

CARACTERIZACION DE LAS DNA
POLIMERASAS DEPENDIENTES DE DNA EN
TRYPANOSOMA CRUZI

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología

por

Cecilia Rojas Baechler

Profesor Patrocinante

Dr. Aldo Solari Illescas

Julio, 1987



FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

Informe de aprobación
Tesis de Doctorado

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

Cecilia Rojas Baechler

ha sido aprobada por la Comisión Informante como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 29 de Julio de 1987.

Patrocinante de Tesis

Dr. Aldo Solari



.....

Comisión Informante de Tesis

Dra. Rosalba Lagos



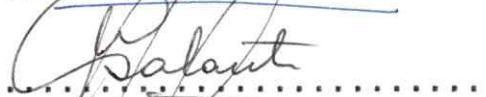
.....

Dr. Rafael Vicuña



.....

Dr. Norbel Galanti



.....

Dr. Eugenio Spencer



.....

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio del Dr. Aldo Solari, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCION.....	1
A. <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1. Características Generales.....	1
2. Forma epimastigote de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
3. Replicación del DNA en Trypanosomatidae.....	5
B. La Actividad DNA polimerásica.....	5
1. Características Generales.....	7
2. Clases de DNA polimerasas.....	12
a. DNA polimerasas involucradas en la replicación del DNA cromosómico.....	12
b. La DNA polimerasa que replica el DNA mitocondrial.....	13
c. DNA polimerasas que participan en la reparación del DNA.....	14
3. Las DNA polimerasas de eucariotes inferiores...	16
C. Objetivos.....	20
MATERIALES Y METODOS.....	22
1. Reactivos.....	22
2. Cultivo de las células.....	23
3. Determinación de la concentración de células	25
4. Ensayo de la actividad DNA polimerásica.....	25
Ensayo estándar de la actividad DNA polimerásica.....	25
5. Preparación del DNA activado.....	27
6. Preparación de los polímeros análogos del DNA activado.....	29
7. Preparación de los extractos de la forma epimastigote de <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
a. Cosecha de las células en cultivo.....	29
b. Lisis de las células.....	30
c. Obtención del extracto.....	30

8. Fraccionamiento con fines analíticos de las actividades DNA polimerásicas de los epimastigote.....	30
a. Primer esquema de fraccionamiento con fines analíticos.....	30
i. Obtención del S ₁₀	30
ii. Filtración a través de geles de "Sephadex G-25".....	31
iii. Cromatografía de intercambio aniónico en una columna de DEAE-celulosa "DE-52".....	31
b. Segundo esquema de fraccionamiento con fines analíticos.....	32
i. Preparación del S ₁₀	32
ii. Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-celulosa "DE-52".....	32
iii. Filtración a través de geles de "Sephadex G-25".....	33
iv. Cromatografía de intercambio catiónico en una resina de fosfocelulosa "P-11".....	33
9. Purificación con fines preparativos de las actividades DNA polimerásicas de T.cruzi....	34
a. Preparación del extracto.....	34
b. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa "DE-52".....	34
c. Filtración a través de geles de "Sephadex G-25".....	34
d. Cromatografía de intercambio iónico en fosfocelulosa "P-11".....	35
e. Cromatografía de afinidad en DNA agarosa.....	35
10. Centrifugación en gradientes de glicerol...	36
11. Determinación de la concentración de proteínas.....	37
12. Autorradiografía en células intactas.....	37
RESULTADOS.....	39
A. Actividad DNA polimerásica en la forma epimastigote de Trypanosoma cruzi.....	39
1. Preparación de los extractos de epimastigote.....	39
2. Medición de la actividad DNA polimerásica en los extractos.....	40
a. Concentración de los nucleótidos en el extracto.....	40
b. Pérdida de la actividad DNA polimerásica.....	40
c. Factores que interfieren con el ensayo de la actividad DNA polimerásica.....	41
3. Fraccionamiento del extracto con fines analíticos.....	41
a. Primer esquema de fraccionamiento del extracto con fines analíticos.....	41
b. Segundo esquema de fraccionamiento con propósitos analíticos.....	48
4. Estudio de estabilización de la actividad DNA polimerásica.....	50

