridge, 1985]. Toda esta reacción en cadena repercute en las propiedades homeostáticas de las membranas, ocasionando disminución de la fluidez y pérdidas de la permeabilidad selectiva que, en última instancia, pueden llegar a producir la lisis celular [Pré, 1991]. Además, algunos de los componentes derivados de la peroxidación lipídica, dada su alta hidrosolubilidad, pueden por sí mismos desestabilizar a otras biomoléculas, como sucede en el caso de ciertos dialdehídos, capaces de reaccionar con grupos tioles o amino de algunas proteínas, promoviendo su polimerización y la pérdida de funcionalidad, o fijarse al ADN alterando la expresión génica [Davies, 1988; Vacca, 1988].

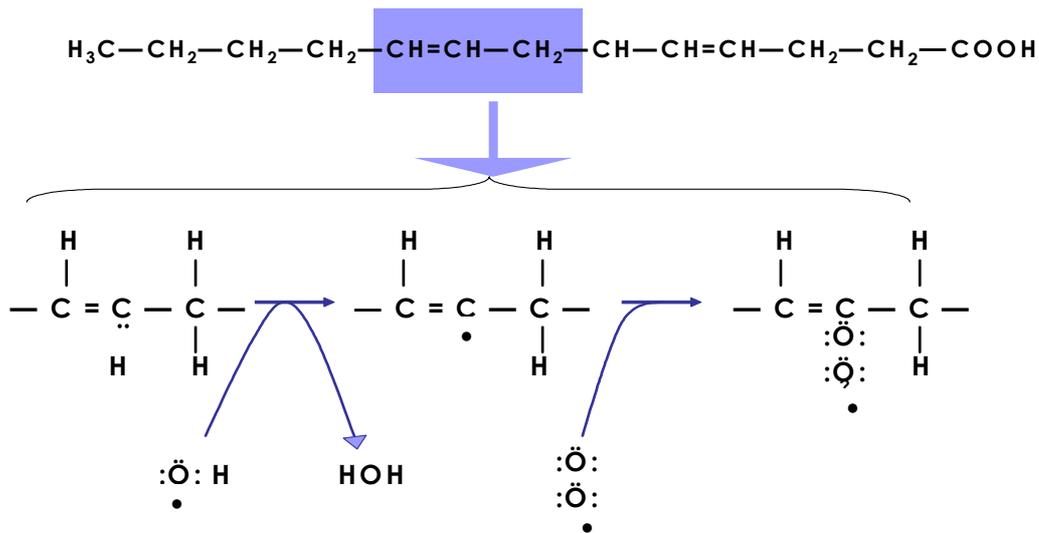


Fig.3: ESQUEMA DE LA DISOCIACIÓN DE UN ÁCIDO GRASO DE MEMBRANA CON FORMACIÓN DE UN PERÓXIDO:

Etapa 1^a: Ataque nucleofílico del radical hidroxilo sobre el átomo de hidrógeno del C α .

Etapa 2^a: Reacción del átomo de C• con una molécula de O₂ para formar un peróxido, susceptible a su vez de atacar a otros ácidos grasos adyacentes o al resto de componentes celulares.

La exposición de las proteínas a dosis controladas de radiación UV en presencia de **EAO** y el estudio de sus productos de reacción ha permitido establecer varios mecanismos degradativos *in vitro*. La ofensiva de los radicales libres sobre la cadena polipeptídica se inicia mediante el ataque nucleófilo sobre un hidrógeno α de un átomo de carbono de residuos laterales de aminoácidos (glutamato, aspartato, prolina o fenilalanina, entre otros), con formación de un radical C•. Dicho radical, altamente inestable, reacciona rápidamente con una nueva molécula de O₂ para formar un intermediario, que, en un intento

de estabilizarse, sufre una reordenación electrónica, originando distintos productos, como derivados hidroxilados o carbonílicos y ácido oxálico [Schuessler y Schilling, 1984; Garrison, 1987]. Muchos de los intermediarios formados en la reacción pueden sufrir paralelamente diferentes reacciones con otros aminoácidos de la misma u otra proteína, dando lugar a CO_2 , NH_3 y ácido carboxílico. Además, en ausencia O_2 , pueden verificarse reacciones de entrecruzamiento de proteínas trámite la formación de enlaces entre dos carbonos que han perdido el átomo de hidrógeno.

En el caso de proteínas estructurales, como el colágeno, estas alteraciones conllevan la formación de enlaces cruzados dentro de la molécula y en ocasiones, la rotura de la misma, transformándose a su vez en substrato de enzimas proteolíticas [Pacifci y Davies, 1990]. Si se trata de proteínas de membrana, el ataque conlleva cambios conformacionales que repercuten en la regulación de los procesos de transporte, proceso al que sin embargo están mucho más expuestas las proteínas solubles [Nakazawa y col., 1996]. Cuando se trata de enzimas, la modificación de su disposición espacial puede llegar a ocasionar gran variedad de desajustes metabólicos que podrían motivar la muerte celular por acumulación o defecto intracelular de ciertos substratos. La presencia en células animales de niveles elevados de estos productos está íntimamente ligada al envejecimiento, así como con un alto número de patologías de distinta índole.

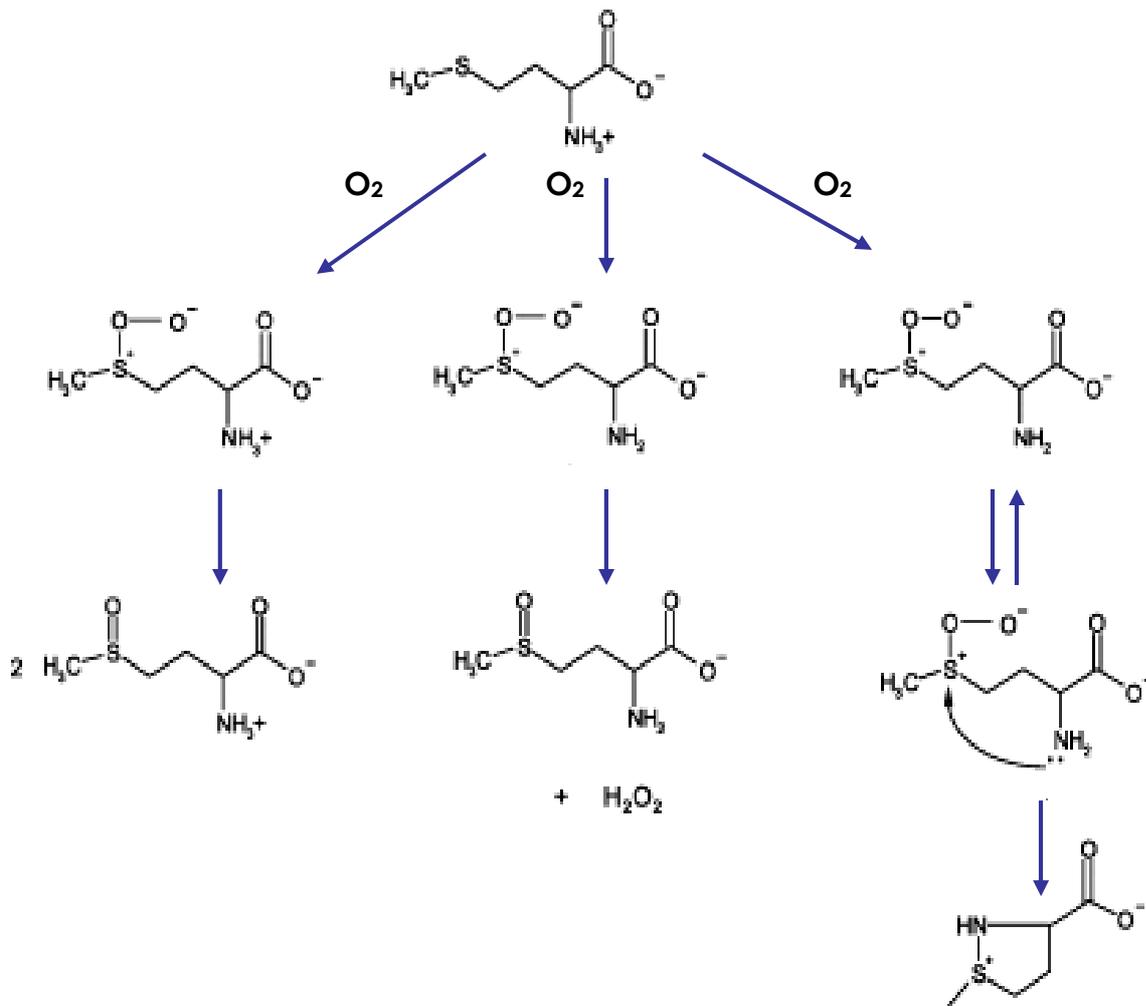


Fig.4: PROPUESTA DE MECANISMOS DEGRADATIVOS DE LA METIONINA EN PRESENCIA DEL OXÍGENO. Fuente: [Imlay, 2003]

Etapa 1ª: Ataque nucleófilo sobre el átomo de **S**

Etapa 2ª: Reorganización electrónica y formación de productos

Existen no obstante algunos mecanismos de reparación que permiten la recuperación de la estructura proteica. Así, la acción de las **EAO** sobre residuos de cisteína y metionina, que da lugar a disulfuros y sulfóxidos, puede ser reparada por medio de reductasas, minimizando las posibles secuelas para la integridad estructural y funcional de la proteína [Oien y Moskovitz, 2007].

En último lugar, los ácidos nucleicos son componentes celulares muy lábiles a la acción de las **EAO**, pudiendo originar rotura de hebras, formación de enlaces cruzados con proteínas, cambios entre cromátidas hermanas y oxidación de azúcares [Teebor y col., 1988; Beckman y Ames, 1997]. Por ejemplo, el radical OH^\cdot manifiesta una dualidad de acción sobre la molécula de ADN: por una parte, es capaz de romper los enlaces π de las bases nitrogenadas, mientras que por otra, su elevada nucleofilia le confiere una alta capacidad de sustracción de átomos de hidrógeno de las moléculas de desoxirribosa [Ward y col., 1985; Hobza y Poner, 1998].

Se estima que el material nuclear de cada célula es atacado unas 10^4 veces al día por los radicales libres, a pesar de lo cual, la mayoría de estas no tienen consecuencias graves para la célula, pues éstas disponen de mecanismos enzimáticos altamente eficaces encargados de reparar el material nuclear, disminuyendo de este modo sus posibles consecuencias [Demple y Levin, 1991]. Si los citados mecanismos fracasan en su cometido y las alteraciones permanecen sin ser subsanadas, el daño nuclear inducido conlleva la desestructuración del esqueleto fosfatado de una de las hebras del ADN que, no obstante, puede ser reparada a tiempo sin daño aparente para la célula gracias a que la hebra complementaria permanece intacta [Blakely y col., 1982]. Si por el contrario, el daño persiste, se producen distorsiones en la

doble hélice que pueden provocar graves errores en los procesos de replicación, transcripción y transducción, y en consecuencia, originar proteínas con déficit estructural y funcional e inducir mutaciones, cáncer y muerte celular. Los productos de dichas agresiones pueden ser medidos experimentalmente empleando técnicas de radiolisis de pulso, ESR (Electron Spin Resonance) y métodos de *trapping* [Termini, 2000].

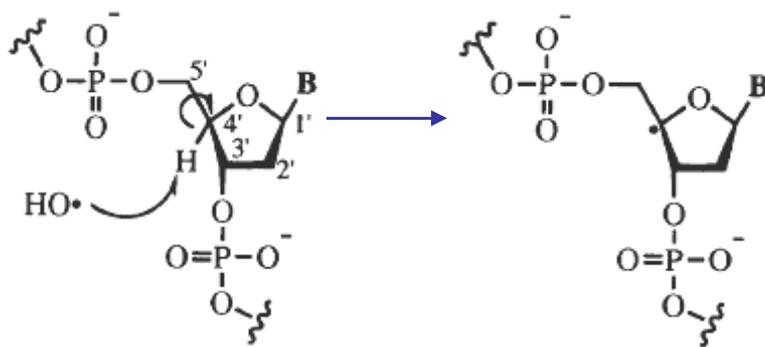


Fig.5: ETAPA INICIAL DEL ATAQUE NUCLEOFÍLICO DEL RADICAL OH• SOBRE LA MOLÉCULA DE DESOXIRRIBOSA (**B**: BASE NITROGENADA) [Breen y Murphy, 1995].

La alteración de las distintas biomoléculas debido al ataque de los radicales libres puede tener, como hemos visto, consecuencias desastrosas para la fisiología celular, estando los radicales libres relacionados con el envejecimiento celular, así como con numerosas enfermedades degenerativas (Alzheimer y Parkinson), vasculares (hipertensión, problemas cardio y cerebrovasculares), inflamatorias (artritis, hepatitis, colitis ulcerosa, enfermedad periodontal) o cáncer, entre otras [Balaban y col., 2005].

II.III.III Toxicidad del Oxígeno en Protozoos

El cultivo de distintos protozoos bajo medios a los que se aplican tensiones crecientes de oxígeno, de modo semejante a lo que ocurre en una cámara hiperbárica, ha permitido estudiar su comportamiento frente a este gas, estableciendo diferencias metabólicas sustanciales entre ellos y considerando su influencia un factor decisivo para la supervivencia y el crecimiento [Docampo, 1990]. Se ha dado en llamar *estrés oxidativo* al daño celular asociado a la presencia de altas presiones (o tensiones) de oxígeno y otras moléculas derivadas (fundamentalmente los aniones superóxido e hidroxilo: O_2^- , OH^- y el peróxido de hidrógeno, H_2O_2) [Sies, 1985].

El estudio comparativo de las defensas antioxidantes presentes en la mayoría de los protozoos frente a las existentes en otros organismos eucariotas presenta ciertas particularidades: la superóxido dismutasa constituye la principal y casi única línea de defensa frente al estrés oxidativo, puesto que los sistemas catalasa y glutatión peroxidasa, que constituyen las principales defensas enzimáticas en la mayoría de eucariotas, son extremadamente deficientes en protozoos, siendo en algunos tripanosomátidos reemplazados por el sistema peroxidasa dependiente de tripanotión, cuyo rendimiento no obstante es mucho menor [Docampo, 1995]. Como consecuencia de esta capacidad reductora disminuida, cualquier reacción extra o intracelular que

genere un aumento, aun moderado, de la tensión parcial de oxígeno o de cualquier otra especie derivada, como son las reacciones de autooxidación de tioles, formación de peróxidos orgánicos, reacciones de fagocitación o generación de especies reactivas del oxígeno por agentes químicos, conlleva un incremento de la concentración de dichas especies (fundamentalmente peróxido de hidrógeno) hasta alcanzar niveles altamente tóxicos, las cuales, de ser irreversibles, terminan por provocar la muerte del parásito [Docampo y Moreno, 1984; Docampo, 1990].

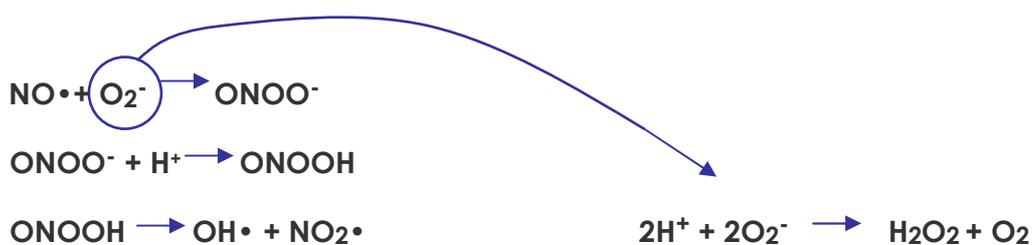
Ciliados del rumen y flagelados de termitas son protozoos anaerobios obligados, que habitan en entornos faltos de oxígeno y que mueren rápidamente cuando son sometidos a tensiones moderadas (por encima de 2 KPa) [Von Brand, 1973]. Los primeros, no obstante, son capaces de sobrevivir durante algunas horas en medios con tensiones de oxígeno bajas (entre 1 y 2 KPa), lo cual es de importancia dadas las concentraciones de oxígeno existentes en el fluido del rumen [Yarlett y col., 1982]. *Trichomonas* spp. y *Entamoeba* spp. son protozoos anaerobios algo menos sensibles a las variaciones de la tensión de oxígeno, capaces de crecer indefinidamente en condiciones de anaerobiosis total o parcial. El crecimiento de *Trichomonas vaginalis* se ve incluso ligeramente estimulado por la aplicación en el medio de cultivo de presiones de O₂ bajas (entre 1 y 3 μM), característica que permite definir a este organismo como microaerófilo

[Paget y Lloyd, 1990]. Los tripanosomátidos, por su parte, son organismos aeróbicos capaces de soportar condiciones de cultivo anaeróbicas; sin embargo y contrariamente al caso anterior, en estas condiciones carecen de capacidad multiplicativa [Von Brand, 1973].

Parece probado que el mecanismo de toxicidad de las **EAO** proviene, no de un efecto tóxico directo sobre los componentes de la célula parasitaria, sino más bien de la generación en presencia de iones metálicos [Fe(II,III), Cu (I, II), Mn (II, III) o Co (II, III)] de un intermediario extremadamente reactivo, como el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), como pone de manifiesto la *reacción de Fenton* para el peróxido de hidrógeno:



Más recientemente, ha sido propuesto un nuevo mecanismo que explicaría la producción del radical hidroxilo de manera independiente a la presencia de iones metálicos [Beckman y col., 1990]. Dicho mecanismo implicaría la formación de otros intermediarios altamente inestables, como el radical $\text{ONOO}\cdot$, como ilustra la siguiente reacción:



En la reacción, la combinación del NO• con el anión superóxido se completaría con la dismutación de este último. El peroxinitrito presenta un pKa de 7.5 y en condiciones fisiológicas podría ser fácilmente protonado, originando ácido peroxinitroso (ONOOH), capaz a su vez de descomponerse dando lugar a OH• y NO₂•. Este mecanismo mediado por óxido nítrico tiene un gran interés biológico, puesto que esta molécula actúa como un factor de relajación generado a nivel del endotelio que participa en multitud de reacciones bioquímicas [Lowenstein y Snyder, 1992]. Especial interés desde el punto de vista farmacológico tiene su papel como mediador en los procesos de activación de macrófagos por agentes leishmanicidas y tripanocidas, mecanismo aun no del todo conocido pero en el que parece clara la participación del NO• en la nitración de un extremo N-terminal de un residuo de L- Arginina [Buchmüller- Rouiller y col., 1992; Denicola y col., 1993]

Como sabemos, las **EAO** son producidas de manera fisiológica en las cadenas de transporte mitocondrial y microsomial. En muchas especies de protozoos han sido detectadas cantidades considerables de peróxido de hidrógeno y anión superóxido, como en el caso de *Tritrichomonas foetus*, capaz de excretar al medio H₂O₂ en condiciones aeróbicas [Ninomiya y Ziro, 1952].

En otros parásitos, sin embargo, no existe evidencia que demuestre dicha capacidad, como en el caso de *Plasmodium* spp., para el que sin embargo se ha propuesto un mecanismo de generación de **EAO** mediado por la producción de grupos hemo y otros productos que contienen hierro [Atamna y Ginsburg, 1993]. Preparaciones mitocondriales de formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei* producen cantidades de H_2O_2 y O_2^- que corresponden a una tasa de entorno al 1-3 % del O_2 consumido [Penketh y Klein, 1986]. En *Crithidia fasciculata*, un tripanosomátido apatógeno, la tasa de formación de H_2O_2 se encuentra en niveles próximos a la producción mitocondrial en tejidos de vertebrados [Kussel y col., 1973]. *Trypanosoma cruzi*, por su parte, no libera H_2O_2 al medio de cultivo bajo condiciones de aerobiosis, aunque la adición de dinucleótidos reducidos en presencia de NADH o NADPH, sí deriva en la producción de los estos gases [Denicola y col., 1992].

II.III.IV Defensas Antioxidantes

Como hemos dicho, debido a la mermada capacidad reductora que poseen por lo general los protozoos, un aumento de los niveles de **EAO** en el medio externo puede traer consigo fatales consecuencias para la viabilidad de la célula. Precisamente se sabe que éste constituye uno de los principales mecanismos de defensa puestos en marcha por el sistema inmune del hospedador infectado, de manera que una puntual

puesta en circulación masiva de radicales libres pueda acabar con la infección. Sin embargo, los parásitos son organismos dinámicos dotados de una serie de sistemas detoxificantes altamente eficaces que les permiten combatir y neutralizar un eventual incremento de la concentración de **EAO** y asegurar de este modo la supervivencia y su establecimiento dentro del hospedador. Las defensas antioxidantes pueden clasificarse según su naturaleza química en dos grandes grupos: enzimáticas y no enzimáticas.

a. Defensas Antioxidantes No Enzimáticas

A pesar de que, en la mayoría de los seres vivos, el grueso de la actividad antioxidante recae sobre sistemas enzimáticos y de que su importancia cuantitativa es mucho menor, se sabe que algunas **EAO** pueden ser neutralizadas por acción de ciertas moléculas orgánicas de bajo peso molecular. Dentro de este grupo se engloban una serie de compuestos tanto de naturaleza hidrófoba (vitamina E y β -caroteno) como hidrófila (vitamina C, glutatión o piruvato) [Sies, 1985].

El **α -tocoferol (vitamina E)** es un compuesto liposoluble que, gracias a su estructura fenólica, desempeña una importante función como protector de las membranas frente al ataque de radicales peroxilo procedentes de la oxidación lipídica. El **β -caroteno** es un compuesto vegetal precursor del **retinol (vitamina A)**, que desempeña importantes

funciones en la visión y como antioxidante de membranas. El **ácido ascórbico (vitamina C)** es asimismo un eficaz antioxidante en medio acuoso. Por un lado reacciona con los radicales peróxido citosólicos antes de que entren en contacto con las membranas, mientras que por otro incrementa la actividad antioxidante de la vitamina E al regenerar el α -tocoferol a partir del radical α -tocoferilo [McKee y McKee, 2003]. En *T. cruzi* han sido descritas actividades ascorbato peroxidasa y dehidroascorbato reductasa, que sugieren la existencia de un ciclo reductor que abastecería la célula de ácido ascórbico para su utilización como defensa antioxidante [Clarke y col., 1994]. Por su parte, el **piruvato** ha sido propuesto como sumidero de peróxido de hidrógeno, a pesar de que no existe evidencia empírica de esta actividad para muchos microorganismos [Penketh y Klein, 1986].

Aunque la existencia de actividad glutatión peroxidasa en protozoos es, como ya hemos dicho, prácticamente inexistente, sí se ha detectado su cofactor, el glutatión, lo cual parece indicar la presencia de cierta actividad reductora asociada a esta molécula [Docampo, 1995]. Por otro lado, existen antecedentes que proponen la capacidad de algunas proteínas (transferrina, lactoferrina) de fijar en su estructura iones metálicos que actúan como catalizadores en las reacciones de formación de **EAO**, pudiendo ser el secuestro de estos cationes considerado un mecanismo defensa en sí mismo [Gutteridge, 1986].

Recientemente, ha sido puesta de manifiesto en *T. cruzi* la existencia de una cierta actividad antioxidante asociada a moléculas de tipo poliamínico, como la **espermina** y la **espermidina**, las cuales, además de participar como cofactores de otros sistemas enzimáticos, presentan una actividad protectora propia frente a la lipoperoxidación mediada por el H_2O_2/Fe^{2+} y el nifurtimox [Hernández y col., 2006].

