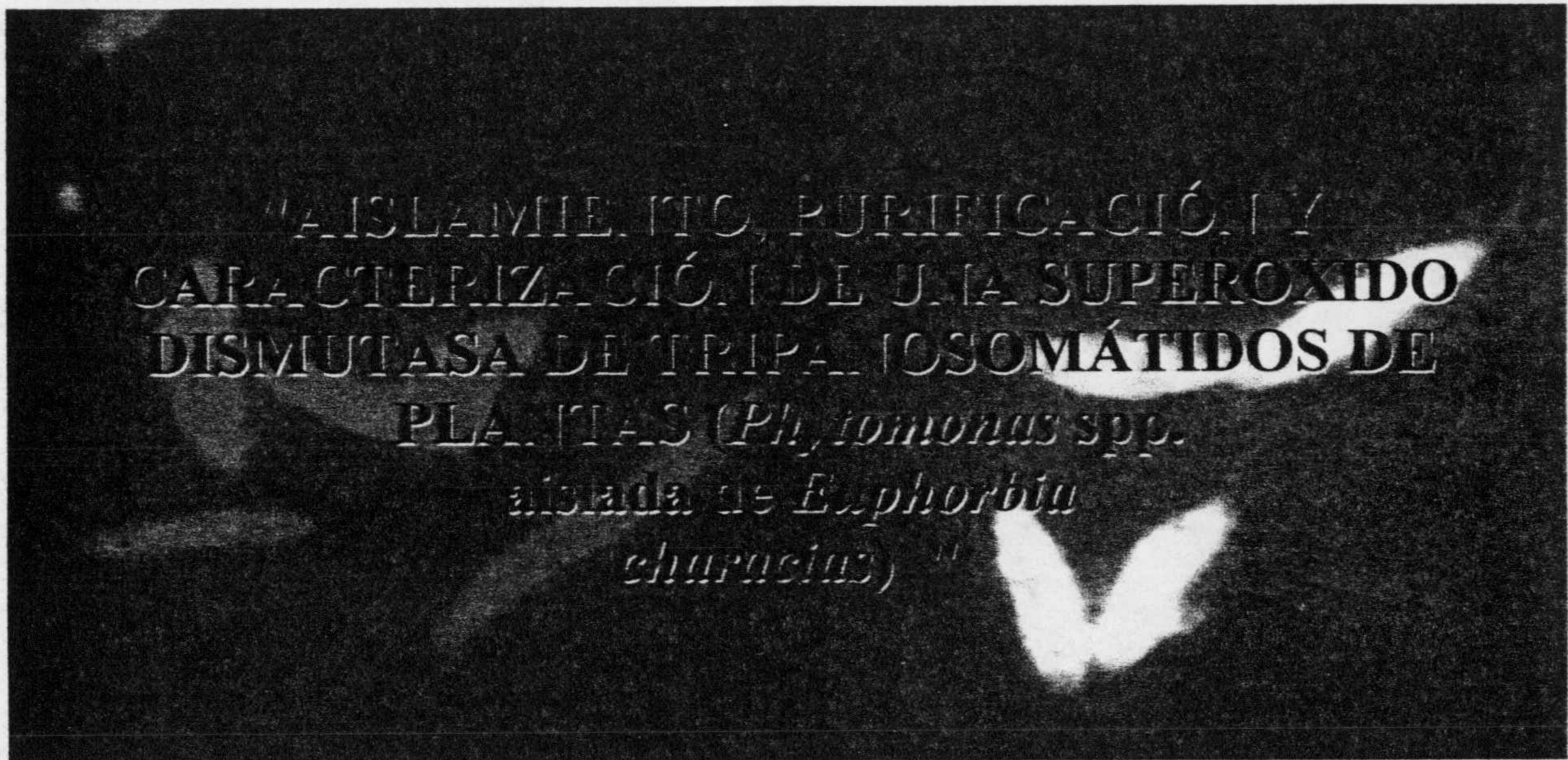


T 7/66



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ..11/3/03
ENTRADA NUM. ..2211

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA MOLECULAR
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**



BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 13658669
N.º Copia 15733282

Tesis

UNIVERSIDAD DE GRANADA
17 JUN. 2003
COMISION DE DOCTORADO

Clotilde Marín Sánchez

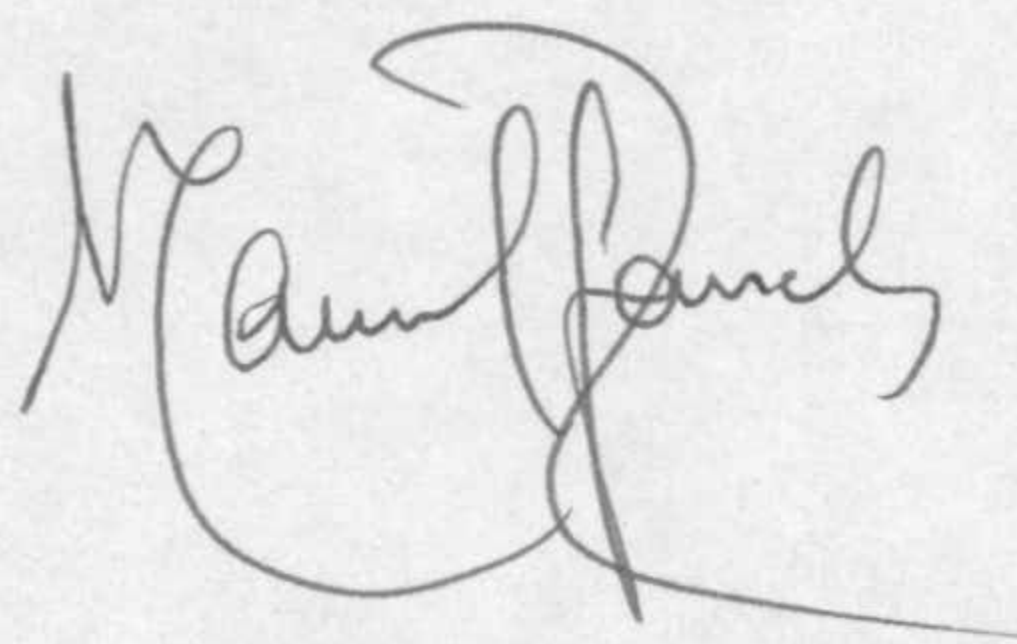
Granada, 2003

Los trabajos de investigación que se exponen en la presente memoria titulada "AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA SUPEROXIDO DISMUTASA DE TRIPANOSOMÁTIDOS DE PLANTAS (*Phytomonas* spp. aislada de *Euphorbiaceas*) ", han sido realizados en los laboratorios del Departamento de Parasitología en la Universidad de Granada, bajo la supervisión del Profesor Doctor D. Manuel Sánchez Moreno.

Granada, Junio 2003

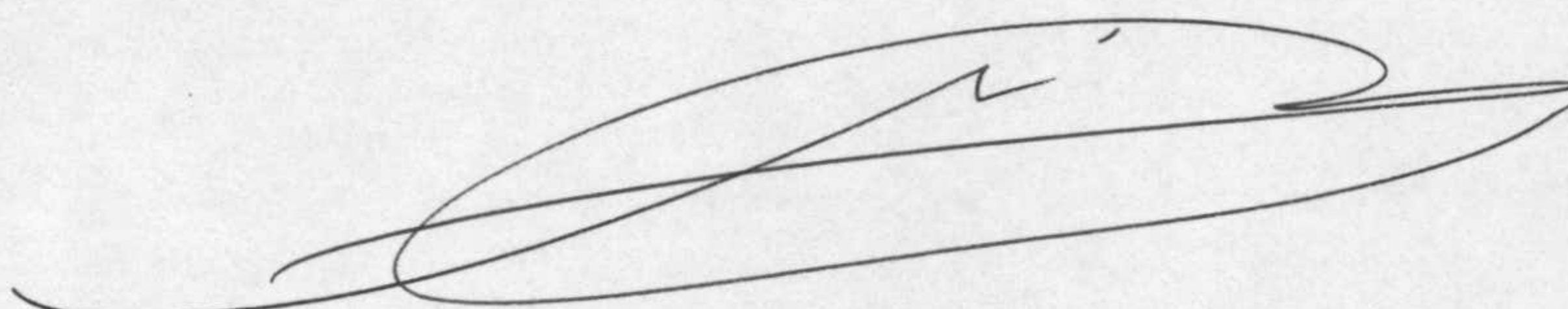
Tesis Doctoral presentada para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas, por Dña. Clotilde Marin Sanchez.

El director de la Tesis



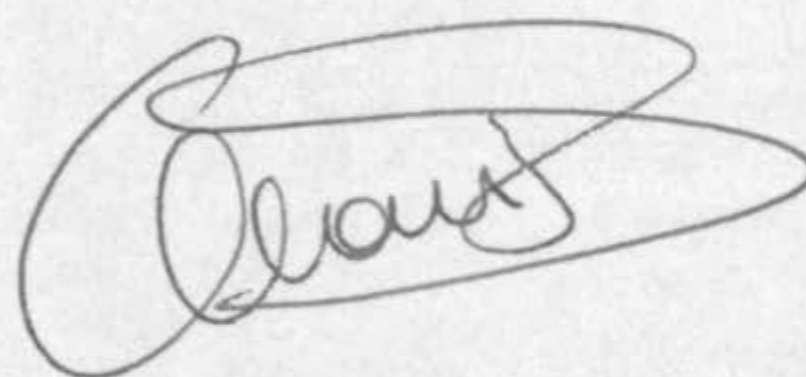
Fdo. Prof.Dr.D.
Manuel Sanchez Moreno

La tutora de la Tesis



Fdo. Prof.Dr.Dña.
Carmen Mascaró Lazcano

La licenciada

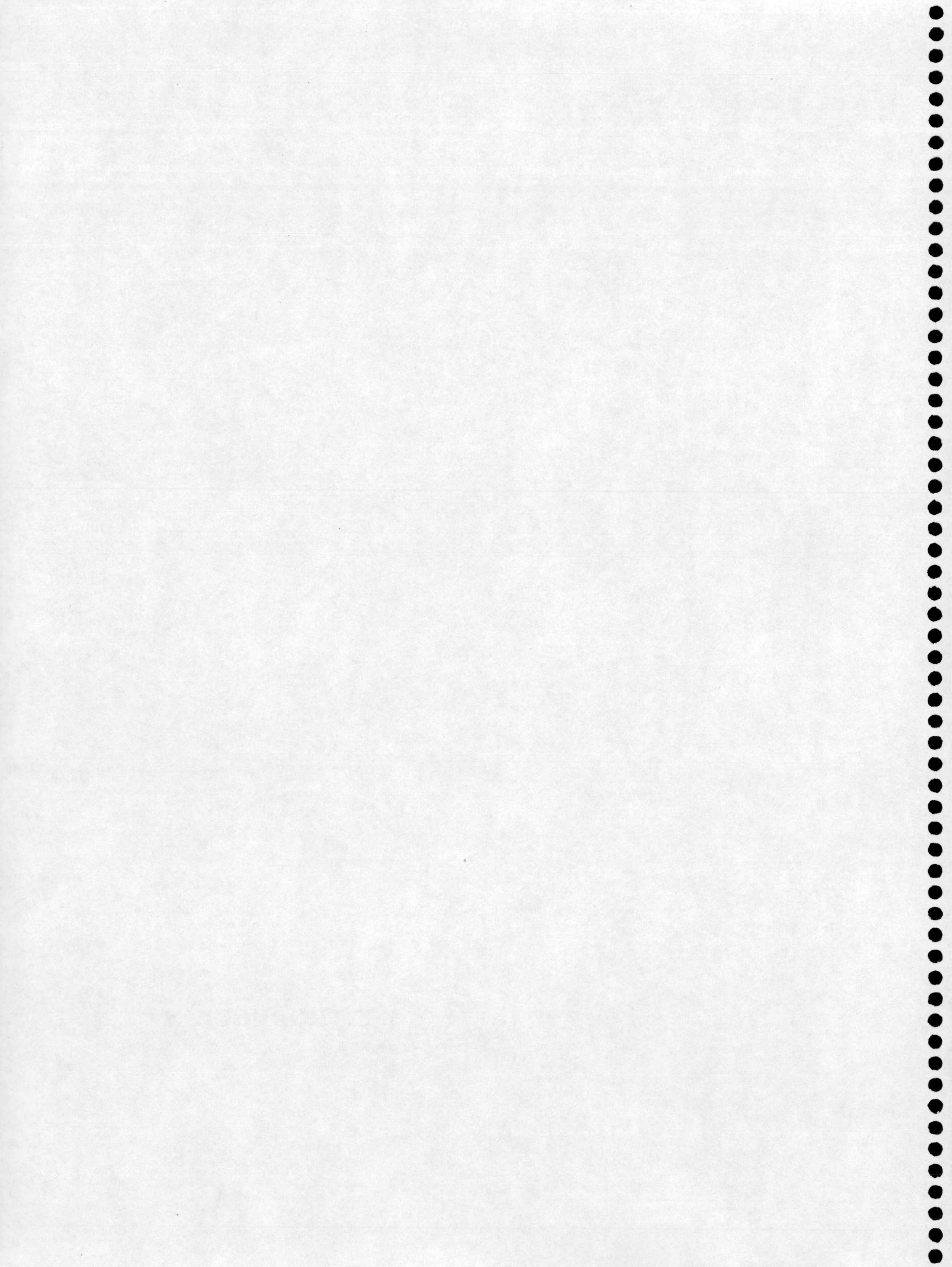


Fdo. Clotilde Marin Sanchez

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS.....	7
2. ANTECEDENTES	8
2.1. EL PARÁSITO.....	10
2.2. TAXONOMÍA Y NOMENCLATURA	11
2.3. MORFOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA	13
2.4. TRANSMISIÓN Y CICLO DE VIDA	14
2.4.1. Transmisión	14
2.4.2. Ciclo de Vida	17
2.4.3. Reservorios	18
2.5. PATOGENICIDAD	18
2.6. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	21
2.7. DIAGNÓSTICO	21
2.7.1. Detección de Flagelados en Plantas	21
2.7.2. Identificación de Género	22
2.7.3. Identificación de Cepas	23
2.8. TRATAMIENTO Y PROFILAXIS	24
2.9. EL CHOQUE OXIDANTE	25
2.9.1. Los Radicales Libres	26
2.9.2. La Toxicidad del Oxígeno en Protozoos	28
2.9.3. Especies Activas del Oxígeno en Protozoos	30
2.9.4. El Estrés Oxidativo	31
2.9.4.a. La peroxidación de los fosfolípidos de membrana	31
2.9.4.b. La desnaturalización de proteínas	31
2.9.4.c. La alteración de los ácidos nucleicos	32
2.9.5. Defensas Antioxidantes de los Protozoos frente a las EAO	33
2.9.5.a. Defensas antioxidantes no enzimáticas	33
2.9.5.b. Defensa antioxidantes enzimáticas	34
2.9.5.b.1. Catalasa (E.C.1.11.1.6)	34
2.9.5.b.2. Glutation Peroxidasa (E.C.1.11.1.9)	35
2.9.5.b.3. Superóxido dismutasa (E.C.1.15.1.1)	37
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	44
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CULTIVO CELULAR	45
3.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA	45
3.2.1. Preparación del Extracto Celular	45
3.2.2. Purificación de la SOD	46
3.2.2.a. Cromatografía de intercambio iónico	46
3.2.2.b. Cromatografía de filtrado	47
3.3. CUANTIFICACIÓN	
3.3.1. Cuantificación de la Concentración de Proteínas	47
3.3.2. Cuantificación de la Actividad Enzimática	48

3.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	49
3.4.1. Isoelectroenfoque (IEF)	49
3.4.2. Electroforesis Nativa	50
3.4.3. Revelado de la Actividad SOD en Geles	50
3.4.4. Tinción de Proteínas en Geles	51
3.5. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LA SOD	51
3.5.1. Determinación del Peso Molecular	51
3.5.2. Determinación del pI	51
3.5.3. Determinación del Cofactor Metálico	52
3.5.4. Efecto de la Temperatura en la Conservación de la Actividad SOD	52
3.6. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	53
3.7. INMUNOGENICIDAD DE LA SOD	55
3.7.1. Producción de Anticuerpos policlonales.....	55
3.7.1.a. Inmunización de ratones Balb-C	55
3.7.2. Ensayos de los Sueros anti-SODI y anti-SODII	56
3.7.3. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	58
3.7.4. Inmunocitoquímica bajo Microscopía Electrónica de Transmisión: Localización de la SOD con el suero Policlonal de ratón anti-SOD	58
3.7.5. Ensayo de ELISA (<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay)	58
4. RESULTADOS.....	61
4.1. PURIFICACIÓN DE LAS DOS ISOENZIMAS SOD DE <i>Phytomonas</i> aislada de <i>E.characias</i>	62
4.2. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA SODI Y DE LA SODII	65
4.3. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO DE LA SODI Y DE LA SODII	66
4.4. DETERMINACIÓN DEL COFACTOR METÁLICO	67
4.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CONSERVACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOD	67
4.6. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA SOD	69
4.7. INMUNOGENICIDAD DE LA SOD	71
5. DISCUSIÓN	78
6. CONCLUSIONES	89
7. BIBLIOGRAFÍA	92

1. INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN.

Los Tripanosomátidos representan uno de los mayores problemas en casi todos los países del mundo, tanto para las autoridades médicas como para las fitosanitarias, ya que son fuentes principales de morbilidad, mortalidad y perjuicio económico. Son responsables de importantes afecciones o enfermedades que afectan tanto a los seres humanos, como a los animales y a las plantas (Oliveira, 2000). Es conocido que numerosas plantas pueden ser parasitadas por miembros de la familia *Trypanosomatidae*, y más concretamente, por especies pertenecientes al género *Phytomonas* (Dollet, 1984). En cultivos tales como cafetal, cocotero, mandioca y palma aceitera, la infección por *Phytomonas* pueden tener consecuencias devastadoras (Camargo, 1999). Estas infecciones no solamente ocasionan pérdidas económicas, sino que conllevan implicaciones ecológicas importantes, debido a la necesidad de tratamiento intensivo de los cultivos con insecticidas, ante la ausencia de un tratamiento eficaz de esta parasitosis.

Es evidente, sin embargo, que aunque la presencia del parásito en la planta no implique necesariamente una patogenicidad, al establecerse una dependencia metabólica ello ocasionará un deterioro o perjuicio al hospedador (Catarino y col., 2001; Dollet, 2001). Tal es así que las *Phytomonas* están incluidas hoy día, dentro de los organismos patógenos de plantas descritos en España en una reciente publicación del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (de Andrés y col., 2000).

En las enfermedades infecciosas, el agente patógeno puede ser buscado al menos en tres tipos de hospedadores: hospedadores definitivos que sufre el daño causado por el agente infeccioso, el vector –un insecto como en el caso que nos interesa- y el o los reservorios naturales.

La detección y la identificación de tripanosomas en estos distintos tipos de hospedadores es un elemento esencial en la evaluación de situaciones epidemiológicas, en el seguimiento del impacto de las campañas de lucha, en la ayuda a las decisiones terapéuticas y profilácticas. Aunque es un problema complicado, ya que tanto en los reservorios, como en los vectores, el Tripanosomátido incriminado en la patología estudiada puede coexistir con uno o muchos otros Tripanosomátidos, morfológicamente no distinguibles y muy cercanos a los incriminados. En el vector, por ejemplo, existen Tripanosomátidos llamados “de insectos” pero que también los podemos encontrar en otros hospedadores biológicamente alejados (Batistoti y col., 2001 y Polipaev, 2001).

En este sentido, los insectos vectores de tripanosomas de plantas pueden contener *Herpetomonas*, *Leptomonas* y *Crithidia*, tres tipos considerados hasta hace 10 años como específicos de insectos, pero que ahora sabemos que se pueden multiplicar en frutas y semillas. De hecho, los Tripanosomátidos de plantas (denominados de forma genérica como *Phytomonas*) tienen una morfología idéntica a la de otros tripanosomas de insectos.

Por ello la caracterización en el insecto vector y también la taxonomía y el reconocimiento de estos Tripanosomátidos de insectos y/o de plantas, genera serios problemas. En todos los casos, **el estudio de la circulación de parásitos, la presión ejercida por los vectores y también la demostración de la infección en los hospedadores, requiere por lo tanto de una identificación precisa de los Tripanosomátidos.**

La descripción de nuevas especies de Tripanosomátidos ha estado basada tradicionalmente en sus características morfológicas y en el hospedador. Hoy día, estos criterios se consideran insuficientes para la clasificación lo que ha llevado a los investigadores a la utilización de otros parámetros, con el fin de identificar a estos protozoos. Y parece ser que solo las técnicas moleculares pueden darnos una respuesta satisfactoria.

En los últimos años nuestro grupo ha puesto a punto diferentes técnicas de caracterización bioquímica y molecular, para abordar el estudio de la identificación y diagnóstico de los tripanosomas de plantas (*Phytomonas spp.*): aglutinación por lectinas (Sánchez-Moreno y col., 1995 a y b); perfiles isoenzimáticos (Muller y col., 1997; Fernández-Becerra y col., 1996 y Fernández-Ramos y col., 1999), estudio del ADN del kinetoplasto y ARN ribosomal (Fernández-Becerra y col., 1996, Sánchez-Moreno y col., 1998 y Dollet y col., 2000).

Diferentes experimentos, nos han permitido identificar **marcadores específicos**, que pueden ser de una gran utilidad en la clasificación y diferenciación del género *Phytomonas*.

Sabemos que la presencia de un patógeno en un hospedador desencadena en éste una serie de mecanismos encaminados a eliminarlo. Entre estos mecanismos de defensa se encuentran procesos altamente conservados en la cadena evolutiva, como son la producción de radicales libres, altamente inestables y reactivos, capaces de alterar la integridad de las membranas o, la de los ácidos nucleicos de los patógenos (Docampo, 1990).

Estos organismos han desarrollado mecanismos detoxificantes de alta eficacia a fin de poder adaptarse a su hospedador. Entre estos mecanismos se encuentran una serie de enzimas (catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, etc) que actúan como potentes detoxificantes. Los Tripanosomátidos, al igual que otros patógenos, poseen mecanismos enzimáticos detoxificadores de radicales de oxígeno, aunque debemos destacar que en general carecen de una enzima crucial como es la catalasa, si exceptuamos a *Crithidia luculiae* y, según nuestros datos, en algunos flagelados aislados de plantas. No obstante, los niveles de catalasa detectada en *Phytomonas* son muy bajos (Sánchez-Moreno y col., 1992). Los Tripanosomátidos presentan otros sistemas alternativos detoxificantes de radicales libres entre los que se encuentra la SOD (Quesada y col., 2001).

Las enzimas superóxido dismutasas (SOD; EC 1.15.1.1) son la primera línea de defensa contra el tóxico radical superóxido (O_2^-). La verdadera función de la SOD (dismutación de O_2^- a H_2O_2 y O_2) fue descubierta por McCord y Fridovich en 1969. La SOD se encuentra en todos los organismos consumidores de oxígeno, anaerobios aero-tolerantes, y algunos anaerobios obligados (Fridovich., 1986). Delecciones o mutaciones en los genes de la SOD puede conducir a graves desordenes biológicos (Qurollo y col., 2001).

Las enzimas superóxido dismutasa (SODs) que aparentemente son ubicuas en todos los organismos, son una de las familias enzimáticas más estudiadas en la naturaleza, habiéndose examinado en diferentes especies desde bacterias a humanos, conociéndose sus funciones defensivas desde los procariotas más rudimentarios hasta su implicación en la degeneración del cerebro humano.

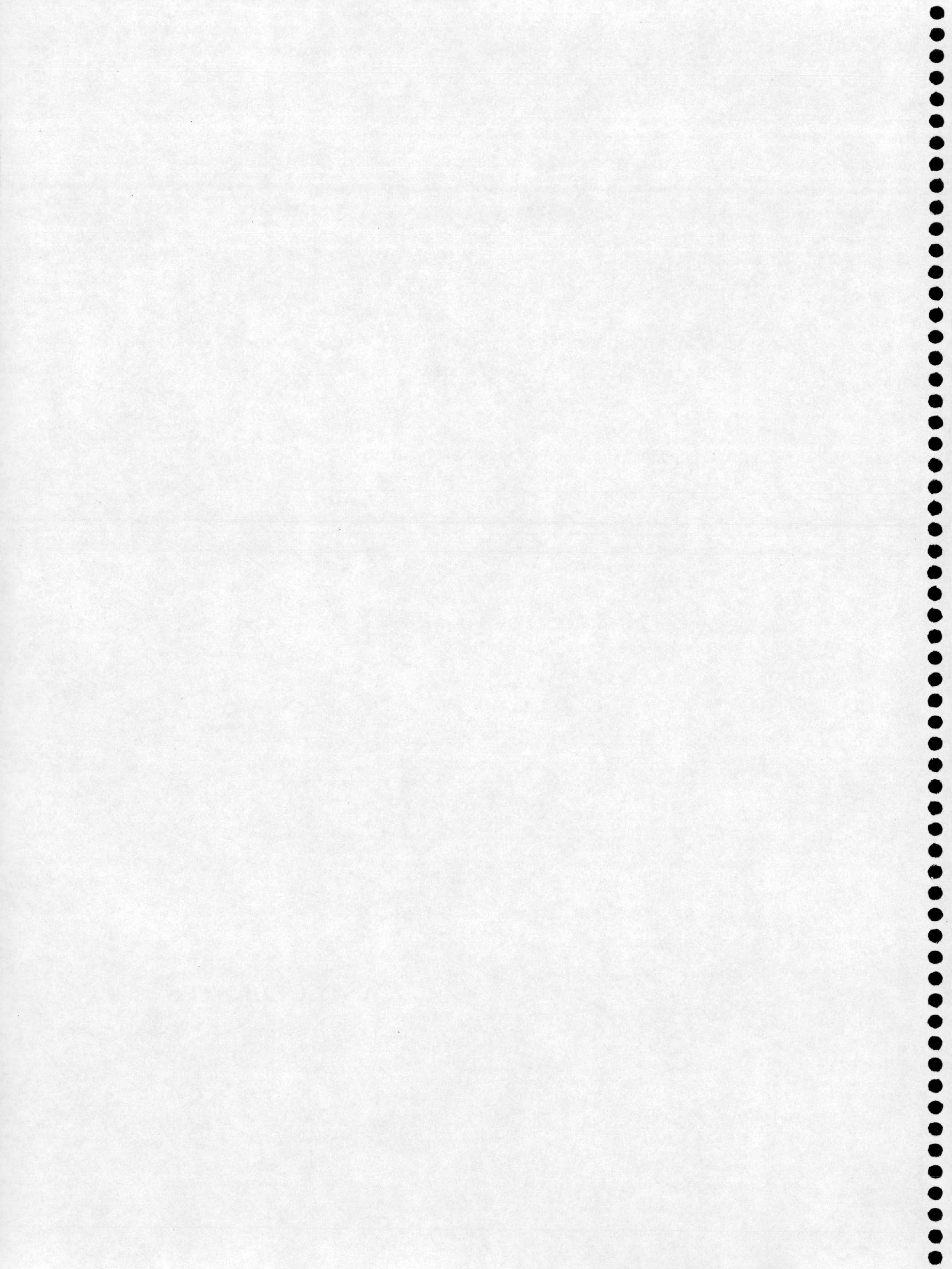
Se han detectado actividades SODs en las principales especies pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, en *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei brucei*, en varias especies del género *Leishmania*, en algunos Tripanosomatidos inferiores y por nosotros, en tripanosomas de plantas, aunque muy pocas, y ninguna, en el caso de *Phytomonas* spp. han sido caracterizadas a nivel bioquímico. **La caracterización exhaustiva a nivel bioquímico y molecular de la SOD, así como el desarrollo de técnicas para la valoración de inhibidores se hacen necesarias para abrir nuevas vías de lucha frente a estos patógenos.**

Las SODs de protozoos parásitos han sido consideradas como factores de virulencia que protegen a los parásitos del ataque de los efectos de las células hospedadoras por la actuación tanto de agentes oxidantes como anti-inflamatorios. Con la excepción de *Acantamoeba castellanii*, que posee dos isoformas de SOD, FeSOD y CuZnSOD, todos los demás protozoos parásitos hasta ahora investigados, sólo poseen FeSOD. Además los mamíferos tienen CuZnSOD y MnSOD pero no FeSOD, **FeSOD puede ser una diana excepcional para el diseño de agentes quimioterápicos específicos frente a estas parasitosis.**

1.1. OBJETIVOS.

Por todo lo anteriormente expuesto, el **objetivo principal** de esta memoria ha sido **caracterizar a nivel bioquímico y molecular** a las SODs de Tripanosomátidos de plantas, utilizando para ello como muestra biológica *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias*. Con la idea de elaborar una herramienta molecular que nos permita **identificar, diagnosticar y nombrar** con certeza a estos Tripanosomátidos, así como abrir nuevas **vías de lucha** frente a estos protozoos parásitos de plantas.

2. ANTECEDENTES



2. ANTECEDENTES

2.1. EL PARÁSITO

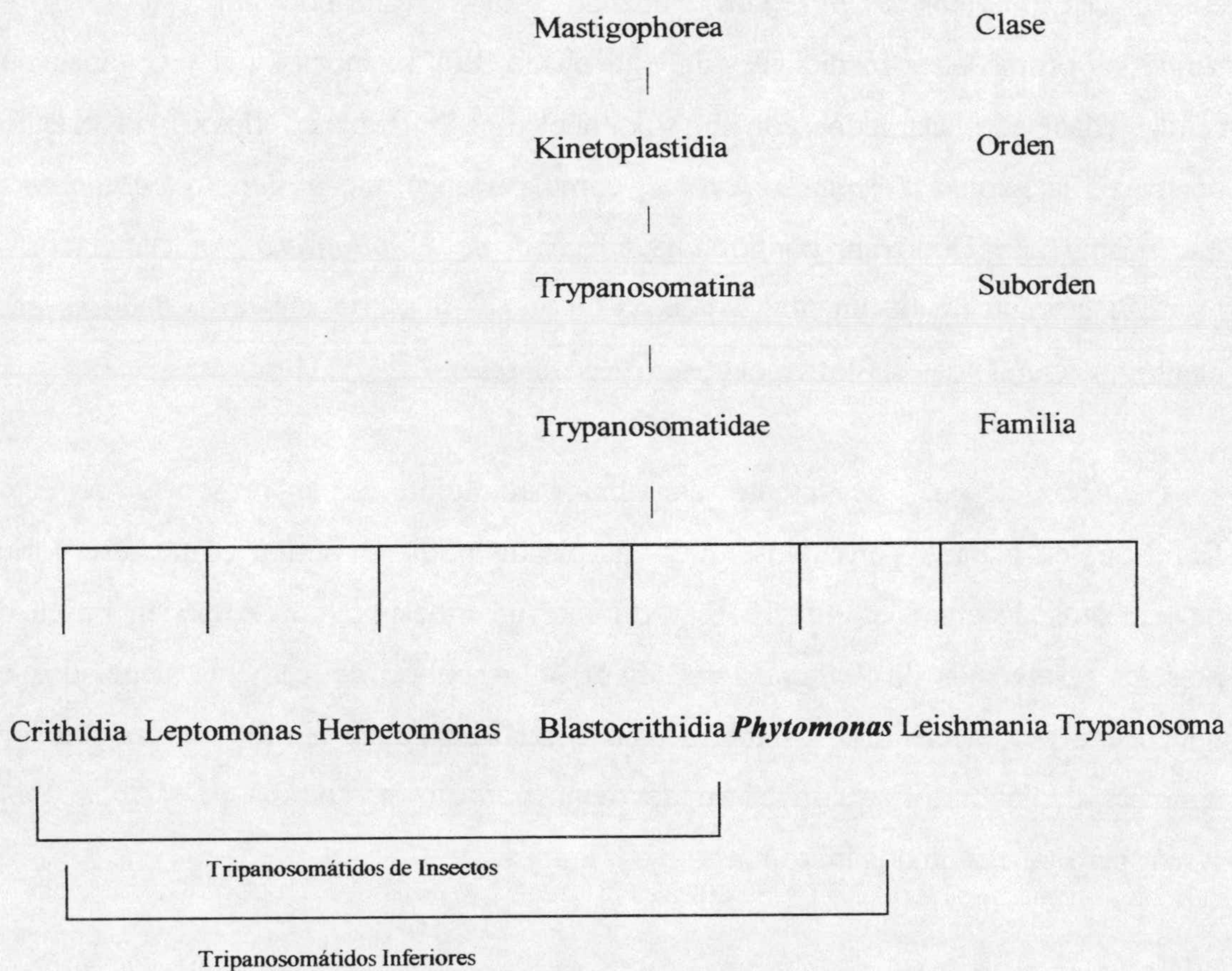
En 1909, Lafont descubrió un protozoo flagelado en el látex de una euforbiácea (*Euphorbia pilulífera*), cuando estaba realizando un estudio sobre supuestas propiedades medicinales de esta planta. Por su morfología y organización celular (flagelado, alargado, con un solo núcleo y kinetoplasto típico), lo clasificó dentro de la Familia *Trypanosomatidae*, como perteneciente al género *Leptomonas*. Ese mismo año Donovan, confirmó la infección de *E. pilulífera* por flagelados y, propuso la creación de un nuevo género en atención a que sus hospedadores eran plantas, naciendo de esta forma el género *Phytomonas*.

Años después se intentó dar una explicación de la presencia de estos flagelados en plantas, pensándose que, las plantas pudiesen actuar como reservorios de parásitos de animales. En 1916, y durante un muestreo de campo en busca de posibles reservorios de *Tripanosoma vivax*, se descubrió nuevamente flagelados en una planta perteneciente a la Familia *Asclepiadáceas*. Este aislado fue inoculado a animales de laboratorio, con el fin de demostrar que se trataba de *Tripanosoma vivax*, pero los resultados fueron negativos (Franca, 1920).

En los años siguientes a estos descubrimientos, aparecieron diversos artículos que denunciaban la presencia de Tripanosomátidos en plantas laticíferas, principalmente en zonas tropicales de todo el mundo, pero no atrajeron demasiado la atención de los investigadores. Y no fue hasta 1976, cuando realmente *Phytomonas* llamó la atención de los especialistas, con el descubrimiento y asociación de estos organismos a dos enfermedades de la palmera: la enfermedad de Hartrot en el cocotero y la "marchitez" en la palmera aceitera (Parthasarathy y col., 1976 y Dollet y col., 1977).

2.2. TAXONOMÍA Y NOMENCLATURA

Debido a su morfología y características ultraestructurales, los protozoos de plantas se clasifican según Molyneux y Ashord (1983):



Siguiendo esta clasificación *Phytomonas* se incluye dentro del denominado grupo de Tripanosomátidos inferiores, que agrupa a los tripanosomas monogénicos de insectos, a pesar de que, este género se ha demostrado que es digenético: se transmiten y se multiplican en hemipteros. (Camargo y Wallace, 1994 y Vickerman, 1994).

Este grupo se creó para diferenciarlos de los denominados Tripanosomátidos mayores (género *Trypanosoma* y *Leishmania*), debido a que se pensaba que evolutivamente este segundo grupo era más reciente, a pesar de que provenían de los flagelados monogenéticos. El empleo de técnicas moleculares han permitido confirmar que evolutivamente los más antiguos son, en primer lugar el *Trypanosoma* (tanto la especie africana como americana), *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Phytomonas*, *Leptomonas*, *Crithidia* y *Leishmania*, constituiría la copa del árbol evolutivo (Fernandes y col., 1993; Maslov y col., 1996).