B. Purificación con fines preparativos de las actividades DNA polimerásicas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
C. Caracterización de las actividades DNA polimerásicas de las Fracciones I Y III.....	59
1. Requerimientos de la reacción de polimerización.....	59
a. Efecto de cloruro de potasio.....	59
b. Efecto de los cationes Mg^{+2} y Mn^{+2}	59
c. Efecto de pH en la actividad DNA polimerásica.....	61
2. Capacidad de utilización de matrices.....	64
3. Velocidad de sedimentación en gradiente de glicerol.....	67
4. Efecto de inhibidores de la actividad DNA polimerásica.....	69
a. Efecto de Berenil y de bromuro de etidio.....	69
b. Efecto de 2',-3'didesoxitimidinatrifosfato y de arabinosilcitosina 5'-trifosfato....	70
c. Efecto de N-etilmaleimida.....	73
d. Efecto del ácido fosfonacético.....	76
e. Efecto de butilifenildesoxiguanosina - 5' trifosfato.....	76
5. Efecto de afidicolina.....	82
D. Efecto de algunos inhibidores de las DNA polimerasas en la incorporación de 3H -timidina al DNA nuclear y al DNA kinetoplastídico.....	87
DISCUSION.....	91
A. Actividad DNA polimerásica en la forma epimastigote de <i>Trypanosoma cruzi</i>	91
B. Caracterización de las actividades DNA polimerásicas de la Fracción I y de la Fracción III obtenidas de la forma epimastigote de <i>Trypanosoma cruzi</i>	95
1. Características generales y requerimientos del ensayo.....	95
2. Utilización de matrices artificiales.....	97
3. Efecto de los inhibidores de DNA polimerasas	99
C. Estudios del efecto de afidicolina.....	103
D. Conclusiones y proyecciones.....	108
REFERENCIAS.....	114

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla I	Las DNA polimerasas de <i>E. coli</i> y de los vertebrados.....	11
Tabla II	Presencia de factores que interfieren con la determinación de la actividad DNA polimerásica en los extractos crudos de <i>T. cruzi</i>	42
Tabla III	Actividad de tipo nucleolítica que coelufa con la actividad DNA polimerásica en la cromatografía en DEAE-celulosa (DE-52).....	47
Tabla IV	Estabilización de la actividad DNA polimerásica.....	53
Tabla V	Utilización de matrices.....	66
Tabla VI	Capacidad inhibitoria de afidicolina pretratada con la Fracción I y la Fracción III.....	86
Tabla VII	Efecto de afidicolina en la actividad DNA polimerásica medida en el curso del fraccionamiento de los extractos.	88
Tabla VIII	Principales características de las actividades DNA polimerásicas de las Fracciones I y III de <i>T. cruzi</i>	110

Lista de Esquemas y Figuras

	Pág.
Esquema I. Ciclo vital de <i>Trypanosoma cruzi</i> y sus diferentes formas celulares.....	3
Figura 1. Efecto de la glucosa en la curva de crecimiento de un cultivo de la forma epimastigote de <i>T. cruzi</i>	24
Figura 2. Cromatografía en DEAE - celulosa (DE-52) de la actividad DNA polimerásica de epimastigote.....	44
Figura 3. Ensayo de la actividad DNA polimerásica eluida de la columna de DEAE-celulosa, con dos matrices diferentes.....	45
Figura 4. Cromatografía en columna de fosfocelulosa (P-11) de la actividad DNA polimerásica, ensayada con DNA activado.....	49
Figura 5. Ensayo de la actividad DNA polimerásica eluida de la columna de fosfocelulosa, con diferentes matrices.....	51
Figura 6. Cromatografía de afinidad de la actividad DNA polimerásica en columnas de DNA agarosa.....	57
Figura 7. Efecto de cloruro de potasio.....	60
Figura 8. Efecto del catión Mg^{+2} en la actividad de DNA polimerasa de la Fracción I y de la Fracción III.....	62
Figura 9. Efecto del catión Mn^{+2} en la actividad DNA polimerásica de la Fracción I y de la Fracción III.....	63
Figura 10. Efecto del pH sobre la actividad de DNA polimerasa.....	63