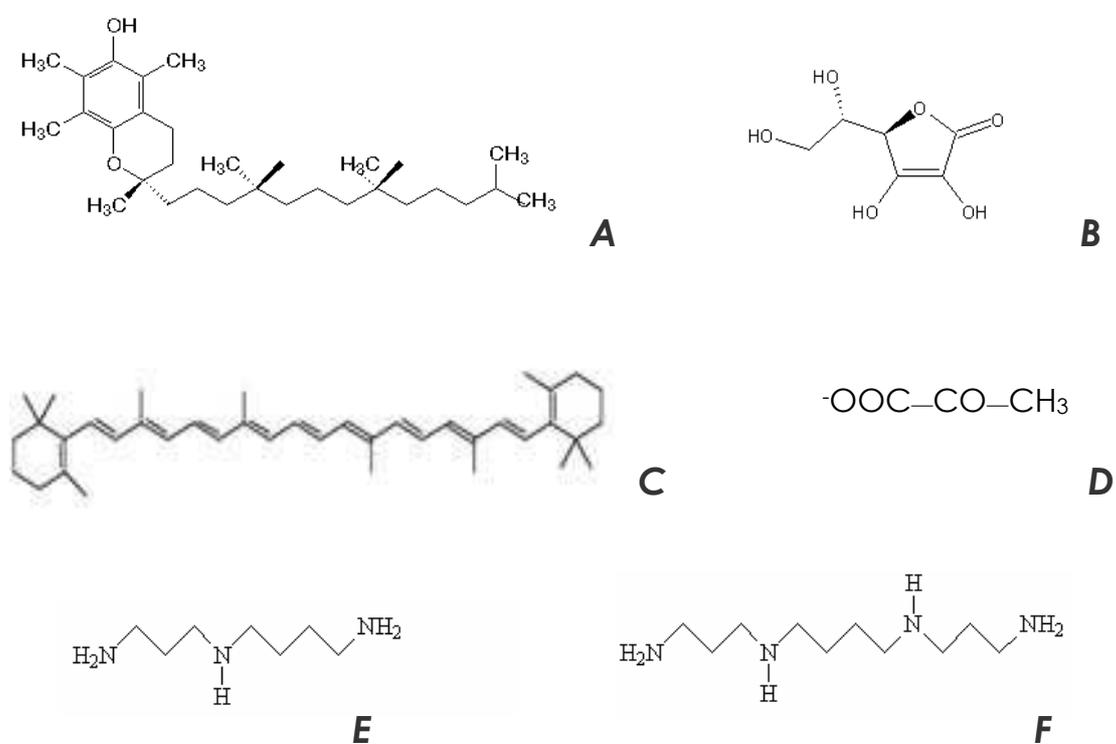


Fig.6: REPRESENTACIÓN DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS PRINCIPALES MOLÉCULAS ANTIOXIDANTES PRESENTES EN LOS SERES VIVOS:

A α -Tocoferol (Vitamina E)

D Piruvato

B Ác. Ascórbico (Vitamina C)

E Espermina

C β -Caroteno (Pre-Vitamina A)

F Espermidina

b. Defensas Antioxidantes Enzimáticas

Como ya hemos anticipado, la mayor parte de la actividad antioxidante en los seres vivos es debida a la acción conjunta de una serie de sistemas de naturaleza enzimática. Estos sistemas, a saber: catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, constituyen un sistema de defensa altamente regulado, encargado de mantener un ambiente intracelular favorable y capaz de contrarrestar posibles aumentos de las nocivas **EAO**.

b.1. Catalasa (EC 1.11.1-6)

Se trata de un sistema enzimático oxidoreductor ampliamente distribuido entre los seres vivos. Presenta una dualidad funcional: por un lado está encargado de la descomposición del agua oxigenada hasta agua y oxígeno molecular (1), mientras que por otro es responsable de la oxidación dependiente de peróxido de moléculas donadoras de electrones, como alcoholes o ácido fórmico (2) [Docampo, 1995].



Estructuralmente, se trata de un enzima tetramérico de peso molecular alto (entorno a los 250 KDa), en el que cada subunidad contiene un grupo hemo capaz de fijar una molécula de NADH.

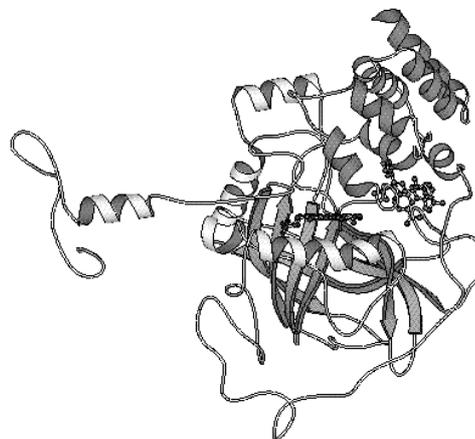


Fig. 7: REPRESENTACIÓN

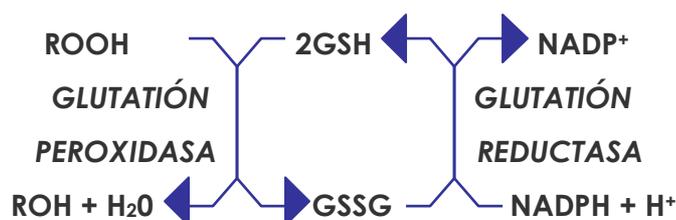
EN 3D DE LA ESTRUCTURA TETRAMÉRICA DE LA CATALASA, EN LA QUE SE PUEDEN OBSERVAR LAS CUATRO SUBUNIDADES [Gouet y col., 1995].

En la mayoría de organismos eucariotas, la actividad catalasa se encuentra confinada dentro de entidades subcelulares llamadas peroxisomas, en los cuales se concentran además muchas otras actividades enzimáticas [Docampo, 1995]. Aunque está escasamente extendida dentro del subphylum *Protozoa*, incluidos los tripanosomátidos más importantes desde el punto de vista sanitario (*T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania* spp.), la catalasa sí se ha identificado en los citoplasmas de *Tritrichomonas foetus* [Müller, 1978] y, más recientemente, de *Toxoplasma gondii* [Kwok y col., 2004], además de en otros tripanosomátidos inferiores [Von Brand, 1973]. En *Crithidia luciliae*, *C. fasciculata* o *Phytomonas* sp., por ejemplo, la actividad catalasa ha sido localizada dentro de los glicosomas, orgánulos que ocupan hasta el 3 % del volumen total de la célula y cuya función, aunque menos

estudiada, parece análoga a la que desempeñan los peroxisomas en el resto de eucariotas [Opperdoes y col., 1977; Sánchez-Moreno y col., 1992]. Además, existen indicios que hacen presagiar la presencia de hidrogenosomas dentro de los microcuerpos en *T. cruzi*, lo cual permitiría abrir ciertos interrogantes acerca de una posible actividad catalasa en este flagelado [Docampo y col., 1976; Kulda y col., 1977].

b.2. Glutati3n Peroxidasa y otros Sistemas Peroxidasa (1.11.1.9)

La glutati3n peroxidasa (GPasa) es un enzima encargado de catalizar la reacci3n de reducci3n de hidroper3xidos inespec3ficos procedente de fuentes diversas (org3nicas, l3pidos de membrana y restos nucleicos) a trav3s de la oxidaci3n del glutati3n [Knappen y col., 1999; Knappen, 2000]. Tambi3n es el sistema encargado de la detoxificaci3n del per3xido de hidr3geno a concentraciones intracelulares bajas (por debajo de 10^{-6}M).



El sistema de la peroxidasa requiere para su funcionamiento la presencia de dos mol3culas de glutati3n en forma reducida (GSH), que actúan como cofactor espec3fico de dicho enzima, cediendo hidr3geno y cuyo producto, la forma oxidada (GS-SG), ser3a objeto de la acci3n de un nuevo enzima, la glutati3n reductasa (GRasa), que permitir3a la regeneraci3n de la forma reducida gracias a la oxidaci3n simult3nea de NADPH [Docampo y col., 1995].

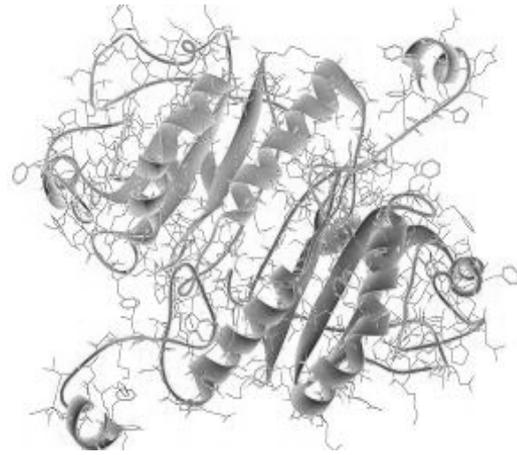


Fig.8: MODELIZACIÓN TRIDIMENSIONAL DE LA ESTRUCTURA ESPACIAL DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA HUMANA, EN LA QUE SE APRECIAN LAS DOS SUBUNIDADES, CON UN PM TOTAL DE APROXIMADAMENTE 85 KDa.
Fuente: [In Silico Sciences Inc.: www.pd-fams.com]

Dentro del subphylum *Protozoa*, *Toxoplasma gondii* y algunas especies del género *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vinckei* y *P. berghei*) han demostrado poseer en alguno de sus estadios biológicos actividades glutatión peroxidasa [Murray y col., 1980; Fritsch y col., 1987], hecho éste que ha sido imposible evidenciar fehacientemente en ningún miembro de la familia *Trypanosomatidae* [Turrens, 2004]. Algunos kinetoplastidos, empero, sí han demostrado poseer toda una serie de actividades peroxidasa asociadas, cuya actividad parece girar alrededor de una molécula de naturaleza tiólica específica llamada tripanotión (N^1 , N^8 bis-glutationil espermidina) [Field, 1992; Müller y col., 2003]. Esta molécula es sintetizada por la tripanotión sintasa/amidasa en un proceso que, en *T. cruzi* (no así en otros tripanosomátidos), está supeditado a la captación exógena de putrescina (compuesto poliamínico precursor del cofactor, la espermidina) de manera dependiente de transportadores específicos. *T. cruzi* es capaz de solventar los problemas

derivados de una eventual baja biodisponibilidad de espermidina de procedencia exógena mediante la puesta en marcha de rutas alternativas en las que conjuga glutatión con otros substratos poliamínicos (principalmente espermina, *N*-acetilespermina y *N*⁸-acetilespermidina) [Ariyanayagam y col., 2003].

En torno a dicho compuesto, en los últimos años se han ido descubriendo distintos componentes de lo que parece constituir toda una red de sistemas antioxidantes conectados, complementarios y dependientes, que trabajan de forma coordinada para mantener un ambiente intracelular favorable y minimizar incrementos ocasionales de **EAO** [Hernández y col., 2006], siendo considerados por varios autores como factores de virulencia de los parásitos y potenciales dianas terapéuticas [Ariyanayagam y col., 2003]. Entre estos sistemas, cabe destacar el de la triparredoxin peroxidasa (constituido por dos peroxidases de localización mitocondrial y citosólica pertenecientes a la familia de las peroxirredoxinas, ampliamente distribuidas entre los seres vivos y que químicamente se caracterizan por estar unidas en su sitio activo a un residuo de cisteína) [Wilkinson y col., 2000], dos glutatión peroxidases independientes de selenio, capaces de metabolizar ácidos grasos e hidroperóxidos fosfolipídicos y, en el segundo caso, también hidroperóxidos de cadena corta [Wilkinson y col., 2002a; Wilkinson y Kelly, 2003] y una ascorbato hemoperoxidasa reticuloendotelial de reciente descubrimiento, estructuralmente semejante a la existente en

plantas [Wilkinson y col., 2002b]. Sobre este conjunto de defensas enzimáticas recae la importante tarea de la reducción de peróxidos endógenos frente a la acción de las **EAO** y, en consecuencia, el mantenimiento de un ambiente celular reductor [Fairlamb y Cerami, 1992].

b.3. Superóxido Dismutasa (EC 1.15.1.1)

Las Superóxido Dismutasas (SODs) constituyen un grupo de metaloenzimas antioxidantes encargadas de eliminar del medio los tóxicos radicales superóxido (O_2^-) por dismutación de éstos en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, según la siguiente reacción [McCord y Fridovich, 1988; Fridovich, 1989]:



Se trata de un enzima polimérico (usualmente se constituye como dímérico o tetrámérico) de peso molecular muy variable, que se encuentra ampliamente distribuido entre los seres vivos. Su localización es preferentemente citosólica, aunque también se ha detectado su presencia en otros orgánulos, como la mitocondria y, en tripanosomátidos, en los glicosomas. Químicamente se caracteriza por ser capaz de incluir ciertos cationes metálicos en su estructura.

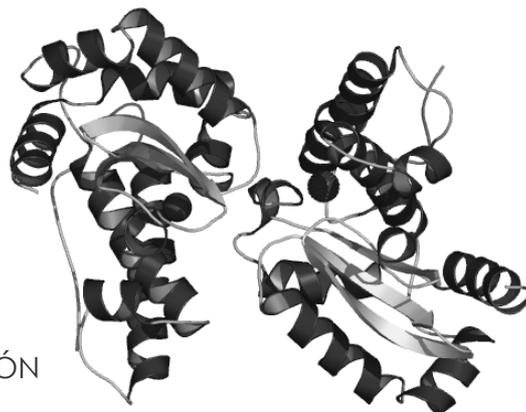


Fig.9: REPRESENTACIÓN ESPACIAL DE LA SOD I HUMANA, DE PM 32'5 KDa, EN LA QUE SE PUEDEN APRECIAR LA DISPOSICIÓN HOMODIMÉRICA Y LOS CATIONES METÁLICOS (EN ESTE CASO Cu-Zn).

Fuente: [In Silico Sciences: www.pd-fams.com]

Su descubrimiento, en 1969, supuso un considerable avance en la comprensión de los mecanismos antioxidantes de las células. Tradicionalmente, las SODs se han clasificado en tres tipos de acuerdo con el cofactor metálico al que aparecen unidas: cobre-zinc (Cu-ZnSODs), manganeso (MnSODs) y hierro (FeSODs). Mientras que las Cu-Zn y las Mn están presentes en el citosol y las mitocondrias, respectivamente, de la mayoría de organismos eucariotas [Okado-Matsumoto y Fridovich, 2001], las FeSOD son típicas de procariontas y plantas superiores [Docampo, 1995]. Actualmente, sin embargo, se acepta la inclusión de una nueva isoforma de SOD unida a un átomo de Níquel (NiSOD) descrita en algunas especies de *Streptomyces* sp. [Youn y col., 1996]. Técnicas moleculares han permitido agrupar las SODs en dos familias teniendo en cuenta el grado de homología de las secuencias de aminoácidos: la primera familia incluiría a las cobre-zinc, mientras que la segunda, la evolutivamente más antigua, estaría compuesta por las hierro y las manganeso [Bannister y col., 1987].

Experimentalmente, es posible discernir de manera rápida y fiable el cofactor metálico ligado a las SOD mediante exposición del enzima a inhibidores específicos, como son el peróxido de hidrógeno y el cianuro. Las isoenzimas que contienen Fe son inhibidas por el H₂O₂, pero no por el CN⁻, mientras que aquellas que fijan átomos de Cu-Zn o Mn en su sitio activo son inhibidas por ambos compuestos [Bannister y col., 1987].

Además, es posible cuantificar la cantidad de cada catión empleando técnicas de espectrometría de absorción atómica en una determinada muestra, lo cual tiene interés desde el punto de vista estructural.

La totalidad de los protozoos parásitos investigados hasta la fecha han demostrado poseer actividad SOD ligada a Fe, siendo considerada, como en el caso anterior, un factor de virulencia, al permitir a los parásitos sobrevivir a la ofensiva oxidante puesta en marcha por el hospedador y establecerse en él [Paramchuk y col., 1997]. Así, actividades SOD han sido detectadas en *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii* o *Trichomonas* spp. en al menos un estadio de su ciclo de vida [Gradus y Matthews, 1985; Sibley y col., 1986; Fairfield y col., 1988; Tannich y col., 1991; Bécuwe y col., 1996; Viscogliosi y col., 1998; Baert y col., 1999; Ödberg-Farragut y col., 2000]. Del mismo modo, estudios llevados a cabo con parásitos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae* han corroborado la presencia de al menos dos actividades SOD, como sucede en los casos de *Leishmania* spp. [Le Trant y col., 1983; Bogdan y col., 1990; Paramchuk y col., 1997; Genetu y col., 2006;], *T. cruzi* [Boveris y Stoppani, 1980; Ismail y col., 1997; Temperton y col., 1996; Villagrán y col., 2005], *T. brucei* [Kabiri y Steverding, 2001; Wilkinson y col., 2006; Dufernez y col., 2006], *Phytomonas* spp. (triptanosomátidos de plantas) [Quesada y col., 2001; Marín y col., 2004] o *Crithidia fasciculata* [Le Trant y col., 1983].

Las **SODs** trabajan de manera coordinada con el resto de sistemas, constituyendo un complejo entramado en el cual el producto de la acción de un enzima es el substrato del siguiente, originando toda una serie de reacciones destinadas a eliminar del ambiente el exceso de **EAO** y consecuentemente, evitar un daño celular irreversible (**Fig. 10**). Gracias a su acción conjunta, el aumento puntual de alguna especie tóxica debido a la supresión o disminución de uno de los elementos que lo componen (como consecuencia del mecanismo de acción de alguna droga o del sistema inmune), puede ser subsanado en primera instancia gracias a un sobreesfuerzo del resto de sistemas.

Las diferencias existentes a nivel del catión metálico entre las isoformas protozoarias y de sus hospedadores, junto a sus propiedades inmunogénicas, encumbran a la SOD hasta una privilegiada posición desde cuyo conocimiento se hace factible su empleo como marcador molecular para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y diferenciación de especies, así como potenciales dianas terapéuticas para el diseño de nuevos fármacos antichagásicos susceptibles de aprovechar las diferencias estructurales existentes entre las FeSOD protozoarias y la Cu-ZnSOD de la mayoría de eucariotas [Kabiri y Steverding, 2001]. En esta línea, nuestro grupo ha sugerido con anterioridad el uso de las SODs de distintos parásitos con fines diagnósticos [Villagrán y col., 2005; Marín y col, 2004, 2007 (en prensa)].

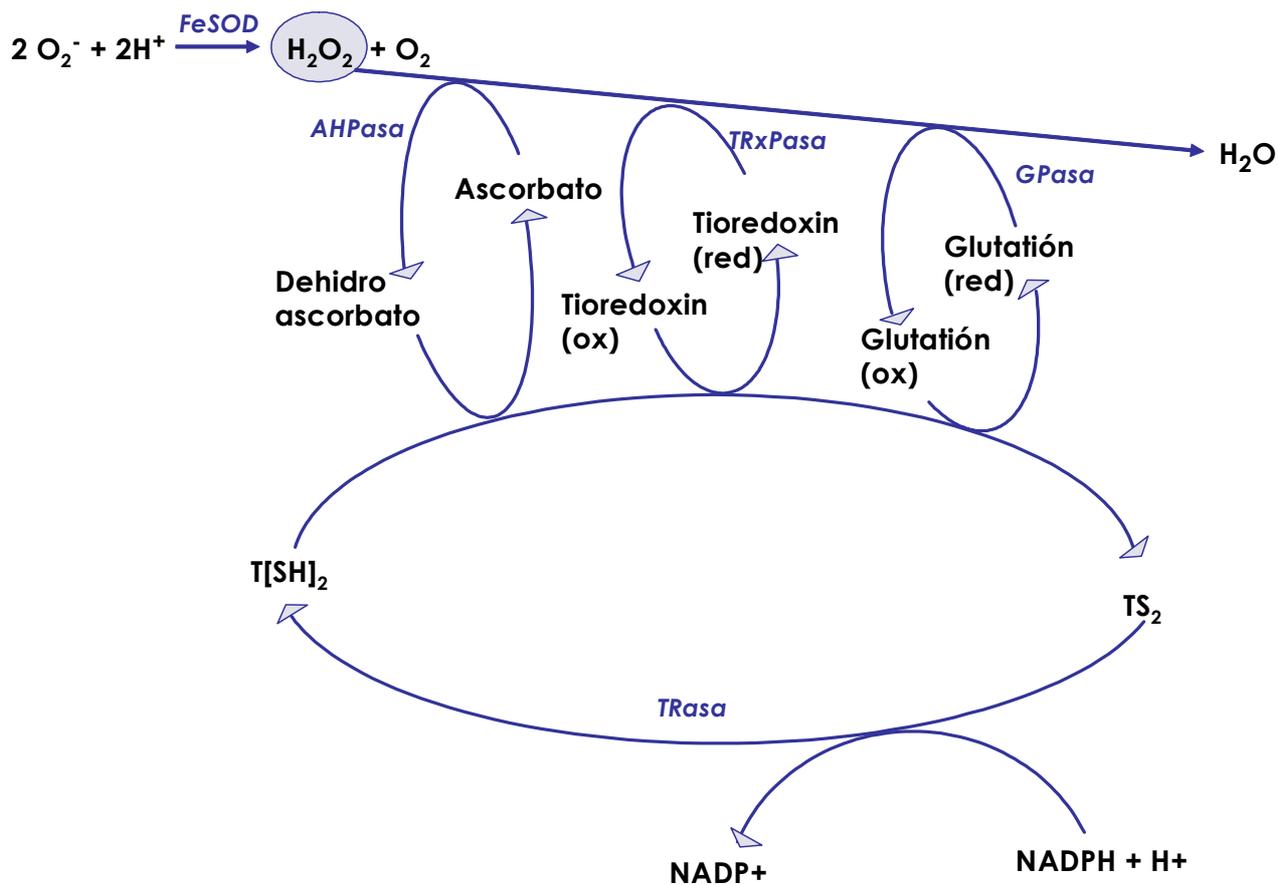


Fig.10: MECANISMOS DEGRADATIVOS DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN *T. cruzi*
(las reacciones no están ajustadas):

FeSOD: Hierro Superóxido Dismutasa

AHPasa: Ascorbato Hemoperoxidasa

TRxPasa: Triparredoxín Peroxidasa

GPasa: Glutati6n Peroxidasa independiente de Se

TRasa: Tripanotión Reductasa

T[SH]₂: Tripanotión (red)

TS₂: Tripanotión (ox)

Además, el estudio exhaustivo de la estructura y propiedades de las FeSOD de los distintos patógenos, su secuenciación, clonación y comparación, puede suponer en el futuro un importante avance en la comprensión de los mecanismos defensivos de los parásitos, además de tener un evidente interés desde el punto de vista identificativo y taxonómico. Siguiendo esta tendencia, han sido clonados genes para superóxido dismutasa en *T. cruzi* [Ismail y col., 1997; Temperton y col., 1997], *T. brucei* [Dufernez y col., 2006] y en varias especies del género *Leishmania* [Paramchuk y col., 1997; Genetu y col., 2006], así como en otros protozoos de importancia sanitaria: *Entamoeba histolytica* [Tannich y col., 1991], *Plasmodium falciparum* [Baert y col., 1999], *Toxoplasma gondii* [Ödberg-Ferragut y col., 2000] o *Trichomonas vaginalis* [Viscogliosi y col., 1998].

III MATERIAL Y MÉTODOS

III. Material y Métodos

III.I Cultivo Celular

Como material biológico para el estudio y caracterización de la(s) SOD(s), se han utilizado formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa Maracay, aislada de un paciente chagásico crónico en el Instituto de Malariología y Salud Ambiental de Maracay (Venezuela) y perpetuada mediante resiembras consecutivas en nuestro laboratorio. Con objetivo de mantener la infectividad del aislado, cada seis meses se inoculó el parásito a hamster dorado de Siria (*Mesocricetus auratus*), recuperando tras un periodo de aproximadamente veinte días nuevas formas tripomastigotes altamente infectivas, que fueron adaptadas a cultivo.

El parásito fue cultivado *in vitro* a 27 °C bajo agitación suave en frascos para cultivo de tejidos Cellstar® (Greiner Bio-One®), empleando para ello Grace's Insect Medium (Gibco®) suplementado con un 10 % V/V de suero bovino fetal (SBF, PAA®), previamente inactivado por calentamiento (56 °C, 30 min) hasta una densidad de crecimiento (estimada mediante recuento en cámara de contaje hemocitométrico de Neubauer®) de aproximadamente 10^7 células/mL.

Para la purificación de la SOD total, los flagelados fueron recogidos por centrifugación (2500 *g*/10 *min*) en la fase exponencial del crecimiento, siguiendo la metodología descrita por [Marín y col., 2004], obteniéndose la fracción **P** (*pellet*).

Para la obtención de la fracción excretada, un sedimento o *pellet* obtenido de forma análoga a como ha descrito, fue resuspendido en medio Grace no suplementado con SBF e incubado bajo las mismas condiciones durante 36 *h*, tiempo transcurrido el cual los tripanosomátidos fueron nuevamente recogidos por centrifugación, decantando y conservando el sobrenadante (**S₁**) para las etapas de purificación descritas a continuación.

III.II Obtención de las SOD

III.II.I Preparación de los Extractos Celulares

Las fracciones resultantes (**P** y **S₁**) fueron procesadas de manera independiente a fin de purificar tanto la actividad SOD total como la SOD excretada (**SOD_e**), respectivamente. El conjunto de operaciones destinadas a la obtención y purificación de las SOD aparece esquematizado en la **figura 11**.

Para la purificación de la actividad SOD total, el *pellet* de flagelados (en torno a 0'5- 0'6 g de peso húmedo) fue sometido a un proceso de lisis o rotura celular. Para ello, una vez eliminados los restos del medio de cultivo mediante dos lavados con tampón fosfato (PBS, pH 7), se resuspendió dicho sedimento en 3 mL de tampón de lisis STE –**Tampón 1-** (250 mM sacarosa, 25 mM Tris-HCl pH 7'4 y 1 mM EDTA) y se sonicó en frío en tres ciclos de 60 V durante 30 s (con intervalos de 1 min entre ciclos). El sonicado se centrifugó (2500 g/10 min/ 4 °C) para descartar los restos de membranas, obteniendo un nuevo sobrenadante al que llamamos **Homogenado (H)**.