La diferenciación entre *Phytomonas* y kinetoplástidos monogenéticos de insectos empezó en los años 1980s tras el cultivo "in vitro" de flagelados de látex obtenido por Dollet y col. (1982). El primer estudio comparativo que se hizo fue sobre el ciclo ornitina-arginina, que ya había sido bien estudiado en Tripanosomátidos de insectos. Los flagelados de látex, a diferencia de *Crithidia* y la mayoría de las especies de *Leptomonas* no contienen arginasa, algo que comparten con *Herpetomonas* (Camargo y col., 1987). Aunque más tarde, se encontró arginasa en algunos Tripanosomátidos aislados de frutos (Almeida y col., 1992). Posteriormente, se han venido utilizando anticuerpos monoclonales, aglutinación por lectinas, y perfiles isoenzimáticos, para esta diferenciación (Petry y col., 1987; Vainstein y col., 1987; Teixeira y Camargo, 1989; Guerrini y col., 1992; Muller y col., 1994; Sánchez-Moreno y col., 1995 a y b; Fernández-Becerra y col., 1996 y 1997; Uttaro y col., 1997; Fernández-Ramos y col., 1999 y Marín y col., 2000). Otros marcadores moleculares como: estudios del ADN del kinetoplasto (Fernández-Becerra y col., 1996), el perfil de restricción de genes ribosomales (Marché y col., 1995) están siendo utilizados.

Estudios sobre Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) clasifican a los Tripanosomátidos de plantas en seis grupos (Serrano y col., 1999a). Otro estudio sería el de las regiones transcritas del gene del mini-exón, que permiten diferenciar *Phytomonas* de Tripanosomátidos de insectos (Serrano y col., 1999 b y

c) y la secuencia de ADN de la región del espaciador que no se transcriben, nos permiten distinguir entre los aislados de floema, látex y fruto (Sturn y col., 1995). Según Dollet y col. (2000), el género *Phytomonas* contemplaría al menos ocho grupos de Tripanosomátidos de plantas (A,B,C,D,E, F,G,H,I), de los que cinco coincidirían con los definidos por los estudios de RAPD. El grupo H englobaría a los aislados intrafloemáticos, los grupos B,D,F,G e I incluirían a los aislados de látex, y en el grupo E los aislados de fruto; mientras que en los otros grupos (A y C) habría mezcla de aislados de látex y fruto.

A pesar de todos estos intentos y a la espera de una mayor información sobre su identificación, la clasificación de todo nuevo aislamiento de *Phytomonas* debe seguir la fórmula: Planta o vector/Familia y Género/País de aislamiento/Año de aislamiento/Inicial del autor, denominándose a todos ellos como *Phytomonas* spp. (Dollet, 1984; Attias y col., 1986; Dollet y Wallace, 1987; Kastelein, 1988; Conchon y col., 1989, Jankevicius y col., 1989 y Dollet, 1994).

2.3. MORFOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA.

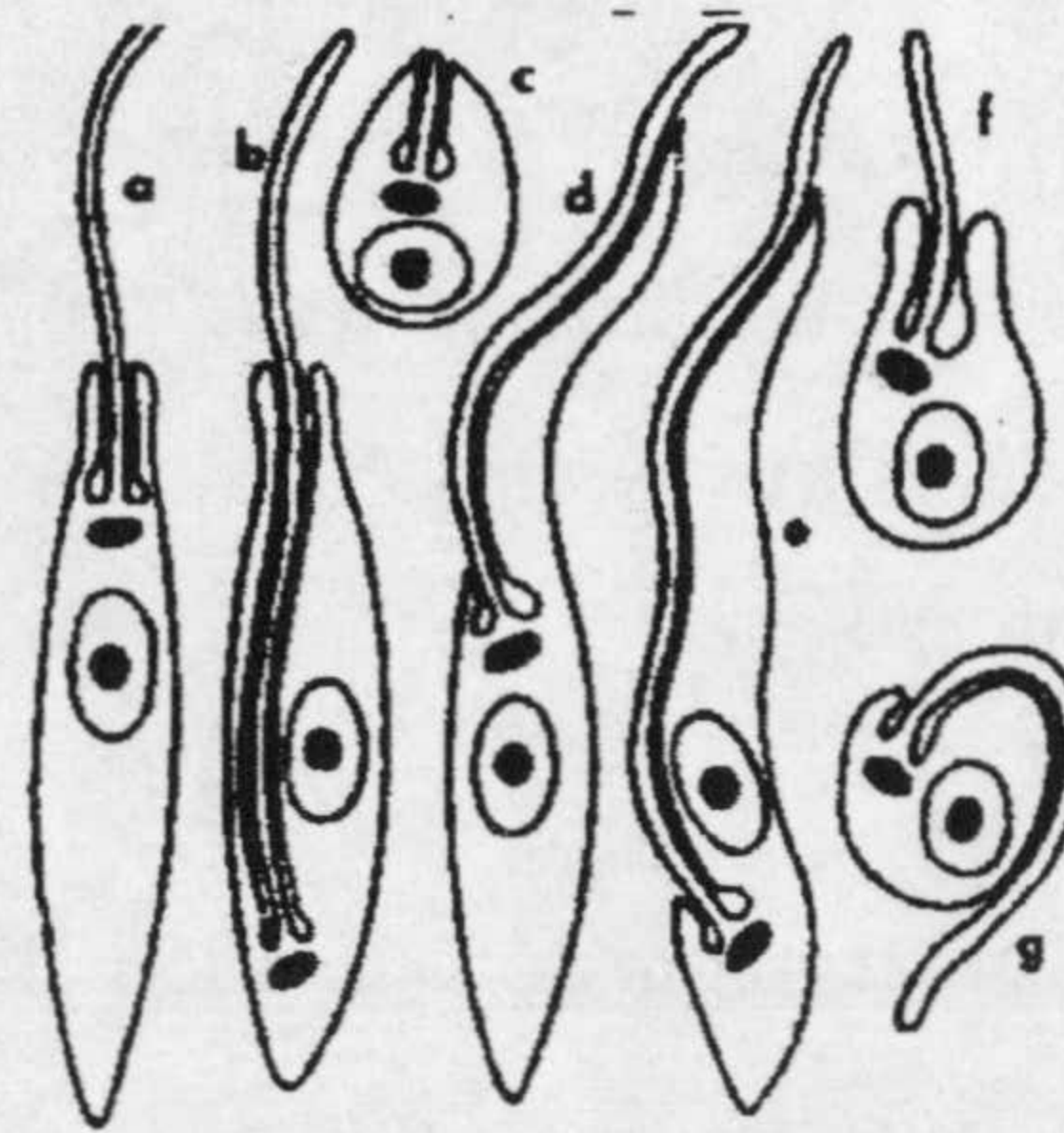
A microscopía electrónica de barrido se observa que la población de cada aislado de *Phytomonas* varía en el flagelo y longitud del cuerpo. La forma predominante en los cultivos “in vitro” es la promastigote, que tiene forma fusiforme pudiendo exhibir forma delgada o “slender”, torsionada hasta dos o tres veces alrededor de su eje longitudinal.

A microscopio óptico se aprecia que son muy activos al ondular el flagelo con leves contorsiones del cuerpo y, con multiplicación binaria (Sánchez Moreno y col. 1995a). Igualmente se han visto formas aflageladas con o sin torsiones, lo mismo que esféricas con o sin flagelo, esferomastigotes y amastigotes, respectivamente; encontrándose normalmente estas formas en el látex de las plantas, mientras, que en los frutos predominan las formas

promastigotes y en menor número formas aflageladas (Sánchez-Moreno y col., 1995a y b).

Morfología de *Phytomonas*

- a- promastigote
- b- opisthomastigote
- c- amastigote
- d- epimastigote
- e- tripanomastigote
- f- coanomastigote
- g- esferomastigotes



A microscopía electrónica de transmisión , los cortes muestran que *Phytomonas* tienen una ultraestructura típica de Tripanosomátidos, esto es, un citoesqueleto, una bolsa flagelar, un núcleo que posee un gran nucleolo central, así como un citoplasma rico en ribosomas, retículo endoplásmico y vacuolas lipídicas. Destaca una **mitocondria** única; generalmente ramificada y extendida desde un extremo al otro de la célula y con un kinetoplasto, que es una masa de ADN mitocondrial, localizado próximo a la base del aparato flagelar. Así como unos orgánulos citoplasmáticos delimitados por una membrana: **glicosomas**, que contienen enzimas glucolíticas.

2.4. TRANSMISIÓN Y CICLO DE VIDA.

2.4.1. Transmisión.

Su transmisión y ciclo de vida son algunos de los aspectos que aún hoy día no se conocen bien. En la transmisión de estos organismos parece que están

implicados distintos insectos, como vía natural de difusión, que varían dependiendo del tipo de planta parasitada y la localización geográfica de la misma. Los insectos implicados en la transmisión en plantas laticíferas son todos *Heterópteros* de las familias *Lygaeidae* y *Coreidae* (Dollet, 1984; Camargo y Wallace, 1994), solo un miembro de la familia *Pentatomidae* (*Edessa loxdali*) ha sido reconocido como vector de *Phytomonas* que parasitan a la planta laticífera *Cecropia palmata* (Kastelein, 1985).

La transmisión de los flagelados floemáticos ha sido más difícil de concluir por las dificultades operacionales de cercar las plantas y por el largo periodo de observación necesario, ya que puede tardar varios meses desde que aparecen los primeros síntomas de la enfermedad hasta que se desarrolla totalmente. A pesar de ello, ha sido posible demostrar que especies de insectos pentatómidos pertenecientes al género *Lincus* eran los responsables de la transmisión de las enfermedades de las palmas (**Hartrot en el cocotero** y **Marchitez en la palma aceitera**) (Perthuis y col., 1985; Louise y col., 1986; Rezende y col., 1986). Desmier de Chenon en 1984, encontraron chinches sobre palmeras aceiteras (*Elaeis guineensis*) en Ecuador, y aunque aparentemente estaban sanas, los árboles infectados comenzaban a enfermar después de 2 ó 3 meses; e incluso los árboles alejados del foco de infección, terminaban enfermando, al estar expuestos a las chinches procedentes de árboles afectados. Sin embargo, adultos de *Lincus* sp. infectados experimentalmente con flagelados de coco cultivados "in vitro" no transmitieron la infección a palmas jóvenes, aunque tenían flagelados en su intestino nunca aparecieron en las glándulas salivares (Dollet y col., 1997). La transmisión de la infección a los árboles cassava permanece aún sin resolver, mientras que para los árboles del café Stahel en 1954 demostró que el responsable era *Lincus* sp..

En el caso de la transmisión en los frutos, como *P. serpens* que afecta al tomate, parece que los vectores implicados son: los pentatómidos *Nezera viridula*

(demostrado por Gibbs en 1957 en el sur de Africa) y *Arvelius albopunctatus* y un miembro de la familia Coreidae (*Phthia picta*) responsable de transmitir la infección de los tomates en Brasil (Teixeira y col., 2000). En el sur de España el vector de los Trypanosomátidos del tomate, mango y chirimoyo es por el momento desconocido (Sánchez Moreno y col., 1995b).

Aunque existe una cierta controversia en las cuestiones relacionadas con los vectores y la transmisión de los mismos, parece evidente que al igual que ocurre con los tripanosomas parásitos de animales, los de plantas son transmitidos por insectos. En algunos casos, se ha demostrado que tienen un ciclo de vida heteroxeno y lo más probable es que el vector sea un hemíptero fitófago, ya que los miembros de este grupo de insectos poseen un aparato digestivo muy bien adaptado a ingesta acuosas, lo que implica que su saliva podría ser un buen medio para la transmisión de estos Tripanosomátidos. Así la localización de estos en la planta puede estar condicionada por los hábitos alimentarios del vector (Momen, 2001 y Maslov y col., 2001).

Las especies de insectos mencionadas anteriormente e implicadas en esta transmisión no existen en el continente europeo, lo que indica que los vectores en el área mediterránea deben ser otras especies. Se sabe que en ausencia de vectores cíclicos, algunos tripanosomas de animales han sabido establecerse en un lugar determinado (Ventura y col., 1996). Diferentes observaciones nos hacen pensar en la posibilidad de que en el área mediterránea los protozoos parásitos de plantas pudieran ser transmitidos por insectos de hábitos fitófagos como los machos del género *Phlebotomus*, que se alimentan de jugos vegetales. Estos insectos Nematóceros son endémicos de la región mediterránea, lo que haría que la distribución de la leishmaniosis en España y la infección por *Phytomonas* geográficamente coincidan.

2.4.2. Ciclo de Vida.

El ciclo de vida de *Phytomonas* ha sido descrito al menos en seis ocasiones: Franca (1920) describió el ciclo de *P. davidi* en *Euphorbia peplus* y en el insecto *Stenocephalus agilis*; Holmes (1930) y McGhee y Hanson (1964) describieron el ciclo de *P. elmassiani* en el látex de *Asclepias*, y en el insecto *Oncopeltus fasciatus*; Vickerman (1962) describió el de *P. elmassiani* en *Pergularia extensa* (Aclepiadaceae) y en *Oncopeltus famelicus*; Dollet y colaboradores (1982) publicaron el ciclo entre *E. pinea* y *Dicranocephalus* (se refiere al anterior *Stenocephalus*), y Jankevicius y cols. (1989) el ciclo de *P. serpens* en el tomate con la chinche *Phthia picta*.

Se sabe que en su ciclo de vida, estos parásitos tienen, al menos, dos etapas: una primera en la planta y una segunda en el insecto. Cuando el parásito se encuentra en la planta, suele presentar una forma típica promastigote con el cuerpo torsionado y con un largo flagelo, aunque también se han visto formas promastigotes sin el cuerpo torsionado y con o sin flagelo. Igualmente se han detectado formas amastigotas, aunque por el momento desconocemos si el parásito tiene una fase intracelular dentro de la planta y su significado.

En el insecto y en infestaciones experimentales, a los cuatro días, se encuentran en el píloro formas similares a la de las plantas, pero no se ha observado división de estas formas. A partir del sexto día, se ve un aumento de la longitud de los organismos. Y hacia el décimo día, se observan en el píloro y hemocele del insecto, formas gigantes de hasta 80 μm en longitud. Tras dos semanas, estas formas gigantes aparecen en las glándulas salivales y después de 20 días pueden observarse formas más pequeñas. A partir de los 26 días, solo se observan las formas pequeñas, con un cuerpo alargado y con un corto flagelo, siendo aproximadamente del mismo tamaño que aquellas que aparecen en las plantas. La ruta de migración hacia el hemocele y las glándulas, aún no ha sido determinada (Jankevicius y col., 1989),

pero, por nuestra propia experiencia, sabemos que estos parásitos son capaces de entrar dentro de las células y parece ser que en el interior son capaces de multiplicarse.

2.4.3. Reservorios

En plantaciones de palma afectadas por *Phytomonas* también, se han encontrado a los parásitos en las plantas herbáceas silvestres circundantes a los cultivos, sugiriendo que estas pueden actuar como reservorios del parásito. En este sentido, hemos detectado la presencia de flagelados en tallos de trébol y amaranto, localizados en las cercanías de los árboles de *Annona cherimola* afectados. El análisis de los tres aislados, el de trébol, amaranto y de chirimoya, demostró que eran similares. Esto nos hace pensar que existen plantas que pudieran servir como reservorios de los parásitos, lo que es de gran interés a la hora de tomar medidas preventivas para el control de estas afecciones (Sánchez-Moreno y col., 1998 y Marín y col., 2000).

2.5. PATOGENICIDAD.

Desde el mismo descubrimiento de *Phytomonas* persiste la controversia en relación con su patogenicidad en plantas laticíferas, aceptándose en un principio que no producían daños en la mayoría de las plantas (Holmes, 1925; Rodhain y Bequaert, 1911), pero más tarde se demostró que en algunas otras plantas de importancia económica, como el café, mandioca, cocotero y palmera aceitera, la infección tenía consecuencias devastadoras (Camargo y cols., 1990).

La clasificación de las diferentes afecciones de plantas originadas por *Phytomonas* spp. se viene haciendo en base al lugar de la planta en la que se encuentre el flagelado (látex, floema o frutos).

Las plantas laticíferas padecen (*Euphorbia lasiocarpa*) una defoliación y una deformación asociada a la presencia de *Phytomonas* en el xilema y espacios intercelulares; la **enfermedad de la mandioca** por la infección de *Phytomonas francai* produce clorosis de las partes aéreas de la planta, y una atrofia de las raíces (Franca, 1914; Aragão, 1927; Kitajima y col., 1986). Los flagelados son abundantes en el látex de plantas enfermas, y se observa una acusada disminución de la concentración de almidón. La acción patógena en Euphorbiaceas sólo se podrá establecer tras obtener un cultivo puro de *Phytomonas* y demostrar que se cumplen los postulados de Koch, y aún no se sabe si se trata de una enfermedad o de una senescencia, ya que, el efecto que se ha observado es la disminución del tamaño de los tubérculos (Dollet y col., 1982).

En plantas parasitadas en el floema, los primeros informes vienen de Surinan, de Colombia, de las Guayanas, y del Norte de Brasil; y las patologías que producen son: **Necrosis del floema del café** causada por *P. leptosporum* afectando a la planta *Coffea liberica*, y también *C. arábica*, *C. excelsa*, *C. stenophylla* y *C. abeocutae*, se ha visto que afectan las reservas de almidón (Stahel, 1931a y b), una deposición de callosa en el tamiz de los tubos y necrosis posterior. Esta enfermedad tiene dos formas, una aguda y otra crónica, ésta última es la más frecuente, comienza con el amarilleamiento de las hojas más viejas muriendo prematuramente, y las hojas jóvenes son menos y más pequeñas que en un árbol sano, así las ramas quedan desnudas y tras 3 o 12 meses muere el árbol (el desarrollo y sintomatología pueden cambiar según la variedad). En la forma aguda sólo las hojas más viejas mueren y las otras palidecen, pierden turgencia y no todas caen, tras 2 o 3 semanas después ennegrecen y se necrosan. En ambas formas la raíz se oscurece y muere. Los árboles de café parecen escapar de la infección antes de la edad de dos años, por lo que, sólo los árboles bien desarrollados parecen propensos a la enfermedad.

Otra enfermedad es la que afecta a las palmeras aceiteras: **Marchitez**

sorpresiva (Dollet y col., 1977), y al cocotero: **Hartrot** o pudrición del cogollo (Parthasarathy y col., 1976), ambas causadas por *P. staheli*, produciendo una clorosis progresiva de las hojas más viejas, los frutos se desprenden y las inflorescencias se secan, las hojas jóvenes comienzan a pudrirse desde la base hacia el ápice y, finalmente cae la copa dejando el tronco desnudo. Se pueden detectar gran número de flagelados en los tubos cribosos produciendo taponamiento en la placa cribosa e impidiendo la circulación de nutrientes (Parthasarathy y Van Slobbe, 1978; Van Slobbe y col., 1978). Es una enfermedad que se extiende rápidamente desarrollándose focos de considerable tamaño y, que aparece en el Sur y Centro América siendo las especies susceptibles: *Elaeis quineensis* (palmera aceitera), *Cocos nucifera* (cocotero), *Attalea funifera*, *Caryota mitis* y *Roystonea regia*. Otra enfermedad es la **marchitez de Alpina purpurata** que origina amarilleamiento y necrosis de las hojas e inflorescencias que terminan con la muerte de la planta, y la propagación es tallo a tallo dentro de una misma planta, evidenciándose en la Isla de Granada y otras islas del Caribe.

En el caso de los flagelados que infectan frutos, la infección por Tripanosomátidos fue descrita por primera vez en el tomate, en el año 1957 en Africa del sur (Gibbs, 1957), y posteriormente en otros frutos comestibles, tales como granadas, melocotones, guayabas y mandarinas. Pero aún no está claro si realmente son parásitos de frutas, o simplemente invasores oportunistas, ya que en la mayoría de los frutos se detectan pocos flagelados. En los frutos de tomate, sin embargo *Phytomonas serpens* se suele encontrar en abundancia. En las semillas de algunas leguminosas se han encontrado *Phytomonas*, pero actualmente desconocemos su patogenicidad (Jankevicius y col., 1989). También se han aislado en el sudeste de España Tripanosomátidos en frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y chirimoyo (*Anona cherimolia*) (Sánchez Moreno y col., 1995b).

2.6. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Con respecto a su distribución geográfica los Tripanosomátidos de plantas predominan principalmente en zonas tropicales y subtropicales, aunque se han descrito en todos los continentes, excepto en la Antártida. En Europa se han encontrado *Phytomonas* infectando principalmente a Euforbiáceas, en frutos de tomate, en árboles frutales etc., alcanzando latitudes de hasta 50° norte (Podlipaev, 1986 y Dollet, 1994).

En USA, se han encontrado varias especies de *Asclepias* infectadas con *P. elmassiani*. Un punto interesante sería saber cómo estos parásitos sobreviven al invierno, ya que el vector, en el caso de Norteamérica, no hiberna, migra a Florida y estas plantas se degeneran por las raíces. Una posibilidad, es que sobrevivan en otro vector o en otro reservorio (Camargo y Wallace, 1994).

2.7. DIAGNÓSTICO.

A la hora de un diagnóstico ha de tenerse en cuenta varios aspectos: el diagnóstico de la enfermedad, la detección de flagelados en las plantas, la identificación del género de los flagelados y la caracterización de la cepa infectante.

El diagnóstico de la enfermedad se hace por los síntomas externos, aunque estos no son patognomónicos. Por eso, el diagnóstico debe ser confirmado por demostración de la presencia de los flagelados en la planta enferma. Esto puede hacerse microscópicamente o por técnicas indirectas.

2.7.1. Detección de Flagelados en Plantas.

En plantas con una gran concentración de flagelados, encontrarlos

nadando en los fluidos de la planta es fácil para un persona entrenada en microscopía. Mientras que, en plantas con un bajo número de flagelados, su detección puede ser muy difícil y requeriría mucho tiempo, tal es el caso de las afecciones en palma. En fruto, las infecciones naturales nunca son abundantes, normalmente es muy difícil encontrar flagelados mediante microscopía. En todas estas circunstancias se hace necesario recurrir a otros métodos.

La ausencia de anticuerpos en plantas imposibilita el uso de métodos inmunológicos para el diagnóstico. Sin embargo, anticuerpos anti-*Phytomonas* podrían usarse para detectar antígenos de los flagelados en los fluidos de la planta. Este método ya ha sido ensayado pero, hasta ahora ha resultado difícil por la existencia de inhibidores de los anticuerpos en la planta y por la aparición de falsos positivos. Por el contrario, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha demostrado ser un buen método para el diagnóstico etiológico. En este sentido, Texeira y col. (1994) desarrollaron un ensayo para la detección de flagelados en fruto de tomate, mediante la amplificación de un fragmento de 800-pb del gen ribosomal SSU. Usando una sonda derivada del gen SSU de *T. cruzi* para hibridar con el producto amplificado (Dietrich y col.,1990). Este proceso de PCR/hibridación fue utilizado para el diagnóstico de Tripanosomátidos en general y también, para los Tripanosomátidos en tomates, permitiendo la detección de los flagelados en menos tiempo que las técnicas microscópicas, y con un mínimo de 10 ng de ADN de flagelados. Hasta ahora, PCR es el único método disponible, aparte de la microscopía, de detectar la infección de flagelados en plantas.

2.7.2. Identificación del Género.

Una vez que los flagelados han sido detectados en las plantas, es necesario identificar su género. Si se disponen de cultivo "in vitro", las *Phytomonas* pueden ser diagnosticadas mediante las técnicas descritas anteriormente en el apartado de Taxonomía y Nomenclatura. Sin embargo, esto es complicado y requiere bastante

tiempo, ya que, los primocultivos son difíciles de obtener. Por lo tanto, lo ideal sería encontrar un método que no necesitara primocultivos.

El estudio del gen ribosomal SSU por PCR/hibridación descrito por Teixeira y col., (1994), podría utilizarse si en el producto de amplificación se buscara la presencia del sitio *PvuII* 360, mediante digestión con *PvuII* o con hibridación con oligonucleótidos SSU3 (Camargo y col., 1992) y SSU4 (Teixeira y col., 1997), que reconocen las secuencias que flanquean el sitio *PvuII*. Este sitio está presente en todos los géneros de Tripanosomátidos excepto en *Phytomonas*. Por lo tanto, la carencia de hibridación con SSU3 y SSU4 podría servir para el diagnóstico de *Phytomonas*, pero no es así, debido a que no está confirmado en otros Tripanosomátidos de plantas.

Serrano y col. (1996) publicaron un ensayo de PCR, que amplificaba la región transcrita del gen del *spliced leader* seguido de hibridación con el oligonucleótido SL3', proponiéndolo como método para el diagnóstico de *Phytomonas*, pero aún los resultados son muy preliminares y requieren de más ensayos.

2.7.3. Identificación de Cepas.

El último aspecto en el proceso de diagnóstico es la identificación del aislado en cuestión (cepa, especie?). Esto puede hacerse comparando los aislados por análisis isoenzimático, y análisis de restricción de ADNr o ADNk (Ahomadegbe y col., 1990, 1992; Camargo y col., 1992; Guerrini y col., 1992; Muller y col., 1994,1995). A pesar de que se ha demostrado la fiabilidad de estas técnicas para la identificación de aislados, estos métodos no han sido usados en la práctica. Debido a que requieren de la disponibilidad de una base de datos referentes a los perfiles de cada aislado, pero hoy día no se disponen de ella (Camargo, 1999).

El hecho de que las *Phytomonas* de origen floemático (flagelados del floema de palmas y *Alpinia purpurata*) presenten un sitio "único" para EcoRI en la posición 752 del gen ribosomal SSU, podría ser de gran importancia en la identificación (Marché y col., 1995). Esto autores observaron que aislados de látex o de fruto carecían de dicho sitio, cosa que está de acuerdo con los datos de Camargo y col. (1992). Conocidas las secuencias próximas del sitio EcoRI, no debe ser difícil diseñar una sonda de oligonucleótidos específica para los flagelados de floema. La PCR /hibridación EcoRI, dada su simplicidad podría ser el método elegido, no sólo para identificar flagelados de palma sino también, para todo tipo de insecto y plantas que puedan funcionar como reservorios, e incluso identificar vectores sanos. En general podemos decir que, cualquier método de diagnóstico de *Phytomonas* en plantas puede ser también usado para la detección de *Phytomonas* en insectos, como han sido hechos (Sbravate y col., 1989; Camargo y col., 1992; Serrano y col., 1996; Teixeira y col., 1996).

2.8. TRATAMIENTO Y PROFILAXIS.

Hay muchas drogas contra Tripanosomátidos de humanos y otros animales, algunas de las cuales, son activas frente a flagelados de palma. Sin embargo, el problema de la quimioterapia en palmas no se basa sólo en las drogas disponibles sino más bien, en la viabilidad de su uso en el campo. No existen datos de tratamientos a gran escala en palmas infectadas. Test hechos a pequeña escala mostraron que las pentamidinas y fenantridina eran activas frente a los flagelados de plantas, pero el trabajo nunca se extendió a estudios de campo (Dollet y col., 1979).

En cuanto a la profilaxis, al principio lo que se hacía era la tala y quema de los árboles enfermos, pero esto conllevaba la destrucción de plantas sanas (Slobbe, 1977; Parthasarathy y Slobbe, 1978; Slobbe y col., 1978; Kastelein, 1987). Posteriormente, se empezaron a utilizar insecticidas que permitió la

reducción de la enfermedad en algunas partes de Latino America, a pesar de desconocer la etiología de la enfermedad (López y col., 1975).

Una vez que se descubrió que los flagelados eran los agentes etiológicos de la infección y los insectos fitófagos sus vectores, el uso profiláctico de insecticidas se encontró razonable y exitoso (Dollet y col., 1979; Louise y col., 1986; Oliveira y col., 1987). Medidas adicionales, como limpieza de los límites, eliminación de hierbas, y corte de las hojas de las palmas en contacto con la tierra, mejoran la situación fitosanitaria (Renard, 1989). La enfermedad ha sido erradicada de algunas grandes plantaciones comerciales, pero su erradicación total es aún una quimera.

2.9. EL CHOQUE OXIDANTE.

La atmósfera del planeta Tierra era anaeróbica hasta la aparición de los mares y el nacimiento de la fotosíntesis. La acumulación de oxígeno (O_2) cambió el entorno y las presiones selectivas sobre todos los organismos vivos. Incrementándose la proporción de mutaciones y acelerando, por lo tanto, la evolución. Las ventajas que se pudieron ganar por el uso de O_2 fue el incremento de la energía derivada de los alimentos, comportando nuevas transformaciones metabólicas, para solubilizar y detoxificar numerosos compuestos e incluso, llegar a generar calor y luz.

Pero hay que pagar un precio por estos beneficios y, este fue proveer defensas frente a la considerable toxicidad de este gas paramagnético. Los organismos que consiguieron desarrollar estas defensas fueron los que triunfaron, y originaron la enorme variedad de formas de vida aeróbica que ahora encontramos en la tierra. Aquellos que no se acomodaron al desafío de la

toxicidad del O_2 evolucionaron a sensibles anaerobios microscópicos actualmente restringidos a nichos anaeróbicos que persisten en un planeta aeróbico.

No fue hasta el año 1774 cuando se descubrió el oxígeno como elemento, gracias a Joseph Priestley, que vió que, cuando enfocaba los rayos del sol sobre óxido mercúrico, recogía el "aire deflogisticado" u oxígeno puro que se desprendía. Con una gran capacidad previsor, Priestley no solamente especuló con las posibles aplicaciones médicas del oxígeno puro, sino también con su probable toxicidad biológica.

2.9.1. Los Radicales Libres.

Un radical libre es cualquier especie química que tiene uno o más electrones no apareados en un orbital más externo. El adjetivo "**libre**" se usa para subrayar el hecho de que dichos radicales son capaces de tener una vida independiente a diferencia de los radicales ligados, un término que se refiere a una entidad estructural en una fórmula molecular. Pero sería más correcto llamarlos simplemente radicales, ya que, usar el adjetivo libre para describir "radical" es algo redundante.

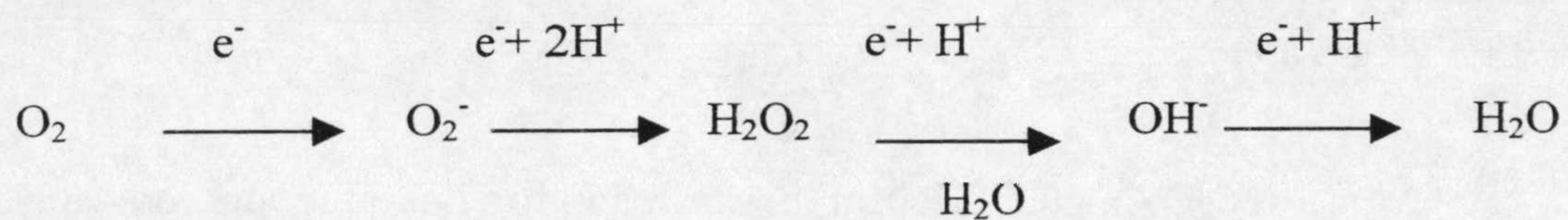
El que tengan algún electrón desapareado origina que un radical sea ligeramente atraído por un campo magnético, esto es paramagnetismo. Esta característica permite que se detecten por métodos químicos como las técnicas espectroscópicas de la resonancia del Spin del electrón, o métodos más sofisticados como el atrapamiento del Spin del electrón (Spin Trapping) (Halliwell y col., 1989).

Ejemplo de radicales son, el átomo de hidrógeno (H), la molécula de trichlorometilo (CCl_3), el anión superóxido (O_2^-), el radical hidróxilo (OH^\cdot), óxidos

de nitrógeno, como el óxido nítrico (NO), radicales peróxilo (RO₂), alcóxilo (RO), entre otros.

En los organismos aeróbicos, el oxígeno molecular es un aceptor final de electrones para diferentes sistemas de transporte de electrones, como los presentes en la mitocondria. Actualmente, muchas evidencias experimentales apoyan la tesis de que los aspectos favorables de la vida aeróbica están acompañados de potenciales daños ligados a procesos en los que interviene el oxígeno. Algunos radicales altamente inestables y reactivos derivados del oxígeno se producen en el metabolismo del O₂ y procesos oxidativos en células vivas, estos serían: el anión superóxido(O₂⁻), que se produce por la reducción univalente del oxígeno molecular y el altamente tóxico radical hidróxilo (OH[•]) que puede ser producido del peróxido de hidrógeno y del anión superóxido en presencia de iones metálicos de transición.

En la siguiente reacción se representa la reducción completa de una molécula de O₂ a agua, para lo que se necesitandose cuatro electrones cuando se realiza por pasos univalentes:



De los intermediarios que se producen el más estable y el único que se podría acumular apreciablemente en medios acuosos neutros es el H₂O₂, mientras que el O₂⁻ tiene una vida media del orden de milisegundos, y ésta es aún mucho más corta en el caso del radical OH[•] (Czapski, 1971).

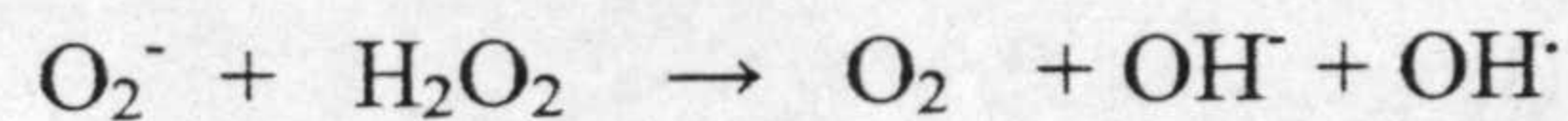
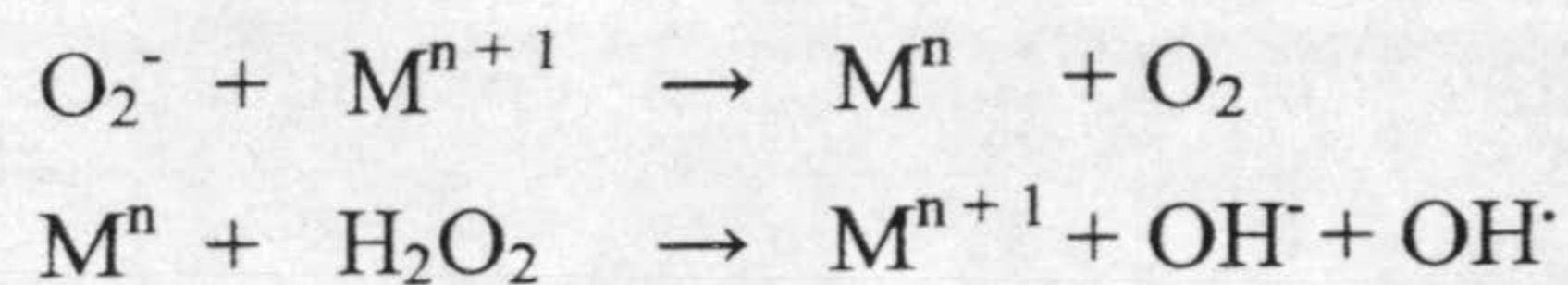
El daño causado por las especies activas del oxígeno (EAO) ha sido llamado "estress oxidativo". Las EAO son importantes mediadores de algunos

daños celulares en parásitos y por lo tanto, han tenido que desarrollar diferentes mecanismos de defensa contra ellas.

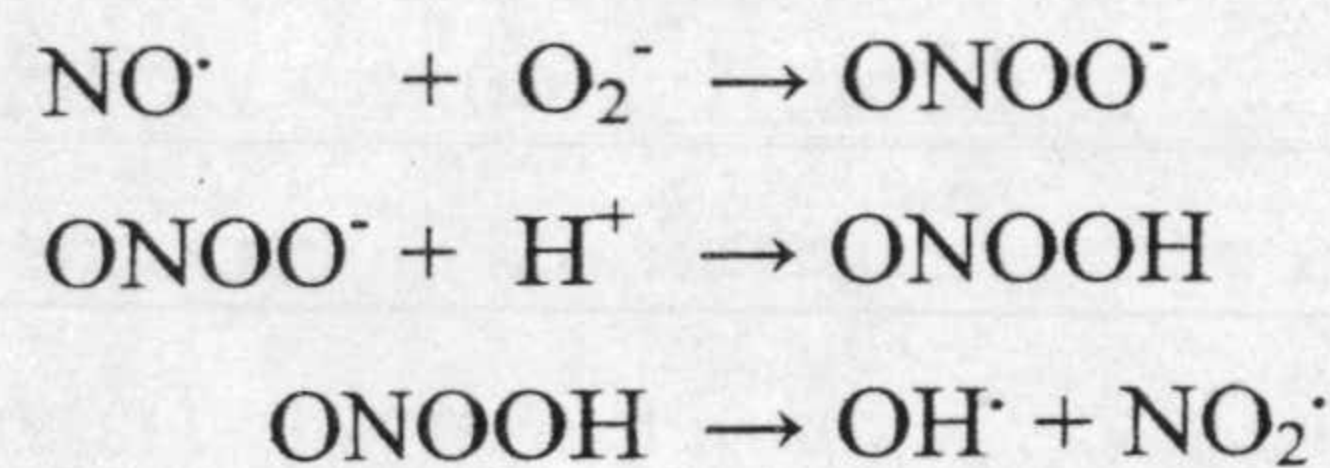
2.9.2. La Toxicidad del Oxígeno en Protozoos.