Figura 11. Sedimentación en gradiente de glicerol.	68
Figura 12. Efecto de la concentración de Berenil y de bromuro de etidio en la actividad DNA polimerásica de las Fracciones I y III.....	71
Figura 13. Efecto de la concentración de 2'-3'-didesoxitimidinatrifosfato (ddTTP) y de 1- β -D-arabinofuranosilcitosina-5'-trifosfato (araCTP) en la actividad DNA polimerásica de las Fracciones I y III.	74
Figura 14. Efecto de la concentración de N-etilmaleimida.....	77
Figura 15. Efecto de la concentración del ácido fosfonacético.....	78
Figura 16. Efecto de la concentración de butilfenildesoxiguanosinatrilfosfato (BuPdGTP)	80
Figura 17. Efecto de BuPdGTP en la incorporación de dAMP a la matriz polidT-oligorA.....	81
Figura 18. Efecto de afidicolina en la incorporación de ^3H -timidina al DNA in vivo.....	83
Figura 19. Efecto de afidicolina en la incorporación de ^3H -timidina al DNA nuclear y al DNA kinetoplastídico.....	84
Figura 20. Efecto de algunos inhibidores de las DNA polimerasas en la incorporación de ^3H -timidina al DNA nuclear y al DNA kinetoplastídico.....	89

ABREVIATURAS

DEAE	dietilaminoetilo
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAsa	desoxirribonucleasa
dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
PMSF	fenilmetilsulfonil-fluoruro
PPO	2,5-difeniloxazol
POPOP	1,4-bis-2-(5-feniloxazol)
TCA	ácido tricloroacético
TLCK	tosilisin-clorometilcetona
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMEN

El ciclo vital del parásito *Trypanosoma cruzi* contempla algunas etapas de división celular activa y otras de receso multiplicativo, las que están representadas por estados celulares que poseen una morfología característica.

El conocimiento del mecanismo de transición de una forma celular a otra resulta relevante, desde el punto de vista del control de la enfermedad causada por el parásito, así como de la regulación de la proliferación celular. Los antecedentes señalan una relación directa entre el estado proliferativo de las formas celulares de *T.cruzi* y la síntesis del DNA nuclear. Por lo tanto el proceso de replicación del genoma podría constituir un punto donde se ejerce un control del ciclo vital de *T.cruzi*.

Con el propósito de permitir posteriormente el estudio de los factores involucrados en la regulación de la síntesis del DNA en el parásito, este trabajo abordó la caracterización de las DNA polimerasas dependientes del DNA, enzimas que desempeñan una función principal en este proceso.

Como primer objetivo, se emprendió la búsqueda de un esquema de fraccionamiento que pusiera de manifiesto las diferentes DNA polimerasas presentes en los extractos celulares. Para ello se utilizó los extractos de la

forma epimastigote de *T.cruzi* obtenidos de cultivos en medio líquido, en su etapa exponencial de crecimiento.

El fraccionamiento de los extractos mediante una cromatografía en fosfocelulosa, previa eliminación de los ácidos nucleicos mediante adsorción en DEAE-celulosa, permitía la separación de al menos tres fracciones con actividad DNA polimerásica. Debido a limitaciones en cuanto a la estabilidad y a la cantidad de material disponible, sólo se abordó la caracterización de dos de las actividades, aquellas presentes en la Fracción I y en la Fracción III.

Al igual que las DNA polimerasas de otros eucariotes inferiores, las actividades estudiadas en *T.cruzi* se diferenciaban sólo en algunas propiedades. Las dos actividades tenían requerimientos particulares para el ensayo de polimerización. Así, la Fracción I era estimulada por KCl, mientras que la Fracción III resultaba inhibida. La Fracción I catalizaba la incorporación de los desoxirribonucleótidos a una matriz en presencia de Mg^{+2} o de Mn^{+2} como catión divalente, en tanto la Fracción III era prácticamente inactiva con el catión Mn^{+2} como cofactor. En relación a la capacidad para utilizar polímeros sintéticos análogos del sustrato natural como matriz, ambas actividades denotaban una similitud cualitativa, copiando exclusivamente poli-desoxirribonucleótidos hibridados a

partidores de naturaleza ribonucleotídica o desoxirribonucleotídica. De los inhibidores utilizados habitualmente para la caracterización de las DNA polimerasas, tres mostraban un efecto diferenciador de las actividades de la Fracción I y de la Fracción III. N-etilmaleimida y el ácido fosfonacético ejercían un efecto inhibitorio comparativamente mayor sobre la actividad de la Fracción III. Por otra parte, el derivado butilfenilo del dGTP inhibía únicamente la actividad DNA polimerásica de la Fracción I.

De acuerdo con lo descrito en otras especies inferiores, las actividades aisladas de *T.cruzi* presentaban propiedades diferentes a las de las DNA polimerasas de los eucariotes superiores. Además, sus características resultaban distintas de aquellas determinadas para la única DNA polimerasa estudiada con anterioridad en este parásito.