Paralelamente, el sobrenadante inicial (**S₁**), que contiene los productos de excreción celular, fue filtrado con objeto de retener los restos que hayan escapado a la centrifugación, utilizando un microfiltro de tamaño de poro 0'2 μm (Minisart®, Sartorius®) (**Fracción F**).

III.II.II Obtención de las SODs

Ambas fracciones, **H** y **F**, fueron sometidas separadamente a dos procesos de adición y centrifugación sucesivos (9000 g/ 25 min/ 4 °C) con sulfato amónico, para hacer precipitar las proteínas existentes en el rango de concentración salina comprendida entre el 35 y el 85 %, obteniendo de este modo dos precipitados a los que denominamos, respectivamente, fracciones **P85** y **P85e**. Cada precipitado fue resuspendido, también por separado, en 2'5 mL de tampón fosfato potásico 20 mM pH 7'4, 1 mM EDTA (**Tampón 2**) y dializado a través de columna de Sephadex G-25 (PD column, Pharmacia®) previamente equilibrada con la misma solución tampón hasta un volumen final de 3'5 mL. Por último, fueron añadidos 25 µL de antiproteasa (Protease Inhibitor Complete Mini, Roche®) para minimizar la acción degradativa de las proteasas presentes en el medio.

III.III Purificación Cromatográfica de las SODs

Las fracciones **P85** y **P85e** fueron purificadas independientemente a través de dos procesos continuos de cromatografía en columna: en primer lugar intercambio iónico y posteriormente filtración. Las muestras, concentradas por centrifugación (11200 g/ 20 min) hasta un volumen de 2 mL, fueron aplicadas separadamente a una columna de QAE-Sephadex A-50 (Sigma®, 30 x 2Φ cm) previamente equilibrada con **tampón 2**. La elución de las proteínas adsorbidas en la matriz se realizó mediante la aplicación de un gradiente lineal de KCl (0-0'6 M), en fracciones de 2'5 mL. De éstas, las que exhibieron actividad SOD (picos **Q1**, **Q2** y **Q3** para fracción **P85** y pico **Q1e** para la **P85e**, respectivamente) fueron reunidas y concentradas por ultrafiltración en tubos Microcon® (Amicon®) a 11200 g durante 20 min hasta un volumen de 2 mL.

Cada uno de los picos fue sometido ahora a una nueva separación cromatográfica, en este caso de filtración en columna de Sephadex G-75 (Sigma®, 75 x 1.6Φ cm), previamente equilibrada con el **tampón 2**. Las proteínas fueron eluidas con 200 mL del mismo tampón, siendo las fracciones (4 mL/ fracción) con la actividad SOD específica más alta (**SOD I**, **SOD II**, **SOD III** y **SOD IV** para la purificación de la fracción **P85** y **SODe** para la purificación de la fracción **P85e**) nuevamente reunidas, concentradas (hasta una concentración de aproximadamente

2 mg/ mL) y empleadas para los experimentos descritos a continuación. Para verificar la ausencia de lisis celular en el medio donde se obtuvo la **SODe** se ensayaron enzimas marcadores: piruvato kinasa, hexokinasa y alanin aminotransferasa, según la metodología descrita por [Uttaro y Opperdoes, 1997].

Epimastigotes *T. cruzi* Maracay

Cultivo 4 días/ 27 °C medio Grace + 10 % SBFi

10^7 cél./ mL

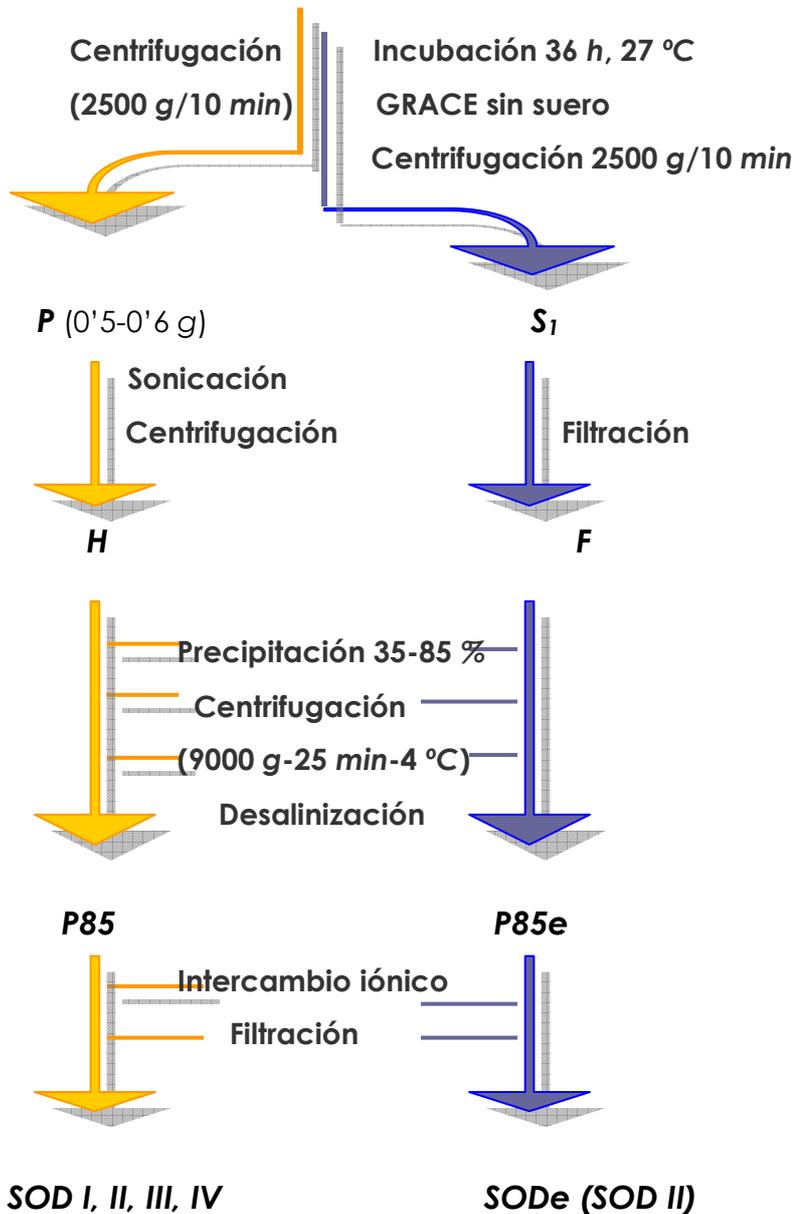


Fig. 11: DETALLE DE LAS DISTINTAS ETAPAS DE LA OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ACTIVIDADES **SOD** TOTAL Y EXCRETADA DE *T. cruzi*:

- Extracto total epimastigotes (Pellet)
- Excretada (Sobrenadante)

III.IV Ensayos Bioquímicos: Caracterización SOD

III.IV.I. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

a. Electroforesis Nativa

Cualquier molécula cargada sometida a la influencia de un campo electromagnético es capaz de desplazarse, siendo la velocidad de migración proporcional a la intensidad del campo aplicado y a características de la propia proteína y de la matriz a través de la cual se desplazan.

La electroforesis nativa es una técnica bioquímica que permite la separación de las proteínas existentes en una muestra biológica compleja en función de su peso molecular, carga neta y forma. Así, embebidas en una matriz de poliacrilamida y mientras se aplique de manera constante una corriente, las proteínas son capaces de desplazarse según su peso molecular sin ser desnaturalizadas. Precisamente, la no desnaturalización constituye una de las principales ventajas de la electroforesis nativa, puesto que la estructura y conformación de las proteínas permanecen inalteradas. De este modo, empleando patrones de peso molecular conocido, es posible determinar la masa molecular de una proteína dada.

Para la realización de estos ensayos se emplearon geles de poliacrilamida (archilamida- bisacrilamida) al 12'5 % preparados en laboratorio, de acuerdo al protocolo descrito en el manual del Mini Protean 3® (Bio-Rad®). Los patrones de peso molecular utilizados fueron: fosforilasa B (94 kDa), albúmina de suero bovino (67), ovoalbúmina (43), anhidrasa carbónica (30), inhibidor de tripsina de semilla de soja (20'1) y α -lactalbúmina (14'4) (LMW Calibration Kit, Pharmacia®).

b. Isoelectroenfoque (IEF)

El punto isoeléctrico (pI) de una proteína (o más genéricamente, de cualquier molécula anfótera) se define como el pH al cual tiene carga neta cero; en estas condiciones, además, su solubilidad es prácticamente nula. El isoelectroenfoque (IEF) es un tipo de electroforesis de alta resolución empleada comúnmente en laboratorio para la separación de las proteínas existentes en una muestra compleja en función de su punto isoeléctrico. Así, en el seno de una matriz de poliacrilamida y aplicada una corriente constante, las proteínas presentes en una muestra biológica se desplazan de manera también constante en un gradiente de pH hasta alcanzar su pI.

Para la realización de estos ensayos, se emplearon geles *pre-cast* (PhastGel® 3-9), optimizados para muestras proteicas cuyo pI estimado esté comprendido en el rango de pH especificado (en este caso 3-9) y manipulados de acuerdo al protocolo descrito en el manual del Phast-System® (Amersham Pharmacia Biotech®). Los marcadores proteicos utilizados fueron: tripsinógeno (9'3), banda acídica lentil-lectin (8'15), mioglobina de corazón de caballo (6'8), anhidrasa carbónica II (5'9), α -lactoglobulina (5'1), inhibidor de tripsina de semilla de soja (4'6) y amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (3'6) (Calibration Kit for IEF 3-10, Pharmacia®).

III.IV.II Revelado y Conservación de Geles

A la hora de abordar la caracterización bioquímica de una muestra proteica, resulta imprescindible establecer dos parámetros claves como son el peso molecular y el punto isoeléctrico. Para ello, una vez separadas electroforéticamente las proteínas contenidas en una mezcla compleja (tanto en nativa como en IEF), éstas deben ser visualizadas. En el caso que nos ocupa empleamos dos tipos de revelado: uno general (para la coloración de la totalidad de proteínas presentes en la muestra) y otro específico (para poner de manifiesto únicamente las bandas debidas a la presencia de SOD). Una vez reveladas la banda o bandas de interés, el gel fue sumergido en una solución de acético 10 % y glicerol 5 % para su conservación.

a. Tinción de Proteínas

La visualización de la totalidad de las proteínas contenidas en una muestra resuelta mediante electroforesis se realizó mediante tinción de nitrato de plata, siguiendo el procedimiento descrito en el manual del PhastSystem®, según el cual las bandas proteicas adquieren una coloración marrón intensa en un fondo amarillento.

b. Revelado de Actividad SOD en Geles

El revelado de la actividad SOD en geles se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por [Beyer y Fridovich, 1987], basado en la oxidación colorimétrica de azul de nitrotetrazolio (NBT) en presencia de luz UV, y en la que las bandas de actividad (que indican la no oxidación del NBT como consecuencia de la presencia de SOD) aparecen como zonas acromáticas en un fondo azul-violáceo uniforme.

Para ello, los geles fueron sumergidos en la solución de revelado fresca (conteniendo 27 mL Tampón Fosfato Potásico 50 mM pH 7'8 –**Tampón 3**-, 1 mL NBT 1'41 mg/ mL, 1'5 mL L-Metionina 30 mg/ mL y 0'75 mL Tritón X-100 1 % V/V), a la cual se le añaden *in situ* 0'4 mL de una solución de Riboflavina (0'044 mg/ mL). Posteriormente, la mezcla es incubada en presencia de luz UV a temperatura ambiente bajo agitación suave

hasta que el gel adquiriera la tonalidad deseada y el contraste entre las bandas y el resto del gel se haga patente.

III.IV.III Cuantificación

a. Cuantificación de la Cantidad de Proteínas

La determinación de la concentración de proteínas existentes en una muestra constituye una etapa imprescindible para garantizar el éxito de los ensayos posteriores. En el presente estudio se empleó el método Bradford [Bradford, 1976] de Bio-Rad®, que utiliza albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Dicho método se basa en la medición espectrofotométrica de los valores de densidad óptica (en el rango entre 470 y 595 nm) debidos a la formación de un complejo coloreado entre residuos aromáticos y restos de arginina de las proteínas y el Coomassie Brilliant Blue G, componente principal del reactivo, siendo la intensidad de la coloración proporcional a la cantidad de proteínas presentes. Se trata de una técnica muy común en la práctica de laboratorio, pues combina una alta sensibilidad y especificidad con una compatibilidad con un amplio abanico de compuestos y moléculas.

b. Cuantificación de la Actividad Enzimática

La actividad SOD total de las muestras se determinó según la técnica descrita por Beyer y Fridovich [Beyer y Fridovich, 1987], que posibilita la detección de cantidades muy pequeñas de actividad SOD en solución acuosa (de hasta 2 ng). El método se basa en la medición de las variaciones de absorbancia que se producen en la muestra en un intervalo de tiempo definido (10 min) como consecuencia de la oxidación del NBT por la luz UV. Según lo dicho, en presencia de SOD, la coloración de la muestra y por ende, la diferencia entre los valores inicial y final, es menor que la de los controles incluidos en cada lote. Para minimizar las oscilaciones propias del método y las debidas a la manipulación de las muestras, fueron efectuadas al menos tres réplicas de cada muestra. Se trata de una técnica utilizada rutinariamente en nuestro laboratorio, que permite determinar de manera fiable y rápida la actividad SOD sin recurrir a complicadas cinéticas enzimáticas.

En cada fracción testada, la obtención de los valores de absorbancia inicial y final fue aplicada a las siguientes ecuaciones a fin de calcular la actividad específica final:

Diferencia entre absorbancia inicial: $A_0 - A_{10} = A_F$

Cálculo absorbancia relativa: $A_F / A_C = A_R$, siendo A_C la media de los controles

Cálculo porcentaje de absorbancia relativa: $(1 - A_C) \cdot 100 = A_R \%$

Actividad: $\frac{A_R \% \cdot 10^3}{36'4 \cdot VF} = A \text{ (U/ mL)}$, donde VF es el volumen de muestra

Actividad total: $A \text{ (U/ mL)} \cdot V_T = A_T \text{ (U}_T\text{)}$

Actividad específica: $A_e \text{ (U/ mg)} = A_T / P$, siendo P las proteínas totales de cada fracción.

III.IV.IV Determinación del pI y PM

Como ya hemos mencionado en los apartados III.IV.I y III.IV.II ("Electroforesis en geles de Poliacrilamida" y "Revelado y Conservación de Geles"), el pI y el PM aparente de las SODs fueron determinados mediante aplicación de las SOD a electroforesis en IEF y electroforesis nativa seguidas de tinción de plata (para proteínas totales) y tinción de Beyer & Fridovich (para revelado de la actividad SOD).

III.IV.V Estudios de Inhibición

Las SODs, tal y como aparece descrito en el capítulo **II.III.IV** (“Defensas Antioxidantes en Protozoos”) son enzimas diméricas o tetraméricas en cuya estructura aparecen incluidos uno o varios cationes metálicos. A pesar de que actualmente se acepta la existencia de una nueva isoforma de SOD ligada a un átomo de níquel [Youn y col., 1996], a efectos prácticos, se sigue manteniendo la clasificación tradicional que subdivide las SOD en tres subgrupos: las Cu-ZnSODs, las MnSODs y las FeSODs [Docampo, 1995]. La determinación del tipo de cofactor metálico se realizó teniendo en cuenta las diferencias de sensibilidad existentes entre los citados isotipos cuando son expuestos a inhibidores específicos, como son el cianuro sódico y el peróxido de hidrógeno [Bannister y col., 1987]. Así, como se detalló el punto **II.III.IV**, se ha demostrado que las isoformas ligadas a Fe son inhibidas por el H_2O_2 , pero no por el CN^- , mientras que aquellas que fijan átomos de Cu-Zn o Mn en su sitio activo son inhibidas por ambos compuestos.

Para ello, las fracciones **P85** (que contiene la totalidad del paquete SOD del parásito) y **P85e** (que contiene la fracción excretada), fueron aplicadas a un gel de IEF 3-9; una vez separadas electroforéticamente, las distintas isoenzimas fueron puestas en contacto con los inhibidores. En el primer caso y previo al revelado de la actividad según lo descrito en el apartado **III.IV.II** (“Revelado y conservación de geles”), el gel fue

incubado durante 15 *min* en una solución que contenía 5 *mM* H₂O₂, 1 *mM* EDTA bajo agitación suave a 37 °C seguido del revelado SOD, mientras que en el caso de la inhibición con cianuro, se añadió directamente a la solución reveladora 20 *mM* de CNNa. En ambos casos y como método de control de calidad de los ensayos, se incluyeron paralelamente controles conteniendo las fracciones **P85** y **P85e** intactas.

III.IV.VI Localización Subcelular

Para determinar la localización subcelular de las distintas isoenzimas contenidas en el extracto total de epimastigotes de *T. cruzi*, el sedimento o pellet (fracción **P**) obtenido según lo descrito en el capítulo III.II ("Obtención y Purificación de la SOD"), fue sometido a un proceso de lisis y homogeneización con polvo de sílice extrafino (Carborundum®) de acuerdo al método descrito por [Steiger y col., 1980]. El sobrenadante fue sometido a un proceso seriado en frío consistente en una sucesión de centrifugaciones diferenciales controladas, basadas en los contrastes de densidad entre los distintos componentes celulares (**Fig. 12**), recuperándose así las siguientes fracciones: nuclear (**N**), postnuclear (**PN**), orgánulos grandes (**L**), orgánulos pequeños (**S**), fracción microsomal (**M**) y citosólica (**C**) [Quesada y col., 2001].

A la totalidad de las fracciones recuperadas les fue determinada la concentración de proteínas totales y la actividad SOD según lo descrito en el apartado **III.IV.III** (“Cuantificación”). El **porcentaje de recuperación** (basado en la suma de las fracciones) y la **actividad específica relativa (RSA)** fueron calculados y representados según lo descrito por [Marín y col., 2004]. Además, de acuerdo con el protocolo detallado por [Uttaro y Opperdoes, 1997], fue cuantificada la presencia de enzimas marcadores específicos de cada orgánulo o fracción (piruvato kinasa, hexokinasa y alanin aminotransferasa para las localizaciones citosólica, glicosomal y mitocondrial, respectivamente).

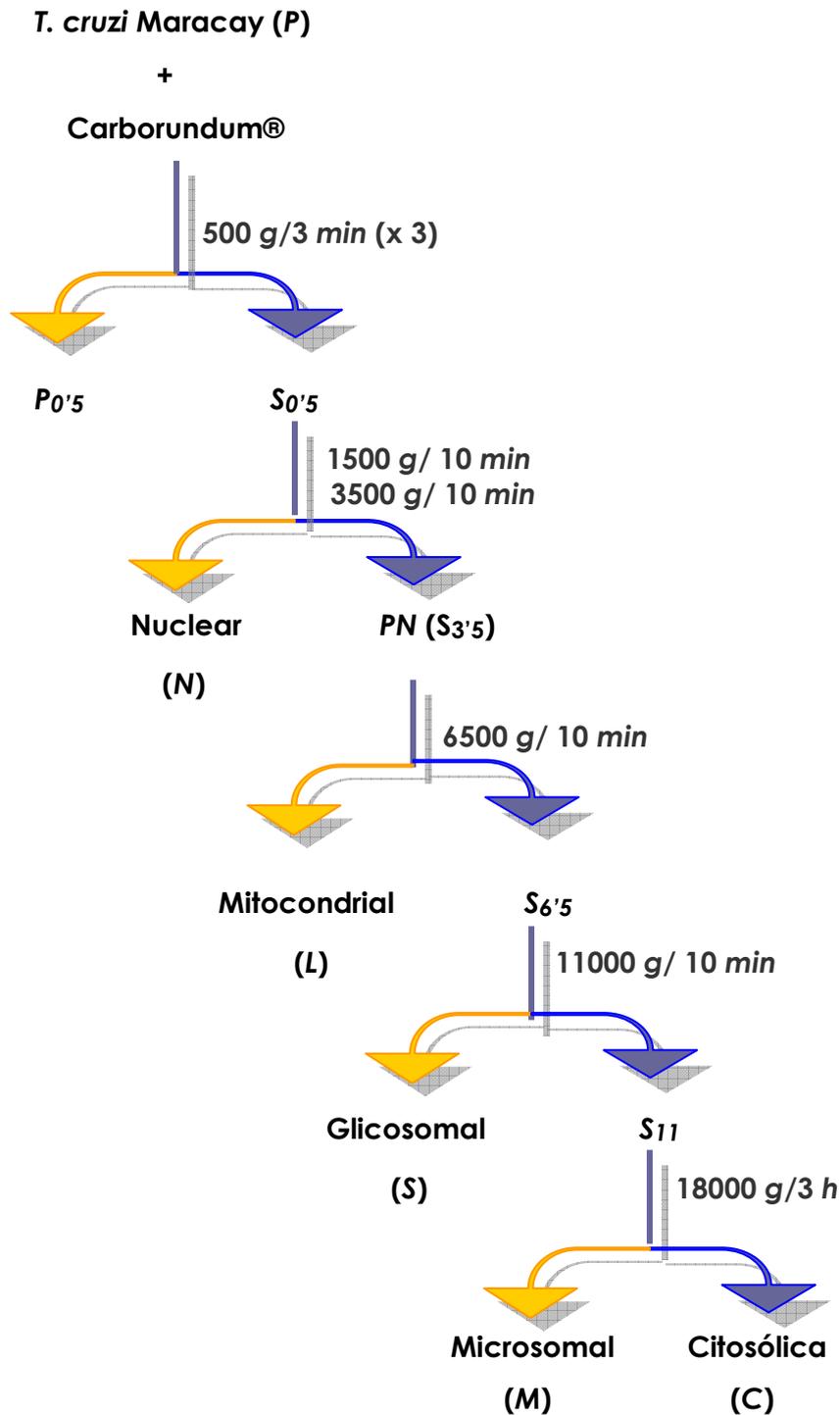


Fig. 12: ESQUEMA DEL FRACCIONAMIENTO POR CENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL DEL EXTRACTO TOTAL DE EPIMASTIGOTES DE *T. cruzi* SEGÚN [Steiger y col., 1980; Quesada y col., 2001].

Fracciones: Nuclear (**N**), postnuclear (**PN**), orgánulos grandes (**L**), orgánulos pequeños (**S**), microsomal (**M**) y citosólica (**C**)

III.IV.VII Tratamiento con Digitonina de Células Intactas

La fracción **H** fue diluida con el **tampón 1** hasta una densidad correspondiente a una concentración de proteínas de aproximadamente 2 mg/ mL , a la cual se le adicionó una cantidad creciente de digitonina (0 a 0.3 mg/ mg de proteína). Tras incubar la muestra durante 5 min a 4 °C , las suspensiones fueron centrifugadas y los sobrenadantes alicuotados para ensayar la actividad SOD y las diferentes actividades enzimáticas (piruvato kinasa, hexokinasa y alanin-aminotransferasa, indicativas, en su caso, de las localizaciones citosólica, glicosomal y mitocondrial) [Uttaro y Opperdoes, 1997].

III.V Inmunogenicidad de la SOD

III.V.I Ensayos Inmunológicos en Ratones

a. Obtención de Anticuerpos Policlonales

La obtención de anticuerpos policlonales específicos frente a las cuatro SODs de *T. cruzi* se llevó a cabo siguiendo el protocolo de inmunización que a continuación se describe [Current Protocols, 1995]. Para ello, por separado, las fracciones antigénicas se obtuvieron tras la homogeneización con adyuvante de Freund de las bandas de poliacrilamida correspondientes a las distintas isoformas de SOD (**SOD I**, **III**, **IV** y **SODe**). Cada una de las fracciones antigénicas purificadas a ensayar fue aplicada, por separado a todos los carriles de un gel y sometida a una separación electroforética por IEF. Tras el corrido, el primer carril de cada gel fue cortado y teñido según la técnica de Beyer y Fridovich para visualizar la banda de actividad. Hecho esto, se alineó el carril teñido, recortando del resto de líneas la zona del gel correspondiente a las bandas de interés (aquellas correspondientes a los pI 6'9 (**SODI**), 3'9 (**SODe**), 8'2 (**SOD III**) y 8'4 (**SOD IV**), respectivamente. Cada línea de bandas fue homogeneizada con adyuvante de Freund (completo para la primera inoculación e incompleto para las sucesivas) hasta que se formó una pasta de textura densa y aspecto blanquecino. A continuación, se procedió a la inoculación intraperitoneal (la primera semana) o subcutánea (las sucesivas) de tres ratones hembra *Balb C* de un mes de edad por cada

enzima a ensayar. Se incluyeron dos ratones control: uno no inmunizado frente a antígeno alguno y otro frente a sólo poliacrilamida. Dicho proceso se repitió hasta cuatro veces a intervalos de diez días. Transcurridos dos semanas desde la última inmunización de recuerdo, los animales fueron sacrificados por punción cardíaca. La sangre así obtenida fue centrifugada (4000 *g*/ 10 *min*), desechando el cuágulo y siendo los sobrenadantes (sueros) del grupo de ratones inmunizados frente a cada antígeno mezclados, aliquotados y conservados a -80 °C para su utilización en los ensayos que se detallarán posteriormente.

b. Titulación de Sueros

La titulación de los sueros de ratón obtenidos de la manera anteriormente descrita fue llevada a cabo mediante las técnicas de ELISA y Western-Blot, enfrentando los sueros de ratón y las distintas isoformas purificadas.

b. 1 ELISA

La ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) [Voller y col., 1976] es un método de diagnóstico que permite poner de manifiesto la presencia de anticuerpos en muestras biológicas. Es una técnica muy sensible y de uso muy extendido, que permite analizar en un solo ensayo multitud de antígenos y/o anticuerpos a concentraciones diferentes.