Algunos protozoos viven en ambientes pobres de oxígeno y son especialmente sensibles al **estres oxidativo**. Anaerobios obligados, que carecen de defensas contra las EAO mueren rápidamente ante tensiones de oxígeno mayores a las de su entorno. Sólo dos grupos de protozoos, ciliados del rumen y flagelados de termitas (Von Brand y col., 1973), pertenecen a esta categoría. Otros protozoos son menos sensibles al daño oxidativo y consumen oxígeno cuando está disponible, pueden ser cultivados durante periodos indefinidos bajo condiciones semianaeróbicas o anaeróbicas totales (*Entamoeba* spp. y *Trichomonas* spp). Sin embargo, el crecimiento de *T. vaginalis* es estimulado por la presencia de tensiones bajas de oxígeno (1-3 μM) en comparación con el crecimiento en anaerobiosis, esta característica define al organismo como microaerofilo (Paget y col., 1990). Los Tripanosomátidos son también capaces de sobrevivir bajo condiciones anaeróbicas, aunque no son capaces de multiplicarse en anaerobiosis, como el caso anterior.

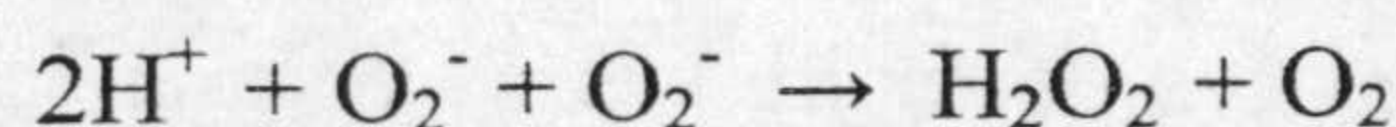
Es bien conocida la alta sensibilidad de los protozoos al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a diferentes O_2^- (como la autoxidación de tioles, xantina-xantina oxidasa, dihidro-orotato-dihidro-orotato oxidasa) y sistemas generadores de H_2O_2 (como glucosa-glucosa oxidasa), y peroxidasas orgánicas (como tert-butil peróxido) (Docampo y col., 1984). Igualmente está bien documentado, su sensibilidad tanto a EAO producidas por drogas como por fagocitos (Docampo y col., 1984, Docampo, 1990). Parece posible que O_2^- y H_2O_2 sean dañinos no por atacar directamente a los componentes del parásito, sino más bien, porque aumentan los niveles del extremadamente reactivo radical hidroxilo (OH^\cdot) en presencia de iones metálicos (Reacción de Fenton):



Recientemente se ha propuesto un nuevo mecanismo para la producción de OH^\cdot que no depende de iones de metales de transición (Beckman y col., 1990), en el que se produce peroxinitrito (ONOO^-) de la reacción entre el óxido nítrico y el superóxido (O_2^-) de la siguiente forma:



La combinación de NO^\cdot con superóxido compite con la dismutación del superóxido:



Esta tomando gran interés el papel biológico del NO^\cdot como mecanismo de transducción dirigidos a varias funciones en diferentes células. Se ha aceptado que NO^\cdot es un factor de relajación derivado del endotelio (es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por las células endoteliales vasculares, fagocitos, algunos tipos de neuronas y otros tipos de células) y, que participa en la regulación de los sistemas inmune y nervioso (Palmer y col., 1987; Lowenstein y col., 1992). Además de su capacidad de generar radical hidroxilo, se ha encontrado que la exposición de grupos Fe-S (proteínas con centro sulfuro-hierro u otros componentes de la membrana celular) a NO^\cdot resulta en la formación del complejo hierro-nitrosil, que causa inactivación de algunas enzimas (Hibbs y col., 1988).

2.9.3. Especies Activas del Oxígeno en Protozoos.

Se sabe que las especies activas del oxígeno tienen un papel importante en muchas reacciones bioquímicas que mantienen el funcionamiento normal de la célula. Estas EAO son producidas como intermediarios normales en los sistemas de transporte de electrones mitocondriales y microsomales, y algunas enzimas que producen cantidades sustanciales de O_2^- y H_2O_2 se han identificado en algunos protozoos (Docampo y Moreno, 1984).

T. foetus excreta aeróbicamente H_2O_2 (Ninomiya y Ziro, 1952). Por el contrario, la respiración del Tripanosomátido *T. cruzi* no libera ni O_2^- ni H_2O_2 al medio de cultivo. Preparaciones mitocondriales de formas sanguíneas de *T. b. brucei* producen 0.2-0.7 nmol H_2O_2 por mg proteína/min, que corresponde al 1-3% del oxígeno consumido. Aunque en un principio se pensaba que la concentración interna de H_2O_2 en formas sanguíneas de *T. b. brucei* era alta (70 μ M), más recientemente se ha descubierto que los valores están por debajo del nivel de detección. Esto implica que estas células tienen una actividad que metaboliza el H_2O_2 (Penketh y Klein, 1986).

La formación de H_2O_2 en preparaciones mitocondriales de *C. fasciculata* es cualitativamente la misma que en mitocondrias de tejidos vegetales (Kusel y col., 1973). Por el contrario, se ha propuesto que en la mitocondria de tripomastigotes procíclicos de *T. b. brucei* (Turrens, 1987) y epimastigotes de *T. cruzi* (Denicola-Seoane y col., 1992) la NADH-reductasa podrían utilizar O_2 como aceptor de electrones en lugar de fumarato para transformarlo en O_2^- que dismuta para generar H_2O_2 . También, en la mitocondria de epimastigotes de *T. cruzi* ha sido postulada la existencia de un lugar dependiente de succinato para la producción de H_2O_2 , que puede ser la semiquinona de la coenzima Q_9 (Denicola-Seoane y col., 1992).

2.9.4. El Estrés Oxidativo.

Las EAO son los causantes de numerosas reacciones de oxidación que perjudican a los componentes celulares. Los sistemas antioxidantes controlan una parte de este ataque radical pero, son necesarios mecanismos específicos de reparación, para renovar las partes que pueden haber sido dañadas irreversiblemente.

2.9.4.a. La peroxidación de los fosfolípidos de membrana.

Los fosfolípidos de membrana están continuamente bajo la acción de las EAO, siendo uno de sus principales objetivos (Gilrotti, 1985). La peroxidación de estos lípidos causa una disminución de la fluidez y pérdida de la permeabilidad selectiva de las membranas. En condiciones extremas, esta peroxidación originará la ruptura de la integridad estructural ocasionando, incluso, la muerte celular (Pré, 1991).

Los productos hidrosolubles formados cuando se produce la peroxidación lipídica de la membrana se difuminan a través de ella hacia otros compartimentos celulares. Estos productos, como el dialdehído malónico (MDA), son capaces de reaccionar con los grupos tioles o aminos primarios de las proteínas, dando lugar a la agrupación de las proteínas entre sí (Davies, 1988). Los dialdehídos pueden fijarse también al ADN provocando y alterando la expresión de los genes (Vaca y col., 1988).

2.9.4.b. La desnaturalización de proteínas.

Las EAO ocasionan en las proteínas modificaciones de sus cargas, formación de puentes disulfuro o enlaces de tipo covalentes anormales (Thomas y Park, 1988). Las proteínas contienen residuos aminos, como el triptófano, tirosina,

fenilalanina, histidina, metionina o cisteína, que son particularmente sensibles a la degradación por EAO (Sies, 1986). Las proteínas solubles están mucho más expuestas a las EAO que las proteínas de membrana (Nakazawa y col., 1996). De esta forma, muchas enzimas pierden sus propiedades catalíticas. Igualmente son atacadas las proteínas estructurales, como el colágeno, dando lugar a enlaces cruzados y roturas en el seno de la molécula (Dean y col., 1986). Cuando las proteínas se desnaturalizan llegan a ser sustratos de enzimas proteolíticas (Pacifci y Davies, 1990).

2.9.4.c. La alteración de los ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos también son blancos para las EAO (Beckman y Ames, 1997). Originando roturas de hebras dobles o simples, cambios en las cromátidas hermanas, enlaces cruzados ADN/proteínas, así como, la oxidación de azúcares o de bases nitrogenadas (Teebor y col., 1988). Las bases nitrogenadas, en particular la timidina, son las más susceptibles a las EAO. Su alteración implica distorsiones en la doble hélice que puede conducir a la descomposición de estas bases alteradas, resultando espaciosapurínicos o apirimidínicos.

Recientemente, Keyer e Imlay (1996) demostraron que la aceleración de la desnaturalización del ADN se debía principalmente al hierro liberado de la célula a partir del complejo [4 Fe-4 S] de las deshidrogenasas. Esto se opone a las hipótesis clásicas, que defendían que la liberación de Fe de moléculas transportadoras como la ferritina, era tras la oxidación directa por el anión superóxido (Minotti y Aust, 1987). El anión superóxido disocia el complejo metálico liberando uno o varios átomos de Fe que pueden entonces participar como catalizadores de la producción de HO^\bullet a partir de H_2O_2 mediante la reacción de Fenton (Henle y Linn, 1997). Si persisten los daños del ADN, la replicación, transcripción y la traducción de los ácidos nucleicos son perturbados conduciendo a mutaciones, cánceres e incluso a la muerte celular.

2.9.5. Defensas Antioxidantes de los Protozoos frente a las EAO.

2.9.5.a. Defensas antioxidantes no enzimáticas.

La detoxificación de las especies activas del oxígeno es posible por la acción de algunos compuestos de bajo peso molecular. Algunos son solubles en agua, como el ácido ascórbico, tioles, piruvato y urato, y algunos lípidos solubles, como la vitamina E y el β -caroteno, que evitan la peroxidación lipídica (Sies, 1985).

El piruvato se ha propuesto como sumidero de peróxido de hidrógeno (Fulton y Spooner, 1956). Sin embargo, hay resultados que indican que la actividad de descomposición del H_2O_2 por el piruvato no se detecta en *T. b. brucei* (Penketh y Klein, 1986).

La presencia de ascorbato peroxidasa además de dehidroascorbato reductasa en *T. cruzi* ha sugerido la existencia de un ciclo reductor enzimático de la vitamina C que podría abastecer de ácido ascórbico para la defensa antioxidante (Docampo y col., 1976 y Clarke y col., 1994).

El glutatión (GSH) es otra molécula antioxidante, ya que actúa como cofactor de ciertas enzimas implicadas en estos mecanismos de defensa, por ejemplo: glutatión peroxidasa, glutatión transferasa, etc.. (Halliwell y Gutteridge, 1991). Pero, está ausente en algunos protozoos como *E. histolytica* (Fahey y col., 1984), *T. foetus* y *Giardia duodenales* (Brown y col., 1993) donde la cisteína es el principal tiol presente. Sin embargo, GSH está presente en otros protozoos aunque su concentración varía enormemente.

Ciertas proteínas son capaces de fijar iones metálicos libres en el citosol, entre las que podemos destacar: transferrina, lactoferrina, etc. Que contribuyen a

la protección de las células del choque oxidativo al retirar los iones metálicos necesarios para catalizar las reacciones de formación de EAO (Halliwell y Gutteridge, 1990).

2.9.5.b. Defensas antioxidantes enzimáticas.

Las enzimas antioxidantes trabajan de forma paralela a las defensas no enzimáticas frente al choque oxidativo. Diferenciándose tres enzimas: catalasa, glutatión peroxidasa y Superóxido dismutasa.

2.9.5.b.1. Catalasa (EC. 1.11.1.6).

La catalasa es una enzima óxidoreductoras presente tanto, en células procariotas como en eucariotas. Tienen una doble actividad: descomponen H_2O_2 para dar H_2O y O_2 (actividad catalasa) (Sies, 1985) y, oxidan donadores de electrones, como el metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles, con consumo de 1 mol de peróxido (actividad peroxidasa) (Von Brand, 1973).

Es una enzima tetramérica con uno peso molecular comprendido entre 225 y 270 Kda, y con cuatro grupos hemo capaces de fijar cuatro moléculas de NADH (Kirkman y Gaetani, 1984). Su localización, en la mayoría de las células es, en los orgánulos subcelulares denominados peroxisomas (Kono y Fridovich, 1982 y Kuyumdzieva-Saova y col., 1991).

La catalasa está presente en el citoplasma de *T. foetus* (Müller, 1978) pero, ausente en otras especies de Trichomonádidos, *G. lamblia* (Lindmark, 1980) y *E. histolytica* (Docampo y Moreno, 1984).

Aunque la catalasa está ausente en la mayoría de los Tripanosomátidos patógenos, como *T. b. brucei*, *T. cruzi* y en la mayoría de las especies de

Leishmania, está presente en otros Tripanosomátidos de mamíferos, de aves, anfibios y tripanosomas de insectos (Von Brand, 1973). Se ha encontrado un alto contenido de catalasa en formas intracelulares (amastigote) de *L. donovani*, pero queda la duda de que sea debido a contaminación por el hospedador, ya que, se obtuvieron de homogenados de bazo de hamster y se sabe que la catalasa puede ser fácilmente absorbida por las membranas celulares (Murray, 1982).

La actividad catalasa se ha detectado y localizado mediante técnicas bioquímicas en los microcuerpos (glicosomas) de algunos otros Tripanosomátidos como, *Crithidia luciliae* (Opperdoes y col., 1977), y en especies del género *Phytomonas* (Sánchez-Moreno y col., 1992). En ooquistes esporulados y en esporozoitos de *Eimeria tenella* (Michalski y Prowse, 1991) se ha detectado actividad pero, no se ha podido localizar. También, se ha detectado un nivel bajo de actividad en *P. berghei* (Fairfield y col., 1986). Mientras que, los taquizoitos de *Toxoplasma gondii* tienen un alto nivel de actividad catalasa (Murray y col., 1980).

2.9.5.b.2. Glutation Peroxidasa (EC. 1.11.1.9).

En 1957, Mills descubrió una proteína eritrocitaria que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno en presencia de glutatión. En 1963, Cohen y Hochstein demostraron que esta enzima, llamada glutatión peroxidasa, detoxifica el peróxido de hidrógeno cuando en la célula está presente a unas concentraciones inferiores a 10^{-6} M, mientras que la catalasa intervendría a unas concentraciones superiores.

Esta enzima cataliza la reacción de reducción de los hidroperóxidos orgánicos, lipídicos, nucleicos y del peróxido de hidrógeno (ROOH), en presencia de glutatión reducido (GSH). En estas reacciones el GSH es donador de hidrógenos por parte del grupo tiol libre portado por la cisteína. Además es

específica de su donador de hidrógenos (GSH) e inespecífica para el hidroxiperóxido (Chance y col., 1979).

La regeneración del glutatión oxidado en glutatión es catalizada por una glutatión reductasa (EC. 1.6.4.2) con consumo de una molécula de NADPH y H^+ . Y por reducción, tanto la glutatión reductasa como, la glutatión peroxidasa son dependientes del NADPH disponible.

En ningún protozoo parásito se habían encontrado sistemas detoxificantes dependientes de glutatión (GSH). En el único en el que se detectó algo, fue en el género *Plasmodium*, con actividades glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. Pero, se ha demostrado que, estos parásitos almacenan la glutatión reductasa del hospedador durante la maduración eritrocitaria (Hempelman y col., 1987).

El descubrimiento de la presencia de un cofactor contenedor de un grupo tiol para las actividades reductasa y peroxidasa en tripanosomas fue en 1985 por Fairlamb y Cerami, y más tarde se le llamó tripanotiona (Fairlamb y col., 1985). Algunos protozoos tienen esta actividad peroxidasa dependiente de un cofactor glutatión-espermidina [tripanotriona, $(T(SH)_2)$], cuya oxidación permite la formación de la tripanotiona disulfuro $(T(S)_2)$. Una actividad peroxidasa tripanotiona que usa también H_2O_2 o hidroperóxidos orgánicos ha sido medida en extractos crudos de *C. fasciculata* y *T. b. brucei*, pero la enzima es aparentemente muy lábil y aún no ha sido purificada (Henderson y col., 1987). No está claro el mecanismo de acción de la tripanotiona peroxidasa pero, es un sistema análogo al sistema glutatión reductasa/glutatión oxidasa del hospedador pero utilizando tripanotiona (Henderson y col., 1987).

La actividad glutatión peroxidasa no se ha detectado en *E. histolytica* ni en *G. lamblia* (Docampo, 1990), y tampoco aparece glutatión reductasa en *T. vaginalis* (Thong y Coombs, 1987).

Carnieri y col. (1993) han publicado la ausencia de la actividad de tripanotiona peroxidasa en *T. cruzi* y sugirieron que la oxidación de los tioles endógenos reducidos está relacionada con los valores del metabolismo del H_2O_2 detectado en células intactas. Por el contrario la tripanotiona reductasa ha sido purificada y estudiada estructuralmente con rayos X, en *C. fasciculata* (Shames y col., 1986; Hunter y col., 1990) y *T. cruzi* (Krauth-Siegel y col., 1987; Zhang y col., 1993; Lantwin y col., 1994). La enzima, que solamente se ha encontrado en el citosol de *T.b. brucei* (Smith y col., 1991), cataliza la reducción de la tripanotiona, dependiente de NADPH pero, no la del el glutation.

Es difícil evaluar las publicaciones que habla de la presencia de glutation peroxidasa en especies de *Leishmania*, se ha demostrado la presencia del enzima en promastigotes de *L. trópica* (Meshnick y Eaton, 1981) y un alto contenido de la misma en formas intracelulares de *L. donovani* (Murray, 1982), pero es difícil descartar una contaminación del hospedador.

2.9.5.b.3. Superóxido dismutasa (EC. 1.15.1.1).

El descubrimiento por McCord y Fridovich en 1969 de las enzimas superóxido dismutasa (SODs), fue una apertura significativa en la comprensión de los mecanismos antioxidantes de las células. Estas enzimas catalizan la reacción de dismutación del ion superóxido, limitada por los valores de difusión. Esta catálisis extremadamente eficiente está ampliamente distribuida en células aeróbicas y mantiene el nivel de O_2^- estable en una concentración de 10^{-10} mol.l⁻¹ (Imley y Fridovich, 1991).

Se distinguen varios tipos de SOD según el metal que se encuentre en su centro activo (Cu y Zn, Mn, Fe e incluso Ni), y también se han encontrado diferencias en su localización: citosólica, en orgánulos subcelulares e incluso

excretadas por las células. Así las CuZnSODs aparecen principalmente en el citosol de células eucariotas, las MnSODs en la matriz mitocondrial y las FeSODs en el citosol de células vegetales y en algunos protozoos de vida libre y parásitos (Le Trant y col., 1983; Van Camp, 1990; Barro y col., 1990; Bruchhaus y col., 1992; Smith y Doolittle, 1992 y Liochev y Fridovich, 1997).

La diferente sensibilidad a inhibidores (cianuro, peróxido de hidrógeno y azida) permite caracterizarlas: el peróxido de hidrógeno inhibe a la FeSOD, el cianuro y el peróxido de hidrógeno inhibe a CuZnSOD y, la azida inhibe de mayor a menor proporción a FeSOD, MnSOD y CuZnSOD (Bannister y col., 1987).

Según estudios realizados en plantas, el grupo de las FeSOD probablemente sea el más antiguo, ya que, parece ser que el hierro fue el primer metal usado como cofactor metálico en el sitio activo de la SOD debido a su abundancia en su forma soluble Fe(II) en ese tiempo. Y al decrecer el Fe(II) disponible en el medio originó el cambio del metal por el que había más presente, Mn(III) (Bannister y col., 1991).

Según la homología de la secuencia de aminoácidos indican que hay dos familias de SOD, una está compuesta por las CuZnSODs, y la otra, por las MnSODs y FeSODs.

La SODs de protozoos parásitos han sido consideradas como factores de virulencia que protegen a los parásitos del ataque de las células hospedadoras con agentes antioxidantes y anti-inflamatorios (Paramchuk y col., 1997). Con la excepción de *Acanthamoeba castelanii*, que presenta dos formas de SOD, una es FeSOD y la otra Cu,ZnSOD (Choi y col., 2000), en general, todos los protozoos parásitos estudiados hasta la fecha tienen solamente FeSOD (Le Trant y col., 1983; Smith y Doolittle, 1992; Bruchhaus y col., 1992 Ismail y col., 1997;

Paramchuk y col., 1997; Choi y col., 2000 y Kabiri y Steverding, 2001). Sorprendentemente, algunos protozoos parásitos, como es el caso de *G. intestinalis* se ha publicado que carece de actividad SOD (Smith y col., 1988). Si se confirmasen estos resultados será una notable excepción entre los organismos eucariotas.

Desde que se descubrió que las SODs de protozoos parásitos eran FeSODs y, que difieren de las de su hospedador vertebrado no sólo estructuralmente sino también, en el inhibidor, las SODs han sido propuestas como potenciales dianas quimioterapéuticas (Kabiri y Steverding, 2001). Y aunque todavía no se han encontrado drogas diseñadas para explotar esta diferencia, el modo de acción de un número de drogas tripanocidas, antileishmanial y antimalarial, involucra generación de especies activas del oxígeno (Docampo y Moreno, 1984; Aldunate y Morello, 1993) y puede aprovecharse de las diferencias entre las SODs de hospedador y parásito.

Las FeSODs se han encontrado en células lisadas de *E. dispar* y *E. histolytica*, y sus genes han sido clonados, y la comparación de las dos secuencias reveló un 5% de nucleótidos diferentes para la sustitución de un único aminoácido. La estructura primaria de ambas enzimas mostró aproximadamente un 55% de similaridad con otras secuencias de FeSODs. La enzima está codificada por una sola copia de genes en ambos, y se encontró una ausencia de correlación entre el comportamiento patogénico de la ameba y la expresión de ARNm de la FeSOD (Tannich y col., 1991).

La actividad SOD está presente en flagelados aerobios facultativos *T. foetus* (Lindmark y Müller, 1974). Sobre la quinta o sexta parte de la actividad de *T. foetus* está en la proporción no sedimentable del citoplasma. El resto está contenido en el hidrogenosoma. Los extractos dializados de *T. foetus* tiene SOD a niveles bastante más altos que en otros organismos eucariotas (Kitchener y col.,

1984). La actividad es inhibida por H_2O_2 , pero no por cianuro, sugiriendo que se trata de una FeSOD. Se vió por isoelectroenfoque que tres isoenzimas eran sensibles a la inhibición por H_2O_2 (Kitchener y col., 1984 y Viscogliosi y col., 1996).

En tripanosomátidos como, en *T. cruzi* se ha descrito un actividad sensible al cianuro (Boveris y Stoppani, 1977), aunque posteriormente se ha encontrado en varias ocasiones que la actividad SOD en *T. cruzi* es insensible a cianuro pero, sensible al H_2O_2 , lo que sugiere que se trata de una FeSOD, y además aparecen dos isoenzimas (FeSODA y FeSODB), la explicación de estas dos formas según los autores, sería que la FeSODA sería constitutiva mientras que, la FeSODB se expresa principalmente en las etapas de desarrollo cuando presenta la forma epimastigote (Ismail y col., 1997).

Otras SODs insensibles al cianuro se han encontrado en otros Tripanosomátidos, tales como *C. fasciculata* (Asada y col., 1980), *L. donovani chagasi* (Ismail y col., 1994), *L. trópica* (Le Trant y col., 1983) y *T. b. brucei* (Opperdoes y col., 1977). La distribución bimodal de la SOD en *T. b. brucei* es similar a la descrita para otros eucariotas. Ambas actividades son insensibles al cianuro 1mM (Opperdoes y col., 1977). Recientemente se ha clonado el gen de la FeSOD de *T. b. brucei*, presentando una homología de un 80% con SODs de otros Tripanosomátidos y que, parece ser que, tiene una regulación postranscripcional y que, su concentración aumenta en los estadios de proliferación de los parásitos para la eliminación de los radicales superóxido que se liberan con la generación de radicales libre hierro-tirosil concentrados en subunidad de la ribonucleótido reductasa (Kabiri y Steverding, 2001).

La actividad SOD también se ha detectado en *L. donovani* (Docampo y col., 1984), aunque todavía no se ha determinado su naturaleza con certeza. Diez años después se ha descrito en diferentes especies de *Leishmania*, entre ellas *L.*

donovani, dos actividades SODs, una de ellas localizada en los glicosomas y otra, predominantes, citosólica (Dey y Datta, 1994). Estudios de sensibilidad del enzima a los inhibidores clásicos apuntan la posibilidad de que la glicosomal sea una SOD del tipo Cu/Zn, mientras que la citosólica sería FeSOD, las razones que aluden los autores para justificar la presencia de una Cu,ZnSOD en este grupo de protozoos parásitos es que su actividad es muy baja y solamente el aislamiento de los glicosomas han permitido su demostración. Varios años después, Paramchuk y col. (1997), aislaron y caracterizaron dos SODs en promastigotes de *L. chagasi*, uno de los genes (L.c.FeSODA) era una simple copia, mientras que el gen L.c.FeSDOB sería una familia multigénica, encontrándose diferencias en los niveles de transcripción y de actividad enzimática, estos eran mayores cuando el parásitos se encontraba en la forma amastigote que en la forma promastigote.

En *C. fasciculata* la actividad SOD está localizada en el citosol y aparece en tres formas, que pueden representar tres formas isoenzimáticas diferentes. La comparación de los aminoácidos componentes de esta SOD con SODs de otras fuentes, sugiere que la enzima crítica está estrechamente relacionada con la FeSOD bacteriana y sólo lejanamente relacionada con la MnSOD humana y CuZnSOD y a la FeSOD del alga *Euglena gracilis* (Asada y col., 1980).

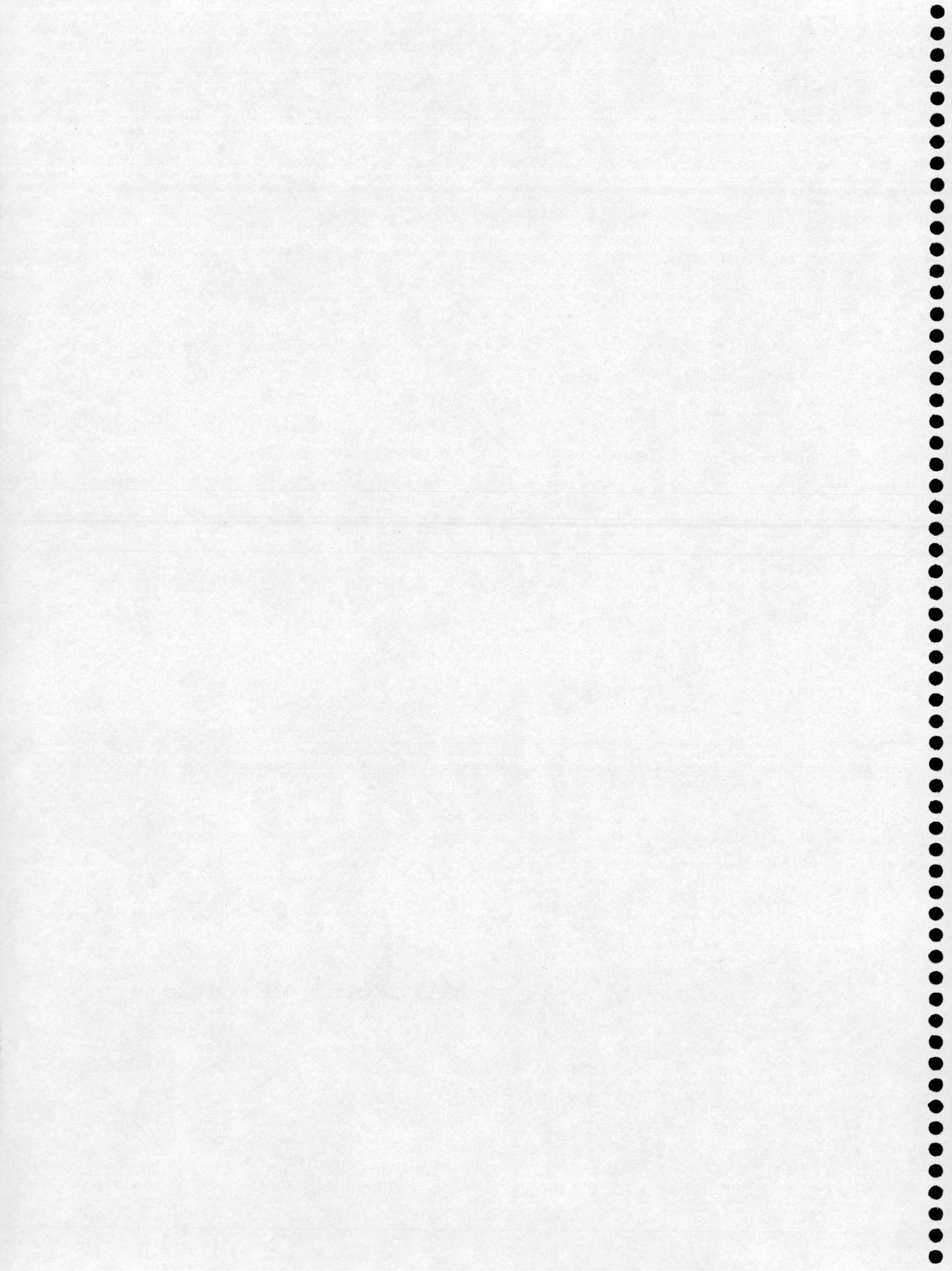
En el caso de los Tripanosomátidos de plantas, *Phytomonas* aislados de diferentes hospedadores (floema, látex, fruto e insecto), muestran dos isoenzimas SOD. Y ambas formas eran sensibles al peróxido de hidrógeno: FeSOD. La actividad SOD se localizaba principalmente en el citosol y una pequeña proporción en los glicosomas (Quesada y col., 2001).

También en especies pertenecientes al *Phylum Apicomplexa* se ha encontrado una actividad endógena SOD, en todos los casos se trata de una FeSOD: en *T. gondii* (Ödberg-Ferragut y col., 2000), en ooquistes de *E. tenella* (Michalski y col., 1991) en ooquistes de *C. parvum* (Entrala y col., 1997), en los

especies de *Babesia*, *B. hylomysci* y *B. divergens*, demostrándose en todos los casos que el enzima juega un papel esencial para el crecimiento intracelular.

Las especies del género *Plasmodium* también presentan una actividad sensible al cianuro. Aunque, la enzima FeSOD procedente de *P. berghei* aislada de glóbulos rojos de ratón y la del propio hospedador son indistinguibles electroforeticamente, lo que sugiere la posibilidad de que la enzima del parásito sea importada del propio hospedador (Fairfield y col., 1983). Posteriormente se ha encontrado dos actividades principales de SOD con puntos isoelectrico 6,2 y 6,8 y otras dos menores de pI 5,6 y 6,4 endógenas en *P. falciparum*, estas actividades fueron insensibles al cianuro pero sensibles al peróxido de hidrógeno y representaban el 20 al 30% de la actividad SOD. Concluyendo que esta actividad FeSOD representa el primer nivel del sistema de defensa antioxidante del parásito (Bécuwe y col., 1996, y Erel y col., 2001).

3. MATERIAL Y MÉTODOS



3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CULTIVO CELULAR.

Como material biológico se ha utilizado formas promastigotes de *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias* (EC1), por Michel Dollet (CIRAD-Francia) en el año 1982 (Dollet, 1982).

Para su cultivo in vitro, se utilizó medio de cultivo GRACE (Sigma®), suplementado al 10% (v/v) con suero bovino fetal (Gibco), previamente inactivado por calentamiento a 56°C durante media hora. Los flagelados fueron cultivados en 3 ml de medio en frascos Roux de plástico (Corning) de 25 cm² a 28°C, partiendo de una concentración de 5 x 10⁴ células/ml. Cuando la densidad celular fue aproximadamente de 2 x 10⁷ células/ml (mediante el conteo en la cámara hemocitométrica de Neubauer), los cultivos fueron centrifugados a 1500 rpm x10 minutos, el precipitado obtenido se lavó 2 veces en solución PBS y posterior centrifugación.

3.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA.

3.2.1. Preparación del Extracto Celular.

El precipitado obtenido de la forma descrita anteriormente, se resuspendió en 3 ml de tampón de sacarosa (STE) (250 mM de Sacarosa, 25 mM de Tris-HCl pH 7.4 y 1 mM de EDTA) y 25 µl de antiproteasa (Sigma®), sonicándose en 3 ciclos de 30 segundos de duración a 60 voltios y separados por intervalos de 1 minuto cada ciclo.

3.2.2. Purificación de la SOD.

La muestra sonicada se centrifuga a 1500 rpm x 5 minutos, el sobrenadante se guarda y el precipitado es resuspendido en 2 ml de tampón STE, sometiéndose a una nueva centrifugación a 1500 rpm x 5 minutos, el nuevo sobrenadante se añadio al anterior y el precipitado es sometido al mismo proceso. Al total de los sobrenadantes se le denominó fracción Homogenado (**H**).

La fracción **H** es nuevamente centrifugada a 2500 rpm x 10 minutos, recogiendo el sobrenadante (Fracción **S₀**), y despreciándose el precipitado. La fracción (**S₀**) se sometió a una precipitación con sulfato amónico al 35%, y posterior centrifugación a 9000 rpm x 20 minutos. La fracción sobrenadante, denominada por nosotros como (**S₃₅**) fue sometida a una nueva precipitación al 85% y centrifugandose a continuación a 9000 rpm 20 minutos. El precipitado resuspendido en 2.5 ml de tampón fosfato potásico (20 mM y 1mM EDTA, pH 7.4).

Posteriormente esta fracción fue desalinizada en columna de Sephadex G-25 (Pharmacia, PD 10), previamente equilibrada con el mismo tampón, llevándose a un volumen final de 3.5 ml de muestra y, denominandola **P₈₅**.

3.2.2.a. Cromatografía de intercambio iónico.

La fracción **P₈₅** fue aplicada a una columna de QAE-Sephadex A-50 (30 x 2 cm), que previamente había sido equilibrada con tampón fosfato potásico (20 mM y 1mM EDTA, pH 7.4), y para su elución se lavó primero con 20 ml del tampón fosfato potásico, sometiéndose a continuación a un gradiente lineal (100 ml de tampón fosfato potásico 20 mM, 1mM EDTA, pH 7.4 y 100 ml de KCl 0.6 M), recogiendo fracciones de 2.5 ml.

A las diferentes fracciones obtenidas se les midió la absorbancia a 280 nm, cuantificandose la actividad superóxido dismutasa (SOD) espectrofotométricamente según la técnica de Paoletti y Mocali (1990), descrita en el apartado 3.3.2. Y por electroforesis de IEF 3-9, revelandose la actividad según la técnica de Beyer y Fridovich (1987), detallada en el apartado 3.4. Así, fueron detectados dos picos de actividad de diferente punto isoelectrico (Q1 y Q2). Se reunieron las fracciones, de cada uno de ellos, fueron concentradas hasta un volumen final de 2.5 ml, en centricon (amicon®).

3.2.2.b. Cromatografía de filtrado.

Los picos Q1 y Q2 concentrados fueron aplicados con un 10% de glicerol a una columna de filtración Sephadex G-75. Que igualmente se equilibrio con el tampón fosfato ya mencionado.