ABSTRACT

During its life cycle *Trypanosoma cruzi* proceeds through metabolically and morphologically distinguishable stages. Both dividing and non-dividing cellular forms exist throughout the cycle.

Understanding the molecular mechanism involved in the induction and maintenance of these differentiated cell stages is important from the point of view of controlling the disease caused by the parasite and as a contribution to the knowledge about the regulation of cellular proliferation. At present, a direct relationship between proliferation and nuclear DNA synthesis has been found in *T.cruzi* different cellular forms. Thus, the process of nuclear DNA replication could provide a key point for controlling the parasite's life cycle.

In order to set the basis for studying the regulation of DNA synthesis, this work dealt with the characterization of DNA-dependent DNA polymerases of *T.cruzi*.

Fractionation conditions allowing the detection of the different DNA polymerases existing in *T.cruzi* extracts were established. These extracts were obtained from the exponentially growing cultures of the epimastigote form of the parasite.

Phosphocellulose chromatography of the extracts - previously freed from nucleic acids by adsorption on DEAE-cellulose - yielded at least three fractions bearing

DNA polymerase activity. Only two of these fractions (Fractions I and III) were further characterized because of constraints in enzyme stability and in the amount of available material.

As it has been found among other lower eukaryotes, the DNA polymerase activities characterized in *T.cruzi* only differed in some of their properties. However, both activities required particular assay conditions, Fraction I being stimulated by KCl, while Fraction III was inactivated. In addition, Fraction I carried out the polymerization reaction in the presence of Mg^{+2} or Mn^{+2} but Fraction III had almost no activity when Mn^{+2} was present as a cofactor.

Both activities were similar when synthetic analogs of DNA were used as templates in the polymerization reaction. Fractions I and III could only copy polydeoxyribonucleotides either with ribo or deoxyribo primers. Three of the commonest DNA polymerase inhibitors were useful to distinguish the activities of Fraction I and Fraction III. For example, N-ethylmaleimide and phosphonacetic acid had a greater effect on the DNA polymerase activity of Fraction III. On the other hand, a butylphenil derivative of dGTP exclusively inhibited the activity of Fraction I.

According to the general knowledge about DNA polymerases among lower eukaryotes, the DNA polymerase activities found in *T.cruzi* showed properties quite distinct from the

corresponding enzymes present in higher eukaryotes. The enzyme characteristics described in this work are at variance with those previously reported in this parasite.

INTRODUCCION

A. TRYPANOSOMA CRUZI

1. Características Generales.

Los trypanosoma son eucariotes unicelulares flagelados pertenecientes al orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae. Todos los miembros de esta familia son parásitos de organismos vertebrados, invertebrados e incluso de plantas. Se clasifican en diversos géneros: Crithidia, Leptomonas, Blastocrithidia, Herpetomonas (parásitos exclusivos de invertebrados), Leishmania y Trypanosoma (parásitos de vertebrados e invertebrados). Estos últimos son patógenos de los seres humanos y de algunos animales que tienen importancia económica.

En años recientes, estos parásitos se han convertido en objeto común de estudio, debido a su gran impacto en la salud humana y a sus peculiaridades bioquímicas. Entre las últimas cabe mencionar:

- a) La variación antigénica observada en los trypanosoma africanos y que permite a éstos evadir la respuesta inmune del organismo hospedante mediante la muda periódica de su cubierta glicoproteica.
- b) La compartimentalización de una parte de la vía glicolítica que comprende desde glucosa a 3-P-glicerato, en un organelo denominado glicosoma, que se encuentra exclusivamente entre los miembros del orden Kinetoplastida.