En nuestro estudio utilizamos el ELISA indirecto, para el cual nos servimos de placas de poliestireno de 96 pocillos y fondo plano (Nunc®). Las placas fueron sensibilizadas con 100 μL de las fracciones antigénicas diluidas en tampón carbonato-bicarbonato 0'1 M pH 9'6 (**Tampón 4**). Se ensayaron cantidades de **Ag** de 0'05, 0'1, 0'25, 0'5 y 1 μg total por pocillo, incubando durante toda la noche en oscuridad y bajo atmósfera húmeda a temperatura ambiente. A continuación, se eliminaron los restos de **Ag** no fijados al pocillo mediante tres lavados consecutivos con 250 μL de tampón de lavado (**Tampón 5**: Tween 20® 0'05 % en PBS). Los sitios de adsorción libres (en los que no se ha unido el **Ag**) se bloquearon (**Tampón 6**: Tween 20®, 0'05 % BSA en PBS) mediante incubación durante 2 h a temperatura ambiente y agitación para impedir que se produzcan uniones no específicas entre la placa y el suero. Tras lavar como anteriormente, la placa se incubó durante 45 min en presencia de 100 μL de suero murino, obtenido como se describió previamente, a la dilución deseada (1:50, 1:100, 1:200 y 1:500 en PBS).

En dicho suero, de existir respuesta inmunológica frente a algunas de las isoenzimas, existirán anticuerpos (**Ac**), que habrán de unirse específicamente al **Ag** formando el complejo **Ag-Ac**. Ahora, después de un nuevo lavado, se volvió a incubar (30 min, 37 °C) con 100 μ L del inmunoconjugado (Anti IgG Peroxidasa murina, Sigma®) a dilución 1:2000, que se une a los posibles complejos existentes. Lavamos nuevamente y añadimos 100 μ L por pocillo del sustrato del inmunoconjugado, orto-fenilendiamina dihidroclorhídrica (OPD, Sigma®) en 25 mL de una mezcla a partes iguales de tampón citrato-fosfato (**Tampón 7**) y agua destilada. Incubamos 20 min en oscuridad, tras lo cual se puede apreciar en el fondo del pocillo, si la reacción es positiva, una coloración amarillenta que denota la presencia de todo el complejo (**Ag-Ac-AntiIgG peroxidasa**). La reacción se detuvo mediante adición de 50 μ L por pocillo de una solución de ClH 3 N y se procedió a tomar las lecturas de absorbancia a 492 nm en el lector de ELISA Metertech Σ 960.

b. 2 Western-Blot

También llamado **Inmunoblot** [Burnette, 1981; McLellan, 2004], es una potente herramienta molecular utilizada en inmunodiagnóstico, dada su versatilidad a la hora de detectar de manera específica una respuesta inmunitaria frente a una proteína en concreto.

Para la titulación de sueros por Western-Blot, la fracción antigénica (en este caso únicamente la fracción **S1e**) fue concentrada (hasta una concentración de 2 mg/ mL) y aplicada a un IEF 3-9 como aparece descrito en el apartado **III.IV.I** (“Electroforesis en geles de Poliacrilamida”). A continuación, las diferentes proteínas contenidas en el gel fueron sometidas a un proceso de transferencia a una membrana de nitrocelulosa, para lo cual fue sumergido en tampón de transferencia (**Tampón 8**: Base Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20 %, pH 8'3) durante 10 min. Lo mismo se hizo con la membrana de nitrocelulosa a la que se transferirán las muestras (Hybond-C Extra, Pharmacia®) y con dos papeles de filtro, que aseguran un exceso de medio acuoso durante el proceso. Antes de realizar la transferencia, con sumo cuidado, fue separado el gel de la membrana de plástico que le sirve de soporte por la cara inferior, para lo cual fue empleado el accesorio de cortado con hilo de diamante que se suministra con el Phast System®. A continuación se procedió a la transferencia (immunoblot), disponiendo el gel, las membranas y los papeles en “sándwich”, asegurando un contacto íntimo entre el gel y la membrana, en el dispositivo de transferencia PhastTransfer®, según las indicaciones que aparecen en el manual de instrucciones: la membrana queda sobre el ánodo protegida por cuatro papeles absorbentes, encima de ésta, el gel y por último, otros cuatro papeles absorbentes que contactan con el cátodo. Terminado el proceso de electrotransferencia

(aproximadamente unos 30 *min*), se pudo comprobar el éxito del mismo mediante tinción con rojo Ponceau, que permite visualizar las proteínas en la superficie de la membrana. Los restos de colorante fueron eliminados mediante lavados repetidos con agua. La siguiente etapa consiste en el bloqueo de los sitios de adsorción libres mediante incubación en tampón Tween 20® 0'2 % y gelatina 0'4 % en PBS (**Tampón 9**). La membrana se dejó bloqueando durante 2 *h* a temperatura ambiente. Lavamos tres veces (**Tampón 10**: Tween 20® 0'1 % en PBS) para eliminar los restos de tampón de bloqueo y se incubó la membrana con los sueros en PBS a las diluciones deseadas (1:50, 1:100, 1:200 y 1:500) durante otras 2 *h*. Transcurrido este tiempo y después de lavar como se describió anteriormente, las membranas fueron nuevamente incubadas durante 2 *h*, esta vez con el inmunoc conjugado (Anti-IgG de ratón marcada con peroxidasa) a dilución 1:1000. Lavamos e incubamos con el sustrato de la peroxidasa 0'5 *mg/ mL* de DAB (3,3' diaminobenzidina) en tampón Tris-ClH 0'1 M pH 7'4 y 1:5000 H₂O₂ durante 15 *min*, tras lo cual se detuvo la reacción por adición de agua destilada en exceso.

III.V.II Ensayos Inmunológicos en Humanos

a. Sueros de Pacientes Chagásicos

A continuación, la validez como posible marcador molecular (y en consecuencia sus posibles aplicaciones diagnósticas) fueron estudiadas para las fracciones antigénicas que manifestaron poseer alguna capacidad inmunogénica en los experimentos con ratones. Merced a dichos resultados, sólo la fracción excretada (**SODe**) fue empleada como antígeno en los análisis serológicos realizados mediante la técnica de ELISA. Para ello fueron enfrentadas las fracciones **Homogenado** (como fracción antigénica de referencia) y **SODe** parcialmente purificada (el pico **Q1e** concentrado y desalinizado) a una batería de doscientos veintidós sueros aislados de supuestos pacientes chagásicos crónicos de diferentes procedencias. Para facilitar su estudio y comparación, los sueros fueron clasificados en cinco grupos según su origen y fecha de obtención, según aparece en la tabla adjunta. Además, doce sueros aislados en España procedentes de individuos sanos y que nunca tuvieron contacto con la enfermedad, fueron utilizados como controles negativos. Por último, a fin de garantizar la ausencia de fenómenos de reactividad cruzada (especialmente importante en el caso de parásitos del género *Leishmania* sp.), fueron también incluidos los sueros de diez pacientes diagnosticados con leishmaniasis por el Instituto Nacional de la Salud de Lima (Perú).

Grupo	Nº Sueros	Lote	Nº Sueros	Fecha	Procedencia
MÉXICO	56	Me1	24	Agosto/ 2005	Querétaro
		Me2	32	Agosto/2004	Querétaro
PERÚ	10	Pe1	10	Julio/ 2005	Lima
CHILE	60	Ch1	25	Septiembre/ 2003	Santiago
		Ch2	35	Agosto/ 2004	Santiago
COLOMBIA	86	Co1	54	Agosto/ 2006	Medellín
		Co2	32	Agosto/ 2006	Bogotá
BRASIL	10	Br1	10	Agosto/1984	Sao Paulo

Tabla 3: PROCEDENCIA DE LOS SUEROS AISLADOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS PARA LOS ENSAYOS INMUNOLÓGICOS (IFI Y ELISA) CON FORMAS EPIMASTIGOTES Y LAS FRACCIONES **H** Y **SODe** DE *T. cruzi*

Los sueros de los lotes **Co2** (Bogotá) pertenecen a pacientes con afecciones cardiacas a los que les ha sido colocado un marcapasos. Por su parte, los sueros procedentes de Chile (lotes **Ch1** y **Ch2**) corresponden a enfermos sintomáticos crónicos con diez años de tratamiento. Por último, los sueros incluidos en el lote **Br1** (Brasil) son sueros de pacientes chagásicos aislados en el año 1984.

b. Ensayos con Formas Epimastigotes: IFI

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es una técnica inmunológica empleada para la detección de anticuerpos en suero y otros fluidos biológicos, gracias a la utilización de un compuesto marcado con una sustancia fluorescente [Camargo y col., 1983; O'Connor y col., 2006]. Para su realización, formas epimastigotes de *T. cruzi* fueron fijadas en un porta para IFI. A continuación, las placas fueron incubadas en presencia de los sueros a la dilución deseada (1:40 a 1:200). Seguidamente, las placas fueron incubadas en las mismas condiciones con suero humano marcado con fluoresceína, para, finalmente, tras cubrir la placa con un cubreobjetos impregnado en glicerina tamponada, proceder a la observación de la muestra mediante microscopía de fluorescencia.

c. Ensayos con Fracción Homogenado: ELISA

La positividad de los sueros humanos frente a la fracción **H** de *T. cruzi* fue asimismo analizada mediante la técnica de ELISA del modo descrito anteriormente. La cantidad de antígeno total por pocillo fue de 2 μ g, mientras que la dilución de los sueros utilizada fue de 1:200. Además, el inmunoconjugado empleado en estos ensayos y para los realizados con la fracción excretada fue Anti-IgG peroxidasa humana (Sigma®) a dilución 1:2000.

d. Ensayos con Fracción Excretada (P85e): ELISA

El estudio de la presencia en los sueros de anticuerpos específicos frente a la fracción excretada de *T. cruzi* (**SODe**) fue asimismo llevado a cabo por ELISA, de manera análoga a como se ha descrito previamente. La cantidad de antígeno fue en este caso de 1 μ g.

IV Resultados

IV.I Purificación y Caracterización de la Actividad SOD Total:

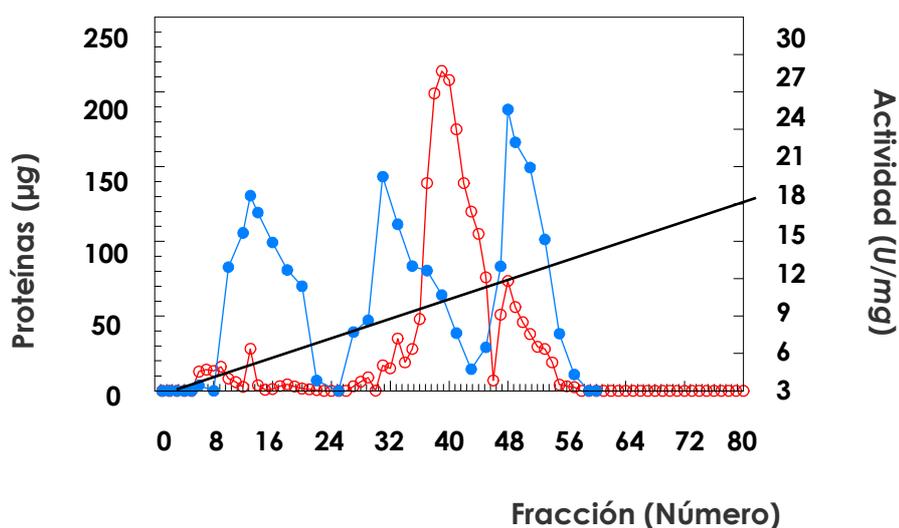
Fracción H

IV.I.I Obtención y Purificación de las SOD

El lisado de epimastigotes de *T. cruzi* (Fracción **H**) fue procesado hasta la fracción **P85** como se ha descrito y, posteriormente, aplicado a una columna de cromatografía de intercambio iónico (QAE-Sephadex A-50), revelando espectrofotométricamente la existencia de tres picos de actividad SOD (**Gráfica 1**): el pico **Q1** (localizado entre las fracciones 9-20), el pico **Q2** (entre las fracciones 26-40) y el pico **Q3** (fracciones 44-55). El isoelectroenfoque 3-9 de las fracciones eluidas por cromatografía en QAE-Sephadex A-50 permitió visualizar las bandas (**Fig. 13**).

Los tres picos activos (**Q1**, **Q2** y **Q3**) fueron reunidos, desalinizados y concentrados, siendo aplicados separadamente a una cromatografía de filtración (Sephadex G-75). La purificación del pico **Q1** originó un nuevo pico denominado **S1 (SOD I)**, localizado entre las fracciones 11 y 14 (**Gráf. 2A**). La purificación del pico **Q2** originó un nuevo pico llamado **S2 (SOD II)**, entre las fracciones 25 y 35 (**Gráf. 2B**), mientras que la purificación del pico **Q3** dio lugar a dos nuevos picos denominados **S3 (SOD III)** (fracciones 10-15) y **S4 (SOD IV)** (fracciones 43-46) (**Gráf. 2C**).

En la **Tabla 4** aparece resumido el proceso de purificación, indicando que la **SOD I** fue purificada 336 veces hasta una actividad específica de aproximadamente 7381 U/ mg de proteína; por su parte, la **SOD II** fue purificada 489 veces hasta una actividad específica total del orden de 10752 U/ mg de proteína. Finalmente, las **SOD III** y **IV** fueron purificadas hasta una actividad específica total de 13956 y 9446 U/ mg de proteína, con tasas de purificación de 635 y 424, respectivamente.



Gráf.1: PERFIL DE LA PURIFICACIÓN DE LAS SODs DE *Trypanosoma cruzi* POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

- Proteínas totales (—○—○—)
- Actividad SOD (—●—●—)
- Gradiente 0-0.6M KCl (—)

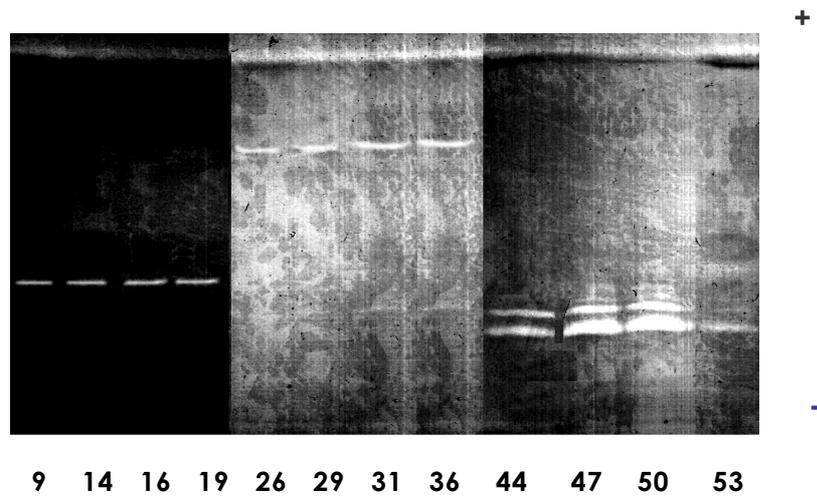
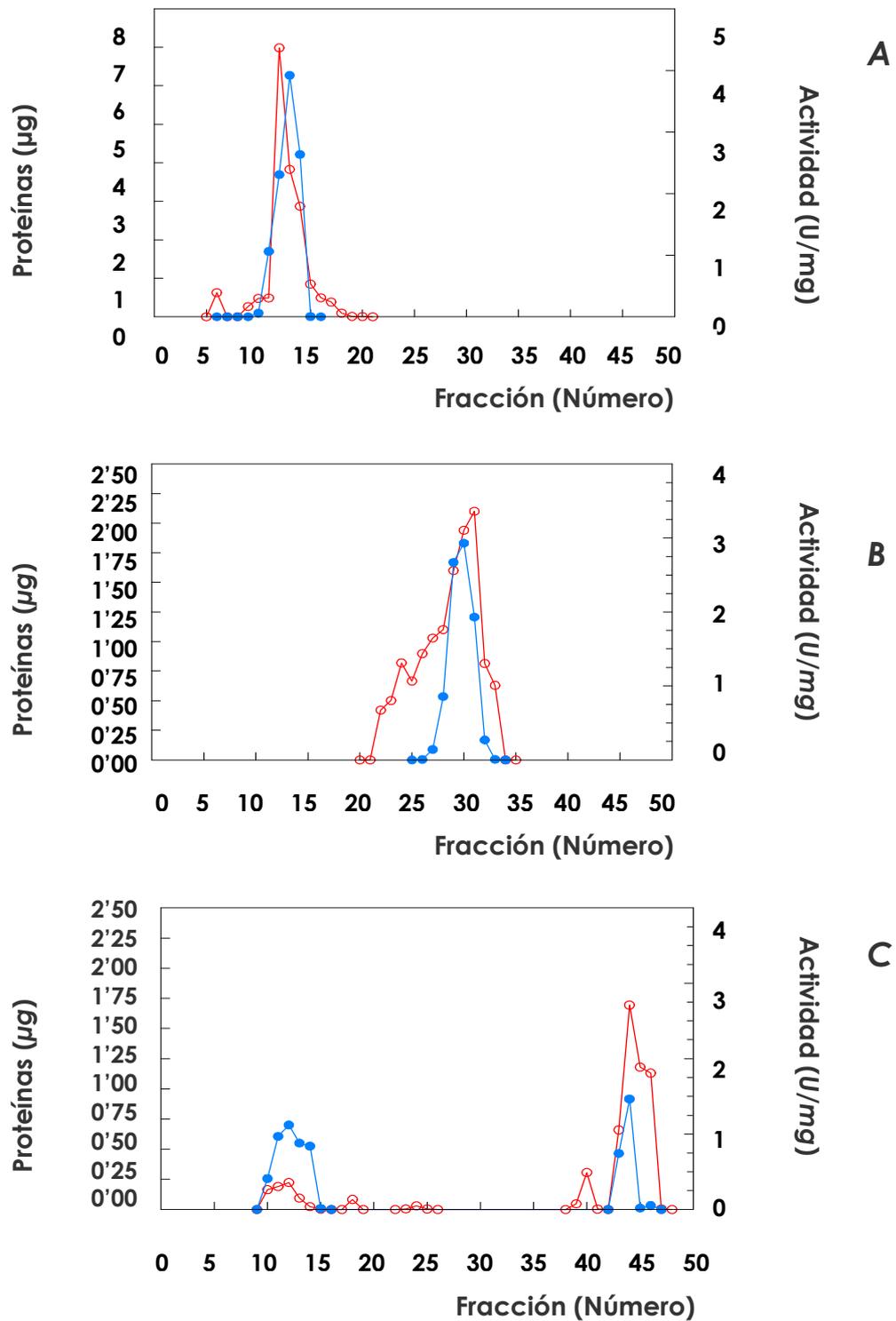


Fig.13: REVELADO SEGÚN LA TÉCNICA DE BEYER Y FRIDOVICH (1987) DE LA ACTIVIDAD SOD EN LOS PICOS CORRESPONDIENTES A LAS FRACCIONES ELUIDAS DE LA COLUMNA DE QAE-SEPHADEX A-50 TRAS SU RESOLUCIÓN EN UN IEF 3-9:

Pico **Q1**: Fracciones 9- 20

Pico **Q2**: Fracciones 26- 40

Pico **Q3**: Fracciones 44- 55



Gráf.2: PERFIL DE LA PURIFICACIÓN DE LOS PICOS **Q1**, **Q2** Y **Q3** POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN SEPHADEX G-75:

A: Purificación **Q1**: Pico **S1 (SOD I)** entre las fracciones 11- 14

B: Purificación **Q2**: Pico **S2 (SOD II)** entre las fracciones 25- 35

C: Purificación **Q3**: Picos **S3 (SOD III)** y **S4 (SOD IV)** entre las fracciones 10- 15 y 43- 46, respectivamente

Proteínas totales (—○—○—○—); Actividad SOD (—●—●—●—)

FRACCIÓN	PROTEÍNAS TOTALES (mg)	ACTIVIDAD TOTAL (Unid ± SD)*	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg prot ± SD)	PURIFICACIÓN
Homogenado	43'1711	661'40 ± 42'33	22'27 ± 1'72	1
P85	3'8321	469'80 ± 18'23	122'63 ± 4'76	6
Pico Q1	0'1273	296'51 ± 6'42	2329'69 ± 25'31	104
Pico Q2	0'9221	217'63 ± 13'08	1236'01 ± 14'18	55
Pico Q3	0'5200	206'63 ± 14'52	397'36 ± 50'06	18
SOD I	0'0161	118'98 ± 1'72	7380'89 ± 106'17	336
SOD II	0'0101	108'71 ± 1'00	10751'72 ± 98'91	489
SOD III	0'0007	9'63 ± 0'67	956'52 ± 971'01	635
SOD IV	0'0013	12'28 ± 0'09	9446'15 ± 7'075	424

Tabla 4: RESUMEN DE LA PURIFICACIÓN DE LAS SOD DE *Trypanosoma cruzi*.

La actividad SOD fue determinada de acuerdo con la técnica de Beyer y Fridovich (1987)

“SD” es la desviación estándar de la media de cinco determinaciones

IV.I.II Caracterización Bioquímica de las SOD

a. Determinación del Peso Molecular (PM) y el Punto Isoeléctrico (pI)

La determinación del peso molecular (PM) se realizó mediante una electroforesis Nativa, para lo cual se utilizó el accesorio Mini-Protean 3®, como se describe en el apartado III.IV.I. (“Electroforesis en Geles de Poliacrilamida”), empleando marcadores proteicos de PM conocido.

Las bandas fueron visualizadas por tinción de Beyer y Fridovich (para actividad SOD) y por tinción con nitrato de plata (para proteínas totales), tras la aplicación y resolución en gel de los picos resultantes de la cromatografía de intercambio iónico (**Q1**, **Q2** y **Q3**), permitiendo concluir los pesos moleculares aproximados de las isoenzimas (**Fig. 14A** y **B**), que fueron: 50 *KDa* (**SOD I**), 28 *KDa* (**SOD II**), 60 *KDa* (**SOD III**) y 20 *KDa* (**SOD IV**).

Por su parte, la determinación del punto isoeléctrico (pI) se llevó a cabo mediante la aplicación de las enzimas purificadas a una electroforesis en isoelectroenfoque 3-9, utilizando para ello el Phast System®, seguido del revelado de la actividad de acuerdo con la técnica de Beyer y Fridovich, tal y como se describió anteriormente. El uso de marcadores proteicos de pI conocido permitió identificar y caracterizar los pIs de las distintas isoenzimas. Las cuatro SODs poseían puntos isoeléctricos diferentes (**Fig.14C**): **SOD I** (6'9), **SOD II** (3'9), mientras que las **SOD III** y **IV** mostraron un pI de 8'2 y 8'4, respectivamente.

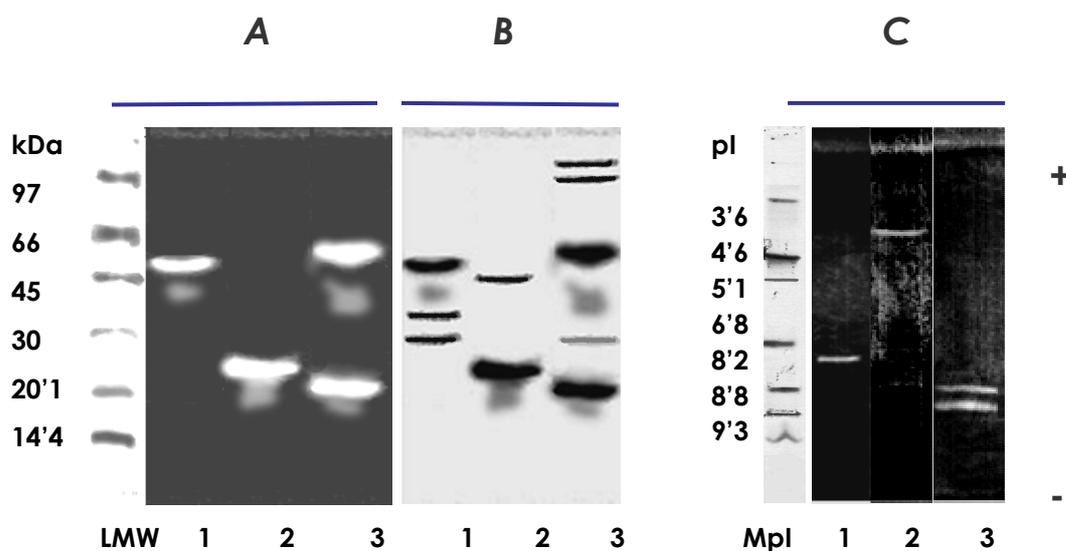


Fig.14: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS SOD DE *T. cruzi*.