La elución se realizó con 200ml del tampón fosfato, recogándose fracciones de 4.5 ml, a las que se midió su absorbancia a 280 nm y la actividad SOD se detectó espectrofotométrica y en electroforesis de IEF 3-9, según las técnicas mencionadas anteriormente. Obteniéndose dos picos que se corresponden a dos isoenzimas de Superóxido dismutasa: SODI y SODII.

3.3. CUANTIFICACIÓN.

3.3.1. Cuantificación de la Concentración de Proteínas.

Esta se realizó según el método Bradford de BIO-RAD, que se fundamenta en los cambios de absorbancia a 595 nm producidos dependiendo de la concentración de proteínas existente (Bradford, 1976). Usando Albumina bovina como patrón.

3.3.2. Cuantificación de la Actividad Enzimática.

La actividad superóxido dismutasa se determinó según la técnica descrita por Paoletti y Mocali (1990) que permite la detección espectrofotométrica de cantidades pequeñas de superóxido dismutasa (2 ng). El método consiste en una reacción secuencial puramente química que genera superóxido de oxígeno molecular en presencia de EDTA, cloruro de manganeso (II) y mercaptoetanol. La oxidación de NAD(P)H está unida a la disponibilidad de aniones superóxido en el medio. La presencia de SOD en la mezcla del ensayo inhibe la oxidación de este nucleótido. A altas concentraciones de la enzima, la absorbancia a 340 nm no varía, mientras que el control (SOD no añadida) la absorbancia decrece de acuerdo a cinéticas predecibles. Cuanto mayor sea la concentración de superóxido dismutasa en la muestra menos dinucleótidos se oxidan siendo por lo tanto menor la disminución de la absorbancia.

A cada lote de ensayos de muestra se le incluyó uno de control. El control consiste en que en la cuveta la cantidad de muestra es reemplazada por igual volumen del tampón usado para la disolución de la muestra. Los ensayos de actividad contienen una solución de: 40 μ l de NAD(P)H (7,5 mM), 35 μ l de EDTA-MnCl₂ (100 mM/50mM, pH 7,0), 0,785 ml de TDB (tampón trietanolamina-dietanolamina, 100 mM, pH 7,4) y 0.1 ml de muestra (o solución disolvente para el control). Una vez mezclada la solución se lee a 340 nm frente a aire, durante un periodo de 5 minutos, hasta alcanzar una estabilidad en la lectura, seguidamente se le adicionó 0.1 ml de mercaptoetanol (10 mM). El volumen final es de 1,06 ml, la reacción se inició con la adición del mercaptoetanol y fue monitorizada por un periodo de 20 minutos a temperatura ambiente.

La velocidad de oxidación del dinucleótido, fue calculada sobre un intervalo de 8 minutos (ΔA 340) y debe estar en un rango de 0,12 a 0,35. Los

valores de ΔA 340 medidos para la muestra con actividad SOD decrecerán progresivamente dependiendo de la cantidad de enzima en el ensayo. El porcentaje de inhibición se calculó en base a la siguiente formula: % Inhibición = $(\Delta A$ 340 de la muestra/ ΔA 340 del control) x 100. Los porcentajes de inhibición fueron convertidos a Unidades de actividad SOD resolviendo la X en las siguientes ecuaciones:

$$X = (99,974 - \% \text{ Inhibición}) / 2,003, \text{ si el rango de inhibición era entre el } 96 \text{ y el } 81 \%$$

$$\text{Log}(X) = 141,2649 - \% \text{ Inhibición}) / 61,156, \text{ en el rango de } 80 \text{ al } 35 \%$$

Las unidades de actividad son calculadas dividiendo X entre 31 ng, que es la cantidad de enzima que permite una inhibición del 50 %, denominada Unidad de actividad SOD(U).

3.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

3.4.1. Isoelectroenfoque (IEF).

IEF es una técnica de alta resolución para la separación de proteínas según su punto isoeléctrico, las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y su velocidad de migración es proporcional a la relación entre las carga/masa de la proteína. En una matriz de poliacrilamida la migración de las proteínas es proporcional a la carga neta, al tamaño y a la forma de las proteínas.

Para la realización de estos ensayos se utilizó el Phast-System (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) con geles Phast pI 3-9, realizándose según se describe en el manual del aparato.

3.4.2. Electroforesis Nativa.

La electroforesis nativa es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturalización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Siendo así, una de las técnicas más sensibles para el estudio de la composición y estructura de las proteínas nativas, ya que tanto, la conformación como la actividad biológica de las proteínas no se alteran con esta técnica.

Usandose para la consecución de estos ensayos y al igual que en el caso anterior el Phast-System (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), con geles de homogeneous 20 % .

3.4.3. Revelado de la Actividad SOD en Geles.

La actividad SOD fue detectada mediante tinción en gel de poliacrilamida, después de separar las proteínas mediante electroforesis nativa (Homogeneous 20) o isoelectroenfoque (pI 3-9) utilizando el Phast System, siguiendo la técnica descrita por Beyer y Fridovich (1987) basada en la reducción de azul de nitrotetrazolio (NBT). Para lo cual una vez desarrollado el gel fue sumergido en 10 ml de una solución stock (27 ml de tampón fosfato potásico, pH 7.8, 1.5 ml de L-metionina (300mg.10ml⁻¹), 1 ml de azul de nitrotetrazolio (1.41mg.10ml⁻¹) y 0.75 ml de Tritón X-100 1% (v/v), a los que se le añadió 0.3 ml de Riboflavina (0.44mg.10ml), posteriormente es iluminado con luz U.V. hasta que la actividad enzimática apareció como bandas no coloreadas en un fondo azul. Una vez terminado el revelado, el gel es sumergido nuevamente en 10 ml de una solución de acético al 10% durante 10 minutos para garantizar su conservación.

3.4.4. Tinción de Proteínas en Geles.

La determinación de proteínas en los geles se hizo por tinción de plata, siguiendo el protocolo que se describe en el manual del Phast-System, tanto para geles de IEF como para Nativa.

3.5. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LA SOD.

3.5.1. Determinación del Peso molecular.

La determinación del peso molecular de las isoenzimas purificadas SOD I y SOD II se hizo mediante electroforesis Nativa en medio homogéneo 20%, con tinción de nitrato de plata y revelado de actividad por la técnicas descrita anteriormente. Las proteínas marcadoras de peso molecular utilizadas fueron fosforilasa b (97,000), albúmina (66,000), ovoalbúmina (45,000), anhidrasa carbónica (30,000), inhibidor de la tripsina (20,100) y, α -lactoalbúmina (14,400) (Amersham Pharmacia Biotech®).

3.5.2. Determinación del pI.

El punto isoeléctrico de la SOD I y SOD II se determinó por isoelectroenfoque en el Phast-System, como ya se ha mencionado, en geles de poliacrilamida en gradiente de pI 3-9 (IEF 3-9), revelandose según la técnica de Beyer y Fridovich (1987). Como marcadores de punto isoeléctrico fueron usados: Tripsinógeno de páncreas bovino (pI. 9.3), Lectina de *Lens culinaris* (p.I. 8.2), Mioglobina de corazón de caballo (pI. 6.8), Anhidrasa carbónica II de eritrocitos bovinos (pI. 5.9), β -lactoglobulina A de leche de vaca (pI. 5.1), Inhibidor de la tripsina de soja (pI. 4.6), Amiloglucosidase de *Aspergillus niger* (pI. 3.6) y teñidos con nitrato de plata..

3.5.3. Determinación del Cofactor Metálico.

La determinación el tipo de SOD, según su cofactor metálico, se hizo apoyándonos en la diferente sensibilidad que la SOD presenta frente a inhibidores específicos (cianuro sódico y peróxido de hidrógeno) (Bannister y col., 1987). Las isoenzimas purificadas se separaron electroforéticamente sobre gel de IEF 3-9, de la forma ya descrita. Una vez obtenido el gel, en el caso de la inhibición con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y antes de proceder al revelado de la actividad, se sometió a una incubación durante 15 minutos a $37^\circ C$ con una solución de 5mM H_2O_2 y 0.1mM EDTA disódico (sin olvidar realizar un gel control que se somete a la misma incubación pero con agua destilada); tras esta incubación la actividad se reveló de la forma descrita anteriormente.

En el caso de la inhibición con cianuro, una vez obtenido el gel y en la mezcla reveladora de actividad se le adicionó 20 mM de cianuro potásico.

3.5.4. Efecto de la Temperatura en la Conservación de la Actividad SOD.

La estabilidad frente a la temperatura de la fracción P_{85} se ensayó a las temperaturas: $4^\circ C$, $-20^\circ C$, $-80^\circ C$, liofilizado y conservados a $-80^\circ C$.

En cada ensayo se determinó la actividad SOD total (Paolletti y Mocali, 1990) y la cantidad de proteínas de la muestra (Bradford, 1976), realizándose durante periodos de tiempo que oscilaban desde tiempo cero a 6 meses, en el caso de a $4^\circ C$ la actividad fue determinada diariamente durante 8 días, y en el caso de $-20^\circ C$ y $-80^\circ C$ se determinó cada semana durante el mes y medio primero y, luego, cada 30 días hasta el sexto mes. En el caso de la fracción P_{85} liofilizada y conservada a $-80^\circ C$, resuspendida a la hora de su determinación, en el mismo

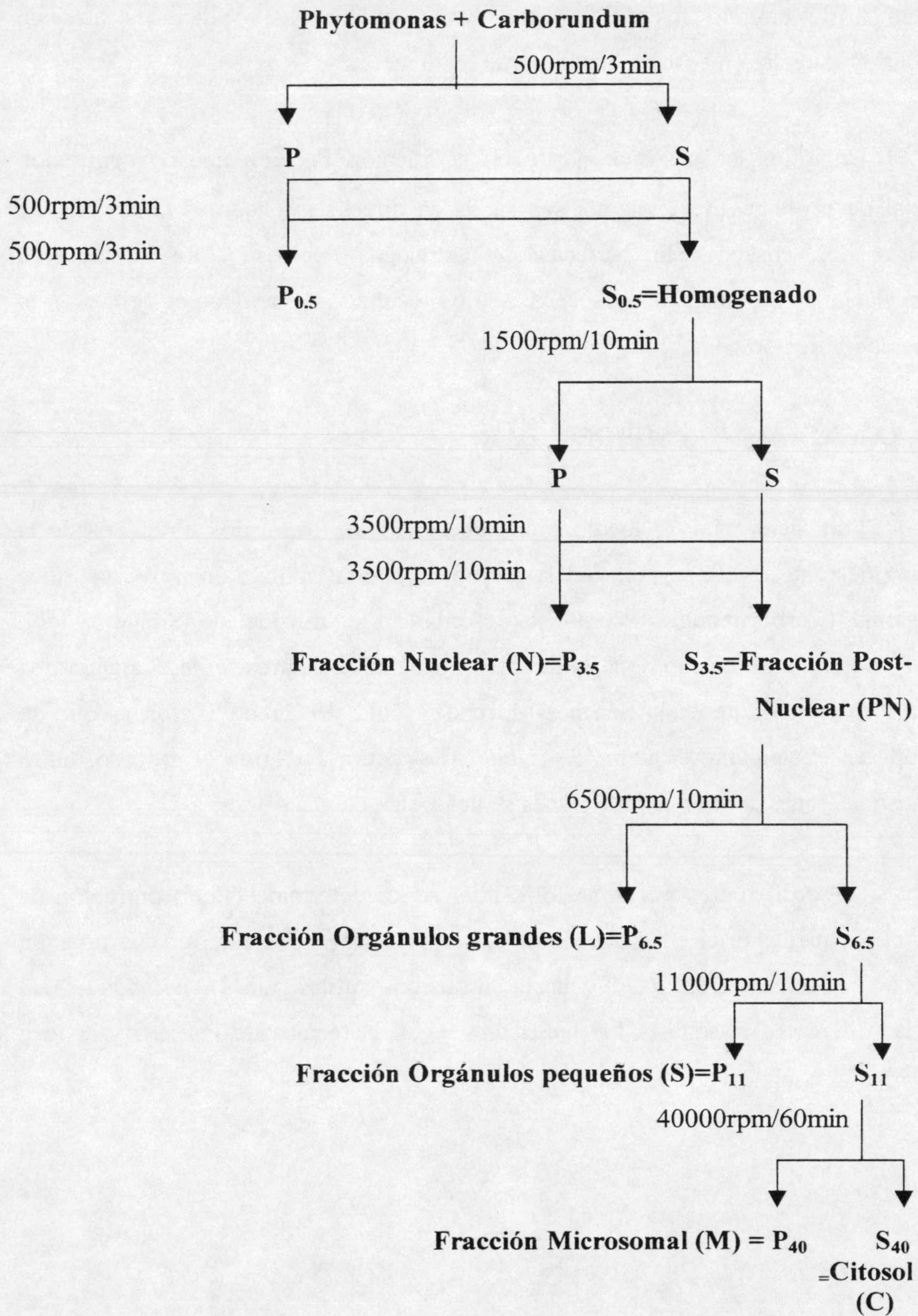
volumen de tampón fosfato potásico para mantener la condiciones que sin liofilizar, se realizó mensualmente durante los 6 meses.

En todos los casos se partió de la fracción **P₈₅** con una concentración inicial de proteínas de 2 mg/ml, separadas en diferentes alícuotas con el fin de realizar los ensayos sin pérdidas de actividad, debidas a los efectos de congelación y descongelación sucesivas. Los resultados obtenidos se refirieron al obtenido a tiempo cero.

3.6. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR.

Para determinar la localización subcelular, los flagelados obtenidos de la forma descrita en el apartado 3.3.1, fueron homogeneizados con polvo de sílice extrafino (Carborundum®) como se describe en el método de Steiger y col. (1980). Para la obtención de las diferentes fracciones celulares se llevó a cabo una centrifugación diferencial (Sánchez-Moreno y col., 1992) de la forma que se detalla en el siguiente esquema de trabajo (**Esquema 1**). Todo el proceso, tanto centrifugaciones como manipulaciones se llevaron a cabo a 4°C.

A las diferentes fracciones obtenidas se les determinó la concentración de proteínas, mediante el ensayo de Bio-Rad, y posteriormente fueron repartidas en alícuotas y conservadas a -80°C hasta su posterior utilización. La actividad SOD de las diferentes fracciones fue realizada según la técnica de Paoletti y Mocali (1990).



Esquema 1

3.7. INMUNOGENICIDAD DE LA SOD.

3.7.1. Producción de Anticuerpos Policlonales.

3.7.1.a. Inmunización de ratones Balb-C.

Con el fin de obtener anticuerpos específicos frente a las dos isoenzimas SOD purificadas se inmunizaron ratones Balb-C (hembras de 4 semanas de edad) con las fracciones proteicas correspondientes a la SODI y SODII, según el siguiente protocolo:

Debido a que en las fracciones mencionadas aparecen otras proteínas además de las SODs y, con el propósito de obtener anticuerpos con la máxima especificidad frente a dichas isoenzimas. Las dos fracciones obtenidas y concentradas tras su elución de la columna Sephadex-G75, fueron separadas por electroforesis de IEF 3-9 en geles de poliacrilamida. Cada muestra (concentración de proteínas de 2mg/ml) fue aplicada con peines de 6 pocillos (5 µl por pocillo), y tras la electroforesis, el carril correspondiente al primer pocillo fue cortado y revelada la actividad SOD con la técnica de Beyer y Fridovich (1987). Visualizada la actividad, al resto del gel le fue cortado la zona correspondiente a la banda de actividad (SODI pI: 6.8 y SODII pI: 3.6). Seguidamente el gel cortado se trituró y homogeneizó con PBS. Este homogenizado fue inyectado vía intraperitoneal a los ratones en cuatro inmunizaciones, una primera inmunización con Adyuvante Completo de Freund (CFA) y las tres siguientes (inmunizaciones de recuerdo) con Adyuvante Incompleto de Freund (IFA), que se realizaron ha intervalos de 10 días. La recogida de los sueros se hizo 15 días después de la última inmunización de recuerdo mediante punción cardiaca, también se recogió suero de ratón que no había sido inmunizado frente a ningún antígeno (control negativo). La sangre recogida se dejó 4 horas a temperatura ambiente para que se formara el coágulo, seguidamente se incubó a 4°C toda la noche para la retracción

del coágulo. Tras ello, se recogió el suero y se centrifugó 10 minutos a 4000 rpm recogiendo el sobrenadante que guardamos en alícuotas a -80°C (Current Protocols, 1995).

3.7.2. Ensayo de los Sueros anti-SODI y anti-SODII

Para examinar la especificidad de los anticuerpos policlonales del suero del ratón inmunizado, se siguió la técnica de Inmunotransferencia o electrotransferencia de proteínas de un gel a una membrana de nitrocelulosa (Westernblot) (Towbin y col., 1979). Las proteínas son separadas en primer lugar por electroforesis en geles de poliacrilamida, y posteriormente transferidas, por la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel, a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C Extra, Nitrocellulose. Pharmacia), usando para ello la unidad PhastTransferTM Semi-dry Transfer Kit (manual del Phast-System).

En nuestro caso, las proteínas de la fracción **P₈₅** son separadas en primer lugar por electroforesis en IEF 3-9, y posterior transferencia a las membranas de nitrocelulosa, durante 30 minutos. Después se bloquearon los sitios libres no específicos de la membrana con PBS que contiene gelatina al 0,4 % y Tween 20 al 0,2 % (tampón de bloqueo), durante 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente se procedió a lavado con PBS al 0,1% de Tween 20 (tampón de lavado). A continuación fue incubada durante 2 horas a temperatura ambiente, en un caso, con suero negativo y con suero anti-SODI, a dilución 1/100; y en otro caso con suero anti-SODII a las diluciones siguientes: 1/50, 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/5000, 1/10000, 1/15000, 1/20000 y 1/40000. Tras lavar con tampón de lavado, se incubó nuevamente durante otras 2 horas a temperatura ambiente con anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (Fc específico) (Sigma®) a dilución 1/1000. Después de un nuevo lavado se incubó con el sustrato de la peroxidasa (3,3'-diaminobenzidina, 0,5 mg/ml en tampón Tris/HCl

0,1 M, a pH 7.4, conteniendo 1/5000 H₂O₂ de 10 v/v), durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente la membrana fue lavada con agua destilada.

El suero anti-SODII fue ensayado de la misma forma, frente a proteínas purificadas (fracción **P₈₅**) obtenidas de 19 protozoos parásitos pertenecientes a diferentes géneros, cultivados según Uttaro y col. (1997). Nueve especies del género *Phytomonas* de diferentes plantas: Una de cocotero (Hartl. Menara y col., 1988), una segunda aislada de *Euphorbia pinea* (EpiM1. Guerrini y col., 1992), otra de *Trifolium sp.* (*Trifolium sp.*. Sánchez-Moreno y col., 1995b), dos aisladas de *Lycopersicum esculentum* (tomate) de Brasil (9T o *P. serpens* y 10T, donadas por V. Jankevicius, un tercer aislado igualmente del fruto de tomate pero, en España (Fernández-Becerra y col., 1996), dos aislados de insectos: *Fabriceilis gonagra* (Coreidae, 19/231G41, TCC-110. Teixeira y col., 1996) y *Veneza zonata* (Coreidae, 40/460, TCC-203. Teixeira y col., 1996), y una noveno aislado de mango (*Mangifera indica*, Fernández-Becerra y col., 1996). Dos especies del género *Herpetomonas*: *H. samuelpessoai* (ATCC 30252) y *H. davidi* (TCC 048). Una especie del género *Crithidia* (*C. luciliae*, ATCC 14765) y otra, del género *Leptomonas* (*L. collosoma*, ATCC 30261). Tres cepas del género *Tripanosoma* (*T. cruzi* cepa maracay, un aislado de un caso asintomático humano de Brazil y otro aislado de Perú (Miralles y col, 2002). Una especie perteneciente al género *Leishmania*: (*L. donovani*, LCR-L133). Y otros dos protozoos: *Trichomonas vaginalis* y *Giardia intestinalis*

La dilución del suero anti-SODII fue en todos los casos de 1/500, exceptuando a *C. luciliae* y *L. collosoma* que además se ensayó a 1/1000.

3.7.3. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):

Formas promastigotes de *P. characias* procedentes del cultivo in vitro en medio Grace's, fueron lavadas (3 veces) con PBS por centrifugación durante 10 minutos a 1500 rpm. Una gota de la suspensión se depositó en los pocillos de un porta para inmunofluorescencia, dejándose a temperatura ambiente hasta su adhesión a la superficie y la evaporación del tampón. Posteriormente fueron fijados con acetona a temperatura ambiente. Una vez fijada la muestra se incubó con el suero anti-SODII (dilución 1/100) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portas se lavaron tres veces con PBS, y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con suero de cabra marcado con fluoresceína (FITC) anti-IgG Fab de ratón (Sigma®) a dilución 1/100 en PBS y con azul de Evans (0.003%). Lavándose y procediendo al montaje del cubreobjetos con glicerina tamponada con PBS (9 volúmenes de glicerina, 1 volumen de PBS) para su observación a microscopía de fluorescencia.

3.7.4. Inmunocitoquímica bajo Microscopía Electrónica de Transmisión: Localización de la SOD con el Suero Policlonal de ratón anti-SOD.

Para la realización de esta técnica se procedió, de la misma forma que se ha descrito anteriormente, a la obtención de promastigotes de *P. characias*. Los tripanosomátidos se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato, a pH 7 durante 12 horas a 4°C. Posteriormente el botón fijado se lavó tres veces con tampón carbonato a pH 9, se trató con la resina LR White y se hicieron las rejillas.

Para bloquear los sitios no específicos, las rejillas fueron incubadas con una solución de albúmina al 0.5% (w/v) en PBS-Tween 20 al 0.05%. Seguidamente, se incubaron 30 minutos con los sueros de ratón anti-SOD II a diluciones 1/50 y 1/100 en PBS. Tras ello, se lavaron con PBS, y para la

visualización del complejo proteína-anticuerpo al microscopio electrónico de transmisión se incubaron con el complejo proteína A-oro coloidal (Protein A-10 nm colloidal gold labeled, Sigma®) a dilución 1/25 en tampón PBS con albúmina al 0.5% (w/v) y Tween 20 al 0.5%, durante 30 min. Todos los pasos de incubación se efectuaron a temperatura ambiente. Paralelamente, se realizó un control, que se incubó directamente con la proteína A, sin previa incubación con suero. Seguido de un lavado con PBS y agua destilada, y posterior observación a Microscopía Electrónica de Transmisión.

3.7.5. Ensayo de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Se trata de una técnica muy sensible, descrita por Voller y col. (1976), usada para la detección de antígenos o anticuerpos de interés en una amplia variedad de muestras biológicas. En nuestro caso utilizamos el ELISA Indirecto en la que primero se une un antígeno a una fase sólida (placa de poliestireno), luego actúa un anticuerpo secundario y posteriormente el anticuerpo conjugado con una enzima es incubado con el antígeno capturado y después de lavar el exceso del conjugado se agrega el sustrato cromogénico. Para que se desarrolle color, el anticuerpo primario que es específico para el antígeno debe estar presente en el complejo final, o lo que es lo mismo, que detecta anticuerpos específicos.

De acuerdo con la técnica, lo que primero se hizo fue la sensibilización de la placa o fijación del antígeno, en placas de 96 pocillos (NuncTM), en cada pocillo se pusieron diferentes cantidades de antígeno, en nuestro caso fracción P₈₅ (0.5, 1, 5, 10, 25 µgramos), en un volumen final 100µl por pocillo en tampón carbonato-bicarbonato 0.1M, pH 9.6, dejándose incubar 2 h a 37°C. Seguido de tres lavados con tampón de lavado (PBS-Tween20 0.05%). Y a continuación, se bloqueó la placa bañando los pocillos con tampón de bloqueo (PBS-Tween20 0.2%-BSA 1%), dejándolo 2h a temperatura ambiente. Después de un nuevo

lavado se incubó con el suero anti- SOD II, obtenido de la forma descrita en el apartado 3.7.1.a, se ensayaron las diluciones 1/500, 1/1000, 1/3000, 1/5000, 1/10000, 1/20000, 1/40000, en tampón de lavado durante 45 min a 37°C. Tras un nuevo lavado, se incubó con el inmunoconjugado (antiIgG anti-raton conjugado con peroxidasa, Sigma®) a dilución 1/2000, durante 30 min. a 37°C. Y después de un nuevo lavado se reveló, empleándose como sustrato de la peroxidasa la o-fenilendiamina dihidroclorihídrica -OPD-(Sigma®) que incubamos en oscuridad durante unos 20 min, transcurrido ese tiempo se paró la reacción con 50 µl de HCl 3N. La reacción fue leída a 450 nm.

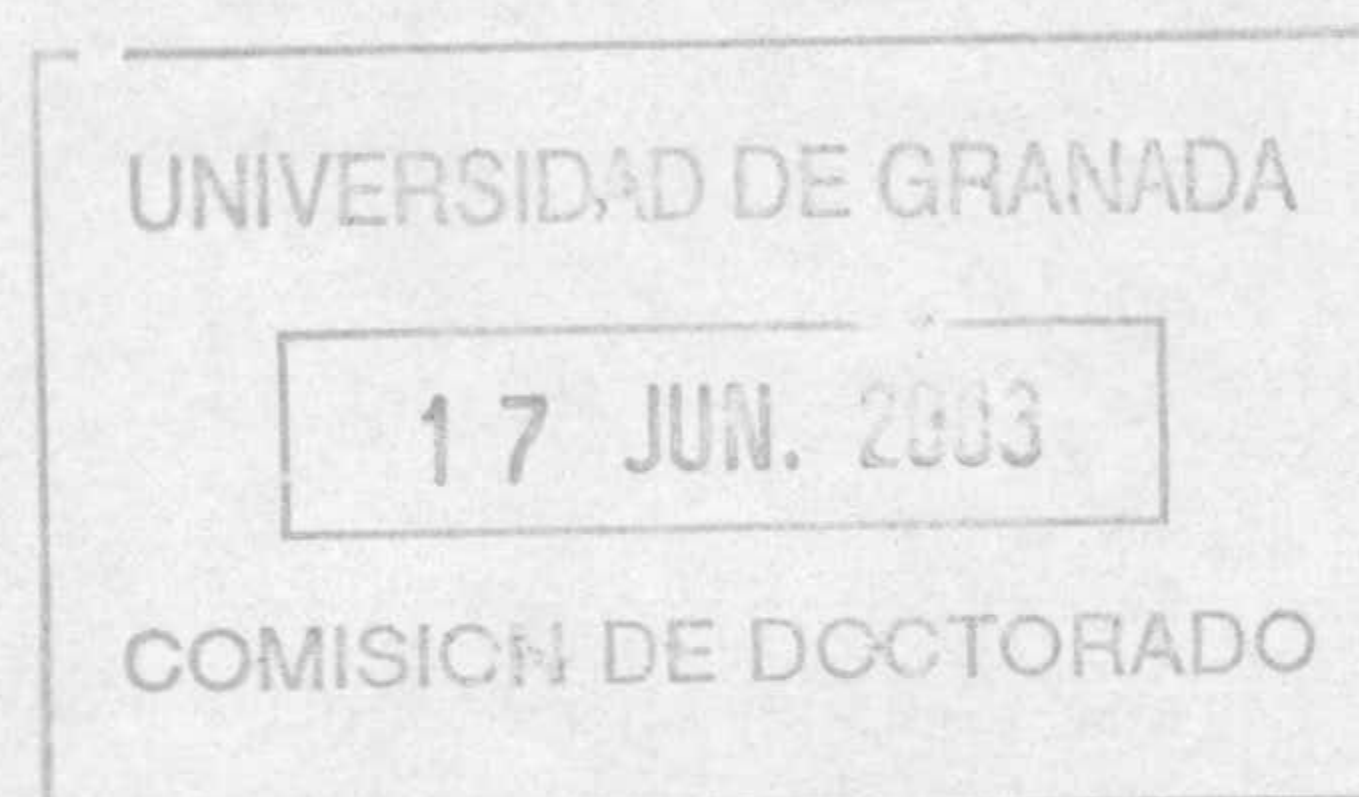
En esta reacción también se hicieron sus correspondientes controles negativos, sin suero (control de la reacción) y control de suero (suero de ratón no inmunizado).

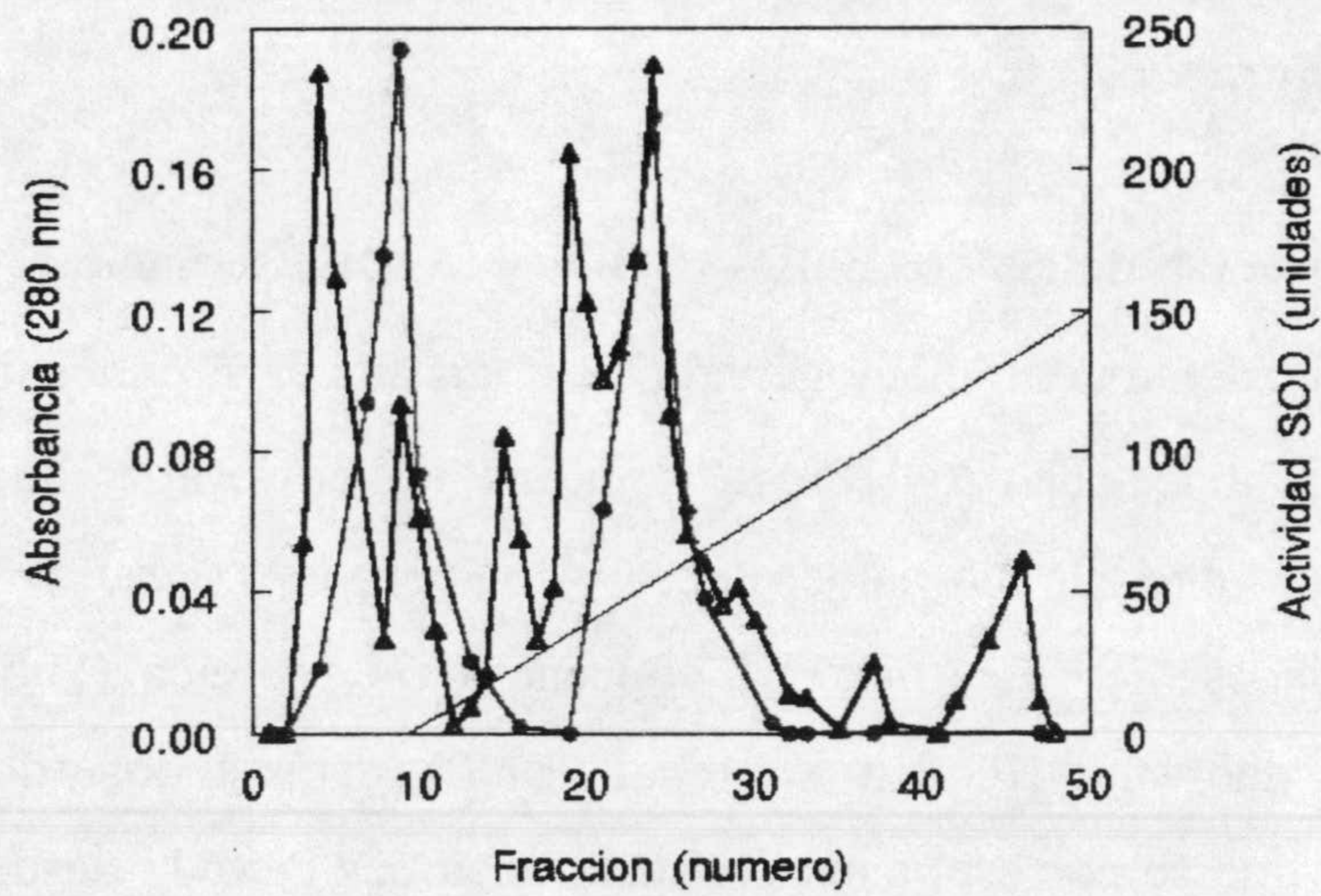
4. RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1. PURIFICACIÓN DE LAS DOS ISOENZIMAS SOD DE *Phytomonas* aisladas de *E.characias*.

La purificación de las dos SODs (SODI y SODII) se inició a partir de la fracción P₈₅ procedente de un homogenado de *P.* aislada de *E.characias* con una concentración proteica de 263,18mg. Aplicándose en primer lugar a una cromatografía de intercambio iónico en QAE-Sephadex (Gráfica 1). A las fracciones eluidas se les determinó la concentración proteica (Bradford, M., 1976) y la actividad SOD (Paoletti y Mocali, 1990), detectándose dos picos de actividad SOD, que se corresponden con las fracciones Pico 1: desde la 3-15 y Pico 2: 19-30. Paralelamente, a estas fracciones se les realizó una electroforesis en IEF de punto isoelectrico 3-9 que fue revelada con la técnica de Beyer y Fridovich (1987) con el fin de localizar las bandas de actividad superóxido dismutasa. Las fracciones correspondientes a cada pico se reunieron, se desalinizaron en columnas de Sephadex G-25 (PD-10.Pharmacia) y concentraron hasta un volumen final de 2.5 ml (centriplus[®].Amicon) (Gráfica 1.Figura 1).





Gráfica 1.- Purificación de dos SODs de *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias* por QAE-Sephadex.

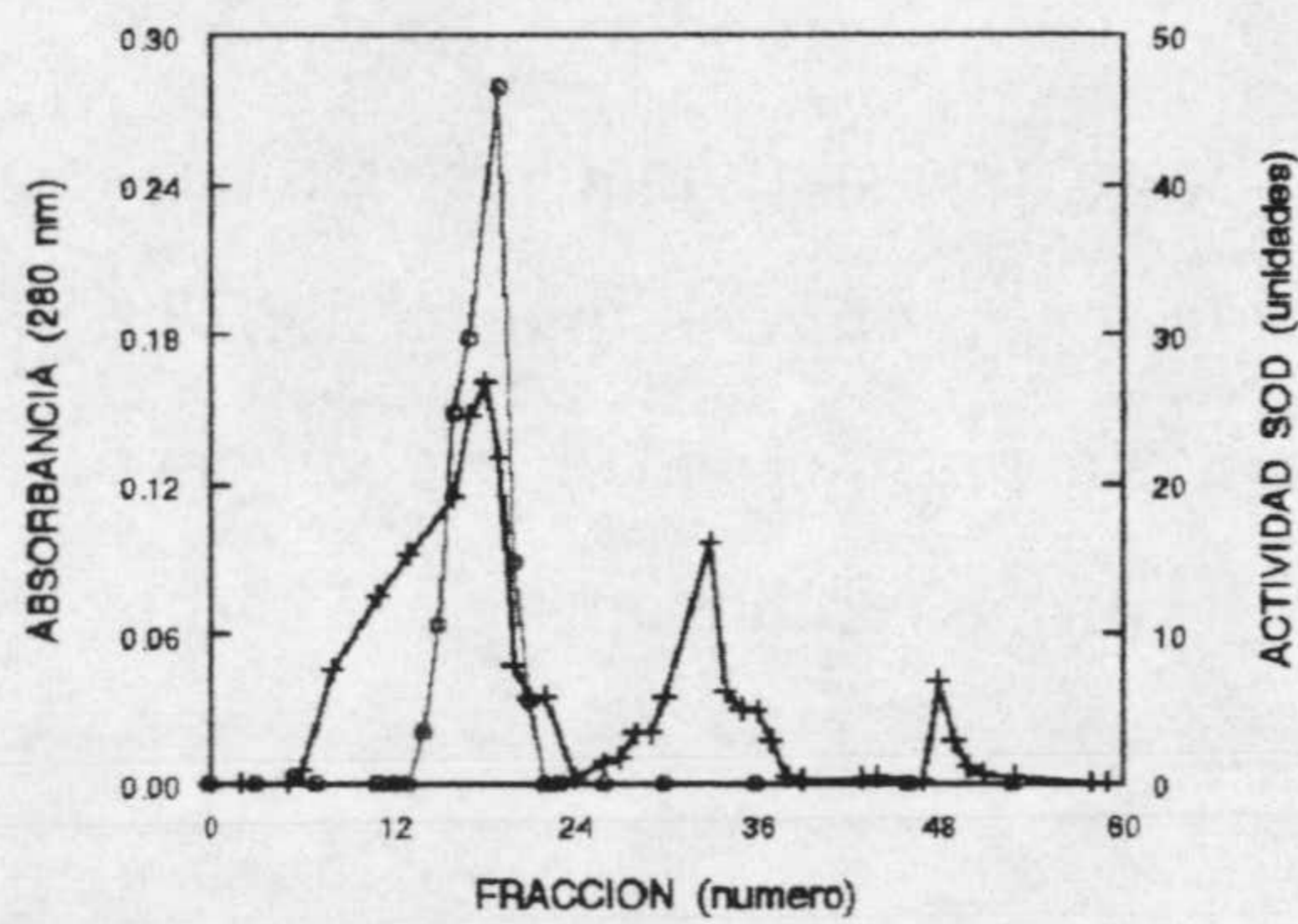
(-▲-) concentración de proteínas; (-●-) actividad SOD y (----) gradiente 0-0.6 M de KCl.