A: Determinación del PM en Nativa + revelado SOD

B: Determinación del PM en Nativa + revelado por nitrato de plata

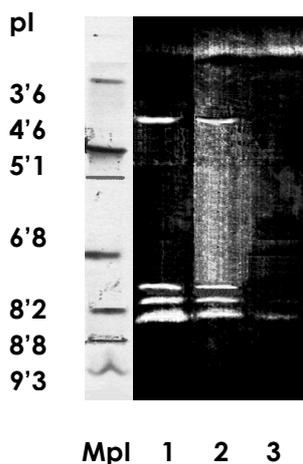
C: Determinación del pI (IEF + revalado SOD)

LMW y **Mpl:** Marcadores de peso molecular y punto isoeléctrico, respectivamente.

Picos: **Q1** (Línea 1), **Q2** (Línea 2) y **Q3** (Línea 3)

b. Estudios de Inhibición

Para la determinación del átomo metálico unido a las SODs, se realizaron estudios con inhibidores específicos sobre los diferentes cofactores. Como muestra la **figura 15**, todas las SODs evidenciaron ser inhibidas parcial o totalmente por peróxido de hidrógeno y no por cianuro sódico, siendo este comportamiento característico de las isoformas ligadas a hierro (FeSODs).



+ **Fig. 15:** ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LAS SODs DE *T. cruzi* POR IEF 3-9 DE LOS PICOS OBTENIDOS TRAS LA CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO E INCUBACIÓN CON INHIBIDORES ESPECÍFICOS Y REVELADO DE ACTIVIDAD.

Línea 1: Fracción **P85**; Línea 2: Fracción **P85** con 20mM NaCN; Línea 3: Fracción **P85** con 5mM H₂O₂;

Mpl: Marcador de pI (Tinción de nitrato de plata).

c. Localización Subcelular de las SODs y Tratamiento con Digitonina

Para la determinación de la localización subcelular de las SOD de *T. cruzi*, el pellet (**P**) de células fue sometido a un proceso de centrifugación diferencial tal y como se detalló en el apartado **III.IV.VI** (“Localización Subcelular”) de Material y Métodos. A cada una de las fracciones recuperadas: **H** (Homogenado), **N** (Nuclear), **L** (Orgánulos de alto PM), **S** (Orgánulos de bajo PM), **M** (Microsomal) y **C** (Citosólica), les fueron cuantificadas espectrofotométricamente la cantidad total de proteínas (método Bradford) y la actividad SOD en disolución (Método de Beyer y Fridovich), a fin de calcular la Actividad Específica Relativa (**RSA**) y los porcentajes de recuperación, cuyos resultados aparecen reflejados en la **figura 16A**. De estos ensayos se puede concluir que todas las isoformas de SOD estaban presentes principalmente en la fracción citosólica, mientras que, además, las isoenzimas **SOD III** y **IV** se

encontraban también localizadas en la fracción glicosomal y la **SOD I**, en cantidades mucho menores, en la fracción mitocondrial, con un porcentaje total de recuperación del 91'8 %. Esta peculiar distribución fue asimismo demostrada mediante la aplicación de las fracciones obtenidas (2 mg/ mL) a un IEF 3-9, seguida de su revelado según la técnica de Beyer y Fridovich (**Fig. 16B**).

Estas observaciones fueron corroboradas mediante el tratamiento de las células intactas con digitonina; los enzimas piruvato kinasa, hexokinasa y alanin aminotransferasa fueron empleados como marcadores específicos para las localizaciones citosólica, glicosomal y mitocondrial, respectivamente. En la **gráfica 3** aparecen representados los resultados de dichos experimentos. Cabe destacar que aproximadamente el 24 % de la actividad SOD total no fue solubilizada aun a concentraciones de digitonina muy altas (por encima de 0'3 mg/ mg de proteína).

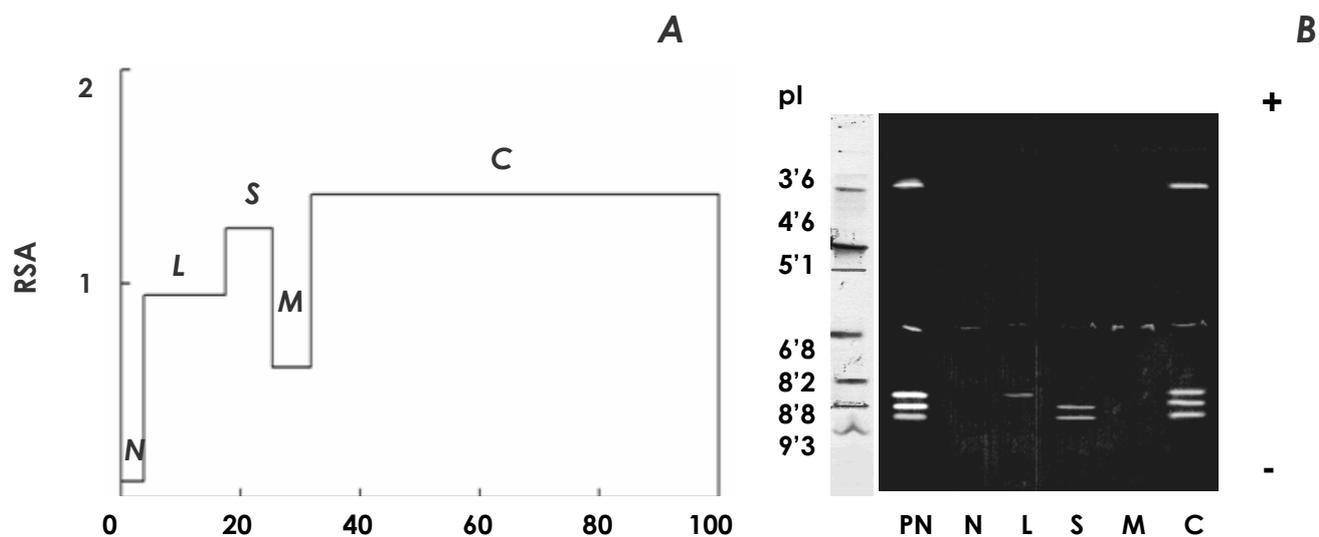
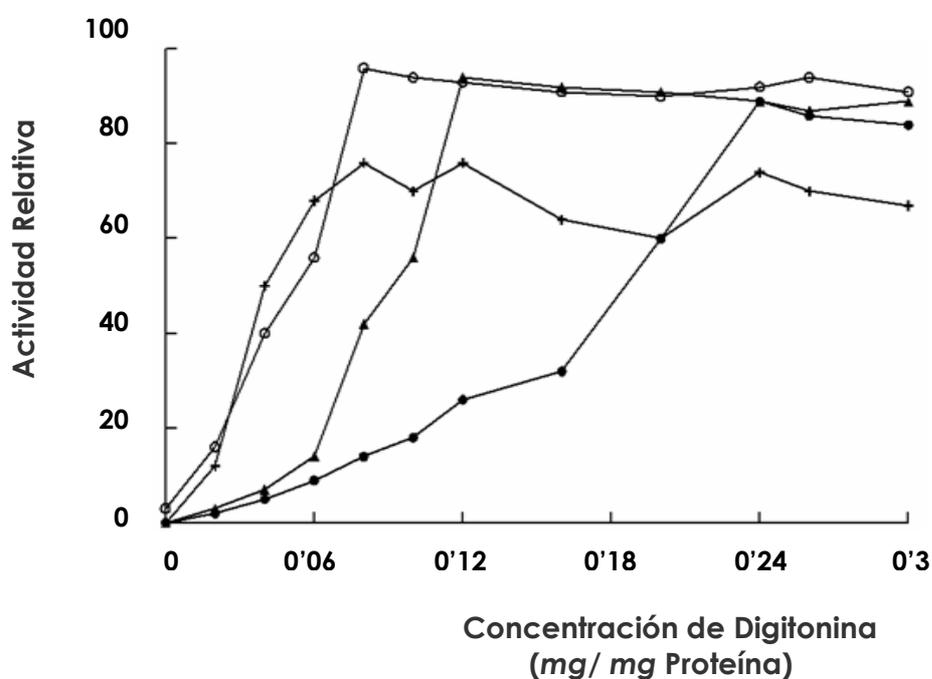


Fig. 16: EXPERIMENTOS DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS SODs DE *T. cruzi*:
A: Distribución de la actividad SOD por fracciones: **RSA** (% Actividad de la fracción/ % Actividad Total) frente al % de proteínas totales.
B: Demostración por IEF 3-9 de la distribución de las fracciones recuperadas por centrifugación diferencial teñidas según la técnica de Beyer y Fridovich: **PN** (Postnuclear), **N** (nuclear), **L** (mitocondrial), **S** (glicosomal), **M** (microsomal), **C** (citoplasmática).



Gráf. 3: TRATAMIENTO CON DIGITONINA SOBRE CÉLULAS INTACTAS:
 Actividad SOD (-+-+); piruvato kinasa (-o-o-), hexokinasa (-▲-▲-) y alanina aminotransferasa (-●-●-)

IV.II Purificación y Caracterización de la Actividad SODe

IV.II.I Obtención y Purificación de la SODe

La fracción **P85e** recuperada del medio de interacción como resultado del proceso de excreción como se describió en el apartado **III.II** "Obtención de la SOD" fue desalinizada y concentrada hasta un volumen final de 2 mL.

A continuación y tal como aparece detallado en el capítulo **III.III** "Purificación Cromatográfica de las SODs", fue purificada a través de dos fraccionamientos cromatográficos consecutivos. La fracción **P85e** fue de este modo aplicada a una columna de intercambio iónico QAE-Sephadex A50, cuantificando para cada fracción eluida la concentración de proteínas (método Bradford) y la actividad SOD (método de Beyer y Fridovich), obteniendo un único pico de actividad, **Q1e**, localizado entre las fracciones 31 y 49 (**Gráf. 4A**). Las fracciones fueron aplicadas a un IEF 3-9 y reveladas según la técnica de revelado SOD para visualizar las bandas (**Fig. 17**).

Las fracciones que constituyen el pico fueron reunidas, concentradas (hasta un volumen final de 2 mL) y aplicadas a una columna de Sephadex G-75, originando un nuevo pico de actividad, llamado **S1e** (**SODe**) entre las fracciones 9 y 23 (**Gráf. 4B**), que fue nuevamente reunido y concentrado para su empleo en los ensayos posteriores.

La **tabla 5** resume los resultados del proceso de purificación, mostrando que la **SODe** fue purificada 1372 veces hasta una actividad específica de 1304 *Unidades/ mg* de proteína.

FRACCIÓN	PROTEÍNAS TOTALES (mg)	ACTIVIDAD TOTAL (Unid ± SD)*	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/ mg prot ± SD)	PURIFICACIÓN (%)
P85e	18'42	17'108 ± 0'68	0'95 ± 0'0452	6
Pico Q1e	1'971	63'64 ± 2'27	63'69 ± 0'37	67
Pico S1e	0'153	37'16 ± 1'548	1304'09 ± 44'96	1372

Tabla 5: RESUMEN DE LA PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN SOD EXCRETADA DE *Trypanosoma cruzi*.

La actividad SOD fue determinada de acuerdo con la técnica de Beyer y Fridovich (1987)

"SD" es la desviación estándar de la media de cinco determinaciones

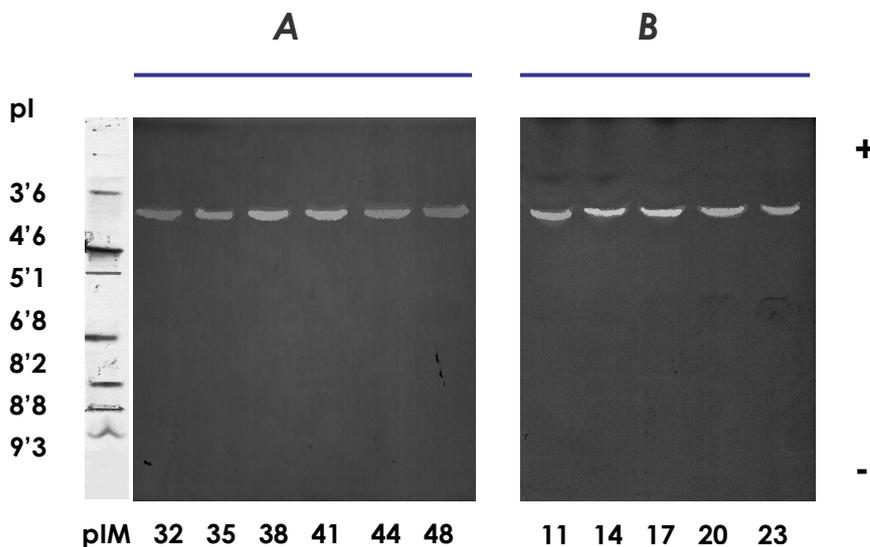
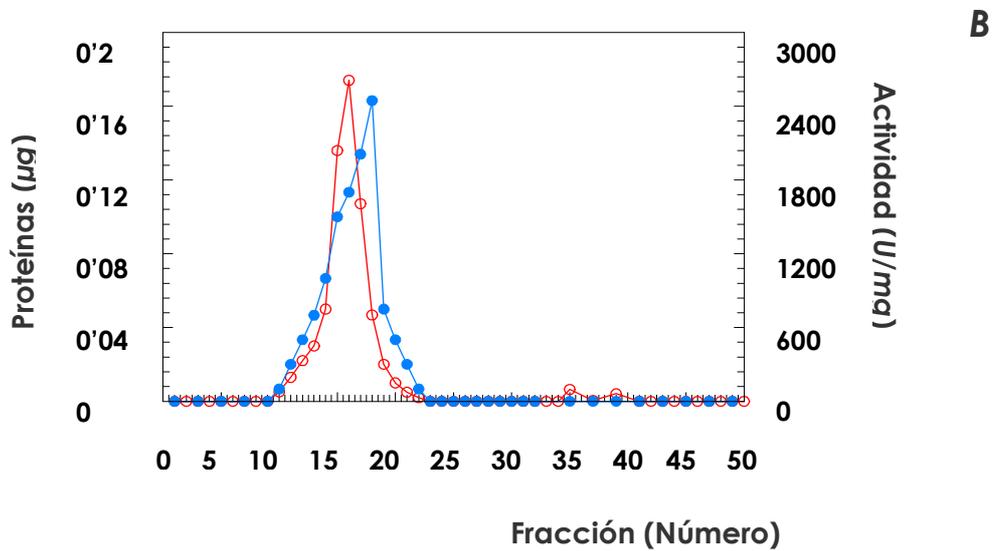
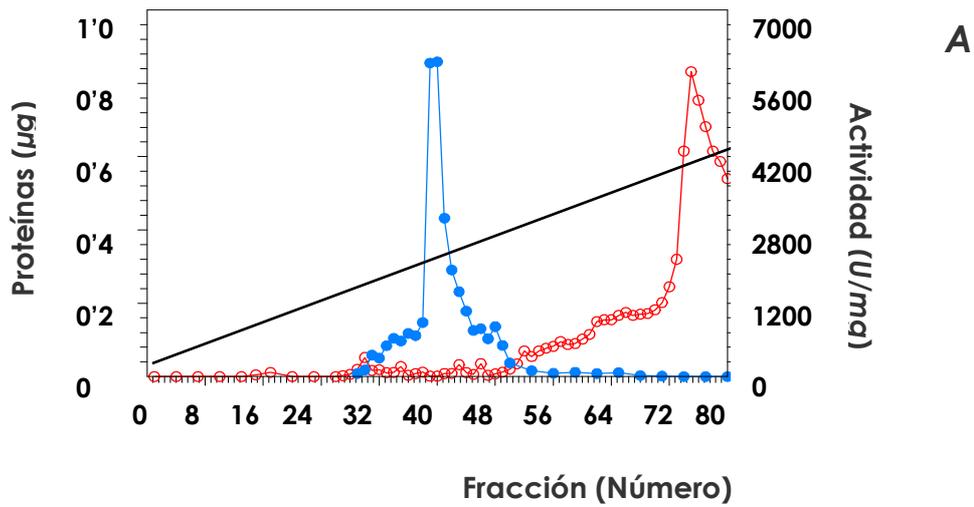


Fig. 17: IEF 3-9 SEGUIDO DE TINCIÓN DE BEYER Y FRIDOVICH DE LAS FRACCIONES ELUIDAS:

A: Fracciones 31- 49 (Pico **Q1e**), eluidas de la columna QAE-Sephadex A-50

B: Fracciones 9- 23 (Pico **S1e**), eluidas de la columna de Sephadex G-75



Gráf.4: PERFIL DE LA PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN SOD EXCRETADA DE *Trypanosoma cruzi*:

A: Cromatografía de intercambio iónico

B: Cromatografía de filtración

Proteínas totales (—○—○—);

Actividad SOD (—●—●—);

Gradiente 0-0'6M KCl (—)

IV.II.II Caracterización Bioquímica de la SODe

a. Determinación del Peso Molecular y el Punto Isoeléctrico

La fracción **P85e** fue aplicada a una electroforesis nativa en gel de poliacrilamida al 12'5 %, empleando marcadores proteicos de PM conocido. La banda correspondiente a la **SODe** fue visualizada por tinción de Beyer y Fridovich, mientras que las proteínas patrón fueron teñidas con nitrato de plata, estableciendo para ella un PM aparente de unos 28 *KDa* (**Fig. 18A**).

Por su parte, la determinación del punto isoelectrico (pI) se llevó a cabo mediante la aplicación de la **P85e** a un isoelectroenfoco 3-9 seguido del revelado con tinción de nitrato de plata para la visualización de las proteínas totales (Línea 1) y de la actividad SOD según la técnica de Beyer y Fridovich (Línea 2), usando marcadores proteicos de pI conocido, que fueron revelados mediante tinción con nitrato de plata. La **SODe** poseía un pI aproximado de 3'9 (**Fig. 18B**). De la comparación de ambos métodos de revelado se deduce que la banda perteneciente a la **SODe** coincide con la banda de proteínas mayoritaria.

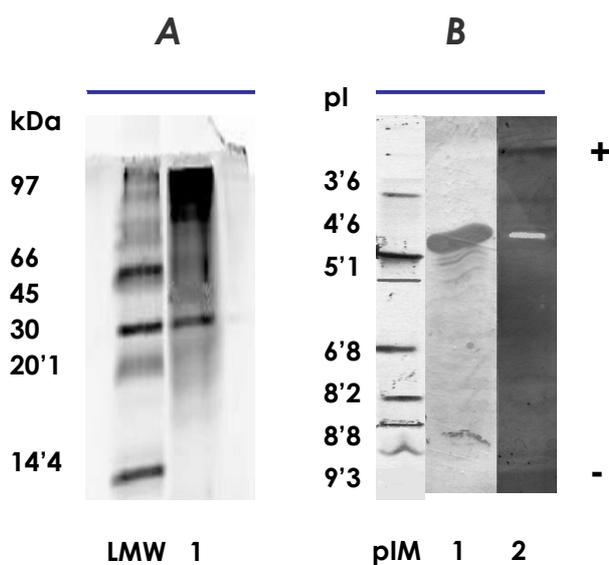


Fig. 18: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA **SODe** DE *T. cruzi*.

A: Determinación del PM en Nativa + revelado con NO_3Ag

B: Determinación del pI en IEF 3-9:

Revelado con NO_3Ag (1);

Revelado SOD (2)

LMW y **Mpl**: Marcadores de PM y pI, respectivamente

b. Estudios de Inhibición y Localización Subcelular

La determinación del cofactor metálico de la **SODe** se llevó a cabo incubando la fracción **P85e** con inhibidores específicos para los distintos cofactores. La banda perteneciente a la **SODe** fue inhibida totalmente por peróxido de hidrógeno y no por cianuro sódico, evidenciando que se trata de una isoforma ligada a hierro (**Fig. 18**).

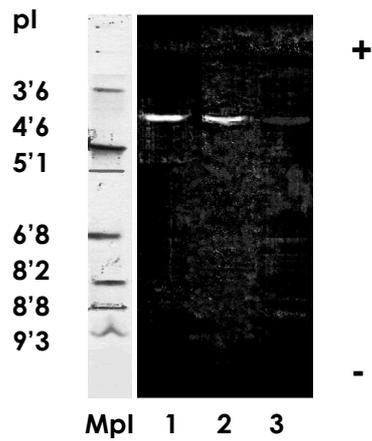


Fig. 18: ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LAS **SODe** DE *T. cruzi* POR IEF 3-9 DE LA FRACCIÓN **P85e** E INCUBACIÓN CON INHIBIDORES ESPECÍFICOS.

Línea 1: Fracción **P85e**

Línea 2: Fracción **P85e** con 20 mM KCN

Línea 3: Fracción **P85e** con 5 mM H₂O₂

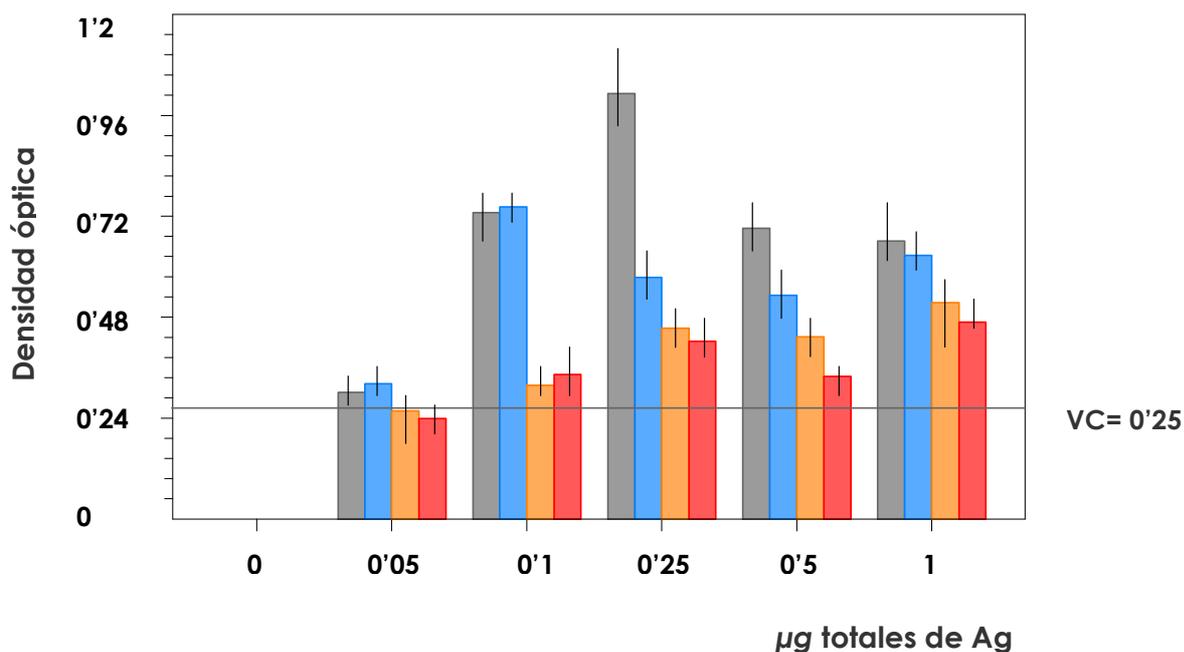
Mpl: Marcador de pI (Tinción de nitrato de plata).

IV.III Inmunogenicidad de la SOD

IV.III.I Ensayos con Sueros de Animales: Titulación de Sueros de Ratón

a. ELISA

En la **Gráfica 5** se ha representado la distribución de los valores obtenidos al enfrentar, en abcisas, la fracción **SODe** purificada (a las cantidades preestablecidas de 0'05, 0'1, 0'25, 0'5 y 1 μg por pocillo) frente a los sueros policlonales de ratón anteriormente obtenidos, a las diluciones 1:50, 1:100, 1:200 y 1:500. Es de destacar que la reacción más significativa (aquella que muestra un mayor número de positivos en referencia a la menor cantidad de antígeno y la mayor dilución del anticuerpo), fue la que enfrentó la cantidad de 1 μg de antígeno y empleó los sueros a la dilución de 1:200. Los ensayos en los que se emplearon las demás isoformas de SOD como fracción antigénica no condujeron a resultados satisfactorios al no originar respuesta inmunológica alguna, por lo que no aparecen representados.