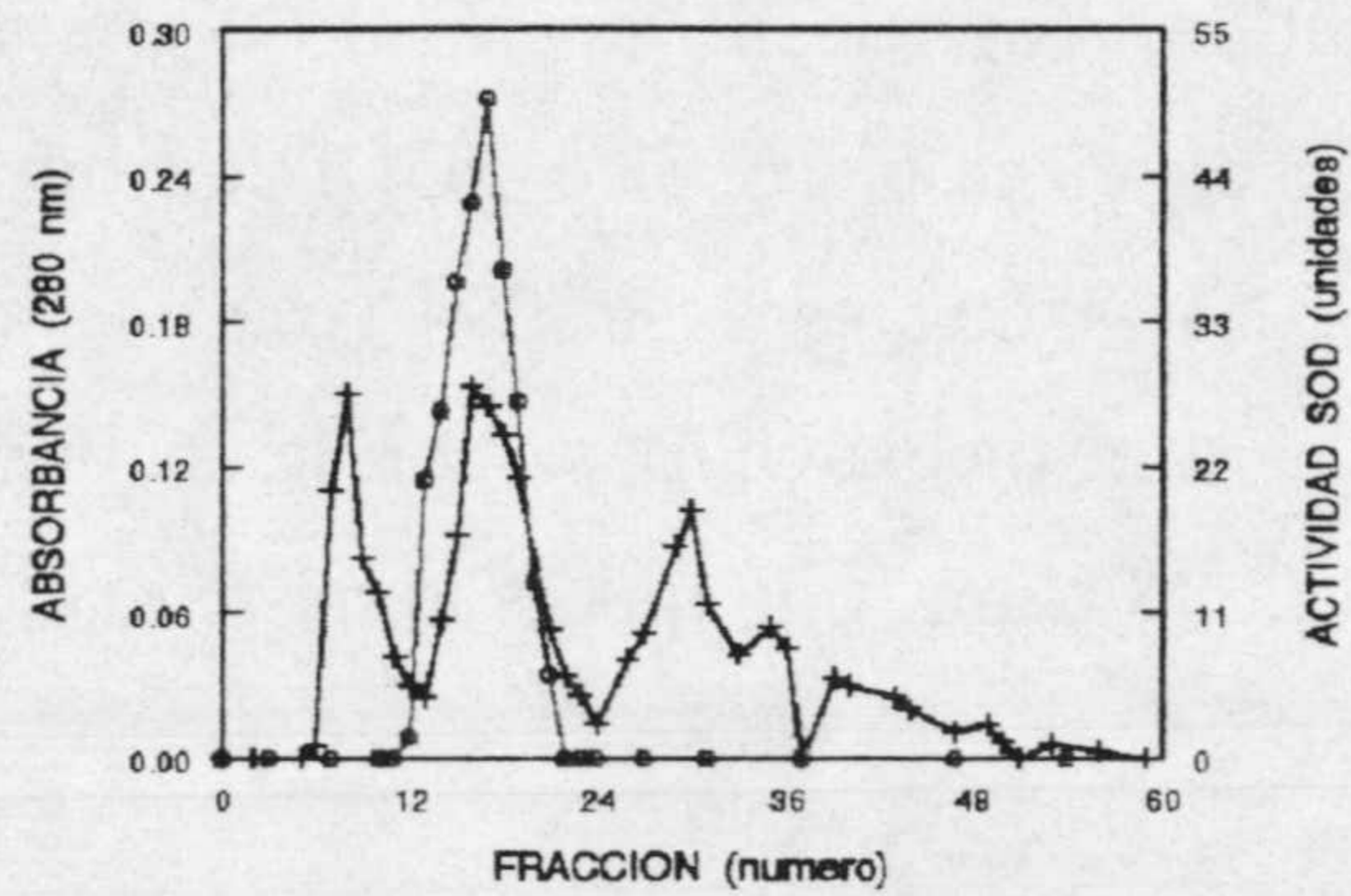
Figura 1.- Isoelectroenfoque pI (3-9) de las dos enzimas SODs de *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias* de las fracciones eluidas por QAE-Sephadex. La actividad SOD fue revelada según la técnica de Beyer y Fridovich (1987).

Ambos picos, denominados Q1 y Q2 según su orden de aparición, fueron sometidos a una nueva separación cromatográfica en Sephadex G-75. En la Gráfica 2 y 3 se muestra el fraccionamiento de estos dos picos. Al igual que en la

cromatografía anterior, se determinaron la concentración de proteínas (Bradford, 1976), la actividad SOD (Paoletti y Mocali, 1990), y en IEF de punto isoelectrico 3-9 revelado según Beyer y Fridovich (1987) (Gráfica 2 y 3.Figura 2 y 3).



Gráfica 2.- Purificación de la SODI de *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias* por Sephadex G-75.
 (-+-) concentración de proteínas;
 (-o-) actividad SOD según Paoletti -Mocali (1990)



Gráfica 3.- Purificación de la SODII de *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias* por Sephadex G-75.
 (-+-) concentración de proteínas;
 (-o-) actividad SOD según Paoletti -Mocali (1990)

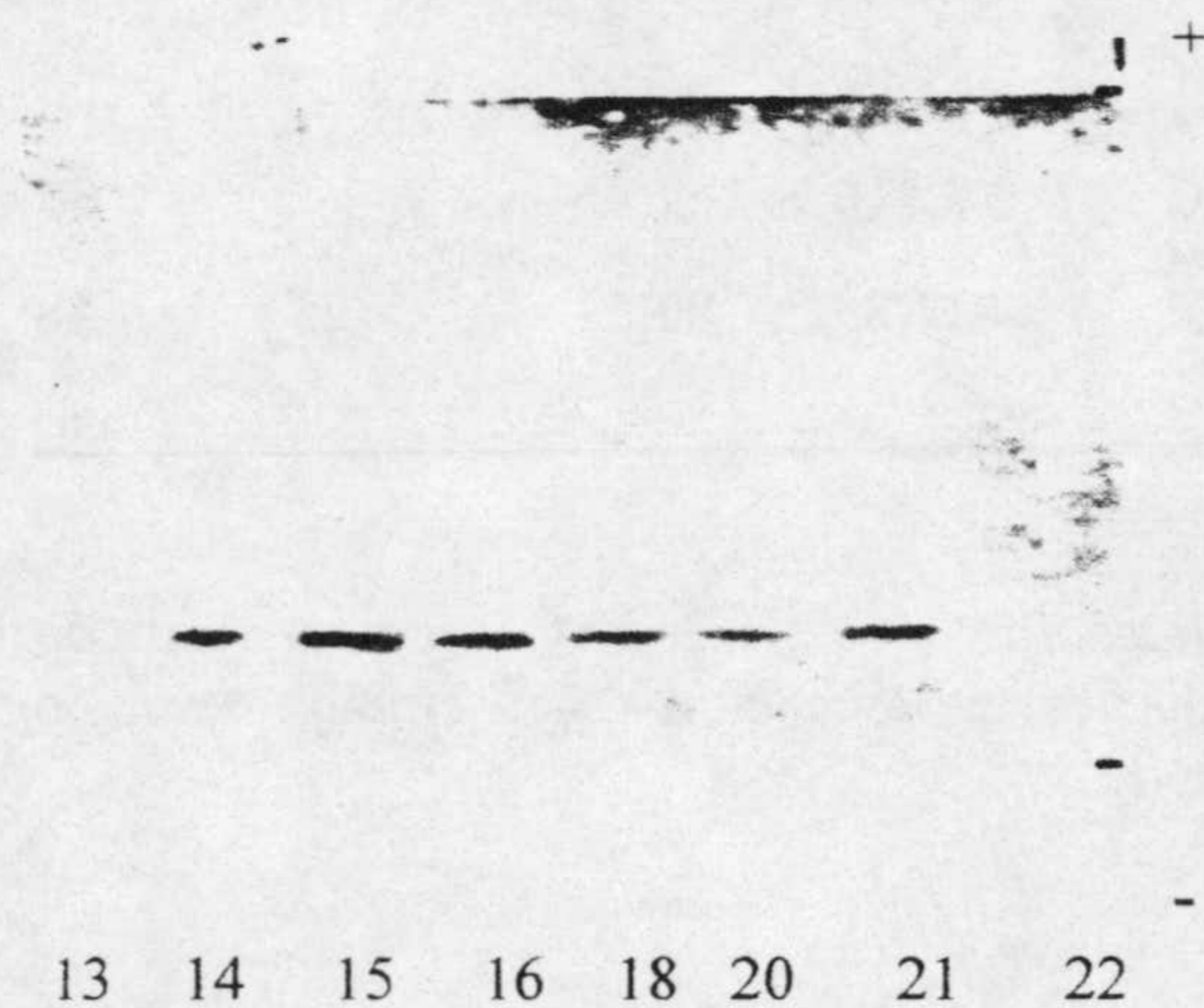


Figura 2.- Isoelectroenfoque pI (3-9) de las fracciones eluidadas por Sephadex G-75 de la SOD-I de *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias*. La actividad SOD fue revelada según la técnica de Beyer y Fridovich (1987).

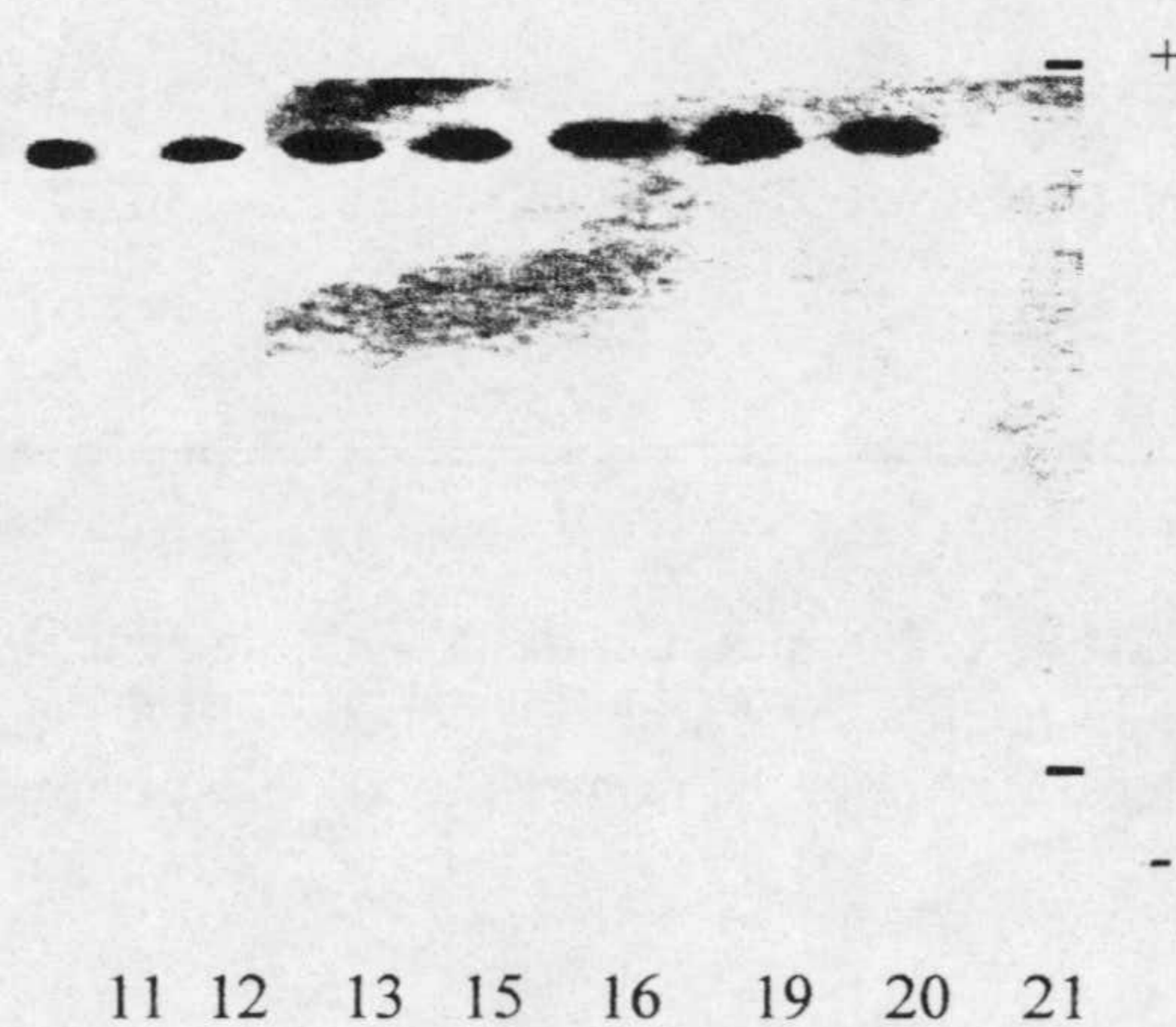


Figura 3.- Isoelectroenfoque pI (3-9) de las fracciones eluidadas por Sephadex G-75 de la SOD-II de *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias*. La actividad SOD fue revelada según la técnica de Beyer y Fridovich (1987).

Las fracciones obtenidas, llamadas SODI y SODII, se reunieron y concentraron de la forma ya descrita.

La Tabla 1 resume el proceso de purificación, resultando una purificación total de la actividad Superóxido dismutasa de 697 veces y rendimiento del 81%. Que en el caso del pico SODI fue purificada hasta una actividad específica de 1.371,16 U/mg, es decir, 394 veces de purificación y con un rendimiento del 33%. Y para el pico SODII se consiguió purificarla hasta una actividad específica de 1.122,85 U/mg, o lo que es lo mismo, 323 veces y con un rendimiento del 48%.

Fracción	Proteínas totales (mg)	Actividad Total (unidades) \pm SD	Actividad específica (U/mg) \pm SD	Purificación	Rendimiento (%)
Homogenado	263,18	916,99 \pm 116,03	3,48 \pm 0,38	1	100
P ₈₅	41,17	794,63 \pm 40,60	19,30 \pm 1,61	6	87
Pico Q-1	2,02	344,00 \pm 44,78	170,30 \pm 22,17	49	37
Pico Q-2	2,66	517,34 \pm 68,91	194,49 \pm 25,91	56	56
Pico SODI	0,22	302,79 \pm 53,50	1371,16 \pm 152,86	394	33
Pico SODII	0,39	437,91 \pm 71,22	1122,85 \pm 182,61	323	48

TABLA 1. Purificación de la SOD de *Phytomonas characias*. La actividad SOD fue determinada por la técnica de Paoletti y Mocali (1990). \pm SD es la desviación estandar de la media de cinco determinaciones. El número total de experimentos fue de 5.

4.2. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA SODI Y DE LA SODII.

La determinación del peso molecular de la SOD-I y SOD-II se hizo en electroforesis Nativa en medio homogéneo al 20% (Figura 4). Para la SODI se estimó un peso molecular aproximado de 66 kDa, mientras que para la SODII el peso molecular estimado fue de aproximadamente 22 kDa.

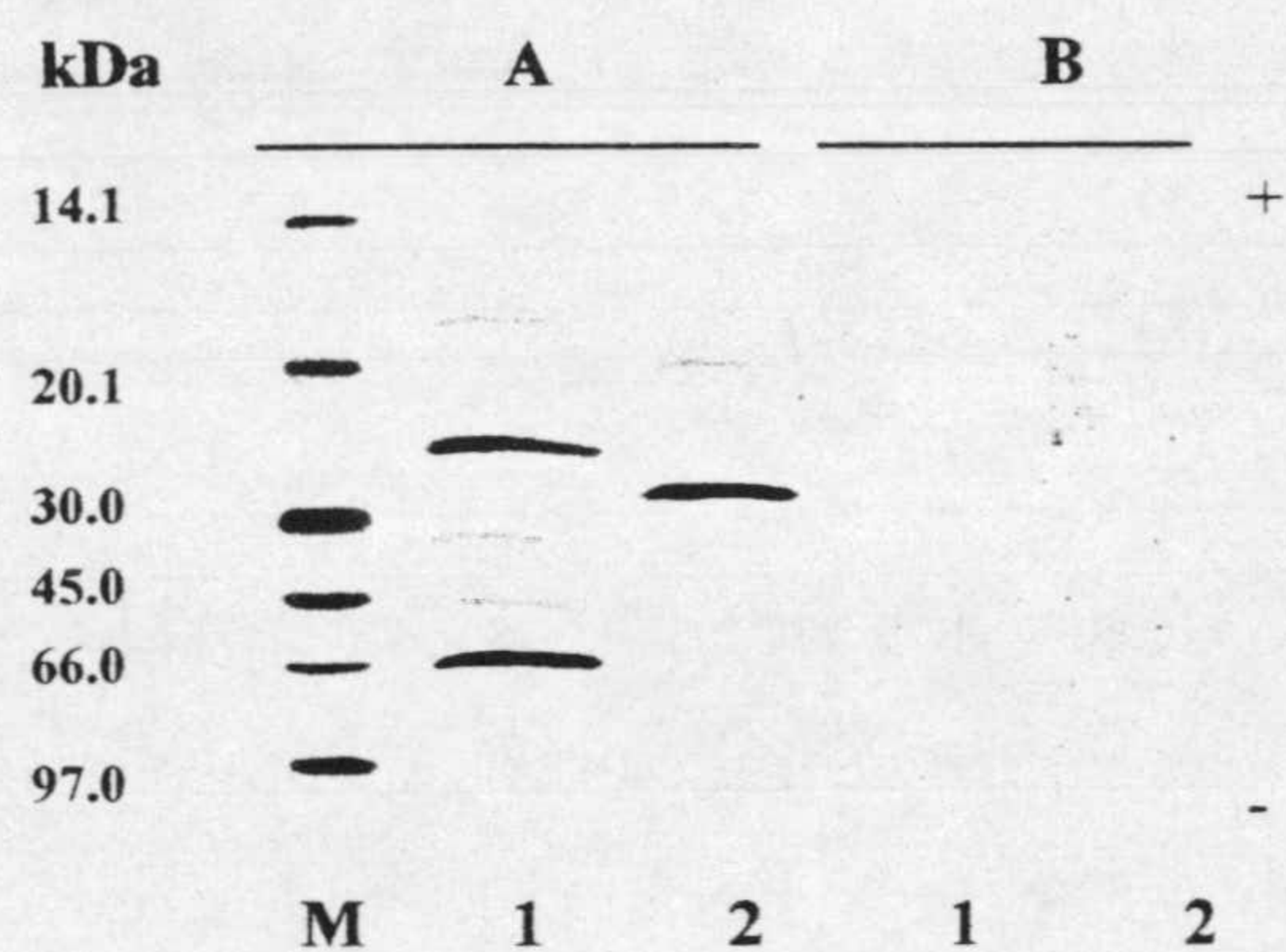


Figura 4.- Determinación del Peso molecular en electroforesis nativa en medio homogéneo al 20 % de la SODI y SODII purificadas de *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias*. (A) Tinción de nitrato de plata: **M.**- Proteínas marcadoras, 1.- SODI y 2.- SODII. (B) Actividad SOD revelada según la técnica de Beyer y Fridovich (1987): 1.- SODI y 2.- SODII.

4.3. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO DE LA SODI Y SODII.

El pI de la SODI y SODII, se determinó mediante una electroforesis de IEF 3-9 de la forma descrita en el apartado 3.5.4 de Material y Métodos. Estos resultados se muestran en la Figura 5: para la SODI se estimó el pI en 6.8 y, para la SODII 3.6, aproximadamente.

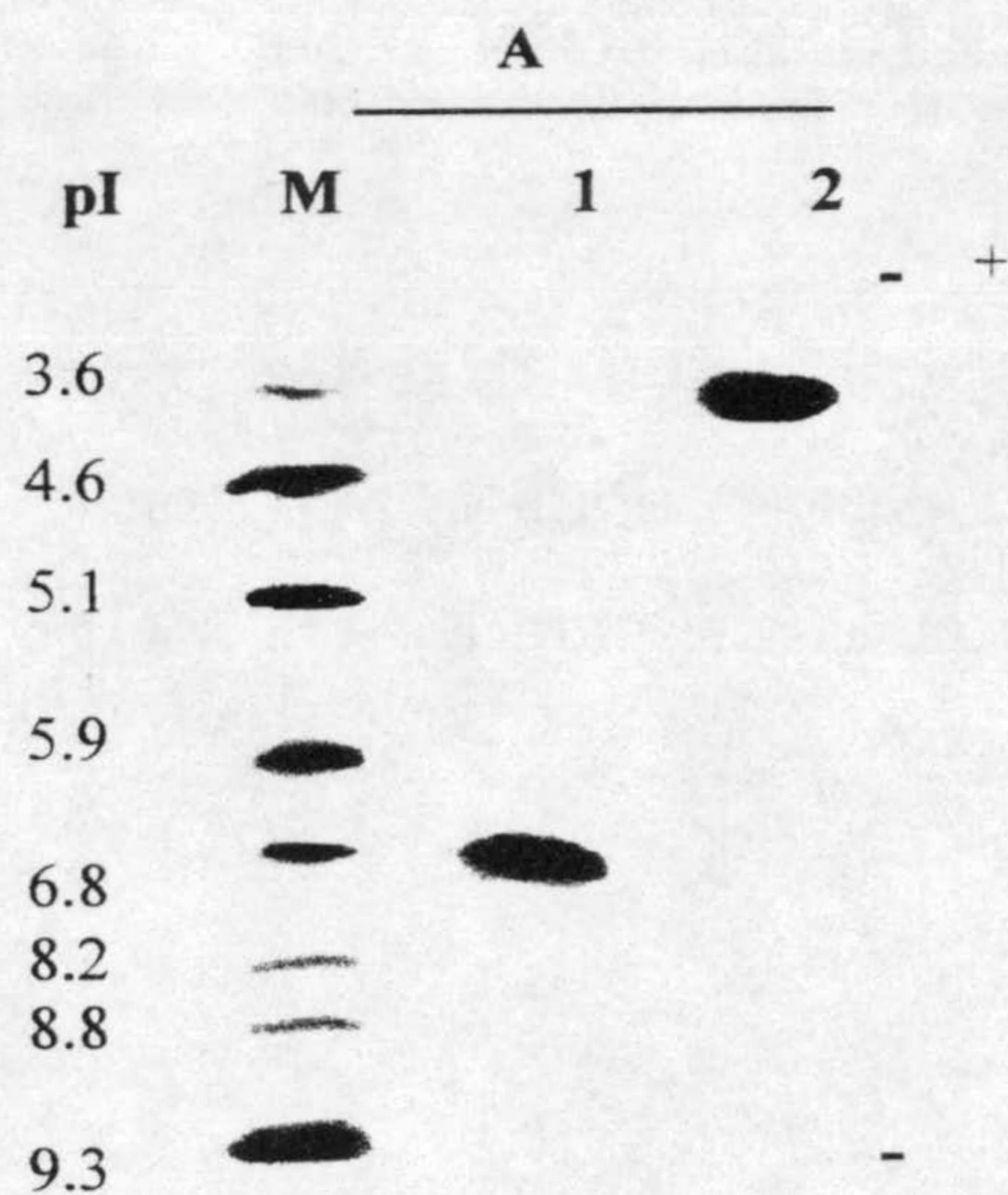


Figura 5.- Determinación del Punto isoelectrico en isoelectroenfoque pI 3-9 de las isoenzimas de la SOD de *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias*. (M) Proteinas marcadoras de pI. (A) Actividad SOD revelada según la técnica de Beyer y Fridovich (1987). 1.- SODI y 2.- SODII.

4.4. DETERMINACIÓN DEL COFACTOR METÁLICO.

La determinación del cofactor metálico de las dos isoenzimas Superóxido dismutasa de *P.* aisladas de *E. characias*, se hizo sobre la fracción P₈₅. Para ello seguimos el protocolo descrito en el apartado 3.5.3 de Material y Métodos, en base a la diferente sensibilidad a inhibidores específicos de cada tipo de SOD (cianuro y peróxido de hidrógeno). En la Figura 6, en las líneas A y B no se observó ninguna inhibición de la actividad SOD (A: control; B: revelado en presencia de cianuro), sin embargo, en la línea C la actividad aparece inhibida (revelada tras la incubación con H₂O₂). Estos resultados nos indican que estaríamos frente a dos isoenzimas de hierro Superóxido dismutasa (FeSOD).



Figura 6.- Determinación del cofactor metálico de las SODs (fracción P₈₅) por la diferente sensibilidad a inhibidores específicos en isoelectroenfoque de pI 3-9 y revelada según la técnica de Beyer y Fridovich (1987). (A) control, (B) revelado en presencia de 20 mM CN⁻, (C) revelado tras incubar durante 45 min con 5mM de H₂O₂, 0,1 mM de EDTA disódico.

4.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CONSERVACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOD.

La Figura 7 refleja la estabilidad de la actividad SOD de la fracción P₈₅ de *P.* aisladas de *E.characias* en distintas condiciones de conservación a lo largo de seis meses.

A 4°C (Figura 7A) la actividad enzimática decrece de forma prácticamente lineal hasta el 8° día, en el que los valores son mínimos. En la Figura 7B, se representa los valores de actividad de las alicuotas conservadas a -20°C, -80°C y de liofilizado conservado a -80°C, de la fracción P₈₅. Tanto en el caso de -20°C y -80°C estos valores decrecen de forma más o menos gradual hasta el día 85, a partir del que, se estabilizan los valores de actividad. Sin embargo, el grado de decrecimiento es mayor en la conservación a -20°C, esto es, el doble que a -80°C. Mientras que, para el caso del liofilizado conservado a -80°C los valores de actividad SOD permanecen estables durante los 6 meses.

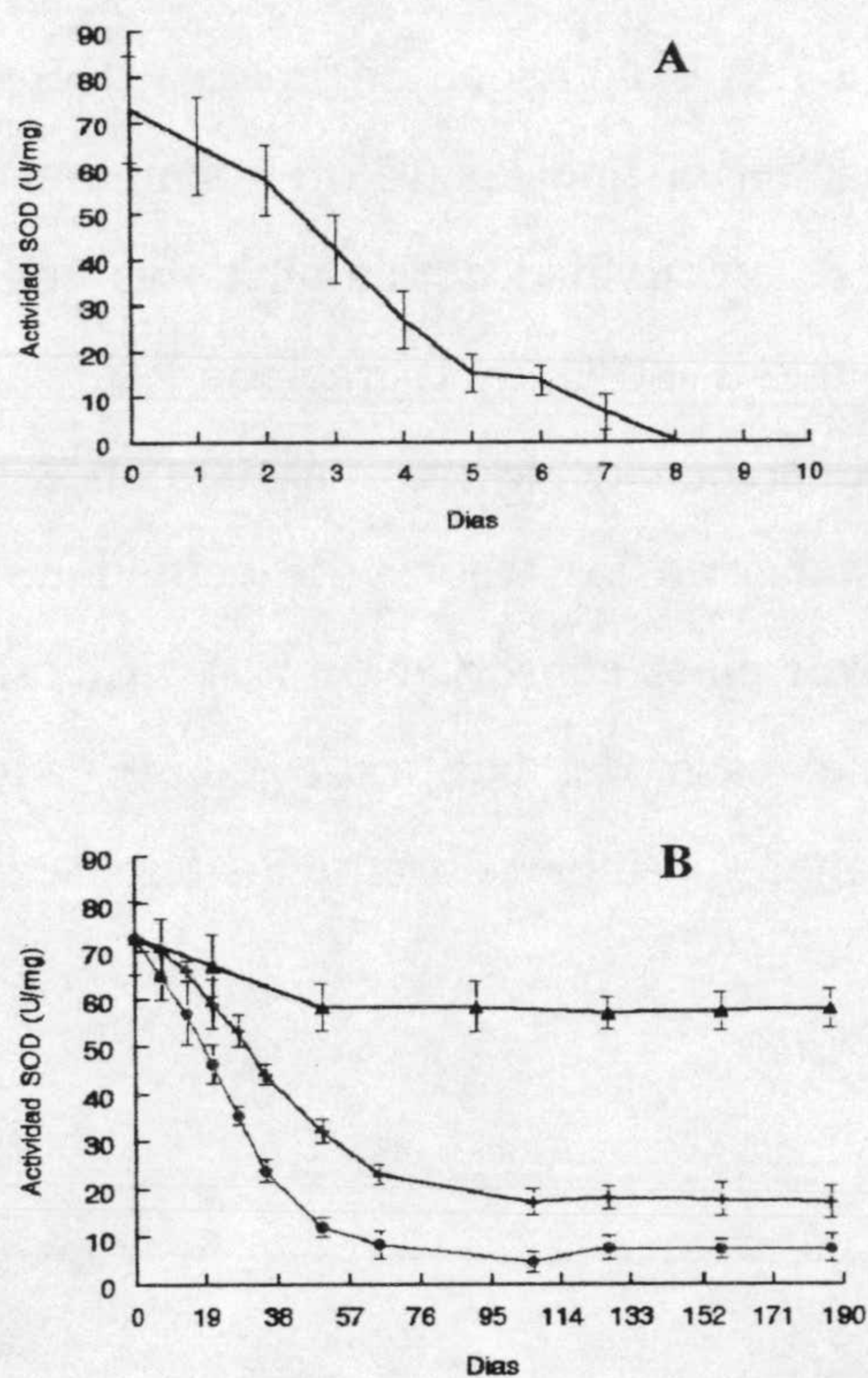


Figura 7.- Estabilidad de la actividad SOD de *Phytomonas* aisladas de *E. characias*, según la técnica de Paoletti y Mocali (1990), en diferentes condiciones de conservación. (A) ----- 4° C de temperatura. (B) --- ○ --- a -20° C, --- + --- a -80° C y --- ▲ -- liofilizado.

4.6. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA SOD.

En la Figura 8A aparece representada la localización subcelular de la SOD de *Phytomonas* aisladas de *E.characias*, en las diferentes fracciones obtenidas según el método descrito en el apartado 3.6 de Material y Métodos. La distribución de la actividad Superóxido dismutasa se expresó en valores de porcentajes de actividad específica relativa (RSA) en las diferentes fracciones obtenidas de las centrifugaciones diferenciales (H, PN, N, L, S, M, C) frente al % de proteínas acumuladas. También se realizó una electroforesis en isoelectroenfoque (IEF 3-9) de las fracciones y se reveló la actividad mediante la técnica de Beyer y Fridovich (1987) (Figura 8B).

Según los resultados de la electroforesis, ambas isoenzimas (SODI y SODII) se ubican en el citosol, mientras que, en la fracción de orgánulos pequeños nos encontramos una actividad SODII.

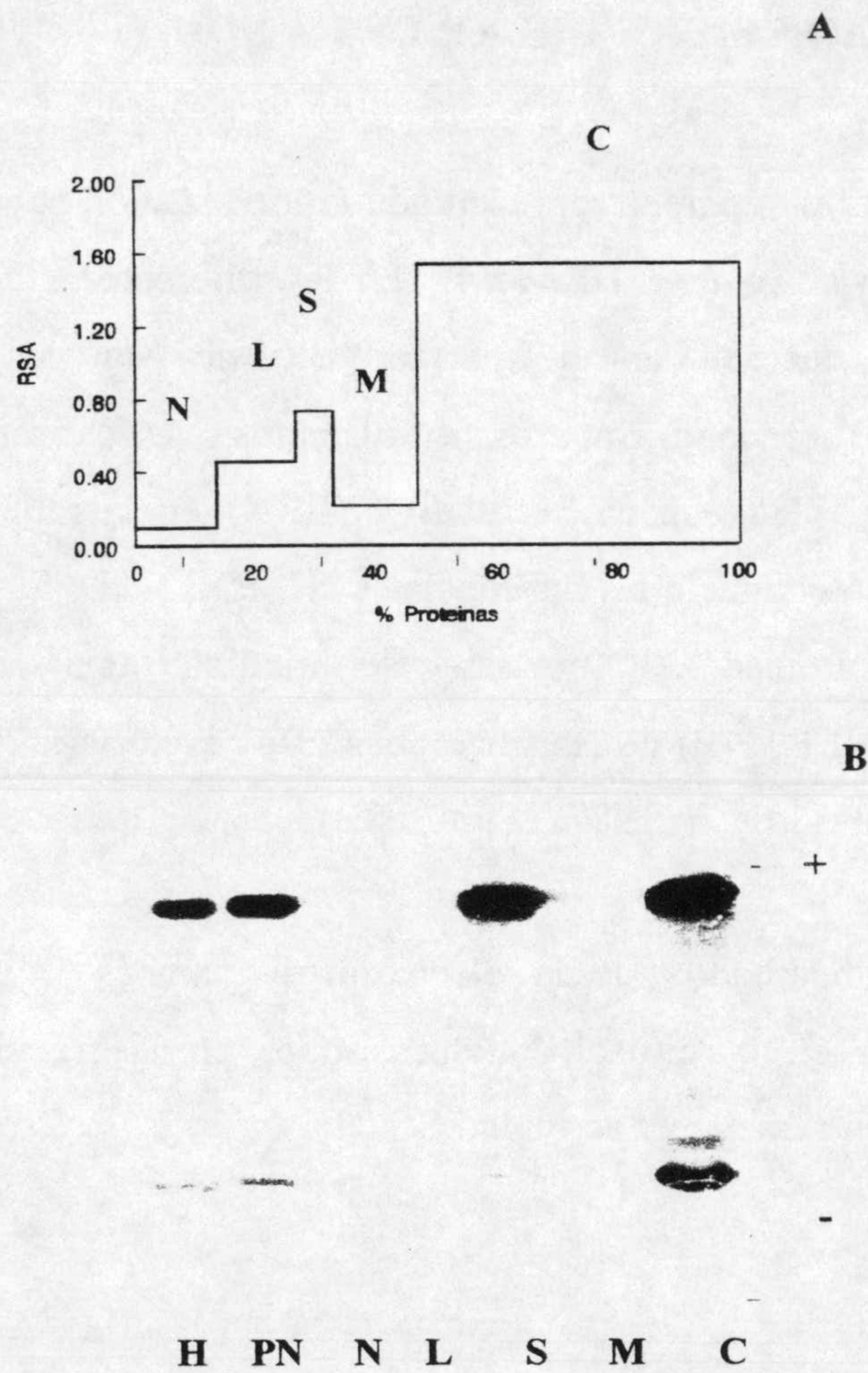


Figura 8.- Localización subcelular de la SOD de *Phytomonas* aisladas de *E. characias*. (A) Perfil de distribución de la actividad SOD en las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial, según técnica descrita en el apartado Material y Métodos, la actividad SOD fue determinada según la técnica de Paoletti y Mocali (1990). Las fracciones están representadas en el orden de su aislamiento (de izquierda a derecha): (H) homogenado, (PN) fracción postnuclear, (N) fracción nuclear, (L) fracción orgánulos grandes, (S) fracción orgánulos pequeños, (M) fracción microsomal y (C) fracción citosólica. (B) Actividad SOD por isoelectroenfoque de pI 3-9 de las diferentes fracciones y reveladas según la técnica de Beyer y Fridovich (1987).

4.7. INMUNOGENICIDAD DE LA SOD.

La Figura 9 refleja el ensayo de inmunotransferencia de los sueros anti-SODs, que se obtuvieron de la forma descrita en el apartado de Material y Métodos 3.7.1, frente a la fracción P₈₅ de *Phytomonas* aisladas de *E. characias*. La línea 1 corresponde al suero control: suero de ratón Balb-C sin inmunizar; línea 2: suero de ratón Balb-C obtenido por la inmunización con la banda de pI 6.8 (suero anti-SODI); y las líneas 3 a 14: suero anti-SODII proveniente de ratón Balb-C inmunizado con la banda de pI 3.6. Tanto en el caso del suero control como en el suero anti-SODI la reacción fue negativa a dilución 1/50 y 1/100. Mientras que, en el caso del suero anti-SODII las reacciones fueron positivas desde la dilución 1/50 hasta la dilución 1/40000.

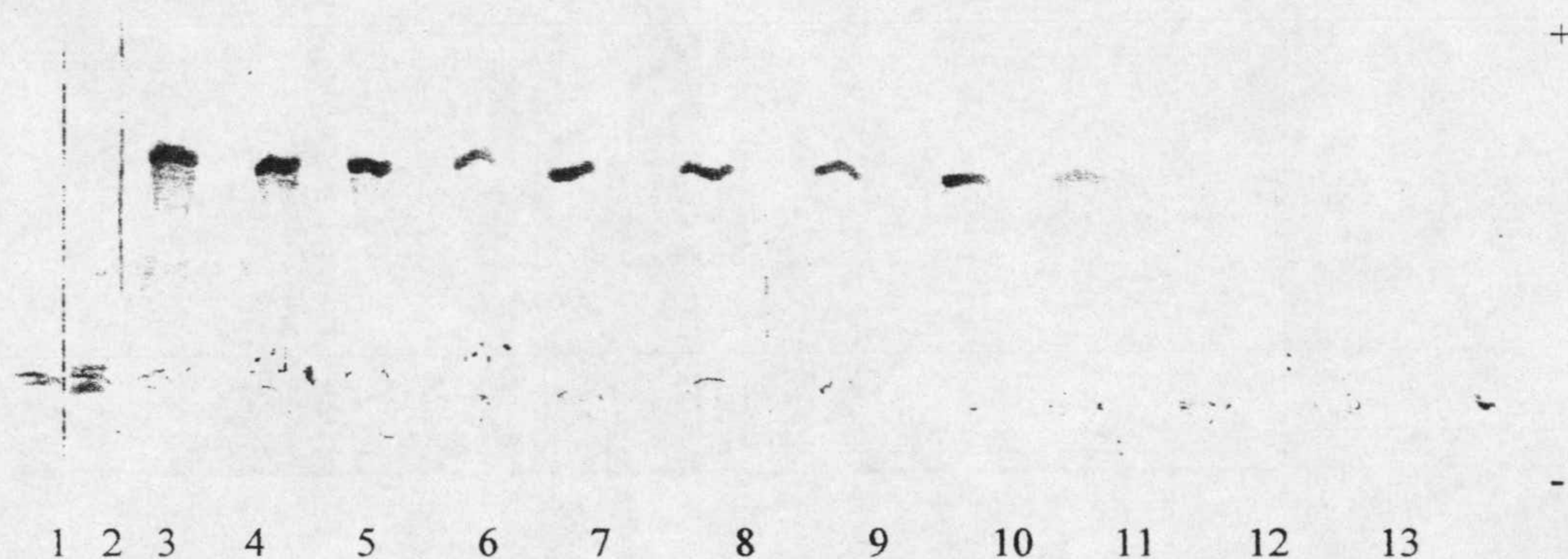


Figura 9.- Inmunotransferencia de la fracción P₈₅ de *Phytomonas* aisladas de *E. characias* incubadas con los inmunosueros obtenidos en ratón Balb-C frente a: (1) suero control – dilución 1/100 -, (2) suero anti SOD-I – dilución 1/100 - y (3-14) suero anti SOD-II. (3) dilución 1/50, (4) dilución 1/100, (5) dilución 1/250, (6) dilución 1/500, (7) dilución 1/1000, (8) dilución 1/2000, (9) dilución 1/3000, (10) dilución 1/5000, (11) dilución 1/10000, (12) dilución 1/15000, (13) dilución 1/20000 y (14) dilución 1/40000.

A continuación se procedió a la valoración del suero anti-SOD-II, mediante la técnica de ELISA, a diferentes diluciones (1/500, 1/1000, 1/3000, 1/5000, 1/10000, 1/20000 y 1/40000) frente a distintas concentraciones de antígeno (fracción P₈₅): 0.5, 1, 5, 10 y 25 µg. En la Figura 10 aparecen los resultados obtenidos, la línea de corte es el valor medio de la desviación standard de tres experiencias del suero control. A la concentración de 1 µg total de antígeno y frente a la dilución de 1/40000 la positividad de la reacción resultó la más significativa, referente a la proporción mínima concentración de antígeno/máxima dilución de anticuerpo.

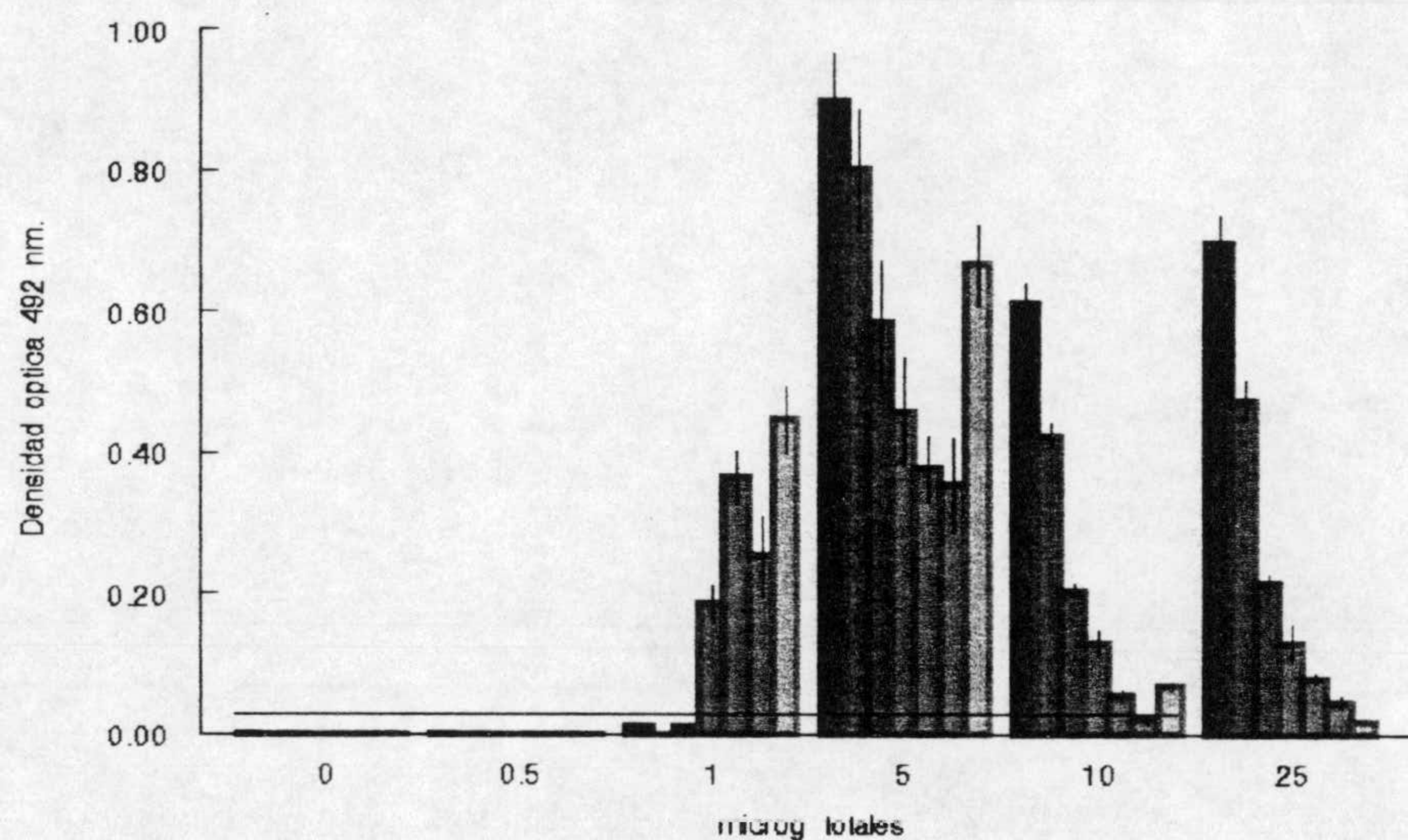


Figura 10.- Valoración del suero anti SOD-II mediante el ensayo de ELISA, a las siguientes diluciones: ■ 1/500; ■ 1/1000; ■ 1/3000; ■ 1/5000, ■ 1/10000, ■ 1/20000 y ■ 1/40000.

Siguiendo con el análisis del suero anti-SODII, se probó su reacción frente a otras fracciones P₈₅ de diversos protozoos parásitos.

El primer paso fue la visualización de la actividad SOD de las diferentes fracciones P₈₅ en electroforesis de IEF de punto isoelectrico 3-9 y revelado según la técnica de Beyer y Fridovich (1987) (Figura 11).

Tanto en, las líneas 1 a 9 como en, la línea 12, se observa que la actividad SOD de diferentes aislados, todos ellos incluidos dentro del género *Phytomonas*, siendo perfil isoenzimático presente en la mayoría semejante, exceptuando el aislado de *Mangífera indica* (línea 12) que muestra dos bandas isoenzimáticas y, *P. hartrot* (línea 1) con tres bandas isoenzimáticas. A pesar de estas diferencias, todos los aislados de *Phytomonas* tienen en común la banda de pI 3.6.

El resto de las muestras ensayadas presentan perfiles isoenzimáticos diferentes aunque, la fracción P₈₅ procedente de *T. cruzi* aislado de Perú (línea 15), de *T. vaginalis* (línea 16) y las procedentes de *C. luciliae* (línea 20) y *L. collosoma* (línea 21), presentan una banda de actividad con pI próximo al 3.6.

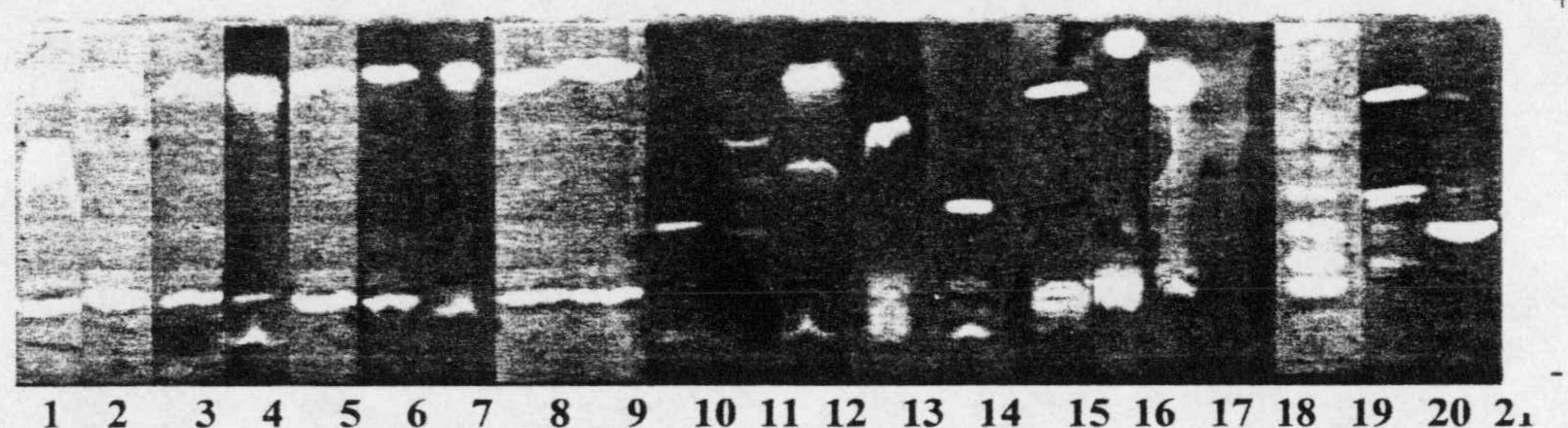


Figura 11.- IEF 3-9.- Actividad SOD según Beyer y Fridovich (1987) en diversos protozoos parásitos y bacterias. (1) *Phytomonas hartrot*, (2) *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia pinea*; (3) *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias*, (4) *Phytomonas* aisladas de *Trifolium* spp., (5) *Phytomonas serpens*, (6) *Phytomonas* aisladas de *Lycopersicum esculentum* de Brazil, (7) *Phytomonas* aisladas de *Lycopersicum esculentum* de España, (8) *Phytomonas* aisladas de *Fabricea gonagra*; (9) *Phytomonas* aisladas de *Venezia zonata*; (10) *Herpetomonas samuelpeesoai*, (11) *Herpetomonas davidi*, (12) *Phytomonas* aisladas de *Mangifera indica*, (13) *Trypanosoma cruzi* cepa maracay, (14) *Trypanosoma* aislado de un caso asintomático humano de Brazil, (15) *Trypanosoma cruzi* aislado de Perú, (16) *Leishmania donovani*, (17) *Trichomonas vaginalis*, (18) *Giardia intestinalis*, (19) *Brucella abortus*, (20) *Crithidia luciliae* y (21) *Leptomonas collosoma*.

Posteriormente se realizó el análisis por inmunotransferencia del suero anti-SODII a dilución 1/500 frente a las diferentes fracciones P₈₅ de los diferentes parásitos mencionados. El resultado del ensayo se refleja en la figura 12, donde podemos observar que sólo los aislados considerados pertenecientes al género *Phytomonas* presentan reacción positiva (línea 1 a 9 y, línea 12). Aunque, las fracciones P₈₅ de *C.luciliae* (línea 19) y *L.collosoma* (línea 20) presentaron igualmente reacción positiva a dilución 1/500, por lo que, se ensayó una mayor dilución del suero (1/1000), perdiéndose la positividad de la reacción (líneas 21-22).

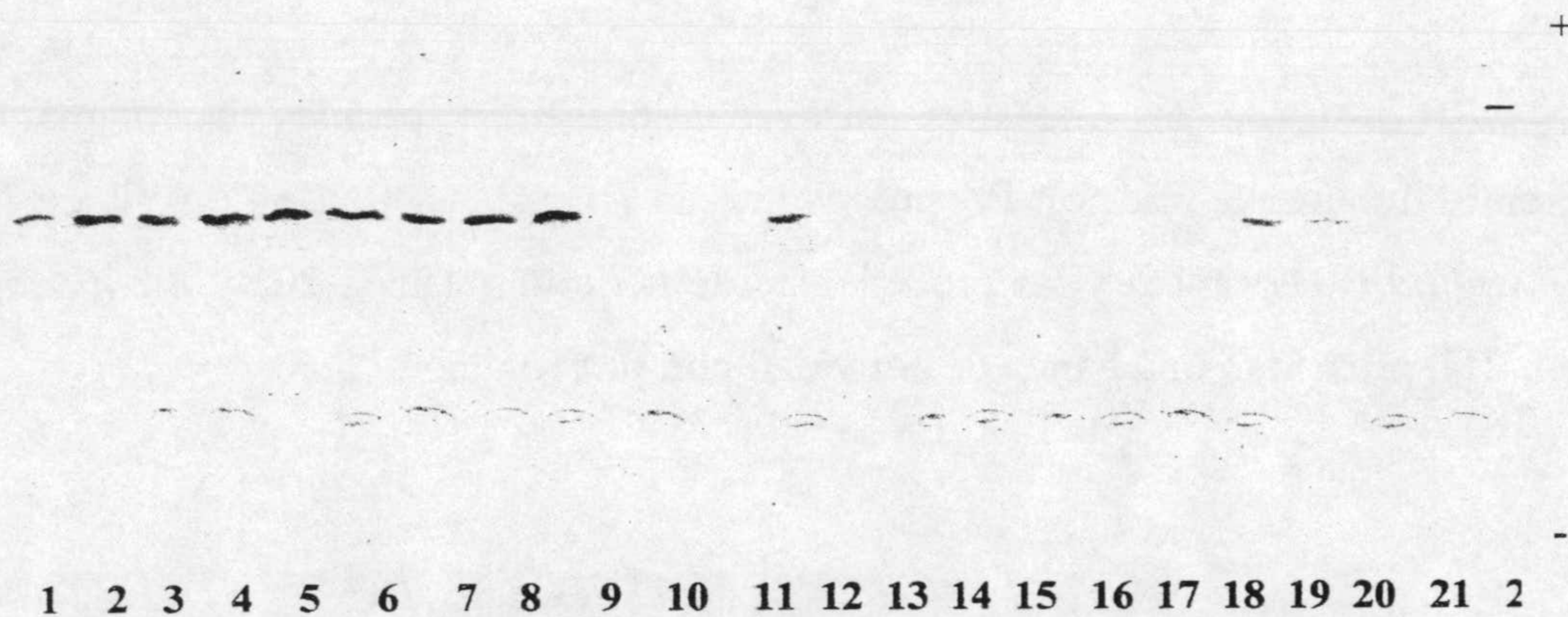


Figura 12.- Inmunoblot de las proteínas purificadas de diferentes protozoos parásitos incubadas con el inmunosuero obtenido en ratón frente a la SOD II de *Phytomonas* aisladas en *Euphorbia characias*. (1-20) a dilución 1/500 y (21-22) 1/1000. (1) *Phytomonas hartrot*, (2) *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia pinea*; (3) *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias*, (4) *Phytomonas* aisladas de *Trifolium sp.*, (5) *Phytomonas serpens*, (6) *Phytomonas* aisladas de *Lycopersicum esculentum* de Brazil, (7) *Phytomonas* aisladas de *Lycopersicum esculentum* de España, (8) *Phytomonas* aisladas de *Fabrictilis gonagra*; (9) *Phytomonas* aisladas de *Veneza zonata*; (10) *Herpetomonas samuel pessoai*, (11) *Herpetomonas davidi*, (12) *Phytomonas* aisladas de *Mangifera indica*, (13) *Trypanosoma cruzi* cepa maracay, (14) *Trypanosoma* aislado de un caso asintomático humano de Brazil, (15) *Trypanosoma cruzi* aislado de Perú, (16) *Leishmania donovani*, (17) *Trichomonas vaginalis*, (18) *Giardia intestinalis*, (19 y 21) *Crithidia lucilae* y (20 y 22) *Leptomonononas collosoma*.

La especificidad del suero anti-SODII (dilución 1/100) fue puesta de manifiesto mediante el ensayo inmunofluorescencia indirecta, utilizando como

antígeno formas promastigotas de *P. aisladas de E. characias* cultivadas “in vitro” (Figura 13). En esta figura se observa que estas formas promastigotes presentan fluorescencia frente a este suero, uniformemente en toda la superficie del parásito, siendo negativa la reacción del suero control.

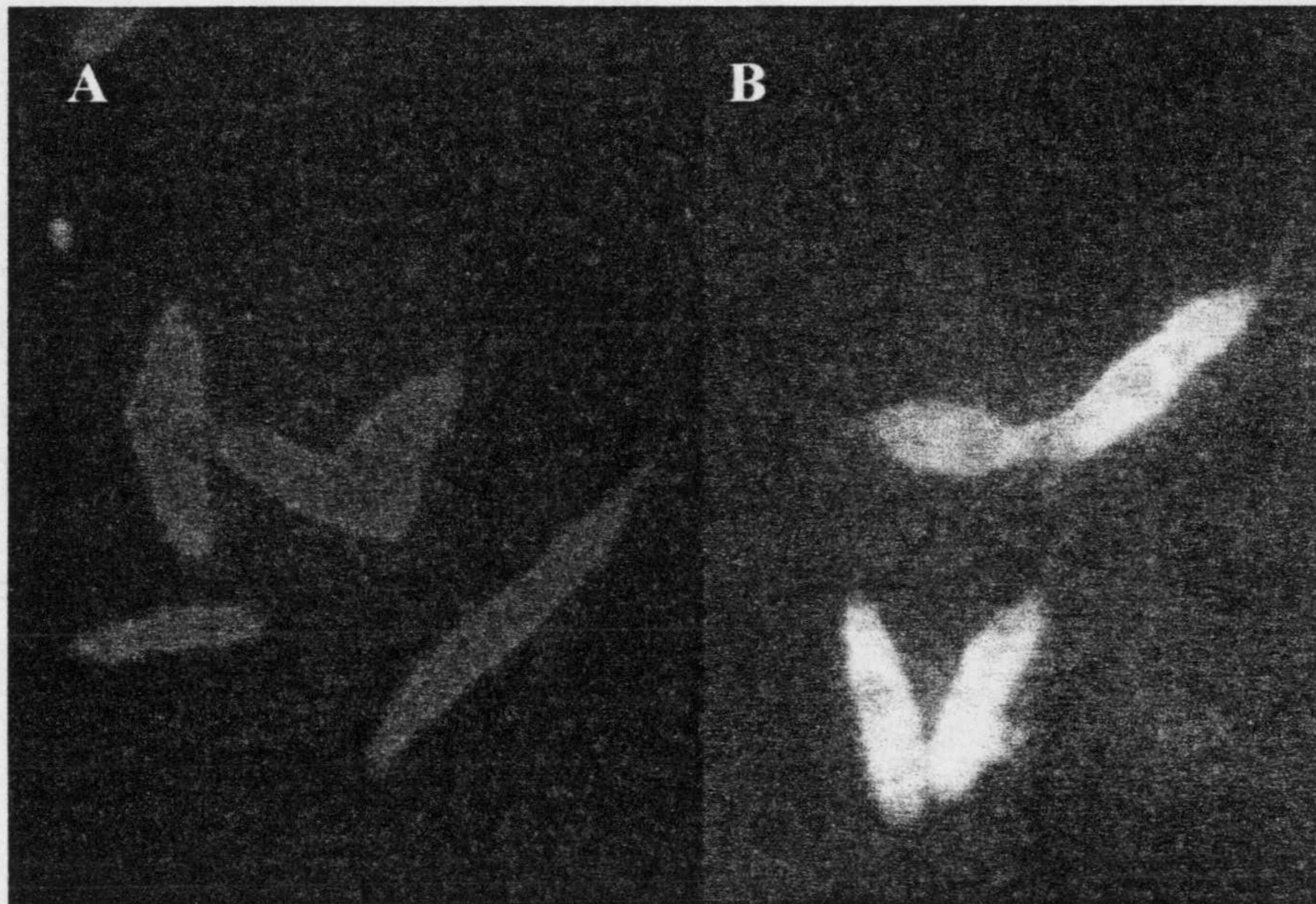
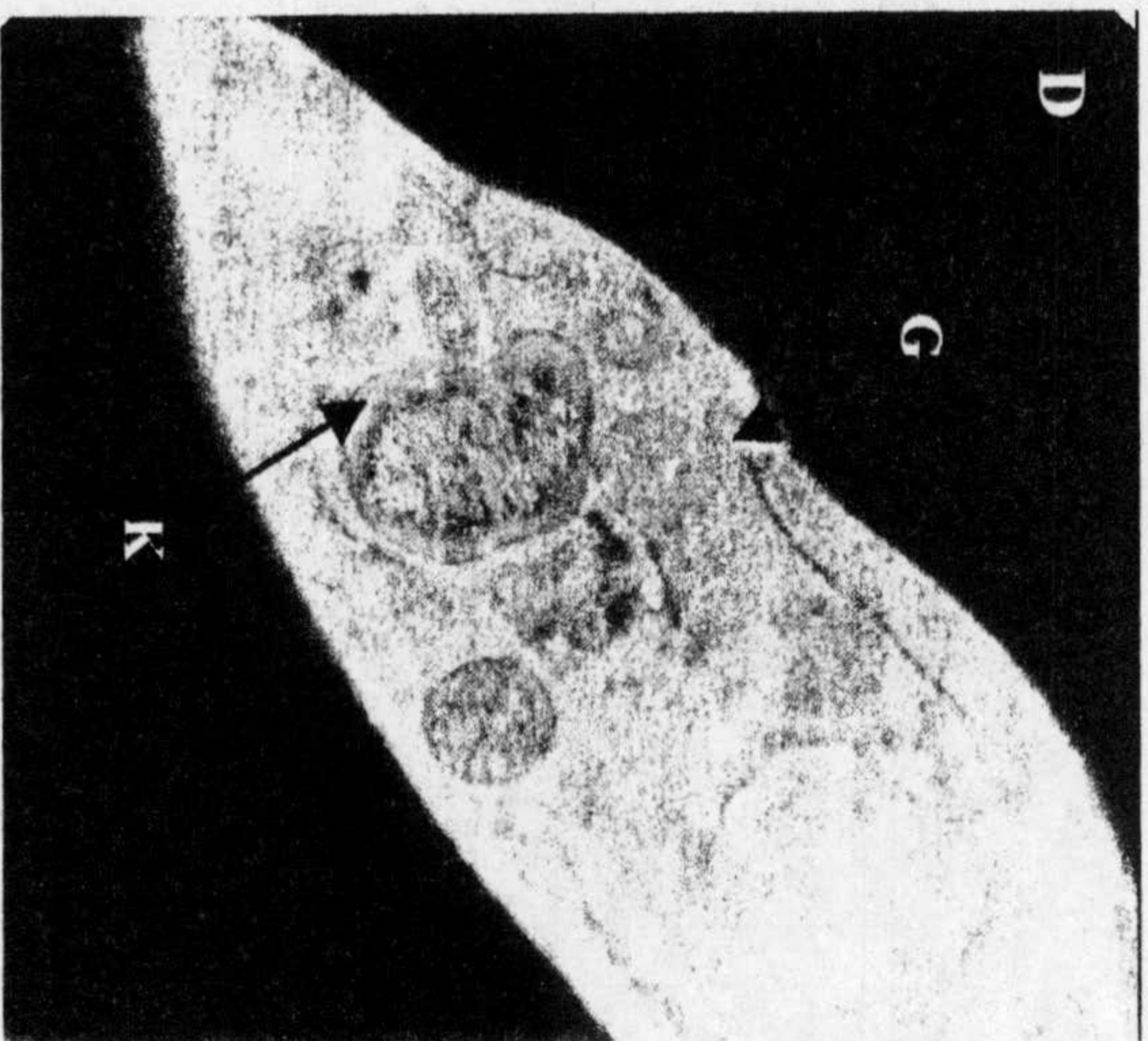
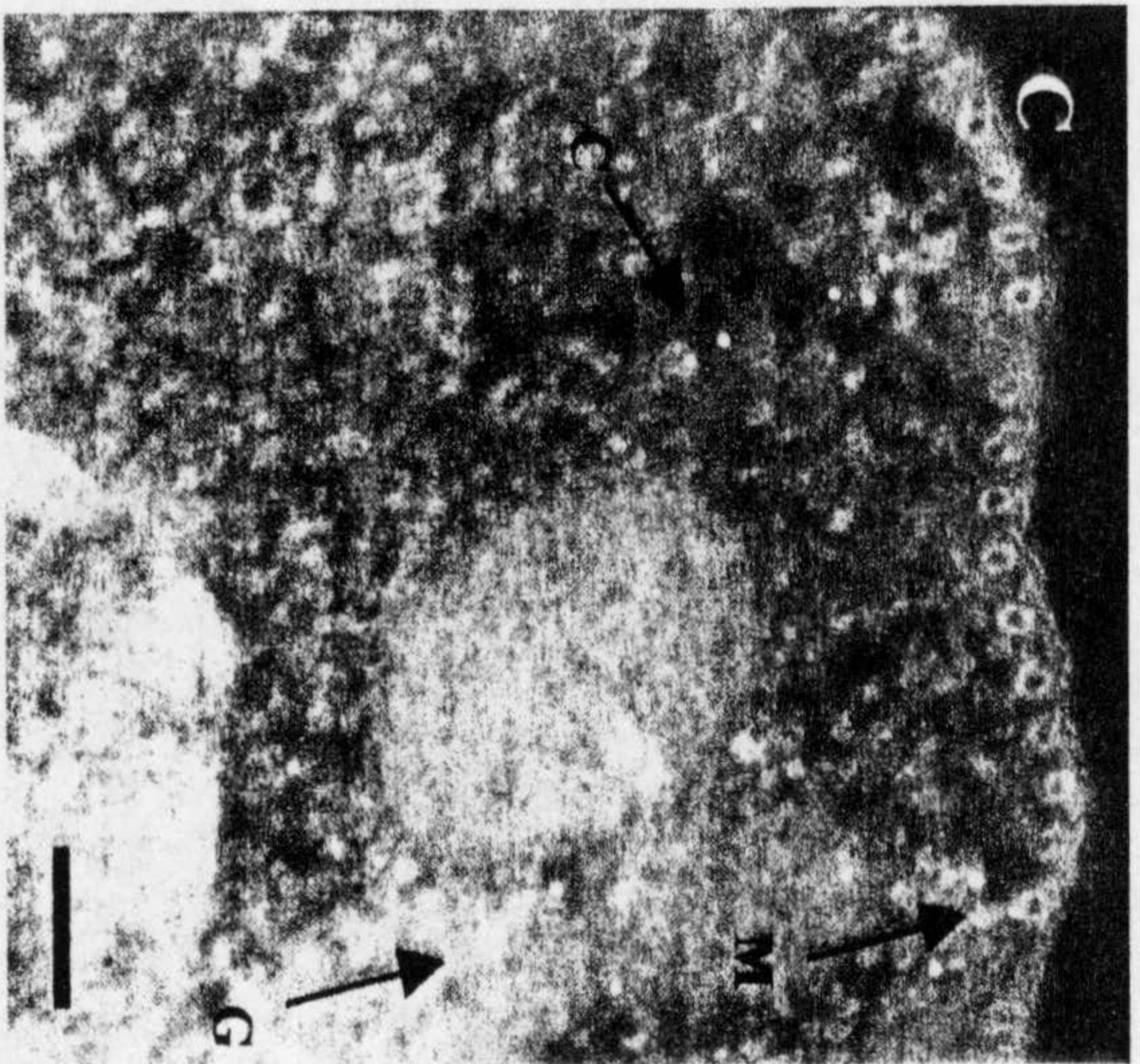
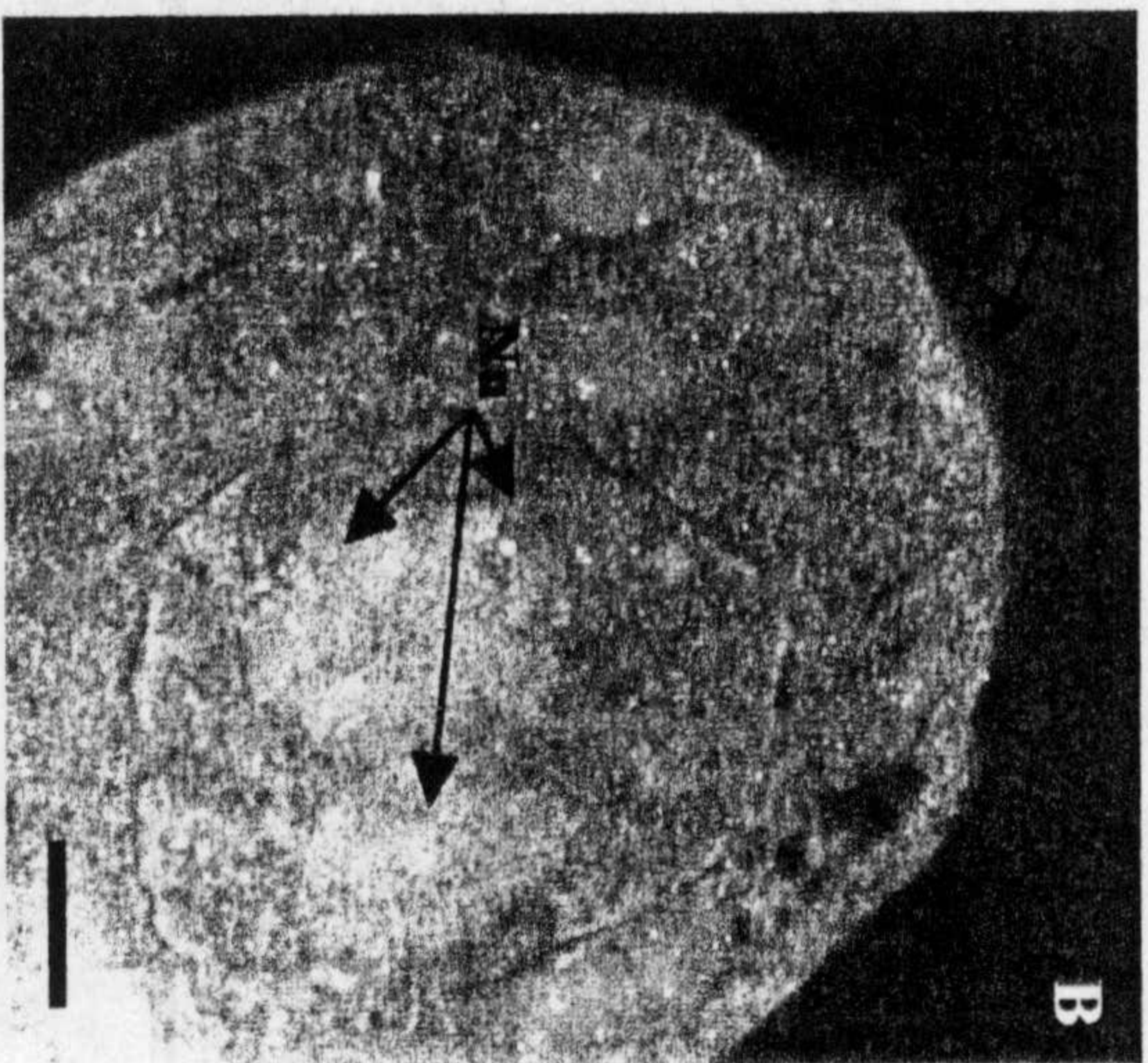
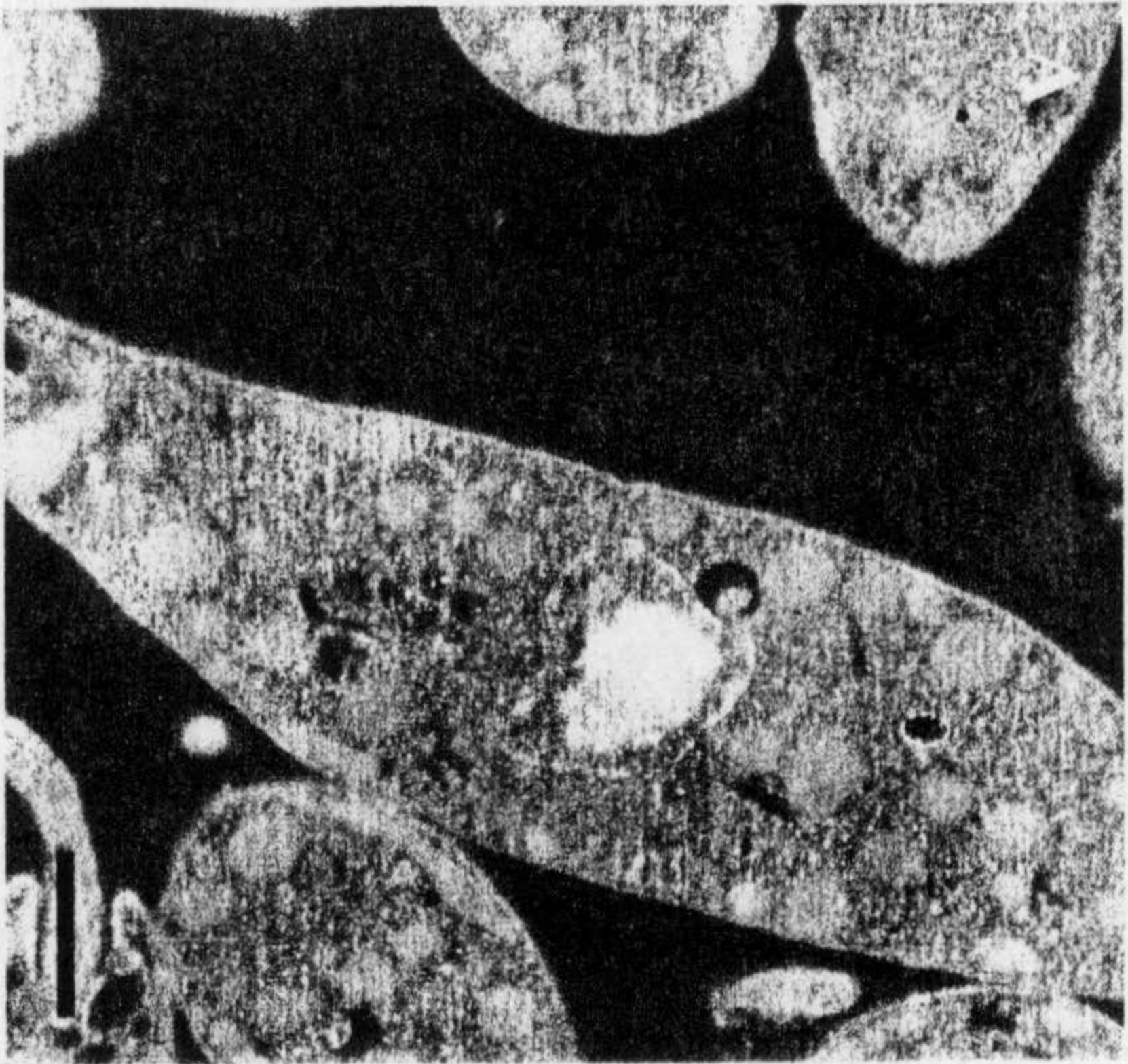


Figura 13.- IFI de promastigotes de *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias* incubadas con suero anti-SOD-II y anti-ratón IgG (FITC) (A) Control negativo. (B) Promastigotes incubados con suero anti-SOD II, dilución 1/100.