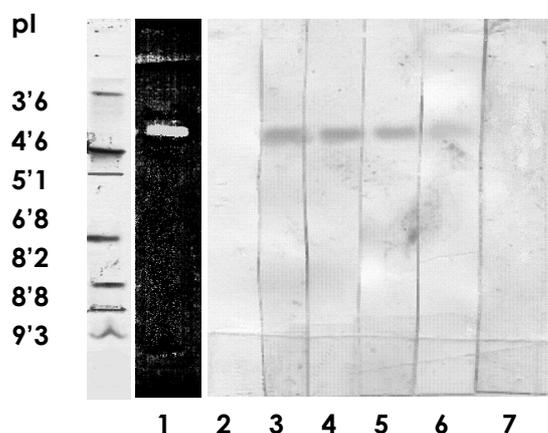
Gráf. 5: VALORACIÓN DEL SUERO ANTI-**SODe** MURINO FRENTE A LA FRACCIÓN **SODe** DE *T. cruzi* MEDIANTE ENSAYO DE ELISA A LAS SIGUIENTES DILUCIONES:

■ 1:50 ■ 1:100 ■ 1:200 ■ 1:500

b. Western-Blot

La especificidad de la respuesta inmunitaria frente a la fracción excretada de *T. cruzi* fue asimismo comprobada mediante la realización de un inmunoblot, en el que fueron enfrentadas, como fracción antigénica purificada la **S1e** (concentración de proteínas de $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) y como fracción sérica los sueros de ratón obtenidos de la manera descrita (diluciones 1:100, 1:500, 1:1000 y 1:5000). Los resultados del ensayo aparecen reflejados en la **figura 19**, donde se puede observar claramente la presencia de una banda de reacción correspondiente a la **SODe** de *T. cruzi*, que indica la existencia de una respuesta inmune altamente específica frente a dicha proteína. La dilución más alta a la

que la reacción fue positiva correspondió a la banda de dilución 1:5000. Del mismo modo, se puede observar la ausencia de reacción cruzada con el suero de ratón inoculado con la **SODe** de *Leishmania infantum*.



+ Fig. 19: IEF 3-9 + INMUNOBLOT DE LA FRACCIÓN **S1e** FRENTE A DIFERENTES DILUCIONES DE SUEROS MURINOS.

1: IEF 3-9 de la fracción **SODe**

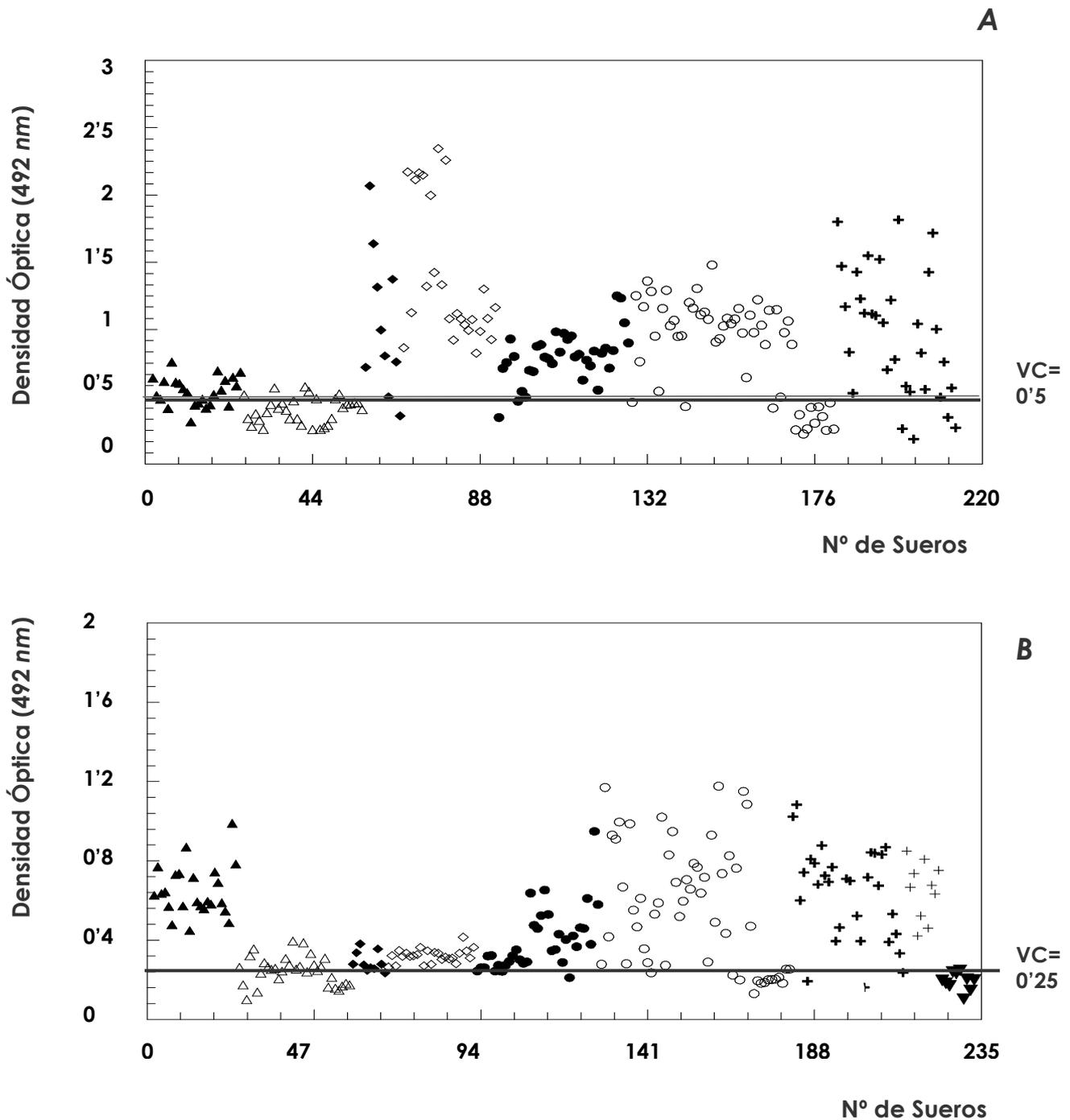
2: Suero control

- **3, 4, 5 y 6:** Sueros Anti-**SODe** de *T. cruzi* a diluciones: 1:100, 1:500, 1:1000 y 1:5000

7: Suero Anti-**SODe** de *Leishmania infantum*

IV.III.II Ensayos con Sueros Humanos

Los cinco grupos de sueros procedentes de supuestos pacientes chagásicos fueron analizados por las técnicas de IFI con el parásito entero y ELISA empleando como fracciones antigénicas el extracto total de epimastigotes (Fracción **H**) y la fracción **SODe** semipurificada (**Q1e**) en las cantidades antes especificadas, tal y como figura en los protocolos descritos para ambas técnicas en los apartados **III.V.I** y **II** ("Ensayos Inmunológicos en Ratones" y "Ensayos Inmunológicos en Humanos"). Los resultados del análisis serológico aparecen reflejados en las gráficas siguientes (**Gráf. 6 A y B**).



Gráf. 6: DISTRIBUCIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LOS SUEROS HUMANOS POR ELISA.

A: ELISA Fracción **H** frente a sueros 1:200 (Valor de Corte = 0'5)

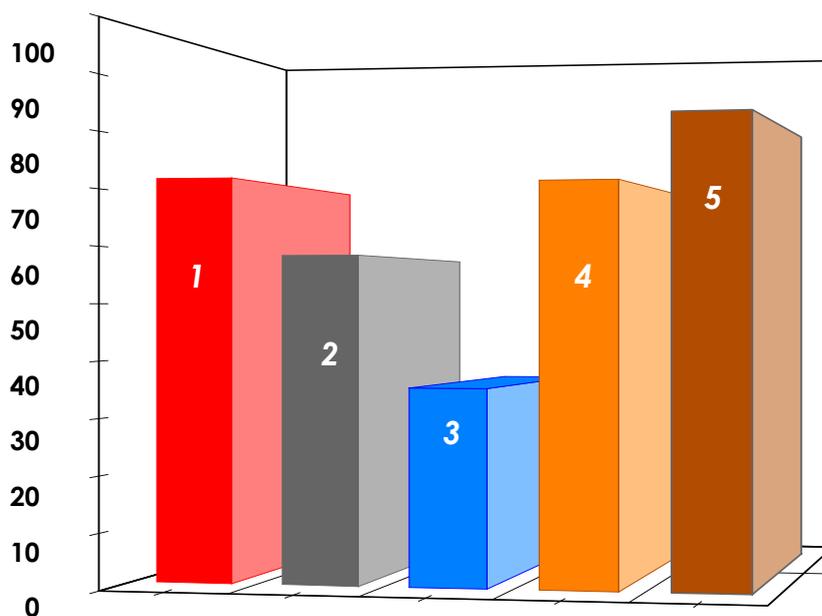
B: ELISA Fracción **SODe** frente a sueros 1:200 (VC = 0'25)

Lotes: ▲ México 1; △ México 2; ◆ Perú; ◇ Chile 1; ● Chile 2; ○ Colombia 1;

+ Colombia 2; + Brasil; ▼ *Leishmania* sp (sólo en **B**)

Por su parte, el estudio de seroprevalencia comparativo entre las diferentes técnicas y para las diferentes fracciones antigénicas utilizadas queda reflejado en la **Gráfica 7**, obteniendo una positividad del 83'2 % para la **SODe**, mientras que en el caso de la fracción **H** fue del 71'6 %. Los resultados cuando se empleó la IFI como técnica de inmunodiagnóstico fueron del 71'4, 58'7 y 35'6 %, para diluciones del suero 1:40, 1:100 y 1:200, respectivamente.

Por su parte, es de reseñar que para el lote caracterizado como **Co2** (Bogotá), que incluía sueros de pacientes chagásicos crónicos a los que les había sido colocado un marcapasos, la positividad con la técnica de ELISA-**SODe** fue del 94 % (frente al 92 % de la ELISA-**H** y al 43'4 % de la IFI a 1:200) mientras que para el lote **Br1** (São Paulo), compuesto por sueros cuya toma se efectuó en 1984, se obtuvo una positividad del 100 % (frente al 80 % de la ELISA-**H** y al 31 % de la IFI a 1:200). Por último, los dos lotes de sueros procedentes de Chile (**Ch1** y **2**), correspondientes a pacientes chagásicos crónicos a los que se les ha suministrado tratamiento con NFX durante diez años, obtuvieron una positividad del 98'33 % con ELISA-**SODe** (frente al 96'66 % de la ELISA-**H** y al 46'6 % de la IFI a 1:200).



Gráf. 7: RESULTADOS COMPARATIVOS DE SEROPREVALENCIA ENTRE LAS DIFERENTES TÉCNICAS, ANTÍGENOS Y DILUCIONES:
1 IFI 1:40; **2** IFI 1:100; **3** IFI 1:200; **4** ELISA **H** 1:200; **5** ELISA **SDe** 1:200

V. Discusión

La entrada de *Trypanosoma cruzi* en un nuevo organismo desencadena cronológicamente en éste una serie de eventos celulares (procesos inflamatorios, proliferación de linfocitos citotóxicos, etc...) y humorales (producción de anticuerpos) altamente regulados, destinados a discriminar y erradicar al agente extraño, neutralizando así la infección y sus posibles efectos nocivos. Sin duda, uno de los mecanismos más importantes puestos en marcha por el hospedador para combatir la infección consiste en la producción de radicales libres, capaces de originar la muerte del parásito por acción sobre los distintos componentes celulares, entre los cuales destacan las especies reactivas del oxígeno (**EAO**) y, entre ellas: el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales peroxinitrito ($ONOO^-$) e hidroxilo (HO^-) [Piñeyro y col., 2005].

A pesar de que se ha demostrado la inexistencia en estos flagelados de los sistemas catalasa y glutatión peroxidasa (las principales defensas antioxidantes frente a los radicales libres en eucariotas) [Hernández y col., 2006], la evolución ha dotado a los parásitos de todo un arsenal de eficaces sistemas enzimáticos, como la SOD y tres sistemas dependientes de tripanotión (un factor de glutatión-espermidina): la triparedoxin peroxidasa, dos peroxidases independientes de selenio y la

ascorbato hemoperoxidasa, encargadas de minimizar los efectos de las **EAO** y asegurar el mantenimiento de un ambiente intracelular reductor, permitiendo de este modo la supervivencia del parásito y su establecimiento en el nuevo hospedador [Wilkinson y col., 2000 y 2003; Krauth-Siegel y col., 2003; Turrens, 2004]. Las SODs, por lo tanto, constituyen para estos organismos una de las primeras y principales líneas de defensa frente al daño celular inducido por las **EAO**, habiéndose demostrado que los organismos que carecen de ella se encuentran desprotegidos en mayor medida frente al daño oxidativo, experimentando fenómenos de bajo crecimiento, menor vida media, mutagénesis e hipersensibilidad a eventuales cambios en las condiciones de cultivo o a subproductos de su propio ciclo reductor [Fridovich, 1998].

En *Trypanosoma cruzi*, así como en muchos otros protozoos parásitos, la existencia de actividad SOD ligada a hierro ha sido ampliamente descrita en al menos un estadio del ciclo de vida [Gradus y Matthews, 1985; Sibley y col., 1986; Fairfield y col., 1988; Bogdan y col., 1990; Tannich y col., 1991; Bécuwe y col., 1996; Temperton y col., 1996; Ismail y col., 1997; Paramchuk y col., 1997; Kabiri y Steverding, 2001; Marín y col., 2004; Genetu y col., 2006; Wilkinson y col., 2006; Dufernez y col., 2006;]. Empero, este es el primer estudio enfocado a caracterizar bioquímicamente la totalidad de las distintas actividades SOD presentes en *T. cruzi*, con especial interés hacia lo que ha dado en llamarse

fracción SOD excretada, para la cual no se ha encontrado referencia alguna en la literatura científica. Dada la complejidad experimental que supone el abordaje de un estudio de estas características y merced a los resultados parciales que se fueron obteniendo, se decidió estructurar el conjunto del trabajo en tres partes:

- El conjunto de experimentos llevados a cabo a fin de aislar y caracterizar la totalidad del paquete de actividad SOD del parásito, utilizando como material celular el extracto total de epimastigotes (Fracción **H**).
- Los ensayos realizados destinados a la obtención y caracterización bioquímica de la fracción de actividad excretada.
- El estudio de las características inmunogénicas de dicha fracción y su posible aplicación con fines diagnósticos.

Como muestra biológica fueron empleadas formas epimastigotes de *T. cruzi* cepa Maracay mantenidas *in vitro* mediante resiembras sucesivas en nuestro laboratorio. Los flagelados fueron aislados de un caso crónico en la División de Malariología del Instituto de Salud Ambiental de Maracay (Venezuela), y han venido siendo utilizadas como cepa de referencia por nuestro grupo en estudios anteriores. Los parásitos fueron cultivados en masa, recogidos por centrifugación y

lisados por sonicación de la manera descrita en los capítulos III.I y III.II de “Material y Métodos”. El extracto celular así obtenido (denominado Fracción **H**) fue sometido a una precipitación con sulfato amónico (Fracción **P85**) y purificado a través de dos etapas de cromatografía en columna consecutivas. Cuatro fracciones (denominadas **SOD I, II, III y IV**), de alta pureza y actividad específica, fueron obtenidas como resultado de todo el proceso, siendo posteriormente caracterizadas. A lo largo de todas estas etapas, la pérdida de actividad debida a la manipulación y al efecto de la temperatura se minimizó reduciendo la duración total de las mismas, optimizando así el rendimiento de la purificación.

La elución de cuatro fracciones correspondientes a cuatro diferentes actividades SOD es coincidente con los resultados obtenidos previamente tras la aplicación de la fracción **P85** a un gel de IEF 3-9 seguido del revelado de Beyer y Fridovich, en el cual fueron identificadas cuatro bandas de actividad de pI 8'4, 8'2, 6'9 y 3'9. Probablemente, las bandas de actividad localizadas en la parte básica del gel (las de pI 8'2, 8'4 y 6'9) sean debidas a tres diferentes isoenzimas o a formas degradadas de un único enzima (un dímero o trímero), si bien ésta última posibilidad es poco probable, dado que durante el proceso de purificación fueron adicionados inhibidores de la acción de las proteasas. Además, existen precedentes que corroboran la primera hipótesis, como sucede en los casos de *T. brucei*, en el cual han sido

detectadas y clonadas cuatro isoformas de FeSOD de diferente pl [Dufernez y col., 2006] y *Phytomonas* spp., en la cual este grupo caracterizó bioquímicamente dos isoenzimas de pl también distinto [Marín y col., 2004]. Además, en la mayoría de los organismos investigados hasta el momento, al menos dos o más isoformas de SOD han sido detectadas [Miller, 2004]. Parece lógico pensar que los niveles de cada isoenzima podrían variar, aumentando o decreciendo hacia una u otra según el estado del parásito, es decir, algunas de las isoformas serían constitutivas y el resto, inducidas.

La electroforesis nativa de las enzimas purificadas mostró que las bandas mayoritarias tras el revelado para proteínas totales con nitrato de plata eran coincidentes con aquellas teñidas para el revelado de actividad SOD. Se sabe que el peso molecular de las SOD varía marcadamente a lo largo de la familia *Trypanosomatidae*. En el presente trabajo, se muestra cómo algunas de las SODs de *T. cruzi* (las isoformas **II** y **IV**, de PM 28 y 20 KDa, respectivamente) presentan un peso molecular similar a las de otros tripanosomátidos, como sucede en los casos de *T. brucei* [Kabiri y Steverding, 2001; Dufernez y col., 2006], que muestra dos SODs de peso molecular 22 y 23 KDa y *Phytomonas* spp. [Marín y col., 2004], que mostraba otras dos SODs de pesos moleculares 24 y 26 KDa. Además, *T. cruzi* presentaba otras dos actividades SOD (las isoformas **I** y **III**) cuyo PM no era coincidente con

los de otras SOD estudiadas hasta la fecha en miembros de la familia *Trypanosomatidae*.

Por otro lado, la búsqueda y comparación de los resultados aquí obtenidos con otras SODs hipotéticas descritas previamente para *T. cruzi* y cuya secuencia de aminoácidos es de sobra conocida (<http://www.genedb.org/genedb/tcruzi>), revela importantes variaciones respecto a los valores conjuntos de pI y PM, que pueden atribuirse a discrepancias entre la proteína nativa y su traducción a la secuencia completa de ADN o incluso a la propia heterogeneidad entre cepas, puesto que los aislados utilizados para la confección de dichas secuencias corresponden mayoritariamente a la cepa CL Brener.

Los ensayos de inhibición revelaron un comportamiento típico de isoformas ligadas a hierro, al ser inhibidas sólo por el peróxido de hidrógeno. Estos parásitos comparten esta característica con otras SOD estudiadas con anterioridad en otros kinetoplastidos patógenos, como *T. brucei* [Kabiri y Steverding, 2001; Wilkinson y col., 2006; Dufernez y col., 2006], *Leishmania* spp. [Genetu y col., 1997; Paramchuk y col., 1997] o *Phytomonas* spp. [Marín y col., 2004].

Por otro lado, los experimentos de localización subcelular demostraron que las distintas isoenzimas tienen localizaciones específicas dentro de la célula. Para evitar la posible contaminación entre las fracciones

recuperadas y asegurar la calidad del fraccionamiento, fueron testados enzimas marcadores (piruvato kinasa, hexokinasa y alanin aminotransferasa), de acuerdo con la metodología descrita por [Steiger y col., 1980; Uttaro y Opperdoes, 1997; Quesada y col, 2001]. El fenómeno de la compartimentación adquiere una especial importancia si admitimos que el principal papel de la SOD consiste en la detoxificación de aniones superóxido procedentes del metabolismo endógeno, y que los diferentes procesos bioquímicos productores de agentes oxidantes intra o extracelulares pueden requerir una gran diversidad de sistemas y ubicaciones para proteger las distintas macromoléculas y orgánulos del daño oxidativo. La SOD es, como se ha demostrado, principalmente un enzima citosólico, aunque una cierta actividad SOD fue detectada también en la fracción glicosomal (**SODs III y IV**) y, en menor proporción, en la fracción mitocondrial (**SOD I**). La localización mitocondrial es peculiar, pero este hecho tiene precedentes, como en *Crithidia fasciculata*, un tripanosomátido apatógeno que posee dos isoenzimas, una citosólica y otra mitocondrial [Le Trant y col., 1983]. Recientemente, cuatro actividades SOD con localizaciones distintas (citosólica, glicosomal y mitocondrial) han sido descritas y clonadas en *T. brucei* [Dufernez y col., 2006].

La SOD es presumiblemente sintetizada a nivel citoplasmático, pudiendo permanecer aquí y/o ser transportada hasta el interior de ciertos orgánulos, como sucede en los casos de *T. brucei* [Steiger y col.,

1980; Dufernez y col., 2006] y *Leishmania* spp. [Paramchuk y col., 1997; Genetu y col., 2006]. En definitiva, la presencia de varios isoenzimas en diferentes localizaciones dentro de la célula asegura una acción muy eficaz frente a un eventual aumento intracelular de los niveles de **EAO**, manteniendo un ambiente reductor favorable dentro de la célula.

Esta distribución fue corroborada gracias a los experimentos con digitonina, para los que se emplearon de nuevo marcadores para las localizaciones citosólica, glicosomal y mitocondrial [Uttaro y Opperdoes, 1997]. De dichos ensayos, además, se dedujo que entorno al 24 % de la actividad total no era solubilizada aun a altas concentraciones de digitonina; estos datos sugieren que podría tratarse de una actividad asociada a las membranas (y que por ende se perdería durante el fraccionamiento) o que incluso podría ser excretada por el parásito al medio. Este hecho es coincidente con un estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo con *Phytomonas* spp., en el cual aproximadamente el 20 % respecto a la actividad SOD inicial se “perdía” aparentemente durante el proceso [Marín y col., 2004, 2007].

El tratamiento con digitonina y sus resultados acerca de la posibilidad de la existencia en *Trypanosoma cruzi* de una actividad SOD que pudiera estar asociada a membranas o ser excretada (como sucede en *Phytomonas* sp.) [Marín y col., 2004] motivaron por ella un creciente interés. En un intento por llevar a cabo la identificación y

caracterización de dicha actividad, se trató de emular *in vitro* el ambiente hostil que encuentra el parásito tras la invasión de un nuevo hospedador. Con este objetivo, fue chequeado el sobrenadante en el que habían sido cultivados los parásitos en busca de algún indicio de la presencia de dicho enzima, encontrando que, bajo ciertas condiciones restrictivas de cultivo (incubación con medio no suplementado con SBF), se detectaba una cierta actividad SOD coincidente en pl y PM con la **SOD II** y que parecía ser producida y excretada al sobrenadante por los flagelados a fin de minimizar los devastadores efectos del anión superóxido sobre las membranas del parásito.

De esta manera, el medio de interacción (medio de cultivo sin SBF que hipotéticamente contendría la actividad excretada) fue centrifugado tras 36 h de incubación y el sobrenadante resultante fue filtrado y procesado hasta la fracción **P85e** de manera análoga a como se llevó a cabo con la fracción **H**, siendo el precipitado final desalinizado y posteriormente purificado a través de dos procesos cromatográficos sucesivos, para dar lugar finalmente a un pico de alta pureza y actividad SOD específica que fue llamado **S1e (SODe)**, que fue utilizado en los ulteriores ensayos de caracterización.

Los análisis mediante isoelectroenfoque en PhastGel IEF 3-9® y electroforesis nativa en geles de poliacrilamida al 12'5 % de las fracciones purificadas seguido de las finciones de actividad SOD según

Beyer y Fridovich y de nitrato de plata para proteínas totales, fueron efectuados para determinar el pI y el PM de la **SODe**, así como para controlar la calidad y el progreso del proceso de purificación, obteniendo una única banda de actividad de pI 3'9 y PM de aproximadamente 28 kDa. Esta banda es, como hemos dicho, coincidente con la **SOD II** citosólica caracterizada previamente.

Por su parte, los resultados de los estudios de inhibición demostraron que la **SODe** de *T. cruzi* exhibía un comportamiento típico de isoformas ligadas a hierro, al ser inhibida únicamente por peróxido de hidrógeno, como sucedía con las cuatro isoformas identificadas previamente. Hasta la fecha, varios autores han reportado la presencia de hierro como cofactor ligado a las SOD de tripanosomátidos estudiadas, no existiendo evidencia que sugiera la unión a otro tipo de catión metálico [Paramchuk y col., 1997; Kabiri y Steverding, 2001; Marín y col., 2004; Genetu y col., 2006; Wilkinson y col., 2006; Dufernez y col., 2006].