Para la localización de la SODII en *Phytomonas* aisladas de *E. characias*, se realizaron los cortes de las formas promastigotes y posterior incubación con el anticuerpo específico anti-SODII (diluciones 1/50 y 1/100), seguido de incubación con la proteína A-oro coloidal (dilución 1/25). Observándose a Microscopía Electrónica de Transmisión el complejo anticuerpo-Proteína-A (Figura 14). Las partículas de oro coloidal se encuentran repartidos de forma más o menos uniforme, aunque se puede apreciar una mayor concentración a nivel del núcleo, nucleolo, así como en membranas, orgánulos citoplasmáticos y flagelo.



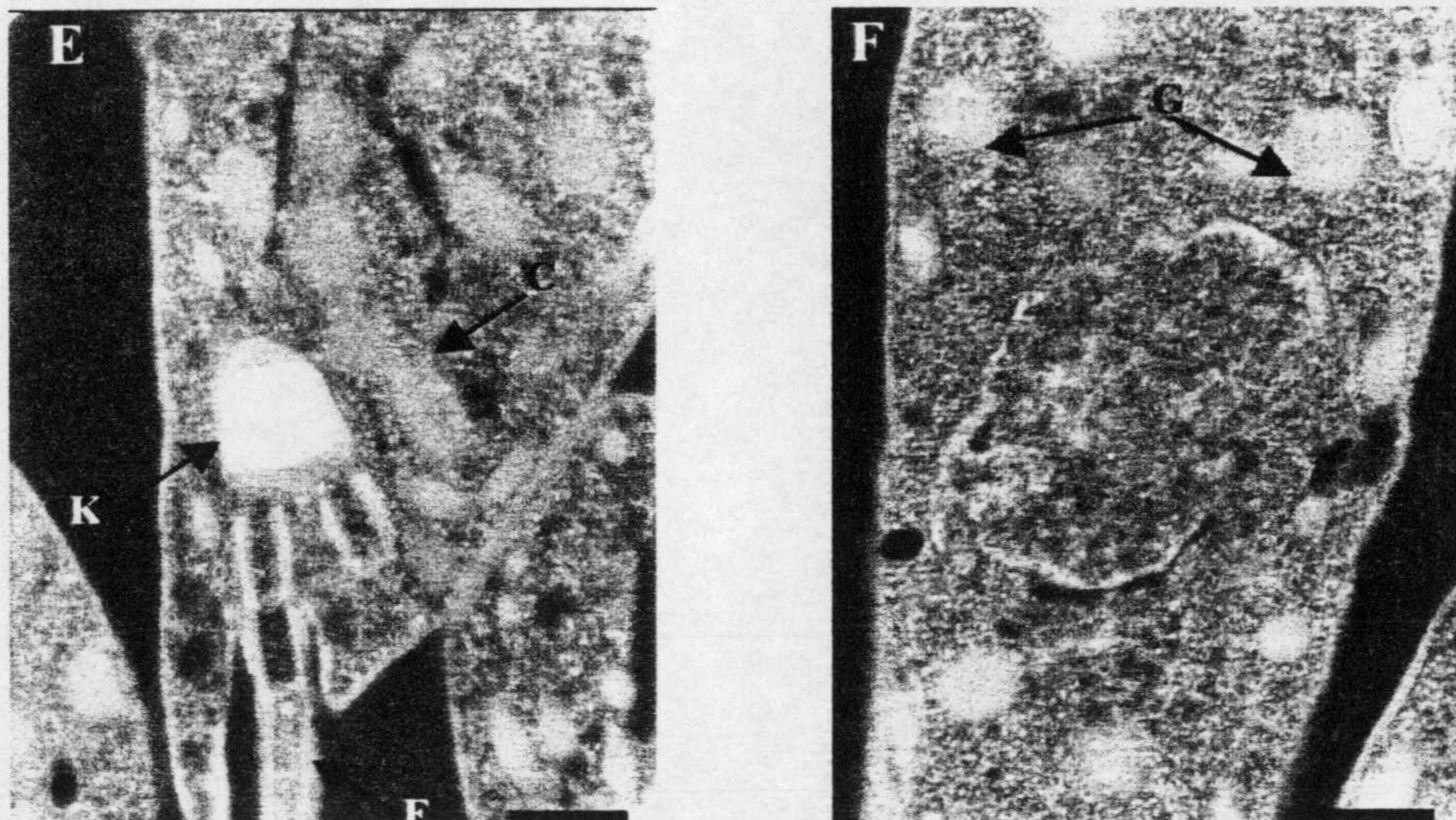


Figura 14.- Inmunocitiquímica bajo Microscopía Electrónica de Transmisión. (A) Control (Barra = 0,583 μm) . (B) (Barra = 0,233 μm),(C) (Barra = 0,082 μm) y (D) (Barra = 0,233 μm) Complejo anticuerpo-proteína A (dilución 1/50). (E y F) Complejo anticuerpo-proteína A (dilución 1/100) (Barra = 0,233 μm).

5. DISCUSIÓN.

La presencia de un parásito en su hospedador desencadena una serie de mecanismos dirigidos a su eliminación, entre los que están, la producción de radicales libres capaces de alterar la integridad de las membranas, proteínas y ácidos nucleicos del parásito. A su vez, estos organismos han desarrollado mecanismos detoxificantes de alta eficacia a fin de adaptarse a su hospedador. La enzima Superóxido dismutasa es considerada como una de las primeras líneas de defensa de los parásitos frente a las especies activas del oxígeno, por su capacidad de degradar al ión superóxido (Kabiri y Sterverding, 2001). Así, los organismos que carecen de ella muestran una proporción de crecimiento menor, un promedio de vida menor, hipersensibilidad frente a los compuestos producidos en el ciclo oxido-reductor e incremento de la mutagénesis espontánea y del índice de mortalidad (Fridovich, 1998).

Al igual que otros protozoos parásitos, los Tripanosomátidos de plantas también poseen esta enzima detoxificadora (Quesada y col., 2001). Sin embargo, a pesar de su papel crucial, hasta ahora los conocimientos que tenemos sobre ella son escasos, por lo que, se hace necesario su caracterización a nivel bioquímico y molecular, lo que nos abriría nuevas vías de lucha contra estas parasitosis. Al mismo tiempo, esta caracterización permitiría la utilización de esta enzima como un marcador específico para la identificación correcta de estos Tripanosomátidos, objetivo principal del presente trabajo.

Como muestra biológica hemos utilizado *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias*, que por su facilidad de crecimiento nos permite la obtención de masa celular suficiente para la realización de los estudios. Además conviene no olvidar que, *Phytomonas* aisladas de *E. characias* han sido

propuestas como modelo para el estudio del metabolismo de los Tripanosomátidos por su gran semejanza desde el punto de vista metabólico (Uttaro y col., 1999).

En este trabajo hemos purificado y caracterizado dos SODs de *Phytomonas* aisladas de *E. characias* (SODI y SODII), mediante centrifugación diferencial, precipitación con sulfato amónico entre el 35-85%, seguido de separación por cromatografía, primeramente de intercambio iónico y posteriormente de afinidad. Según nuestros conocimientos este es el primer estudio enfocado a la caracterización de la SOD de *Phytomonas*, aunque ya en estudios previos se había descrito la actividad SOD en estos Tripanosomátidos de plantas, concretamente en: un aislado del floema de *Coco nucifera* productor de la enfermedad de Hartrot, un aislado de los vasos laticíferos de *Euphorbia characias*, otro del fruto de *Lycopersicon esculentum*, un aislado del insecto *Fabricectilis gonagra*, y por último en un aislado de *Amaranthus retroflexus* (Marín y col., 2000 y Quesada y col., 2001).

El comportamiento frente a inhibidores específicos, cianuro y peróxido de hidrógeno (Bannister y col., 1987), revelaron que la SODI y SODII son FeSODs, característica que comparten con todas las SODs estudiadas en otros Tripanosomátidos: *T. cruzi* (Ismail y col., 1997), *T. brucei* (Kabiri y Steverding, 2001), y más recientemente el grupo del Dr. Opperdoes ha encontrado tres FeSOD (FeSODA, FeSODB y FeSODC) (Gerbod y col., 2003); en diferentes especies de *Leishmania* (Docampo, 1995) y en otros protozoos parásitos: *E. histolytica* (Tannich y col., 1991), *A. Castellanii* (Choi y col., 2000), *P. falciparum* (Bécuwe y col., 1996; Erel y col., 2001), *T. gondii* (Ödberg-Ferragut, 2000), *T. vaginalis* (Viscogliosi y col., 1998), entre otros.

Ambas SODs presentaron diferente peso molecular, SODI: 66 kDa y SODII: 22 kDa. Se sabe que, el peso molecular para las FeSODs aisladas de

diferentes protozoos parásitos son muy variados: en *T. cruzi* y *T. b. brucei* se han detectado dos FeSODs con un peso molecular aproximado de 22 y 24 kDa (Ismail y col., 1997; Kabiri y Steverding, 2001), semejante al peso molecular estimado en este trabajo para la SODII de *P.* aisladas de *E. characias*. En *C. fasciculata*, igualmente con dos FeSODs, los pesos moleculares estimados son de 43 y 39 kDa (Le Trant y col., 1983), y en *A. castellanii* sólo se ha detectado una FeSOD con un peso molecular de 50 kDa y formada por dos subunidades idénticas, cada una de 26 kDa (Choi y col., 2000). No existe referencia bibliográfica comparable con la SODI purificada por nosotros.

Las dos bandas de actividad SOD: SODI y SODII, podrían ser dos isoenzimas distintas, o bien, podría tratarse de formas parcialmente degradadas de una sola enzima. Sin embargo, esta última posibilidad es menos probable, ya que, en el proceso de purificación se han utilizado inhibidores de proteasas. Y además, existen precedentes como es el caso de *T. b. brucei* que tiene dos FeSODs de diferente peso molecular y, que según el estadio del parásito los niveles de actividad pueden estar incrementados o disminuidos hacia una isoforma u otra, o sea, que una de las isoenzimas sea una forma constitutiva y la otra sea inducida (Kabiri y Steverding, 2001). Otra explicación a la existencia de las dos isoenzimas, sería la compartimentación celular que es una característica de estos organismos, los glicosomas. En el caso de *P.* aisladas de *E. characias*, la actividad SODI y SODII se localizan principalmente en la fracción citosólica, aunque, en la fracción glicosomal aparece una actividad SODII. La localización en los glicosomas de una enzima Superóxido dismutasa fue publicado en, 1994 por Dey y Datta en *Leishmania* spp. donde encontraron una Cu-ZnSOD, y en los años 2000 y 2001 por nuestro grupo en varios aislados de *Phytomonas*, en los que el tipo de SOD fue hierro (Marín y col., 2000 y Qucsada y col., 2001). Y muy recientemente, Gerbod y colaboradores han encontrado una FeSODB en el interior de los glicosomas de *T. brucei* (Gerbod y col., 2003).

La diferente localización de estas dos SODs es significativa si admitimos que el papel principal de las SODs es el de detoxificar los iones superóxido, y que las diferentes reacciones biológicas, productoras de agentes oxidantes dentro de la célula puede necesitar que varias SODs protejan las diferentes macromoléculas y orgánulos del daño oxidativo. Lo que justificaría la localización en los glicosomas de la SODII. Estos orgánulos, como hemos mencionado anteriormente, son característicos y muy importantes para los kinetoplastidios, debido a que albergan enzimas para la glucólisis, del metabolismo del glicerol y, enzimas involucradas en rutas tan diversas como, de la fijación del CO₂, en la biosíntesis de novo de pirimidinas, y en la biosíntesis y β -oxidación de los ácidos grasos (Opperdoes, 1984). Todos son procesos metabólicos esenciales para la supervivencia de los parásitos (Opperdoes y col., 1987; Parson y col., 2001).

Sin embargo, no se ha encontrado ADN en su interior. Y a diferencia de otros microcuerpos, los glicosomas en general no se conoce la presencia de oxidasas productoras de peróxido de hidrógeno ni catalasa, salvo en el caso de *Crithidia* spp. (Muse y col., 1973). Otra curiosidad de los glicosomas es, su membrana, que parece actuar como una barrera semipermeable, que previene el flujo de los intermediarios glicolíticos al citosol, llegando a ser su concentración dentro del glicosoma al menos cinco veces más alta que en el citosol (Misset y col., 1986). De esta forma, las proteínas de la matriz glicosomas serían sintetizadas en los ribosomas libres del citosol y luego, sin modificación proteolítica, transferidas al orgánulo (Parson y col., 2001). Esta síntesis-transporte de proteínas podría explicar la localización de la SODII tanto, en el citosol como en los glicosomas. Y aunque esta compartimentación permitiría el funcionamiento de la glucólisis en anaerobiosis se ha visto que no es así, porque los tripanosomátidos no sería capaces de sobrevivir al no producirse energía (ATP) (Borst y col., 1977).

Los glicosomas representa una enorme y eficiente maquinaria metabólica para los kinetoplastidios y, en los que se produciría radicales superóxido, esto unido a la impermeabilidad de su membrana, nos aportan un conjunto de premisas que nos dan pie a sugerir que puesto que estos radicales deben ser metabolizados por una enzima Superóxido dismutasa para proteger del daño oxidativo celular, nos daría respuesta al encuentro de la SOD II, y que posiblemente sería sintetizada en el citoplasma y transportada al interior de estos orgánulos de forma similar a lo que sucede con otras enzimas glicosomales en *T. b. brucei* (Parson y col., 2001). Con lo que, por ser importante para el funcionamiento del glicosoma y, por lo tanto, para la supervivencia del organismo, representaría un blanco quimioterapéutico. Esta consideración de la enzima SOD está totalmente aceptada en el caso de *Leishmania* spp., *T. cruzi* y *T. brucei* (Temperton y col., 1996; Paramchuk y col., 1997; Kabiri y Steverding, 2001).

Hay varias razones que despertaron nuestro interés en la investigación sobre la presencia de una actividad SOD en los glicosomas: Primero, no hay datos concluyentes sobre la localización subcelular de esta enzima. Segundo, algunas funciones que han sido atribuidas a los peroxisomas de mamíferos están relacionadas con los glicosomas de los Kinetoplastidios (Hammond y col., 1981), pero la similitud entre estos dos microcuerpos en cuanto, a los mecanismos de defensa frente a la toxicidad del oxígeno aún no ha sido estudiada. Tercero, la SOD de diversos Tripanosomátidos ha sido propuestas como una posible diana quimioterapéutica (Mesnick y Eaton, 1981). Por lo tanto, un mayor conocimiento de la distribución celular y de las vías de internalización de esta enzima puede conducirnos a una aproximación terapéutica, no sólo para las enfermedades causadas por especies pertenecientes al género *Phytomonas*, sino que, por su gran similitud con otros Tripanosomátidos podría ser extrapolable a otras Tripanosomiasis de interés en salud humana y animal.

Pensamos que, una posible continuación a este trabajo podría ser el establecimiento del papel activo que juega la SOD glicosomal en la supervivencia de los Tripanosomátidos de plantas.

El punto isoeléctrico de la SODI y SODII se determinó mediante electroforesis en isoelectroenfoque de pI 3-9, mostrándose que ambas formas tenían diferente punto isoeléctrico, esto es, SODI: 6.8 y SODII: 3.6, aproximadamente.

Estas dos bandas de actividad SOD son comunes a otras *Phytomonas* aisladas de diferentes fuentes y que, actualmente son consideradas como pertenecientes al género *Phytomonas* (Uttaro y col., 1997). Exceptuando solamente el caso de *P.* aisladas de *Mangífera indica* donde se observaron tres bandas de actividad, una de ellas con pI semejante al de SODII.

La actividad SOD, igualmente, ha sido detectada en especies del género *Herpetomonas*, *T. cruzi* y *L. donovani*, en todos los casos aparecía en diferentes bandas de actividad con pI distinto al de las especies del género *Phytomonas*. En el caso de *C. luciliae* y *L. collosoma*, se revelaron varias bandas de actividad, siendo una de ellas coincidente en su pI con el de SODII de *P.* aislada de *E. characias*.

Ya se había publicado que *G. intestinalis* carecía de actividad SOD (Smith y col., 1988) y, tampoco nosotros en este trabajo hemos detectado dicha actividad, lo que parece confirmar que sea una destacable excepción entre los organismos eucariotas.

En todo proceso de purificación hay indefectiblemente una pérdida de actividad, debido a la duración del proceso y, que ha de ser cuantificada. Para ello,

se realizaron ensayos de conservación de la actividad enzimática total a diferentes temperaturas: 4°C, -20°C, -80°C y muestra liofilizada y conservada a -80°C. A 4°C se observó que la actividad SOD total decrecía muy rápidamente, llegando en el tercer día a una pérdida del 50%. Hemos podido comprobar que la actividad SOD mantiene más tiempo sus niveles si son congeladas o liofilizadas y conservadas a -80°C.

La identificación y descripción de nuevas especies de Tripanosomátidos ha estado tradicionalmente basada en criterios clásicos, tales como morfología y origen del hospedador. Hoy día, estos criterios no son suficientes, ya que, existen numerosos problemas en la identificación de especies y en su inclusión como pertenecientes al género *Phytomonas*. Estos problemas nacen principalmente de la confusa clasificación de los mal llamados "Tripanosomátidos inferiores" que incluyen, además de *Phytomonas*, a otras especies que se encuentran en insectos y plantas, pero pertenecientes a los géneros *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia* y *Leptomonas* y que, morfológicamente son indistinguibles entre sí (Bastistoti y col., 2001). Recientemente se ha propuesto la búsqueda de marcadores bioquímicos y moleculares como herramienta para la resolución de estos problemas (Camargo, 1999).

Diversos experimentos realizados por nuestro grupo han permitido poner a punto diferentes técnicas bioquímicas y moleculares, para abordar el estudio de la caracterización y diagnóstico de los tripanosomas de plantas (Fernandez-Becerra y col., 1997; Muller y col., 1997; Fernández-Ramos y col., 1999 y Dollet y col., 2000) y que nos han llevado al encuentro de marcadores específicos, como son la isopropanol deshidrogenasa (Uttaro y col., 1997) y la Superóxido dismutasa (Quesada y col., 2001), que pueden ser de una gran utilidad en la identificación de especies como pertenecientes al género *Phytomonas*.

Como se ha mencionado anteriormente, en el presente trabajo se ha analizado el perfil isoenzimático de la SOD de diferentes protozoos parásitos, muchos de los cuales están incluidos en el mal denominado grupo de "Tripanosomátidos inferiores". Diez tripanosomátidos aislados de diferentes plantas y considerados como pertenecientes al género *Phytomonas* (Uttaro y col., 1997), dos especies del género *Herpetomonas*, una especie perteneciente al género *Crithidia* y otra al género *Leptomonas*. Además tres aislados del género *T. cruzi*, una cepa perteneciente a *L. donovani*, otra a *T. vaginalis* y otra perteneciente a *G. Intestinalis*. En este análisis hemos podido observar que esta enzima nos permite diferenciar claramente al género *Phytomonas* del resto.

Pero además, la SODII presenta propiedades inmunogénicas que reafirmarían el uso de la SOD como una herramienta distintiva. La demostración de esto se ha realizado mediante la obtención de anticuerpos policlonales frente a las dos bandas de SOD purificadas. Lo que nos ha permitido, en primer lugar demostrar que únicamente la SODII es inmunogénica, ya que, el suero obtenido en ratones Balb-C frente a la SODI resultó negativo; en segundo lugar, el suero obtenido en ratones Balb-C frente a la SODII dio resultado positivo incluso a altas diluciones, como se pudo observar en el análisis de inmunoblot y, en el ensayo de ELISA a una concentración total de antígeno de 1 µg frente a una dilución 1/40000.

En el caso de *P.* aisladas de *Mangifera indica*, que fue el único aislado perteneciente al género *Phytomonas* que no presentaba el mismo perfil isoenzimático para la SOD, ya que, aparecían tres bandas de actividad y, aunque una de ellas es coincidente con la banda de actividad correspondiente a la SODII. Sin embargo, la reacción de inmunoblot fue positiva frente al suero SODII, al igual que, con el resto de los aislados de *Phytomonas*. Mientras que, la reacción con las otras cepas fue negativa y, el caso de *C. luciliae* y *L. collosoma* la reacción

fue ligeramente positiva a la dilución 1/500, pero al aumentar la dilución del suero a 1/1000, se hizo negativa. Por lo que, el suero anti-SODII sería un buen detector del género *Phytomonas* a dilución superior a 1/1000, requisito que cumple sobradamente este suero, ya que, hemos visto que su positividad llega hasta 1/40000.

La especificidad del suero anti-SODII y su uso para la localización de la SODII, ha sido puesta de manifiesto mediante IFI, que en contacto con formas promastigotes de *P.* aisladas de *E. characias* resultó una reacción positiva y uniforme por toda la superficie del parásito. Otra de las pruebas a la que se sometió el suero anti-SODII fue a inmunocitoquímica con partículas de oro coloidal ligadas a proteína A, gracias a la que se pudo observar que la distribución de la isoenzima SODII es más o menos uniforme, sin una localización concreta. Este resultado corrobora la hipótesis propuesta en la localización de la enzima, que se forme en el citosol y sea posteriormente transportada a los glicosomas.

Desgraciadamente estos resultados no pueden ser discutibles puesto que, no existen datos comparables, no solamente con especies del género *Phytomonas* sino, tampoco en otros Tripanosomátidos. No obstante, si tenemos en cuenta la afirmación de Uttaro y colaboradores en 1999, que decía que "hay una gran similitud en el metabolismo de las formas sanguíneas de *T. b. brucei* con *P.* aisladas de *E. characias*", y que, ya fue sugerido anteriormente en 1983 por Le Trant y colaboradores, esto nos abriría la posibilidad de que la propiedad inmunogénica observada en la SODII de *P.* aisladas de *E. characias* pudiera ser extrapolable a otras tripanosomiasis, tales como la africana, americana y la Leishmaniosis, que son afecciones de gran importancia en la salud humana.

Como hemos reflejado quedan numerosas lagunas en el conocimiento de la enzima Superóxido dismutasa, tanto como, enzima detoxificadora como, factor de

virulencia. Y propiedades tales como, la inmunogenicidad que presentan algunas formas isoenzimáticas de la SOD formarán parte de nuestra investigación en un futuro inmediato, así como, su secuenciación aminoacídica que nos permitirá establecer relaciones filogenéticas sobre estos organismos.

Lo que nos lleva a afirmar que, la enzima Superóxido dismutasa podría ser una herramienta para la identificación, diagnóstico y para el diseño de drogas dirigidas al control de estas enfermedades.

5. DISCUSIÓN

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

1.- Se han purificado dos superóxido dismutasas de *Phytomonas* aisladas de *Euphorbia characias*, denominadas SODI y SODII. Con un grado de purificación de 394 veces, para la SODI y, de 323 veces para la SODII; y con un rendimiento del 33% y 48%, respectivamente.

2.- Al igual que otros tripanosomátidos, las dos SODs purificadas de *Phytomonas* aisladas de *E. characias* son hierro superóxido dismutasas.

3.- Ambas formas enzimáticas presentan un peso molecular de, 66 kDa para la SODI y, 22 kDa para la SODII. Y un punto isoeléctrico de 6.8 y 3.6, respectivamente.

4.- Las bandas de actividad SOD son consideradas como isoenzimas con diferente localización celular. La isoenzima SODI presenta una localización en la fracción citosólica, mientras que, la isoenzima SODII aparece tanto en el citosol como en la fracción glicosomal.

5.- La estabilidad de la actividad SOD frente a diferentes métodos de conservación reveló que, la liofilización y posterior congelación a -80°C es el mejor procedimiento de mantenimiento de la actividad enzimática a lo largo del tiempo.

6.- La actividad SODII es común a todos los tripanosomátidos aislados de diferentes plantas y, considerados pertenecientes al género *Phytomonas*, incluidos en este estudio. Lo que nos permite confirmar que esta isoenzima puede diferenciar al género *Phytomonas* del resto de tripanosomátidos.

7.- Anticuerpos policlonales obtenidos frente a la SODII dieron resultados positivos a altas diluciones (1/40000), concluyendo que se trata de una enzima altamente inmunogénica.

8.- Mediante inmunoblot hemos podido confirmar que, la reacción de todos los aislados de plantas incluidos en este estudio frente al suero anti-SODII fue positiva, mientras que, la reacción con las otras especies pertenecientes a la Familia Trypanosomatidae y otros protozoos, fue negativa.

9.- Con la ayuda de los anticuerpos policlonales frente a la SODII mediante inmunofluorescencia e inmunocitoquímica, hemos demostrado que la enzima tiene una localización uniforme, tanto en el citosol como en los diversos orgánulos celulares.

Conclusión final.-

La enzima SODII por su peculiar localización glicosomal y propiedades inmunológicas, es un marcador molecular ideal para la identificación, diagnóstico y diseño de drogas dirigidas, no sólo para las enfermedades causadas por especies del género *Phytomonas* sino que, por su gran similitud con otros tripanosomátidos podrían ser extrapolables a otras tripanosomiasis de interés humano y animal.

7. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA.

- Ahomadegbe, J. C.; Dollet, M.; Couland, D.; Gargani, D. y Riou, G. (1990). Kinetoplast DNA permits characterization of pathogenic plant trypanosomes of economic importance. *Biol. Cell.* 70: 167-176.
- Ahomadegbe, J. C.; Dollet, M. y Riou, G. (1992). Kinetoplast DNA from plant tripanosomatids responsible for the Hartrot disease in coconut trees. *Biol. Cell.* 74: 273-279.
- Aldunate, J. y Morello, A. (1993). Free Radicals in Tropical Disease (Arouma, I.O., ed.) 137-165. Harwood Academic Publishing.
- Almeida, M.L.; Jankevicius, S.L.; Kaneshima, E.N., Ueno, T.C.; Kobayashi, R.K.; Jankevicius, J.V. y García, J.F. (1992). Studies of ornithine-arginine cycle and carbohydrate utilization in twenty strains of *Phytomonas*. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 87,241.
- Andrés de, M.F.; García-Arenal, F.; López, M.M. y Melgarejo, P. (2000). Patógenos de plantas descritos en España. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Sociedad Española de Fitopatología. 181.
- Aragão, H. de B. (1927). Sur le flagellé du latex de *Manihot palmata*, *Phytomonas francai* n. Sp. *C.R. Soc. Biol.* 97: 1077-1080.
- Asada, K.; Kanematsu, S.; Okada, S. y Wang, C. C. (1980). Phylogenetic distribution of three types of superoxide dismutase in organisms and cell organelles. *Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide Dismutases* (eds. Bannister, J. V. And Hill, H.) Elsevier, New York, 136-153.
- Attias, M y de Souza, W. (1986). Axenic cultivation and ultrastructural study of a *Phytomonas* sp. Isolated from the milkweed plant *Euphorbia hyssopifolia*. *J. Protozool.* 33(1): 84-87.
- Bannister, H. W.; Bannister, J. V.; Barra, D.; Bond, J. y Bossa, F. (1991). Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free Rad. Res. Comm.* 12-13: 349-361.

- Bannister, J.V., Bannister, W. H. y Rottilio, G.** (1987). Aspects of the structure, function and application of superoxide dismutases. *Crit. Rev. Biochem.* 22: 111-180.
- Barro, D.; Schinina, M. E.; Bossa, F. y col.**, (1990). A tetrameric iron superoxide-dismutase from the eudaryote *Tetrahymena-pyiformis*. *J. Biol. Chem.* 265: 17680-17687.
- Batistoti, M.; Cavazzana, M. Jr; Serrano, M.G.; Ogatta, S.F.; Baccan, G.C.; Jankevicius, J.V.; Teixeira, M.M; Jankevicius, S.I.** (2001). Genetic variability of trypanosomatids isolated from phytophagous hemiptera defined by morphological, biochemical, and molecular taxonomic markers. *J. Parasitol.* 87(6): 1335-1341
- Beckman, J.S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A. y Freeman, B.** (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *PNAS USA* 87: 1620-1624.
- Beckman, K.B. y Ames, B.N.** (1997). Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* 272: 19633-19636.
- Bécuwe, P.; Gratepanche, S.; Fourmaux, M.N.; Van Beeumen, J.; Samyn, B.; Mercereau-Puijalon, O.; Touzel, J.P.; Slomianny, C.; Camus, D. y Dive, D.** (1996) Characterization of iron-dependent endogenous superoxide dismutase of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76: 125-134.
- Beyer, W.F. y Fridovich, I.** (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 559-566.
- Borst, P.** (1977). Metabolism and chemotherapy of African trypanosomes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71: 3-4.
- Boveris, A. y Stoppani, A. O.** (1977). Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*. *Experientia.* 33: 1306-1308.
- Bradford, M.M.** (1976). A refined and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248.
- Brown, D. M.; Upcroft, J. A. y Upcroft, P.** (1993). Cysteine is the major low-molecular weight thiol of *Giardia duodenalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61: 155-158.

- Bruchhaus, I.; Brattig, N. M. y Tannich, E.** (1992). Recombinant expression, purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 23(2): 27-29.
- Camargo, E. P.** (1999). *Phytomonas* and Other Trypanosomatid Parasites of Plants and Fruit. *Adv. Parasitol.* 42: 29-112.
- Camargo, E.P; Kastelein, P. y Roitman, I.** (1990). Trypanosomatid parasites of plants (*Phytomonas*). *Parasitol. Today* 6: 22-25.
- Camargo, E.P. y Wallace, F.G.** (1994). Vectors of plant parasites of the genus *Phytomonas* (Protozoa, Zoomastigophorea, Kinetoplastidia). *Advances in Disease Vector Research.* 10: 333-359. Spring-Verland, N.Y.
- Camargo, E.P.; Sbravate, C.; Teixeira, M.M.G.; Uliana, S.R.B.; Soares, M.B.M.; Affonso, H.T. y Floeter-Winter, L.M.** (1992). Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids. *J. Parasitol.* 78: 40-48.
- Camargo, E.P.; Silva, S.; Roitman, I.; De Souza, W.; Jankevicius, J.C. y Dollet, M.** (1987). Enzymes of ornithine-arginine metabolism in trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. *J. Protozool.* 34: 439-441.
- Carnieri, E. G. s.; Moreno, S. N. J. y Docampo, R.** (1993). Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61: 79-86.
- Catarino, L.M.; Serrano, M.G.; Cavazzana M.; Almeida, M.L.; Kaneshina, E. K.; Campaner, M.; Jankevicius, J. V.; Teixeira, M.M.G. y Itow-Jankevicius S.** (2001). Classification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates, *FEMS Microbiol. Lett.*:201:65-72.
- Chance, B.; Sies, H. y Boveris, A.** (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605.
- Clarke, D.; Albrecht, M. y Arévalo, J.** (1994). Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66: 143-145.

- Choi, D-H.; Na, B-K.; Seo, M-S.; Song, H-R. y Song, C-Y.** (2000). Purification and characterization of iron superoxide dismutase and copper-zinc superoxide dismutase from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Parasitol.* 86(5): 899-907.
- Cohen, G. y Holstein, P.** (1963). Glutathione peroxidase: the primary agent for elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochem.* 2: 1420-1428.
- Conchon, I.; Campaner, M.; Sbravate, C. y Camargo, E.P.** (1989). Trypanosomatids, other than *Phytomonas* spp., isolated and cultures from fruit. *J. Protozool.* 36: 412-414.
- Section II. *Current Protocols* (1995).
- Czapski, G.** (1971). Radiation chemistry of oxygenated aqueous solutions. *Ann. Rev. Phys. Chem.* 22: 171-208.
- Davies, K. J.** (1988). Protein oxidation, protein cross-linking, and proteolysis in the formation of lipofuscin. In Nagy, Lipofuscin. 1987: state of the art. Elsevier, Amsterdam. 109-133.
- Dean, R. T.; Thomas, S. M.; Vince, G.; y Wolff, S. P.** (1986). Oxidation induces proteolysis and its possible restriction by some secondary protein modification. *Biochem. Biochim. Acta.* 45: 1563-1573.
- Denicola-Seoane, A.; Rubbo, H.; Prodanov, E. y Turrens, J.F.** (1992). Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54: 43-50.
- Desmier de Chenon, R.** (1984). Recherches sur le genre *Lincus* Stal, *Hemiptera*, *Pentatomidae*, *Dicocephalinae*, et son rôle éventuel dans la transmission de la marchitez du palmier à huile et du hartrot du cocotier. *Oleagineux.* 39: 1-6.
- Dey, R. y Datta, C.** (1994). Leishmanial glycosomes contain superoxide dismutase. *J. Biochem.* 301: 317-319.
- Dietrich, P.; Dussan, M.P.; Floeter-Winter, L.M.; Affonso, M.H.T; Camargo, E.P. y Soares, M.B.** (1990). Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal gene spacers of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma conorrhini*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42: 13-20.

- Docampo, R.** (1995). Antioxidant Mechanisms. *Biochem. Mol. Biol. Par.* 147-160.
- Docampo, R.** (1990). Sensitivity of parasitic to free radical damage by antiparasitic agents. *Chem.-Biol. Interact.* 73: 1-27.
- Docampo, R. y Moreno, S.N.J.** (1984). Free-radicals intermediates in the antiparasitic action of drugs and phagocytic cells. *Free Radicals in Biology* (ed. Pryor, W. A.). Academic Press, New York, 243-288.
- Docampo, R.; Boiso, J. F., de; Boveris, A. y Stoppani, A. O.** (1976). Localization of peroxidase activity in *Trypanosoma cruzi* microbodies. *Experientia* 32: 972-975.
- Dollet, M.; Sturm, N.R.; Ahomadegbe, J.C y Campbell, D.A.** (2001). Kinetoplast DNA minicircles of phloem-restricted *Phytomonas* associated with wilt diseases of coconut and oil palms have a two-domain structure. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 65-69.
- Dollet, M.; Sturm, N.R.; Sánchez-Moreno, M. y Campbell, D.A.** (2000). 5s Ribosomal RNA Gene Repeat Sequences Define at Least Eight Groups of Plant Trypanosomatids (*Phytomonas* spp.): Phloem-Restricted Pathogens Form a Distinct Section. *J. Euk. Microbiol.* 47(6): 569-574.
- Dollet, M.; Gargani, D.; Muller, E. y Vezian, K.** (1997). Development of a method for the acquisition of in vitro cultured plant trypanosomatids (*Phytomonas* spp.) by *Lincus croupius* (Pentatomidae). ANPP-Fourth International Conference on Agricultural Pest. Montpellier, France.
- Dollet, M.** (1994). Identification and characterization of pest organisms: a plant trypanosomes case study. In: *The identification and characterization of pest organisms* (D.L. Hawksworth, ed.) 415-426. Wallingford, Uk: CAB International.
- Dollet, M.; Cambrony, D. Y Gargani, D.** (1982). Culture axenique in vitro de *Phytomonas* sp. (Trypanosomatidae) d'Euphorbe transmis par *Stenocephalus agilis* Scop. (Coreidae). *C. R. Acad. Sci. Ser. III.* 295: 547-550.
- Dollet, M.** (1984). Plant trypanosomes case study. In: *Identification and Characterization of Pest Organism* (ed. D.L. Hawksworth). CAB International: 415-426.