Estos trabajos confirman la hipótesis inicial acerca de la existencia en formas epimastigotes de *T. cruzi* de una actividad SOD extracelular, que sería excretada al medio externo como respuesta a un ambiente no completamente favorable, en el cual el parásito es capaz de sobrevivir durante un periodo corto de tiempo (no más de 36 h) y que podría ser clave para su establecimiento en el hospedador. Podemos considerar por tanto la **SODe** como un mecanismo adaptativo del

parásito tendente a contrarrestar una puesta en circulación masiva de **EAO** por parte del sistema inmune del organismo hospedador, por lo que jugaría un papel fundamental en la supervivencia del patógeno y, en consecuencia, en la perdurabilidad de la infección. Existen autores que han sugerido que las SOD de tripanosomátidos se comportan como factores de virulencia [Ismail y col., 1997; Kabiri y Steverding, 2001]; en este sentido, la existencia de una actividad excretada cobra una creciente importancia entendida dentro del marco de una *estrategia celular* destinada a proveer a la célula tanto intra como extracelularmente de diferentes sistemas antioxidantes que neutralicen la acción de las **EAO** y aseguren su supervivencia.

La titulación mediante ELISA de los sueros obtenidos tras la inmunización de hembras de ratones *Balb C* con las diferentes isoenzimas de SOD, sostiene la evidencia de que sólo la **SODe** actúa como fracción antigénica capaz de estimular el sistema inmune del hospedador y, en consecuencia, inducir la producción de anticuerpos policlonales específicos. Además, la titulación de los sueros mediante Western-Blot permitió corroborar, en primer lugar, la altísima especificidad y sensibilidad de la respuesta inmune provocada (al exhibir reactividad sólo para la banda correspondiente a la **SODe** incluso a altas diluciones) y, además, la ausencia de reacción frente a sueros de ratón inoculados con la **SODe** de *Leishmania infantum*.

La validez de la **SODe** como marcador molecular y su posible aplicación clínica fueron corroboradas *in vitro* mediante el análisis serológico de una batería de doscientos veintidós sueros de pacientes supuestamente chagásicos de distintas procedencias, empleando como fracciones antigénicas el extracto total de epimastigotes (como fracción de referencia) y la **SODe**. Además, a fin de demostrar la ausencia de falsos positivos debido a solapamientos con parásitos del género *Leishmania* spp., en estos ensayos fueron incluidos diez sueros de pacientes diagnosticados clínicamente con leishmaniasis, además de doce sueros de individuos sanos.

Así, los resultados de los estudios comparativos de seroprevalencia en los que fueron combinadas las distintas técnicas y fracciones antigénicas, indican que el mayor de número de sueros positivos (un 83'2 %) se obtuvo utilizando la **SODe** como fracción antigénica y la ELISA como método de diagnóstico, frente a un 71'6 % obtenido al emplear como antígeno el extracto total de epimastigotes y porcentajes del 71'4, 58'7 y 35'6 %, si la técnica de diagnóstico es la IFI a diluciones del suero de 1:40, 1:100 y 1:200, respectivamente. Cabe asimismo destacar que, a la dilución de 1:200, el número de positivos de la ELISA-**SODe** frente a la IFI (utilizada rutinariamente en el diagnóstico clínico de esta enfermedad) es aproximadamente 2'5 veces superior.

La **SODe**, por lo tanto, parece demostrado que se comporta como una fracción antigénica susceptible de ser utilizada en el diagnóstico de estas parasitosis, al demostrar, junto a una altísima especificidad, la ausencia de reacciones cruzadas. Ello supone un nuevo giro de tuerca dentro del estudio de las complejas interacciones entre el parásito y su huésped, sentando la base molecular de futuros trabajos encaminados al desarrollo de aplicaciones clínicas de gran repercusión, dada la privilegiada posición de que parece gozar como marcador molecular para el diagnóstico de estas parasitosis y como excepcional diana terapéutica para el diseño y desarrollo de nuevos y más efectivos agentes quimioterápicos, capaces de discriminar entre las Cu-Zn y MnSOD de las células de mamíferos y las FeSOD protozoarias.

Actualmente, los criterios taxonómicos tradicionales que incluían un aislado determinado dentro de un género y una especie (morfometría, curvas de parasitemia, patogenicidad, distribución geográfica, localización histológica, hospedador, etc...) han demostrado ser insuficientes para una rápida identificación a nivel clínico [Miralles y col., 2002]. Este hecho, simultáneamente a la ausencia de métodos de determinación y cuantificación real de la enfermedad (especialmente en casos de baja parasitación y en estadíos iniciales de la infección) y a la baja eficacia y considerable toxicidad de la quimioterapia disponible, ha llevado a los investigadores a la búsqueda de nuevas y específicas

moléculas del propio parásito susceptibles de ser empleadas como marcadores moleculares. Hasta la fecha, han sido varias las tentativas en este sentido, habiéndose postulado con más o menos éxito el uso de una GP90 lectin-purificada [Schechter y col., 1983], una cistein proteinasa (GP57/51) liberada durante la metacicloogénesis [Ronaldo y col., 1991], una proteína de choque térmico de 70 KDa [Krautz y col., 1998] y una ubiquitina altamente específica [Telles y col., 2003], además de un número considerable de moléculas recombinantes (rAgs), como una transialidasa de fase aguda [Frash, 1994] y varios antígenos de excreción-secreción [Umezawa y col., 1999, 2001; Franco da Silveira y col., 2001; Silveira-Lacerda y col., 2004]. La purificación de la **SODe** y la demostración experimental de su capacidad para generar una respuesta inmunitaria altamente específica, abren un nuevo foco de estudio encaminado al desarrollo de un método de diagnóstico diferencial eficaz, al no verificarse fenómenos de reacciones cruzadas con otros organismos próximos, fundamentalmente especies pertenecientes al género *Leishmania*, de especial interés dado el solapamiento de ambas infecciones en algunas regiones geográficas. En esta línea, este grupo de investigación ha propuesto en varias ocasiones el empleo de la **SODe** de *T. cruzi* [Villagrán y col., 2005] y otros tripanosomátidos *Leishmania infantum* y *Phytomonas* spp. [Marín y col., 2004a, 2004b, 2006, 2007 (en prensa)] para el diagnóstico de estas parasitosis.

VI Conclusiones

1ª: Se han aislado, purificado y caracterizado bioquímicamente cuatro actividades FeSOD de diferente pI y PM en formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa Maracay.

2ª: Los experimentos de localización subcelular demostraron que las cuatro isoenzimas presentaron una localización preferentemente citosólica, mientras que, además, las isoformas **SOD III** y **IV** estaban presentes en la fracción glicosomal y la **SOD I**, en menor proporción, en la mitocondrial.

3ª: Se ha descrito, aislado, purificado y caracterizado una actividad SOD extracelular excretada por el parásito. Dicha actividad, de pI 3'9 y PM 28 KDa, coincide con la **SOD II** antes descrita y parece estar relacionada con el establecimiento del parásito dentro del hospedador.

4ª: Se ha demostrado mediante ELISA y Western-Blot la capacidad inmunogénica de dicha fracción excretada en ratones, inoculando intraperitonealmente la banda y obteniendo sueros policlonales frente a la **SODe**.

5º: Se ha demostrado la validez de la fracción **SODe** como marcador molecular en el diagnóstico de estas parasitosis, al ensayar mediante ELISA lotes de sueros de pacientes chagásicos de diferentes países latinoamericanos (Perú, Chile, Colombia, Brasil y México), empleando la **SODe** como fracción antigénica y comparándolo con los resultados de seroprevalencia obtenidos mediante IFI y ELISA en la que se utilizó el extracto total de epimastigotes como fracción antigénica.

Conclusión general:

Se ha purificado y caracterizado por primera vez una actividad superóxido dismutasa excretada por *Trypanosoma cruzi* que juega un papel esencial en la supervivencia del parásito y que podría constituir una herramienta molecular extremadamente útil, de cuyo conocimiento se obtendrían beneficios a nivel diagnóstico y terapéutico extensibles además a otras parasitosis de gran repercusión sanitaria, social y económica.

VII BIBLIOGRAFÍA

VII Bibliografía

Aboagye-Kwarteng, T.; Smith, K. y Fairlamb, A.H. Molecular Characterisation of the Trypanothione Reductase Gene from *Crithidia fasciculata*: Comparison with other Flavoprotein Disulphide Oxidoreductases with Respect to Substrate Specificity and Catalytic Mechanism. *Molecular Microbiology*, **6**, 3089-3099 (1992)

Anónimo. Recommendations for a Satellite Meeting. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **94**: 429- 432 (1999)

Ariyanayagam, M. R.; Oza, S. L.; Mehlert, A. y Fairlamb, A. H. Bis(Glutathionyl) Spermine and Other Novel Trypanothione Analogues in *Trypanosoma cruzi* *Journal of Biological Chemistry*, **278** (30): 27612– 27619 (2003)

Atamna, H. y Ginsburg, H. Origin of Reactive Oxygen Species in Erythrocytes Infected with *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **61**: 231- 242 (1993)

Badaro, R.; Benson, D. y Eulalio, M. C. rK39: A Cloned Antigen of *Leishmania chagasi* that Predicts Active Visceral Leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, **173**: 758– 61 (1996)

Baert, C. B. ; Deloron, P. ; Viscogliosi, E. ; Dauchez, M. ; Camus, D. y Dive, D. Analysis of Genetic Diversity at the Iron-Containing Superoxide Dismutase Locus in *Plasmodium falciparum* Wild Isolates. *FEMS Microbiology Letters*, **181** 237- 243 (1999)

Baker, J. R.; Miles, M. A.; Godfrey, D. G. y Barret, T. V. Biochemical Characterization of Some Species of *Trypanosoma (Schizotrypanum)* from Bats (*Microchiroptera*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **27**: 483- 491 (1978)

Balaban, R. S.; Remoto, S. y Finkel, T. Mitochondria, Oxidants and Aging *Cell*, **120** (4): 483-495 (2005)

Bannister, J.V.; Bannister, W.H. y Rotilio, G. Aspects of the Structure, Function, and Applications of Superoxide Dismutase. *CRC Critical Review in Biochemistry*, **22** (2): 111- 80 (1987)

Barnabé, C.; Brisse, S. y Tibayrenc, M. Phylogenetic Diversity of Bat Trypanosomes of Subgenus *Schizotrypanum* Based on Multilocus Enzyme Electrophoresis, Random Amplified Polymorphic DNA and Cytochrome B Nucleotide Gene Analyses. *Infection, Genetics and Evolution*, **2**: 201- 208 (2000)

Beckman, J. S. y Ames, B. N. Oxidative Decay of DNA. *Journal of Biological Chemistry*, **272**: 19663 - 19636 (1997)

Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshal, P. y Freeman, B. Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endothelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **87**(6): 1335- 1341 (1990)

Bécuwe, P.; Gratepanche, S.; Fourmaux, M. N.; Van Beeumen, J.; Samyn, B.; Mercereau-Pujalon, O.; Touzel, J. P.; Slomianny, C.; Camus, D. y Dive, D. Characterization of Iron-Dependent Endogenous Superoxide Dismutase of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **76**: 125- 134 (1996)

Bestetti, R. B. y Muccillo, G. Clinical Course of Chagas' Heart Disease: A Comparison with Dilated Cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*, **60**: 187-93 (1997)

Beyer, W. F. y Fridovich, I. Assaying for Superoxide Dismutase Activity: Some Large Consequences of Minor Changes in Conditions. *Analytical Biochemistry*, **161**: 559- 566 (1987)

Bhatia, A.; Daifalla, N. S.; Jen, S.; Badaro, R.; Reed, S. G. y Skeiky, Y. A. W. Cloning, Characterization and Serological Evaluation of K9 and K26: Two Related Hydrophilic Antigens of *Leishmania chagasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **102**: 249–261 (1999)

Binder, S.; Levitt, A. M.; Sacks, J. J. y Hughes, J. M. Emerging Infectious Diseases: Public Health Issues for the 21st Century. *Science*, **284**:1311–1313 (1999)

Blakely, W. F.; Ward, J. F. y Joner, E. I. A Quantitative Assay of Deoxyribonucleic Acid Strand Breaks and their Repair in Mammalian Cells. *Analytical Biochemistry*, **124** (1): 125-133 (1982)

Bogdan, C.; Rollinghov, M. y Solbach, W. Evasion Strategies of *Leishmania* Parasites. *Parasitology Today*, **6**: 183–186 (1990)

Boveris, A.; Sies, H.; Martino, E. E.; Docampo, R.; Turrens, J. F. y Stoppani, A. O. Deficient Metabolic Utilization of Hydrogen Peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*, **188**: 643–648 (1980)

Bradford, M. M. A Refined and Sensitive Method for the Quantification of Microquantities of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248 (1976)

Breen, A. P. y Murphy, J. A. Reactions of Oxyl Radicals with DNA. *Free Radical Biology & Medicine*, **18** (6): 1033-1077 (1995)

Brisse, S.; Barnabé, C. y Tibayrenc, M. Identification of Six *Trypanosoma cruzi* Phylogenetics Lineages by Random Amplified Polymorphic DNA and Multilocus Enzyme Electrophoresis. *International Journal for Parasitology*, **30**: 35- 44 (2000a)

Brisse, S.; Dujardin, J. C. Y Tibayrenc, M. Identification of Six *Trypanosoma cruzi* Lineages by Sequence-Characterized Amplified Region Markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **111**: 95- 105 (2000b)

Brisse, S.; Verhoef, F. y Tibayrenc, M. Characterization of Large and Small Subunit rRNA and Mini-Exon Genes further Supports the Distinction of Six *Trypanosoma cruzi* Lineages. *International Journal for Parasitology*, **31**: 1218-1226 (2001)

Brisse, S.; Henriksson, J.; Barnabé, C. ; Douzery, E. J. ; Berkvens, C. ; Serrano, M.M De Carvalho, M. R. ; Buck, G. A. ; Dujardin, J. C. y Tibayrenc, M. Evidence for Genetic Exchange and Hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on Nucleotide Sequences and Molecular Karyotype. *Infection, Genetics and Evolution*, **2**: 173- 183 (2003)

Buchmüller-Rouiller, Y.; Corradin, S. B. y Mauël, J. Macrophage Activation for Intracellular Killing as Induced by a Ca²⁺ Ionophore. Dependence on L-Arginine-Derived Nitrogen Oxidation Products. *Biochemical Journal*, **284**: 387–392 (1992)

Burnette, W. N. "Western blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. *Analytical Biochemistry*, **112** (2): 195- 203 (1981)

Burns, J. M.; Shreffler, W. G.; Benson, D. R.; Ghalib, H. W.; Badaro, R. y Reed, S. G. Molecular Characterization of a Kinesin-Related Antigen of *Leishmania chagasi* that Detects Specific Antibody in African and American Visceral Leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **90**: 775– 9 (1993)

Camargo, E. P.; Mattei, D. M.; Yoshida, N.; Caulada, Z. Staphylococci Adherence to Trypanosomes Exposed to Immune Sera as a Method for the Diagnosis of Chagas' Disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **77**(6): 825- 828 (1983)

Carnieri, E. V. S.; Moreno, S. N. J. y Docampo, R. Trypanothione-Dependent Peroxide Metabolism in *Trypanosoma cruzi* Different Stages. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **61**: 79–86 (1993)

Carvalho, F. A. A.; Charest, H.; Tavares, C. A.; Matlashevski, G.; Valente, E. P.; Rabello, A.; Gazzinelli, R. y Fernandes, A. P. Diagnosis of American Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs Using the Recombinant *Leishmania donovani* A2 Antigen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **43**: 289-295 (2002)

Celeste, B. J.; Angel, S. O.; Castro, L. G. M.; Gidlung, M y Goto, H. *Leishmania infantum* Heat Shock Protein 83 for the Serodiagnosis of Tegumentary Leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **37**: 1591-1593 (2004)

Center for Disease Control, 2005: www.dpd.cdc.gov

Clarke, D.; Albrecht, M y Arévalo, J. Ascorbate Variations and Dehydroascorbate Reductase Activity in *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes and Trypomastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **66**: 143- 145 (1994)

Corliss, J. O. An Interim Utilitarian ('User-Friendly') Hierarchical Classification and Characterization of the Protist. *Acta Protozoológica*, **33**: 1- 51 (1994)

Current Protocols, Section II (1995)

Czapski, G. Radiation Chemistry of Oxygenated Aqueous Solutions. *Annual Reviews in Physical Chemistry*, **22**: 171- 208 (1971)

D'Alessandro, A. y Saravia, N. *Trypanosoma rangeli*. *Parasitic Protozoa*. (Ed. Kreier J. P. y Baker, J. R.) Academic Press (San Diego): 1- 54 (1992)

Darley-USmar, V. y Starke-Reed, P.E. Antioxidants: Strategies for Interventions in Aging and Age-Related Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, **2**: 375-377 (2000)

Davies, K. J. Protein Oxidation, Protein Cross- Linking and Proteolysis in the in the Formation of Lipofuscin. 1987: *State of the Art*, Elsevier (Amsterdam): 109-133(1988)

Dekkers, J. C.; Van Doornen, L. J. P. y Kemper, H. C. G. The Role of Antioxidant Vitamins and Enzymes in the Prevention of Exercise-Induced Muscle Damage. *Sports Medicine*, **21**: 213- 238 (1996)

Demple, B. y Levin, J. D. Repair Systems for Radical-Damaged DNA. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. (Ed. Sies, H.) Academic Press (London): 119-154 (1991).

Denicola-Seoanne, A.; Rubbo, H.; Prodanov, E y Turnes, J. F. Succinate-Dependent Metabolism in *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **54**: 43- 50 (1992)

Denicola, A.; Rubbo, H.; Rodríguez, D. y Radi, R. Peroxynitrite-Mediated Cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **304**: 279- 286 (1993)

De Souza, S.; Da Costa, P. E.; Katz, S.; Machado, M. R. y Barbieri, C. L. A Recombinant Cysteine Proteinase from *Leishmania chagasi* for Serodiagnosis of American Visceral Leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **72**(2): 126- 132 (2005)

Docampo, R. Sensitivity of Parasites to Free Radical Damage by Antiparasitic Agents. *Chemical Biology Interactions*, **73**: 1- 27 (1990)

Docampo, R. Antioxidant Mechanisms. *Biochemistry and Molecular Biology of Parasitology* (Ed. Marr, J. J. y Müller, M.), Academic Press (San Diego):147- 160 (1995)

Docampo, R. y Moreno, S. N. J. Free Radicals Intermediates in the Antiparasitic Action of Drugs and Phagocytic Cells. *Free Radical in Biology* (ed. Pryor, W. A.). Academic Press, NY, 243- 288 (1984)

Docampo, R.; Boiso, J. F.; Boveris, A. y Stoppani, A. O. Localization of Peroxidase Activity in *Trypanosoma cruzi* Microbodies. *Experientia*, **32**: 972- 975 (1976)

Dufernez, F.; Yernaux, C.; Gerbod, D.; Noël, C.; Chauvenet, M.; Wintjens, R.; Edgcomb, V.; Capron, M.; Opperdoes, F. R. y Viscogliosi, E. The Presence of Four Iron-Containing Superoxide Dismutase Isozymes in Trypanosomatidae: Characterization, Subcellular Localization and Phylogenetic Origin in *Trypanosoma brucei*. *Free Radical Biology and Medicine*, **40** (2): 210-225 (2006)

Evans, P. y Halliwell, B. Micronutrients: Oxidant/Antioxidant Status. *British Journal of Nutrition*, **85**(2): 67 (2001)

Fang, Y. Z.; Yang, S. y Wu, G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition *Nutrition*, **18** (10): 872- 879 (2002)

Fairfield, A.; Abosch, A.; Ranz, A.; Eaton, J. y Meschnick S. Oxidant Defence Enzymes of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **30** (1): 77-82 (1988)

Fairlamb, A. H. y Cerami, A. Identification of a Novel, Thiol-Containing Cofactor Essential for Glutathione Reductase Enzyme Activity in Trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **14**: 187-198 (1985)

Fairlamb, A. H. y Cerami, A. Metabolism and Functions of Trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual Reviews in Microbiology*, **46**: 695- 729 (1992)

Fernández-Becerra, C., Osuna, A., Muller, E., Dollet, M. and Sánchez-Moreno, M. Characterization of Isolated from Fruits by Electrophoretic Isoenzymes and Kinetoplast-DNA Analysis. *FEMS Microbiology Letters*, **145**: 463–468 (1996)

Fernández, O.; Sturm, N. R.; Derre, R. y Campbell, D. A. The Mini-Exon Gene: A Genetic Marker for Zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **95**: 129- 133 (1998)

Field, H.; Cerami, A. y Henderson, G. B. Cloning, Sequencing and Demonstration of Polymorphism in Trypanothione Reductase from *Crithidia fasciculata*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **50**: 47- 56 (1992)

Flohe, L.; Hecht, H.J. y Steiner, P. Glutathione and Trypanothione in Parasitic Hydroperoxide Metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, **27**: 966–984 (1999)

Franco da Silveira, F.; Umezawa, E. S. y Luquetti, A. O. Chagas' Disease: Recombinant *Trypanosoma cruzi* Antigens for Serological Diagnosis *Trends in Parasitology*, **17**: 286– 291 (2001)

Frash, A. C. C. Transialidase, SAPA Amino Acid Repeats and the Relationship between *Trypanosoma cruzi* and the Mammalian Host. *Parasitology*, **108**: 37- 44 (1994)

Fridovich I. Superoxide Dismutases: An Adaptation to a Paramagnetic Gas. *Journal of Biological Chemistry*, **264**: 7761- 7764 (1989)

Fridovich, I. Oxygen Toxicity: a Radical Explanation. *Journal of Experimental Biology*, **201**: 1203- 1209 (1998)

Fritsch, B.; Dieckmann, A.; Menz, B.; Hempelmann, E.; Fritsch, K. G. Fritsch y Jung, A. Glutathione and Peroxide Metabolism in Malaria- Parasitized Erythrocytes. *Parasitology Research*, **73**: 515- 517 (1987)

García, M.; de Pascual, S.; Santos, C. y Rivas, J. C. Evaluation of the Antioxidant Properties of Fruits. *Food Chemistry*, **84** (1): 13-18 (2004)

Garrison, W. M. Reaction Mechanisms in the Radiolysis of Peptides, Polypeptides, and Proteins. *Chemical Reviews*, **87**: 381–398 (1987)

Genetu, A.; Gadisa, E.; Aseva, A.; Barr, S.; Lakew, M.; Jirata, D.; Kuru, T.; Hunegnaw, M. y Gedamu, L. *Leishmania aethiopica*: Strain Identification and Characterization of Superoxide Dismutase-B genes. *Experimental Parasitology*, **113** (4): 221- 226 (2006)

Gilbert, D. L. Fifty Years of Radical Ideas. *Annals of New York Academy of Sciences*, **899**:1 (2000)

Gouet, P., Jouve, H.M. y Dideberg, O. Crystal Structure of *Proteus mirabilis* PR Catalase with and without Bound NADPH. *Journal of Molecular Biology*, **249**: 933- 954 (1995)

Gradus M. y Matthews, H. Electrophoretic Analysis of Soluble Proteins and Esterase, Superoxide Dismutase and Acid Phosphatase Isoenzymes of Members of the Protozoan Family *Trichomonadidae*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **81** (1): 229- 233 (1985)

Gutteridge, J. M. Antioxidant Properties of the Proteins Caeruloplasmin, Albumin and Transferrin. A Study of their Activity in Serum and Synovial Fluid from Patients with Rheumatoid Arthritis. *Biochimica & Biophys Acta*, **869**(2):1 19-27 (1986)

Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. The Chemistry of Oxygen Radicals and other Oxygen-Derived Species. *Free Radicals in Biology & Medicine*, Oxford University Press (New York): 20-64 (1985)

Hernández-Chinea, C. *Leishmania amazonensis*: Humoral Response to Amastigote Excreted-Antigens in Murine Leishmaniasis. *Experimental Parasitology* (en prensa, 2007)

Hernández, S. M.; Sánchez, M. S.; Schwarc de Tarlovsky, M. N. Polyamines as a Defense Mechanism against Lipoperoxidation in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, **98**: 94-102 (2006)

Hoare, C. A. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. *Blackwell Scientific Publications* (Oxford) pp. 749 (1972)

Hobza, P. y Poner, J. Significant Structural Deformation of Nucleic Acid Bases in Stacked Base Pairs: An *Ab Initio* Study beyond Hartree–Fock. *Chemical Physics Letters*, **288** (1): 7-14 (1998)

Imlay, J.A. Pathways of Oxidative Damage. *Annual Reviews of Microbiology*, **57**: 395–418 (2003)

In Silico Sciences: www.pd-fams.com

Ismail, S.O.; Paramchuck, W.J.; Bhatia, J.A. y Gedamu, L. Molecular Cloning and Characterization of Two Iron Superoxide Dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*: Differential and Stage Specific Expression. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **86**: 187–97 (1997)

James, S. L. Emerging Parasitic Infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **18**(4): 313-317 (1997)

Kabiri, M. y Steverding, D. Identification of a Developmentally Regulated Iron Superoxide Dismutase of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biochemistry*, **360**: 173-177 (2001)

Kawashita, S. Y.; Sanson, G. F.; Fernades, O.; Zingales, B. y Brioles, M. R. Maximum-Likely Divergente Dates Estimates Based on rRNA Gene Sequences Suggest Two Scenarios of *Trypanosoma cruzi* Intraspecific Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **18**: 2250- 2259 (2001)

Knapen, M. F. C. M. The Glutathione/Glutathione-Related Enzyme System in Reproduction. *European Journal of Obstetrics Gynecology & Reproductive Biology*, **91**:127–129 (2000)

Knapen, M. F. C. M.; Zusterzeel, P. L. M.; Peters, W. H. M. y Steegers, E. A. P. Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction. *European Journal of Obstetrics Gynecology & Reproductive Biology* **82**:171–184 (1999)

Krauth-Siegel, R.L.; Meiering, S.K.; Schmidt, H. The Parasite Specific Trypanothione Metabolism of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Journal of Biological Chemistry*, **384**: 539– 549 (2003)

Krautz G.M.; Peterson, J.D.; Godsel, L. M.; Kretfli, A. U.; Engman, D. M. Human Antibody Responses of *Trypanosoma cruzi* 70-kD Heat-Shock Proteins. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **58**: 137-143 (1998)

Kulda, J.; Kralova, J. y Vavra, J. The Ultrastructure and 3, 3'-Diaminobenzidine Cytochemistry of Hydrogenosomes of Trichomonads. *Journal of Protozoology*, **24**: 51A

Kussel, J. P.; Boveris, A. y Storey, B. T. H₂O₂ Production and Cytochrome C Peroxidase Activity in Mitochondria Isolated from the Trypaosomatid Hemoflagellate *Crithidia fasciculata*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **158**: 799- 804 (1973)

Kwok, L. Y.; Schlüter, D.; Clayton, C. y Soldati, D. The Antioxidant Systems in *Toxoplasma gondii* and the Role of Cytosolic Catalase in Defence against Oxidative Injury. *Molecular Microbiology*, **51** (1): 47– 61 (2004)

Le Trant, N.; Meshnick, S. R.; Kitchener, K.; Eaton, J. W. y Cerami A. Iron-Containing Superoxide Dismutase from *Crithidia fasciculata*. Purification, Characterization and Similarity to Leishmanial and Trypanosomal Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, **258**: 125- 130 (1983)

Levin, M. J.; Da Silveira, J. F.; Frah, A. C. C.; Camargo, M. E.; Lafon, S.; Degrave, W. y Rangel-Aldao, R. Recombinant *Trypanosoma cruzi* Antigens and Chagas Disease Diagnosis: Analysis of a Workshop. *FEMS Microbiology Letters*, **89**: 11-16 (1991)

Levine, N. D.; Corliss, J. O.; Cox, F. E. G.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B. M.; Leedale, G. F.; Loeblich, A. R.; Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, E. G.; Page, F. C.; Poljansky, G.; Sprague, V.; Vavra, J. y Wallace, F. G. A Newly Revised Classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology*, **27**: 37- 58 (1980)

Lowenstein, C. J. y Snyder, S. H. Nitric Oxide, a Novel Biologic Messenger Cell, **70** (5): 705-707 (1992)

Macedo, A. M y Penna, S. D. J. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitology Today*, **14**: 119- 1242 (1998)

Machado, C. A. y Ayala, F. J. Nucleotide Sequences Provide Evidence of Genetic Exchange among Distantly Related Lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **98**: 7396- 7401(2001)

Marín, C.; Rodríguez-González, I. y Sánchez-Moreno, M. In Vitro Culture and Biochemical Characterization of Six Trypanosome Isolates from Peru and Brazil. *Experimental Parasitology*, **102**: 23–29 (2002)

Marín, C.; Hitos, A.; Rodríguez-González, I; Dollet, M. y Sánchez-Moreno, M. *Phytomonas* Iron Superoxide Dismutase: A Possible Molecular Marker. *FEMS Microbiology Letters*, **234**: 69–74 (2004)

Marín, C.; Rodríguez. I.; Hitos, A.; Rosales, M. J.; Dollet, M. y Sánchez-Moreno, M. Purification and Characterization of Two Iron Superoxide Dismutases of *Phytomonas* sp. Isolated from *Euphorbia characias* (Plant Trypanosomatids). *Parasitology*, **129**: 79-86 (2004)

Marín, C.; Longoni, S. S.; Rodríguez-González, I.; Mateo, H.; de Diego, J. A.; Alunda, J. M.; Minaya, G. y Sánchez-Moreno, M. *Leishmania infantum*: Use of Excreted Superoxide Dismutase in ELISA and Western Blotting for Serologic Diagnostic in Naturally Infected Dogs. *Parasitology Research* (en prensa, 2007)

McCord, J. M. y Fridovich, I. Superoxide Dismutase: the First Twenty Years (1968-1988). *Free Radical Biology and Medicine*, **5**: 363- 369 (1988)

McKee, T. y McKee, J. R. Moléculas Antioxidantes. Agresión Oxidativa. *Bioquímica. La Base Molecular de la Vida* (3ªed). McGraw- Hill Interamericana (2003)

McLellan, S. L. Genetic Diversity of *Escherichia coli* Isolated from Urban Rivers and Beach Water. *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (82004): 4658-4665 (2004)

Medina-Acosta, E.; Franco, A. M.; Cansen, A. M.; Sampol, M; Neves, N.; Pontes-de-Carvalho, L.; Grimaldi Junior, G. y Nussenzweig, V. Trans-Sialidase and Sialidase Activities Discriminate between Morphologically Indistinguishable Trypanosomatids. *European Journal of Biochemistry*, **225**: 333- 339 (1994)

Meshnick, S. R. y Eaton, J. W. Leishmanial Superoxide Dismutase: A Possible Target for Chemotherapy. *Biochemical and Biophysics Research Communications*, **102**: 970- 976 (1981)

Miller, A. F. Superoxide Dismutases: Active Sites that Save, but a Protein that Kills. *Current Opinion in Chemical Biology*, **8**: 162–168 (2004)

Miles, M. A.; Souza, A.; Pova, M. M.; Shaw, J. J.; Lainson, R. y Toye, P. G. Isozymic Heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the First Autochthonous Patients with Chagas Disease in Amazonian Brazil. *Nature*, **272**: 819- 821 (1978)

Miralles, D.; Marín, C.; Magán, R.; Fernández-Ramos, C.; Entrala, E.; Córdova, O.; Vargas, F. y Sánchez-Moreno, M. In Vitro Culture and Biochemical Characterization of Six Trypanosome Isolates from Peru and Brazil. *Experimental Parasitology*, **102**: 23–29 (2002)

Molyneux, D. H. Trypanosomes of Bats. *Parasitic Protozoa* (Ed. Kreier, J. P. y Baker, J. R.). Academic Press (San Diego): 195- 223 (1991)

Muelas, S.; Suárez, M.; Pérez, R.; Rodríguez, H.; Ochoa, C.; Escario, J.A. y Gómez-Barrio, A. In Vitro and in Vivo Assays of 3, 5-Disubstituted-Tetrahydro-2H-1,3,5-Thiadiazin-2-Thione Derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97** (2): 269- 272 (2002)

Murray, H. W.; Nathan, C. F.; y Cohn, Z. A. Macrophage Oxygen-Dependent Antimicrobial Activity. Role of Endogenous Scavengers of Oxygen Intermediates. *Journal of Experimental Medicine*, **152**: 1610- 1624 (1980)

Müller, M. Biochemical Cytology of Trichomonad Flagellates. Subcellular Localization of Hydrolases, Dehydrogenases and Catalase in *Trichomonas foetus*. *Journal of Cellular Biology*, **57**: 453- 474 (1978)

Müller, S.; Liebau, E.; Walter, R. D. y Krauth-Siegel, R. L. Thiol-Based Redox Metabolism of Protozoan Parasites. *Trends in Parasitology*, **19**(7): 320-328 (2003)

Nakazawa H.; Genka, C. y Fujishima, M. Pathological Aspects of Active Oxygen/ Free Radicals. *Japanese Journal of Physiology*, **46**: 15- 35 (1996)

Ninomiya, M. y Ziro, S. The Metabolism of *Trichomonas vaginalis* with Comparative Aspects of Trichomonadids. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, **39**: 321- 326 (1952)

Nunes, L. R.; De Carvalho, M. R. y Buck, G. A. *Trypanosoma cruzi* Strain Partition into Two Groups Based on the Structure and Function of the Spliced Leader RNA and rRNA Gene Promoters. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **86**: 211- 224 (1997)

O'Connor, T. P.; Jancy, P. D.; Hanscom, L.; Barbara, B. A.; Hegarty, C.; Randall, B.; Groat, G.; Edward, D. y Breitschwerdt, B. Comparison of an Indirect Immunofluorescence Assay, Western Blot Analysis, and a Commercially Available ELISA for Detection of *Ehrlichia canis* Antibodies in Canine Sera. *American Journal of Veterinary Research*, **67** (2): 206- 210 (2006)

Ödberg-Ferragut, C. ; Renault, J. P.; Viscogliosi, E.; Toursel, C. ; Briche, I. ; Engels, A. ; Lepage, G. ; Morgenstern-Badarau, I.; Camus, D.; Tomavoia, S. y Dive, D. Molecular Cloning, Expression Analysis and Iron Metal Cofactor Characterisation of a Superoxide Dismutase from *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **106**: 121–129 (2000)

Oien, D. B. y Moskovitz, J. Ablation of the Mammalian Methionine Sulfoxide Reductase Affects the Expression Level of Cysteine Deoxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **352**: 556–559 (2007)

Okado-Matsumoto, A. y Fridovich, I. Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver: Cu, Zn-SOD in Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 38388– 38393 (2001)

Opperdoes, F. R.; Borst, P. y Spits, H. Particle-Bond Enzymes y the Bloodstream Form of *Trypanosoma brucei*. *European Journal of Biochemistry*, **76**: 21- 28 (1977)

Organización Mundial de la Salud. Control of Chagas Disease. *Technology Report Series*, **905**:1–109 (2002)

Pacifici, R. E. y Davies, K. J. A. Protein Degradation as an Index of Oxidative Stress. *Methods in Enzymology*, **186**: 485- 502 (1990)

Paget, T. A. y Lloyd, D. *Trichomonas vaginalis* Requires Traces of Oxygen and High Concentrations of Carbon Dioxide for Optimal Growth. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **41**: 65- 75 (1990)

Paramchuk, W. J.; Ismail, S.O.; Bhatia, A. y Gedamu, L. Cloning, Characterization and Overexpression of Two Iron Superoxide Dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: Role in Pathogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **90**: 203- 221 (1997)

Passos, S.; Carvalho, L. P.; Orge, G.; Jerônimo, S. M.; Bezerra, G.; Soto, M.; Alonso, C y Carvalho, E. M. Recombinant *Leishmania* Antigens for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **12**(10): 1164- 1167 (2005)

Penketh, P. J. y Klein, R. A. Hydrogen Peroxide Metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **20**: 111- 121(1986)

Pineyro, M. D; Pizarro, J. C.; Lema, F.; Pritsch, O.; Cayota, A.; Bentley, G. A. y Robello, C. Crystal Structure of the Tryparedoxin Peroxidase from the Human Parasite *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Structural Biology*, **150**(1): 11- 22 (2005)

Podlipaev, S. The More Insect Trypanosomatids Under Study – The More Diverse Trypanosomatidae Appears. *International Journal for Parasitology*, **31**: 648– 652 (2001)

Prata A. Clinical and Epidemiological Aspects of Chagas Disease. *The Lancet Infectious Diseases* **1**: 92–100 (2001)

Pré, J. La Lipoperoxydation. *Pathologie Biologie*, **39** : 716- 736 (1991)

Punukollu, G.; Gowda, R. M.; Khan, I. A.; Navarro, V. S. y Vasavada, B. C. Clinical Aspects of the Chagas' Heart Disease. *International Journal of Cardiology*, **115**(3): 279- 283 (2007)

Qu, J.; Zhong, L.; Masoom-Yasinzai, M.; Abdur-Rab, M.; Aksu, H. S. Z.; Reed, S. G. y Chang, K. P. Serodiagnosis of Asian Leishmaniasis with a Recombinant Antigen from the Repetitive Domain of a *Leishmania* Kinesin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **88**: 543– 5 (1994)

Quesada, J. ; Entrala, E.; Fernández-Ramos, C.; Marín, C. y Sánchez-Moreno, M. *Phytomonas* spp.: Superoxide Dismutase in Plant Trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **115**: 123- 127 (2001)

Quijada, L.; Requena, J. M.; Soto, M. y Alonso, C. Analisis of the Antigenic Properties of the *L. infantum* HSP 70: Design of Synthetic Peptides for Specific Serodiagnosis of Human Leishmaniasis. *Immunology Letters*, **63**: 169- 174 (1998)

Reina-San-Martin, B.; Cosson, A. y Minoprio, P. Lymphocyte Polyclonal Activation: A Pitfall for Vaccine Design against Infectious Agents. *Parasitology Today* **16**: 62–67 (2000)

Rodríguez-González, I.; Marín, C.; Longoni, S.; Mateo, H.; Alunda, J. M.; Minaya, G.; Gutiérrez-Sánchez, R.; Vargas, F. y Sánchez-Moreno, M. Identification of New World *Leishmania* Species from Peru by Biochemical Techniques and Multiplex PCR Assay. *FEMS Microbiology Letters*, **267**: 9- 16 (2007)

Robello, C.; Gamarro, F.; Castanys, S. y Alvarez-Valin, F. Evolutionary Relationship in *Trypanosoma cruzi*: Molecular Phylogenetics Supports the Existence of a New Major Lineage of Strains. *Gene*, **246**: 331- 338 (2000)

Romero, L. I.; Paz, H. M.; Ortega-Barría, E.; Bayard, V.; Hochberg, L. P.; Collins, K. M.; Chan, A. S. T. y Ryan, J. Evaluation of Serological Assays Based on a Novel Excreted Antigen Preparation for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Panama. *Journal of Microbiological Methods*, **57**: 391- 397 (2004)

Ronaldo, M.C.; D'Escoffier, L.N.; Salles, J.M.; Goldenberg, S. Characterization and Expression of Proteases during *T. cruzi* Metacyclogenesis. *Experimental Parasitology*, **73**: 44- 51 (1991)

Ryan, J. R.; Smithyman, A. M.; Rajasekariah, G. H.; Hochberg, L.; Stifeler, J. M. y Martin, S. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Soluble Promastigote Antigen Detects Immunoglobulin M (Ig M) Antibodies in Sera from Cases of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**(3): 1037- 1043 (2002)

Sánchez-Moreno, M.; Laszity, D.; Coppens, I y Opperdoes, F. R. Characterization of Carbohydrate Metabolism and Demonstration of Glycosomes in a *Phytomonas* sp. Isolated from *Euphorbia characias*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **54**: 185- 2000 (1992)

Schechter, M.; Voller, A.; Marinkelle, C. J.; Flint, J. E.; Guhl, F. y Miles, M. A Purified *Trypanosoma cruzi* Specific Glycoprotein for Discriminative Serological Diagnosis of South American Trypanosomiasis (Chagas's Disease). *The Lancet*, 1983

Schmidt, A. y Krauth-Siegel, R. L. Enzymes of the Trypanothione Metabolism as Targets fro Antitrypanosomal Drug Development. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2**(11): 1239- 1259 (2002)

Schofield, C. J. y Dias, J. C. P. The Southern Cone Programme against Chagas Disease. *Advances in Parasitology*, **42**:1-25 (1999)

Schuessler, H. y Schilling, K. Oxygen Effect in the Radiolysis of Proteins. *International Journal of Radiation Biology*, **45**, 267–281(1984)

Sibley, L. D.; Lawson, R. y Weidner, E. Superoxide Dismutase and Catalase in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **19**: 83-87 (1986)

Sies, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. *Oxidative Stress* (Ed. Sies, H.), Academic Press (Orlando): 1- 8 (1985)

Silveira-Lacerda, E. P.; Silva, A. G.; Favoreto S.; Souza, M. A.; Kesper, N.; Botelho-Filho, A. y Umezawa, E. S. Chagas' Disease: Application of TESA-Blot in Inconclusive Sera from a Brazilian Blood Bank. *Vox Sanguinis*, **87**: 204– 207 (2004)

Souto, R. P.; Vargas, N. y Zingales, B. *Trypanosoma rangeli*: Discrimination from *Trypanosoma cruzi* Based on a Variable Domain from the Large Subunit Ribosomal RNA Gene. *Experimental Parasitology*, **91**: 306- 314 (1999)

Steiger, R. F.; Opperdoes, F. R. y Bontemps, J. Subcellular Localization and Fractionation of *Trypanosoma brucei* Blood Stream-Forms with Special Reference of Hydrolases. *European Journal of Biochemistry*, **105**: 163-175 (1980)

Stevens, J. R.; Noyes, H. A.; Dover, G. A. y Gibson, W. C. The Ancient and Divergent Origins of the Human Pathogenic Trypanosomes *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, **118**: 107-116 (1999a)

Stevens, J. R.; Teixeira, M. M.; Bingle, L. E.; y Gibson, W. C. The Taxonomic Position and Evolutionary relationship between of *Trypanosoma rangeli*. *International Journal for Parasitology*, **29**: 747- 759 (1999b)

Stevens, J. R.; Noyes, H. A.; Schofield, C. J. y Gibson, W. The Molecular Evolution of *Trypanosomatidae*. *Advances in Parasitology*, **48**: 1- 56 (2001)

Tannich, I.; Bruchhaus, R. D. I.; Walter, R. D. y Horstmann, R. D. Pathogenic and Non-Pathogenic *Entamoeba histolytica*: Identification and Molecular Cloning of an Iron-Containing Superoxide Dismutase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **49**: 61- 72 (1991)

Teboursky, F.; El Gaid, A.; Louzir, H.; Ben Ismail, R.; Kammoun, R. y Dellagi, K. Identification of an Immunodominant 32-Kilodalton Membrana Protein of *Leishmania donovani infantum* Promastigotes Suitable for Specific Diagnosis of Mediterranean Visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**(10): 2474- 2480 (1994)

Teebor, G. W.; Boorstein, R. J. y Cadet, J. The Reparability of Oxidative Free Radical Mediated Damage to DNA: a Review. *International Journal of Radiation Biology*, **54**: 131- 150 (1988)

Telles, S.; Abate, T.; Slezzynger, T. y Henriquez, D. A. *Trypanosoma cruzi* Ubiquitin as an Antigen in the Differential Diagnosis of Chagas Disease and Leishmaniasis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **37**: 23- 28 (2003)

Temperton, N.J.; Wilkinson, S.R. y Kelly, M. Cloning of an Fe-Superoxide Dismutase Gene Homologue from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **90**: 203– 221 (1996)

Termini, J. Hydroperoxide-Induced DNA Damage and Mutations. *Mutation Research*, **450**: 107– 124 (2000)

Tibayrenc, M. Populatoin Genetics of Parasitic Protozoa and others Microorganisms. *Advances in Parasitology*, **36**: 47-115 (1995)

Tibayrenc, M.; Ward, P.; Moya, A. y Ayala, F. J. Natural Populations of *Trypanosoma cruzi*, the Agent of Chagas Disease, Have a Complex Multiclonal Structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **83**: 115- 119 (1986)

Turrens, J. F. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses: A Target for the Treatment of Diseases Caused by Parasitic Protozoa. *Molecular Aspects of Medicine*, **25**: 211– 220 (2004)

Umezawa, E. S.; Nascimento, M. S. y Stolf, A. M. S. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with *Trypanosoma cruzi* Excreted–Secreted Antigens (TESA-ELISA) for Serodiagnosis of Acute and Chronic Chagas' Disease. *Diagnostic in Microbiology Infectious Diseases*, **39**: 169–176 (2001)

Umezawa, E. S.; Bastos, S. F.; Camargo, M. E.; Yamauchi, L. M.; Santos, M.; Gonzalez, A.; Zingalez, B.; Levin, M.; Sousa, O.; Rangel-Aldao, R. y Silveira, J. F. Evaluation of a Recombinant Antigen for Serodiagnosis of Chagas Disease in South and Central America. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**: 1554-1660 (1999)

Urbina, J.A. y Docampo, R. Specific Chemotherapy of Chagas Disease: Controversies and Advances. *Trends in Parasitology*, **19**: 495–501 (2004)

Uttaro, A. D. y Oppendoes, F. R. Purification and Characterization of a Novel Isopropanol Dehydrogenase from *Phytomonas* sp. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **85**: 213-219 (1997)

Vacca, C. E.; Wihelm, J. y Harás Ringdahl, M. Interaction of Lipid Peroxidation Product with DNA. *Research/ Reviews in Genetic Toxicology*, **195**: 137- 149 (1988)

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncola, J.; Cronin, M. T. D.; Mazura, M. y Telser, J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**: 44–84 (2007)

Vargas, F. Epidemiología Molecular de la Tripanosomiasis Americana (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*) en la Región Norte y Nororiental del Perú. Tesis Doctoral. Director: M. Sánchez-Moreno. Universidad de Granada (2005)

Villagrán, M. E.; Marín, C.; Rodríguez-González, I.; De Diego, J. A. y Sánchez-Moreno, M. Use of an Iron Superoxide Dismutase Excreted by *Trypanosoma cruzi* in the Diagnosis of Chagas Disease: Seroprevalence in Rural Zones of the State of Queretaro, Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **73** (3): 510-516 (2005)

Viscogliosi, E.; Delgado-Viscogliosi, P.; Gerbod, D. ; Dauchez, M. ; Gratepanche, S.; Alix, A. J. P. y Dive, D. Cloning and Expression of an Iron-Containing Superoxide Dismutase in the Parasitic Protist *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiology Letters*, **161**: 115- 123 (1998)

Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwell, A. D.; Clark, M. F. y Adams, A. N. The detection of Viruses by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Journal of General Virology*, **33**: 165-167 (1976)

Von Brand, T. *Biochemistry of Parasites* (Ed. Von Brand, T.), Academic Press (NY): 258- 262(1973)

Ward, J. F.; Blakely, W. F. y Joner, E. I. Mammalian Cells Are No Killed by DNA Single-Strand Breaks Caused by Hydroxyl Radicals from Hydrogen Peroxide. *Radiation Research*, **103**: 383- 392 (1985)

Wilkinson, S. R. y Kelly, J. M. The Role of Glutathione Peroxidases in Trypanosomatids. *Journal of Biological Chemistry*, **384**(4): 517-525 (2003)

Wilkinson, S. R.; Temperton, N. J.; Mondragon, A. y Kelly, J. M. Distinct Mitochondrial and Cytosolic Enzymes Mediate Trypanothione-Dependent Peroxide Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(11): 8220–8225 (2000)

Wilkinson, S. R.; Obado, S. O.; Mauricio, I. L.; Kelly, J. M. *Trypanosoma cruzi* Expresses a Plant-Like Ascorbate Dependent Haemoperoxidase Localized to the Endoplasmic Reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99**(21): 13453-13458 (2002b)

Wilkinson, S. R.; Meyer, D. J.; Taylor, M. C.; Bromley, E. V.; Miles, M. A. y Kelly, J. M. *Trypanosoma cruzi* Enzyme TcGPXI Is a Glycosomal Peroxidase and Can Be Linked to Trypanothione Reduction by Glutathione or Tryparedoxin. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(19): 17062-17071 (2002a)

Wilkinson, S. R.; Prathalingam, R.; Taylor, M. C.; Ahmed, A.; Horn, D. y Kelly, J. M. Functional Characterization of the Iron Superoxide Dismutase Gene Repertoire in *Trypanosoma brucei*. *Free Radical Biology and Medicine*, **40**: 198 – 209 (2006)

Yarlett, N., Lloyd, D y Williams, A. G. Respiration of the Rumen Ciliate *Dasytricha ruminantium*. *Biochemical Journal*, **206**: 259- 266 (1982)

Youn, H. D.; Kim, E.J.; Roe, J. H.; Hah, Y.C. y Kang, S. O. A Novel Nickel-Containing Superoxide Dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochemical Journal*, **318**: 889- 896 (1996)