- Dollet, M., López, G.; Genty, P. y Dzido, J.L.** (1979). Recherches actuelles de l'I.R.H.O. sur les dépérissements du cocotier et du palmier à huile en Amérique du Sud, associés aux protozoaires flagellés intraphloémiques (*Phytomonas*). *Oléagineux*. 34: 449-451.
- Dollet, M., Gianotti, J. y Ollagnier, M.** (1977). Observation de protozoaires flagellés dans les tubes cribles de palmiers à huiles malades. *C. R. Acad. Sci. Ser. D*. 284: 643-645.
- Dollet, M. y Wallace, F.G.** (1987). Compte rendu du Premier *Phytomonas* Workshop, Cayenne, Mars 1987. *Oléagineux* 42: 461-468.
- Entrala, E.; Mascaró, C. y Barret, J.** (1997). Anti-oxidant enzymes in *Cryptosporidium parvum* oocyst. *Parasitol.* 114: 13-17.
- Erel, O; Vural, H.; Aksoy, N.; Aslan, G. y Ulukanligil, M.** (2001). Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with vivax malaria. *Clin. Biochem.* 34(4):341-344.
- Fahey, R. C.; Newton, G. L.; Arrick, B.; Overdank-Bogart, T. y Aley, S. B.** (1984). *Entamoeba histolytica*: a eukariotic without glutathione metabolism. *Science* 224: 70-72.
- Fairfield, A. S.; Eaton, J. W. y Meshnick, S. R.** (1986). Superoxide dismutase and catalase in the murine malaria, *Plasmodium berghei*: content and subcellular distribution. *Arch. Biochem. Biophys.* 250: 526-529.
- Fairfield, A. S.; Meshnick, S. R. y Eaton, J. W.** (1983). Malaria parasites adopt host cell superoxide dismutase. *Science*. 221: 764-766.
- Fairlamb, A. H. y Cerami, A.** (1985). Identification of a novel, thiol-containing cofactor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14: 187-198.
- Fairlamb, A. H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B. T. y Cerami, A.** (1985). Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*. 227: 1485-1487.

- Fernandes, A.P; Nelson, K. y Beverly, S.M.** (1993). Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. PNAS USA. 90: 11608-11612.
- Fernández-Becerra, C.; Osuna, A.; Muller, E.; Dollet, M y Sánchez-Moreno, M.** (1996). Characterization of isolated from fruits by electrophoretic isoenzymes and kinetoplast-DNA analysis. FEMS Microbiol. Letters. 145: 463-468.
- Fernández-Becerra, C.; Sánchez-Moreno, M. y Opperdoes, F.** (1997). Comparative aspects of energy metabolism in Trypanosomatids isolated from plant. J. Euk. Microbiol. 44(5): 523-529.
- Fernández-Ramos, C.; Luque, F.; Fernández-Becerra, C.; Osuna, A.; Jankevicius, S.L., Jankevicius, J.V., Rosales, M.J. y Sánchez-Moreno, M.** (1999). Biochemical characterization of flagelates isolated from fruits and seeds from Brazil. FEMS Microbiol. Lett. 170: 142-156
- Franca, C.** (1920). La flagellose des Euphorbes II. Ann. Inst. Pasteur. 34: 108-132.
- Franca, C.** (1914). La flagellose des Euphorbes. Arch. Protistenkunde. 34: 108-132.
- Fridovich, I.** (1986). Biological effects of the superoxide radical. Arch Biochem Biophys. 247(1):1-11
- Fridovich, I.**(1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. J. Exp. Biol. 201: 1203-1209.
- Fulton, J. y Spooner, J.** (1956). Inhibition of respiration of *Trypanosoma rhodesiense* by thiols. Biochem. J. 63: 475-482.
- Gibbs, A.J.** (1957). *Leptomonas serpens* n. sp., parasitic in the digestive tract and salivary glands of *Nezara viridula* (Pentatomidae) and in the sap of *Solanum lycopersicum* (tomato) and other plants. J. Parasitol. 47: 297-303.
- Gilrotti, A. W.** (1985). Peroxydation mechanisms of lipids. J. Free Radic. Biol. Med. 1: 87-95.
- Gerbod, D.; Dufernez, F.; Noel, C; Bastin, P.; Van Roy, J.; Steverding, D.; Capron, M.; Opperdoes, F. y Viscogliosi, E.** Les superoxide dismutases des trypanosomatidae: caracterisation, origine phylogenetique, et potentialites

therapeutiques. "41ème réunion du Groupement des Protisitologues de langue Française/4ème Biennale de Parasitologie. 25-28 Mars 2003. Clermont Ferrand France."

-Guerrini, F.; Ségur, C.; Gargani, D.; Tibayrenc, M. y Dollet, M. (1992). An isoenzyme analysis of the genus *Phytomonas*: genetic, taxonomic and epidemiologic significance. *J. Protozool.* 39: 516-521.

-Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 280:1-8.

-Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1991). Free radicals in biology and medicine, 2nd edition, Oxford University Press, New York.

-Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1989). Free Radicals In Biology And Medicine. Oxford University Press, New York.

-Hammond, D.J.; Gutteridge, W.E. y Opperdoes, F.R. (1981). A novel location for two enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis in trypanosomes and *Leishmania*. *FEBS Lett.* 128: 27-29.

-Hempelmann, E.; Heiner-Schirmer, R.; Fritsch, G.; Hundt, E. y Groschel-Steward, U. (1987). Studies on glutathione reductase and methemoglobin from human erythrocytes parasitized with *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23: 19-24.

-Henderson, G.; Fairlamb, A. H. y Cerami, A. (1987). Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24: 39-45.

-Henle, E.S. y Linn, S. (1997). Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 272: 19095-19098.

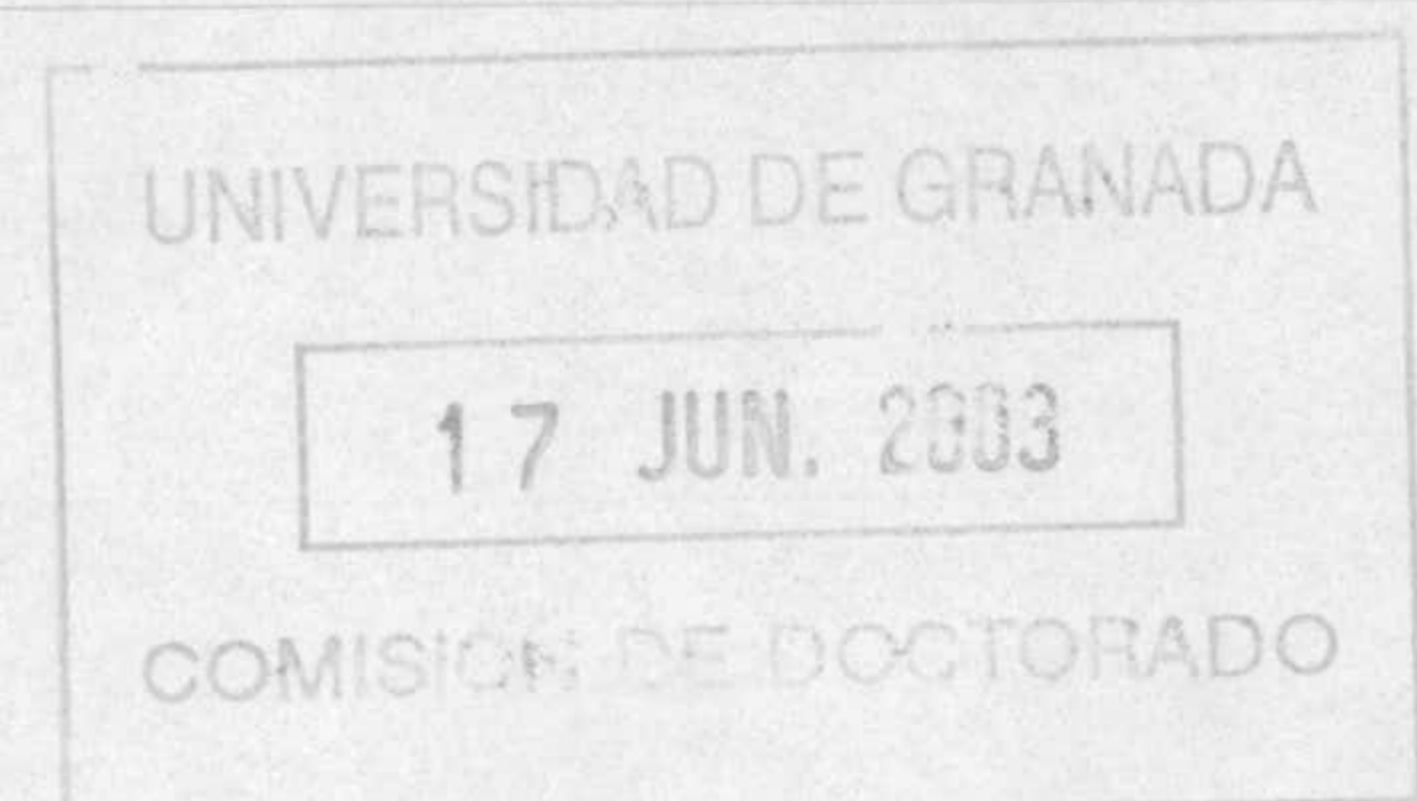
-Hibbs, J.B.; Taintor, R.R.; Vavrin, Z. y Rachlin, E.M. (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 87-92.

-Holmes, F.O. (1930). Protozoa of latex plants. In: Problems and Methods of Research in Protozoology (R. Hegner and J. Andrews, ed.) 257-275. Macmillan, New York.

- Holmes, F.O.** (1925). Non-pathogenicity of the milkweed flagellate in Maryland. *J. Phytopathol.* 15: 294-296.
- Hunter, W. N.; Smith, K.; Derewenda, Z.; Harrop, S.P; Habash, J.; Islam, M.S.; Helliwell, J.R.; y Fairlamb, A.H.** (1990). Initiating a crystallographic study of trypanothione reductase. *J. Mol. Biol.* 216: 235-237.
- Imlay, J. A. y Fridovich, I.** (1991). Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266: 6957-6965.
- Ismail, S. O.; Paramchuk, W.; Skeiky, Y. A.; Bhatia, A.; Reed, S.G.; Bathia, A. y Gedamu, L.** (1997). Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86: 187-197.
- Ismail, S. O.; Skeiky, Y. A.; Bhatia, A.; Omara-Opyene, L. A. y Gedamu, L.** (1994). Molecular cloning, characterization, and expresión in *E.coli* of iron superoxide dismutase cDNA from *Leishmania donovani chagasi*. *Infect. Immun.* 62: 657-664.
- Jankevicius, J.V.; Jankevicius, S.I.; Campaner, M.; Conchon, I.; Maeda, L.A.; Teixeira, M.M.G.; Freymuller, E. y Camargo, E.P.** (1989). Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes. *J. Protozool.* 36: 265-271.
- Kabiri, M. y Steverding, D.** (2001). Identification of a developmentally regulated iron superoxide dismutase of *Trypanosome brucei*. *J. Biochem.* 360: 173-177.
- Kastelein, P. y Parsadi, M.** (1988). Axenic cultivation of *Phytomonas* (Trypanosomatidae) associated with laticiferous plants in Suriname. *J. Protozool.* 35: 533-536.
- Kastelein, P.** (1987). Investigations on "Hartrot" of coconut and oil palms in Suriname. PhD dissertation, Rijksuniversiteit te Utrecht, Holland.
- Kastelein, P.** (1985). Transmission of *Phytomonas* sp. (Trypanosomatidae) by the bug *Edessa loxdali* (Pentatomidae). *Surinaamse Landbouw.* 33: 62-64.
- Keyer, K. e Imlay, J. A.** (1996). Superoxide acelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *PNAS USA.* 93: 13635-13640.

- Kirkman, H. N. y Gaetani, G. F.** 1984. Catalase. a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. PNAS USA. 81: 4343.
- Kitajima, E.W.; Vainstein, M.H. y Silveira, J.S.M.** (1986). Flagellate protozoan associated with poor development of the root system of cassava in the Espiritu Santo State, Brazil. Phytopathol. 96: 638-642.
- Kitchener, K. R.; Meshnick, S. R.; Fairfield, A. S. y Wang, C. C.** (1984). An iron-containing superoxide dismutase in *Trichomonas foetus*. Mol. Biochem. Parasitol. 12: 95-99.
- Kono, Y. y Fridovich, I.** (1982). Superoxide radical inhibits catalase. J. Biol. Chem. 257: 5751-5754.
- Krauth-Siegel, R. L.; Enders, B.; Henderson, G. B.; Fairlamb, A. H. y Schirmer, R. H.** (1987). Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. Eur. J. Biochem. 164: 123-128.
- Kusel, J.P.; Boveris, A. y Storey, B.T.** (1973). H₂O₂ production and cytochrome c peroxidase activity in mitochondria isolated from trypanosomatid hemoflagellate *Crithidia fasciculata*. Arch. Biochem. Biophys. 158: 799-804.
- Kuyumdzieva-Saova, A. V.; Savov, V. A. y Georgieva, E. I.** (1991). Role of superoxide dismutase in the oxidation of *n*-alkanes by yeasts. Free Rad. Biol. Med. 11: 263-268.
- Lafont, A.** (1909). Sur la présence d'un parasite de la classe des flagellés dans le latex de l'*Euphorbia pilulifera*. C. R. Soc. Biol. 66: 1011-1013.
- Lantwin, C. B.; Schlichting, I.; Kabsch, W.; Pai, E. F. y Krauth-Siegel, R. L.** (1994). The structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in the oxidized and NADPH reduced state. Proteins. 18: 161-173.
- Le Trant, N.; Meshnick, S. R.; Kitchener, K.; Eaton, J. W. y Cerami, A.** (1983). Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata*. Purification, characterization, and similarity to leishmanial and trypanosomal enzymes. J. Biol. Chem. 258: 125-130.

- Lindmark, D. G.** (1980). Energy metabolism of the anaerobic protozoon *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 1: 1-12.
- Lindmark, D.G. y Müller, M.** (1974). Superoxide dismutase in the anaerobic flagellates *Trichomonas foetus* and *Monocercomonas* sp. J. Biol. Chem. 249: 4634-4637.
- Liochev, S. I. y Fridovich, I.** (1997). Lucigenin luminescence as a measure of intracellular superoxide dismutase in *Escherichia coli*. PNAS U.S.A. 94: 2891-2896.
- López, G.; Genty, P. y Ollagnier, M.** (1975). Control preventivo de la "Marchitez sorpresiva" del *Elaeis guineensis* en America Latina. Oléagineux. 30: 243-250.
- Louise, C.; Dollet M. y Mariau, D.** (1986). Recherches sur le Hartrot du cocotier, maladie à *Phytomonas* (Trypanosomatidae) et sur son vecteur *Lincus* sp. (Pentatomidae) en Guyane. Oléagineux, 41 (10) : 437-449.
- Lowestein, C.J. y Snyder, S.H.** (1992). Nitric oxide: a novel biologic messenger. Cell. 79: 705-707.
- Marché, S.; Roth, C.; Philippe, H.; Dollet, M. y Baltz, T.** (1995). Characterization and detection of plant trypanosomatids by sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. Mol. Biochem. Parasitol. 71: 15-26.
- Marín, C.; Fernández-Ramos, C.; Quesada, J.M.; Entrala, E. y Sánchez-Moreno, M.** (2000). Biochemical characterization of a trypanosomatid isolated from the plant *Amaranthus retroflexus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 95(5): 641-647.
- Maslov, D.A.; Lukes, J.; Jirtu, M. y Simpson, L.** (1996). Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunits of rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. Mol. Biochem. Parasitol. 75: 197-205.
- Maslov, D.A.; Polipaev, S. y Lukes, J.** (2001). Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. Mem. Inst. Osw. Cruz. 96(3): 397-402.



- McCord, J. M. y Fridovich, I.** (1969). Superoxide dismutase: And enzymatic function in erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- McGhee, R.B. y Hanson, W.L.** (1964). Comparison of the life cycle of *Leptomonas oncopelti* and *Phytomonas elmassiani*. *J. Protozool.* 11: 555-562.
- Menara, A.; Dollet, M.; Gargani, D. y Louise, C.** (1988). Culture in vitro sur cellules d'invertébrés des *Phytomonas* spp. (Trypanosomatidae) associés au hartrot, maladie du cocotier. *C.R.A. Sci., Paris.* 307: 597-602.
- Meshnick, S. R. y Eaton, J. W.** (1981). Leishmanial superoxide dismutase: a possible target for chemotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 970-976.
- Michalski, W. P. y Prowse, S. J.** (1991). Superoxide dismutases in *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47: 189-196.
- Mills, G.C.** (1957). Haemoglobin catabolism. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229:189-197.
- Minotti, G. y Aust, S. D.** (1987). The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 262: 1098-1104.
- Miralles, D; Marín, C; Magán, R; Fernández-Ramos, C.; Entrala, E.; Cordova, O; Vargas, F. y Sánchez-Moreno, M.** (2002). In vitro culture and biochemical characterization of six trypanosome isolates from Peru and Brazil. *Exp. Parasitol.* 102: 23-29.
- Misset, O.; Bos, O.J.M. y Opperdoes, F.R.** (1986). Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. Simultaneous purification, intraglycosomal concentrations and physical properties. *Eur. J. Biochem.* 157: 441-453.
- Molineux, D.H. y Ashford, R.W.** (1983). The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*. In: *The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals* (D.H. Molineux and R.W. Ashford, eds.). Taylor and Francis, London. 3-13.

- Momen, H.** (2001). Some current problems in the systematics of Trypanosomatids. *Int. J. Parasitol.* 31: 39-641
- Muller, E.; Gargani, D.; Banuls, A.L.; Tybayrenc, M y Dollet, M.** (1997). Classification of plant trypanosomatids (*Phytomonas* spp.): parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Parasitol.* 115: 51-59.
- Muller, E.; Ahomadebge, J.C.; Coulaud, D.; Gargani, D.; Fernández-Becerra, C. y Dollet, M.** (1995). Variability of kinetoplast DNA from plant trypanosomatids responsible for hartrot and marchitez diseases. *Phytopathol.* 85: 942-947.
- Muller, E.; Gargani, D.; Schaeffer, V.; Stervens, J., Fernández-Becerra, C.; Sánchez-Moreno, M and Dollet, M.** (1994). Variability in the phloem restricted plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) associated with wilts of cultivated crops. Isoenzyme comparison with the lower trypanosomatids. *Eur. J. Plant Pathol.* 100: 425-434.
- Müller, M.** (1978). Biochemical cytology of trichomonad flagellates. I. Subcellular localization of hydrolases, dehydrogenases, and catalase in *Trichomonas foetus*. *J. Cell. Biol.* 57: 453-474.
- Murray, H. W.** (1982). Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J. Immunol.* 129: 351-357.
- Murray, H. W.; Nathan, C. F. y Cohn, Z. A.** (1980). Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. IV. Role of endogenous scavengers of oxygen intermediates. *J. Exp. Med.* 152: 1610-1624.
- Muse, K.E.** (1973). Microbodies in *Crithidia fasciculata*. *Protoplasm.* 78: 343-348.
- Nakazawa, H.; Genka, C. y Fujishima, M.** (1996). Pathological aspects of active oxygen/free radicals. *Jap. J. Physiol.* 46: 15-35.
- Ninomiya, M y Ziro, S.** (1952). The metabolism of *Trichomonas vaginalis* with comparative aspects of trichomonads. *J. Biochem.* 39: 321-326.
- Ödberg-Ferragut, C.; Renault, J.P.; Viscogliosi, E.; Tourse, C.; Briche, I.; Engels, A.; Lepage, G.; Morgenstern-Badarau, I.; Camus, D.; Tomavo, S. y Dive, D.** (2000). Molecular cloning, expression analysis and iron metal cofactor

characterization of a superoxide dismutase from *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Par. 106: 121-129.

-Oliveira, M.M. (2000). Inositol metabolism in *T. cruzi*: a potential target for the Chagas' disease chemotherapy. Third Internet Conference on Salivarian Trypanosomes and other Trypanosomatids. (www.trypanosome.org)

-Oliveira, D.P.; Bezerra, J.L.; De Souza, W.; Attias, M. y Rezende, M.L.V. (1987). Progressos no estudo de *Phytomonas staheli* McGhee & McGhee em dendê na Bahia, Brasil. Rev. Theob. 17: 233-237.

-Oppendoes, F. R.; Michels, P.A.M.; Misset, O.; Hart, D.T. y Van Beeumen, J. (1987). Biogenesis, properties and sequence of glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 42: 543-552.

-Oppendoes, F. R. (1984). Localization of the initial steps in alkoxyphospholipid biosynthesis in glycosomes (microbodies) of *Trypanosoma brucei*. FEBS Lett. 169: 35-39.

-Oppendoes, F. R.; Borst, P.; Barkker, S. y Leene, W. (1977). Localization of glycerol-3-phosphate oxidase in the mitochondrion and particulate NAD⁺-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the microbodies of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. Eur. J. Biochem. 76: 29-39.

-Pacifci, R. E. y Davies, K. J. A. (1990). Protein degradation as an index of oxidative stress. Meth. Enzymol. 186: 485-502.

-Paget, T.A.; Lloid, D. y Williams, A.G. (1990). *Trichomonas vaginalis* requires traces of oxygen and high concentrations of carbon dioxide for optimal growth. Mol. Biochem. Parasitol. 41: 65-72.

-Palmer, R.M.J.; Ferrige, A.G. y Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 327: 524-526.

-Paoletti, F. y Mocali, A. (1990). Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. Meth. Enzymol. 186: 209-265.

-Paramchuck, W.J.; Ismail, S.O.; Bhatia, A. y Gedamu, L. (1997). Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. Mol. Biochem. Parasitol. 90: 203-221.

- Parson, M.; Furuya, T.; Pal, S. y Kessler, P. (2001) Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115: 19-28.
- Parthasarathy, M.V.; Slobbe, W.G. y Soudant, C. (1976). Trypanosomatids flagellate in the phloem of diseased coconut palms. *Science.* 192: 1346-1348.
- Parthasarathy, M.V. y Slobbe, W.G. (1978). Hartrot or fatal wilt of palms. I. Coconuts (*Cocos nucifera*). *Principes.* 22: 1-14.
- Penketh, P. G. y Klein, R. A. (1986). Hydrogen peroxide metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20: 111-121.
- Perthuis, B.; Desmier De Chenon, R. y Merland, E. (1985). Mise en évidence du vecteur de la Marchitez sorpresiva du palmier à huile, la punaise *Lincus lethifer*! *Dolling (Hemiptera Pentatomidae Discocephalinae).* *Oleagineux* 40, 473-475.
- Petry, K; Schotellius, J. y Dollet, M. (1987). Differentiation of *Phytomonas* sp. and lower trypanosomatids (*Herpetomonas, Crithidia*) by agglutination tests with lectins. *Parasitol. Res.* 74: 1-4.
- Polipaev, S. (1986). *Phytomonas elmassiani* (Mastigophora: Trypanosomatida) from the plant *Cynanchum sibiricum* (Asclepiadaceae) in Central Asia and Kazakhstan (in Russian). *Proc. Zool. Inst. Ac. Sci. USSR* 217: 1-178.
- Polipaev, S. (2001). The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. *Int. J. Parasitol.* 31: 648-652.
- Pré, J. (1991). La lipoperoxydation. *Pathol. Biol.* 39: 716-736.
- Quesada, J. M.; Entrala, E.; Fernández-Ramos, C.; Marín, C. y Sánchez-Moreno. (2001). *Phytomonas* spp.: superoxide dismutase in plant trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115: 123-127.
- Qurollo, B.A.; Bishop, P.E. y Hassan, H.M. 2001. Characterization of the iron superoxide dismutase gene of *Azotobacter vinelandii*: *sodB* may be essential for viability. *Can. J. Microbiol.* 47: 63-71.

- Renard, J.L.**(1989). Coconut hartrot characterization and control methods. *Oleagineux*. 44: 480-481.
- Rezende, M.L.V.; Borges, R.E.L.; Bezerra, J.L. y Oliveira, D.P.** (1986). Transmissao da murcha de *Phytomonas* a coqueiros e dendezeiros por *Lincus lobuliger* (Hemiptera, Pentatomidae): resultados preliminares. *Rev. Theob.* 16: 149-154.
- Rodhain, J. y Bequaert, J.** (1911). Présence de *Leptomonas* dans le latex d'une euphorbe congolaise. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 4: 198-200.
- Sbravate, C.; Campaner, M.; Camargo, L.E.A.; Conchon, I.; Teixeira, M.M.G. y Camargo, E.P.** (1989). Culture and generic identification of trypanosomatids of phytophagous hemiptera in Brazil. *J. Protozool.* 36: 543-547.
- Sánchez-Moreno, M.; Fernández-Becerra, C.; Entrala, E.; Opperdoes, F.R.; Dollet, M. y Osuna, A.** (1995 a). In vitro culture of *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. Metabolic studies by ¹HNMR. *J. Euk. Microbiol.* 43(2): 314-320.
- Sánchez-Moreno, M.; Fernández-Becerra, C.; Mascaró, C.; Rosales, M.J.; Dollet, M. y Osuna, A.** (1995 b). Isolation, in vitro culture, ultrastructure study, and characterization by lectin-agglutination test of *Phytomonas* isolated from tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and cherimoyas (*Annona cherimolia*) in southeastern Spain. *Parasitol. Res.* 81: 575-581.
- Sánchez-Moreno, M.; Fernández-Becerra, C.; Fernández-Ramos, C.; Luque, F.; Rodríguez-Cabezas, M.N., Dollet, M. y Osuna, A.** (1998). Trypanosomatid protozoa in plants of southern Spain: characterization by analysis of isoenzymes, kinetoplast DNA, and metabolic behavior. *Parasitol. Res.* 84: 354-361.
- Sánchez-Moreno, M.; Lasztity, D.; Coppens, I. y Opperdoes, F. R.** (1992). Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54: 185-200.
- Shames, S. L.; Fairlamb, A. H.; Cerami, A. y Walsh, C. T.** (1986). Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases. *Biochem.* 25: 3519-3526.

- Serrano, M.G.; Camargo, E.P. y Teixeira, M.G.M. (1999a). *Phytomonas*: analysis of polymorphism and genetic relatedness between isolates from plants and phytophagous insects from different geographic regions by RAPD fingerprints and synapomorphic markers. *J. Euk. Microbiol.* 46: 618-625.
- Serrano, M.G.; Campaner, M.; Buck, G.A.; Teixeira, M.M.G. y Camargao, E.P. (1999b). PCR amplification of the spliced leader gene for the diagnosis of trypanosomatid parasites of plants and insects in methanol-fixed smears. *FEMS Microbiol. Lett.* 176: 241-246.
- Serrano, M.G.; Nunes, L.R.; Campaner, M.; Buck, G.A.; Camargao, E.P. y Teixeira, M.M.G. (1999c). Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of genus-specific sequence of the spliced leader gene. *Exp. Parasitol.* 91: 268-279.
- Serrano, M.G.; Nunes, L.R.; Campaner, M.; Buck, G.A.; Camargo, E.P. y Teixeira, M.M.G. (1996). *Phytomonas*: genus identification by PCR amplification of spliced leader sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 91: 100.
- Sidbley, L. D.; Lawson, R. y Weidner, E. (1986). Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19: 83-87.
- Sies, H. (1985). Oxidative stress: introductory remarks. *Oxidative Stress* (ed. Sies, H.) Academic. Press. Orlando. 1-8.
- Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. De. Engl.* 25: 1058-1071.
- Slobbe, W.G.; Parthasarathy, M.V. y Heslen, J.A.J. (1978). Hartrot or fatal wilt of palms. II. Oil palms (*Elaeis guineensis*) and other palms. *Principes.* 22: 15-25.
- Slobbe, W.G. (1977). Phloem-inhabiting *Phytomonas* in diseased coffee, coconut palms and African oil palms. *Surin. Landbouw.* 25: 4-13.
- Smith, K.; Opperdoes, F. R. y Fairlamb, A. H. (1991). Subcellular distribution of trypanothione reductase in bloodstream and procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48: 109-112.

- Smith, M.W. y Doolittle, R. F.** (1992). A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *J. Mol. Evol.* 34: 175-184.
- Smith, N. C.; Bryant, C. y Boreham, P. F. L.** (1988). Possible roles for pyruvate: ferredoxin oxidoreductase and thiol-dependent peroxidase and reductase activities in resistance to nitroheterocyclic drugs in *Giardia intestinalis*. *Int. J. Parasitol.* 18: 991-997.
- Stahel, G.** (1954). Die Siebröhrenkrankheit (Phloëmnekrose, Flagellatose) des Kaffeebaumes. [Neth. J. Agr. Sci.] Netherlands Journal of Agricultural Science 4, 260-264.
- Stahel, G.** (1931a). Zur kenntnis der siebröhrenkrankheit (Ploëmnekrose) des kaffeebaumes in Surinam. I. Mikroskopische Untersuchungen und Infektionsversuche. *Phytopathol. Zeits.* 4: 65-82.
- Stahel, G.** (1931b). Zur kenntnis der siebröhrenkrankheit (Ploëmnekrose) des kaffeebaumes in Surinam. II. Mikroskopische Untersuchungen und Infektionsversuche. *Phytopathol. Zeits.* 4: 539-544.
- Steiger, R.F.; Opperdoes, F.R. y Bontemps, J.** (1980). Subcellular fractionation of *Trypanosoma brucei* blood-stream forms with special reference to hydrolases. *Euk. J. Biochem.*: 165-175.
- Sturm, N; Fernandes, O. y Campbell, D.A.** (1995). The mini-exon genes of three *Phytomonas* isolates that differ in plant tissue tropism. *FEMS Microbiol. Lett.* 130: 177-182.
- Tannich, E.; Bruchhaus, I.; Walter, R. y Horstmann, R. D.** (1991). Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49: 61-72.
- Teebor, G. W.; Boorstein, R. J. y Cadet, J.** (1988). The reparability of oxidative free radical mediated damage to DNA: a review. *Int. J. Radiat. Biol.* 54: 131-150.
- Teixeira, M.M.G. y Camargo, E.P.** (1989). Monoclonal antibodies for the identification of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. *J. Protozool.* 36: 262-264.
- Teixeira, M.M.G.; Serrano, M.G.; Nunes, L.R.; Campaner, M.; Buck, G. y Camargo, E.P.** (1996). Trypanosomatidae: a spliced-leader derived probe specific for the genus *Phytomonas*. *Exp. Parasitol.* 84: 311-319.

- Teixeira, M.M.G.; Campaner, M. y Camargo, E.P. (1994). Detection of trypanosomatid *Phytomonas* parasitic in plants by polymerase chain reaction amplification of 18S ribosomal DNA. *Parasitol. Res.* 80: 512-516.
- Teixeira, M.M.G.; Takata, C.S.A.; Conchon, I.; Campaner, M.; y Camargo, E.P. (1997). Ribosomal and kDNA markers distinguish two sub-groups of *Herpetomonas* among old species and new trypanosomatids isolated from flies. *J. Parasitol.* 83: 58-65.
- Teixeira, M.M.G.; Serrano, M.G. y Camargo, E. P. (2000). New data from old Trypanosomatid preparations. *Parasitol. Today* 16: 261-263.
- Thomas, J. A. y Park, E. M. (1988). Oxy radical-initiated protein S-thiolation and enzymatic dethiolation. *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*. Ed. Simic. MG, Taylor KA Ward J F, von Stonntang. C., Plenum press, New York. 365-373.
- Thong, K.W. y Coombs, G.H. (1987). Comparative study of ferredoxin-linked and oxygen-metabolizing enzymes of trichomonads. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B: 637-642.
- Tibell, L.; Aasa, R. y Marklund, S. L. (1993). Spectral and physical properties of human extracellular superoxide dismutase. *Archs. Biochem. Biophys.* 304: 429-433.
- Towbin, H. y Gordon, J. (1984). Immunoblotting and dot imminobinding: Current status and outlook. *J. Immunol. Meth.* 72: 313-340.
- Temperton, N.J; Wilkinson, S.R. y Kelly, J.M. (1996). Cloning of an Fe-superoxide dismutase gene homologue from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76:339-343
- Turrens, J.F. (1987). Possible role of NADH-fumarate reductase in superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25: 55-60.
- Towbin, H.; Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS USA* 75: 4350-4354.

- Uttaro, A.D.; Sánchez-Moreno, M y Opperdoes, F.R. (1997). Genus-specific biochemical markers for *Phytomonas* spp. Mol. Biochem. Parasitol. 90: 337-342.
- Uttaro, A.D.; Mirkin, N.; Rider, M.H. Michels, P.A.M. y Opperdoes, F.R (1999). *Phytomonas* sp. as a model of Trypanosomatid metabolism and drug de. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 94.
- Vaca, C. E.; Wihelm, J. y Harms Ringdahl, M. (1988). Interaction of lipid peroxidation products with DNA. Research/Reviews Gen. Toxicol. 195: 137-149
- Vainstein, M.H.; Silva, J.B.T.; Lima, V.M.Q.G.; Roitman, I.; De Souza, W.; Dollet, M. y Camargo, E.P. (1987). Electrophoretic analysis of isoenzymes in the identification of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. J. Protozool. 34: 442-444.
- Van Camp, W; Bowler, C.; Villarroel, R.; Tsang, E. W. Van Montagu, M. y Inzé, D. (1990). Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 87: 9903-9907.
- Van Slobbe, W.G.; Parthasarathy, M.V. y Hensen, J.A.J. (1978). Hartrot or fatal wilt of palms. II. Oil palm (*Elaeis guinensis*) and other palms. Principies. 22: 15-25.
- Ventura, R.M.; Rodrigues, A.C.; Dell' Porto, A.; Campaner, M.; Takeda, G. F. y Teixeira, M. M. G. (1996). Molecular tools for the identification and characterization of *trypanosoma (megatrypanum)* spp. and *trypanosoma (trypanozoon) evansi*. Round Tables. Mem. Inst.Osw. Cruz. 91
- Vickerman, K. (1994). The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagelates. Int. J. Parasitol. 24: 1327-1331.
- Vickerman, K. (1962). Observations in the life cycle of *Phytomonas elmassiani* (Migone) in East Africa. J. Protozool. 9: 26-33.
- Viscogliosi, E.; Durieux, I.; Delgado-Viscogliosi, P.; Bayle, D. y Dive, D.(1996). Phylogenetic implication of iron-containing superoxide dismutase genes from trichomonad species. Mol. Biochem. Parasitol. 80: 209-214.
- Voller, A.; Bidwell, D.E. y Bartlet, A. (1976). Enzyme Immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. Bull. World Health Org. 53: 55-65.

-Von Brand, T. (1973). *Biochemistry of Parasites*, 2nd edn, Academic Press, New York, 258-262

-Zhang, Y.; Bailey, S.; Naismith, J. H.; Bond, S.; Habash, J.; McLaughlin, P.; Miroslav, Z.; Papiz, A. B.; Cunnigham, M.; Fairlamb, A. H. y Hunter, W. N. (1993). *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase. Crystallization, unit cell dimensions and structure resolution. *J. Mol. Biol.* 233: 1217-1220.