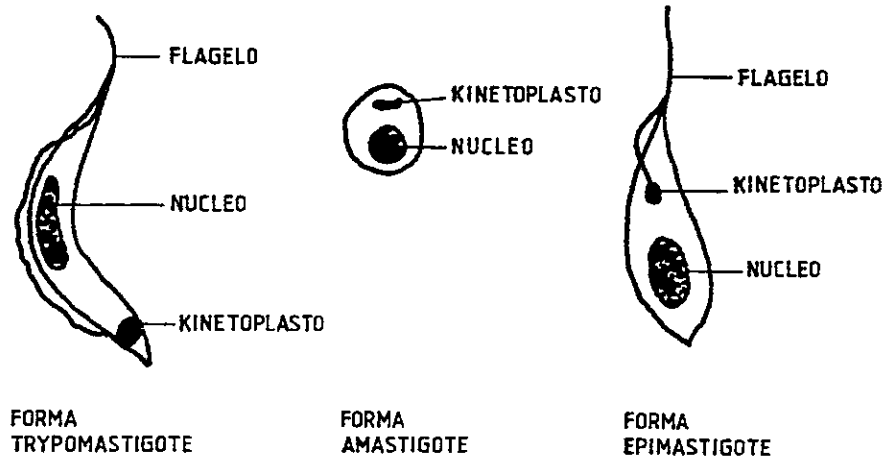
c) El proceso de transcripción discontinua, que constituye otra característica de los Kinetoplastida. Este mecanismo, que parece válido para todos los genes que codifican proteínas, consiste en la formación del mRNA maduro a partir de dos fragmentos derivados de unidades transcripcionales independientes.

d) El "Kinetoplasto", una porción de la mitocondria que contiene el DNA mitocondrial o DNA kinetoplastídico. Este presenta una forma inusual de organización del DNA, consistente en una red compleja de decenas de miles de círculos encadenados entre sí.

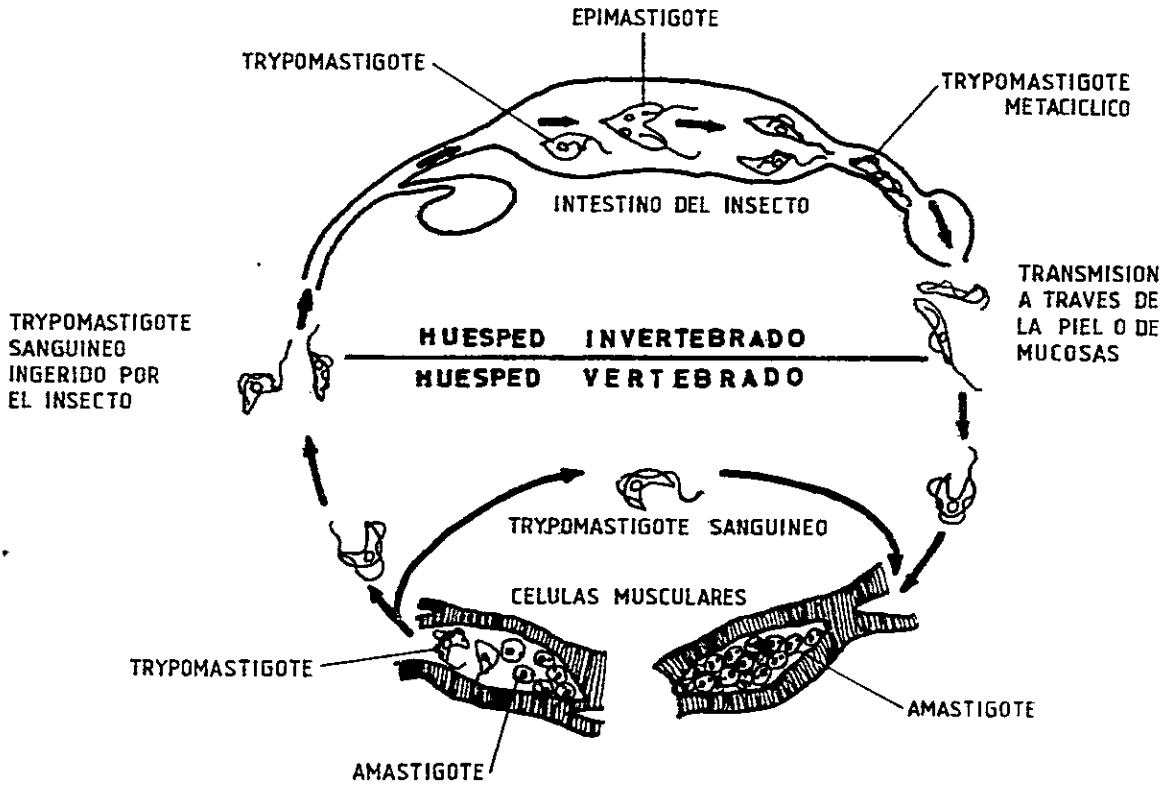
Entre estos parásitos patógenos se encuentra el *Trypanosoma cruzi*, que habita exclusivamente en el continente americano, y que causa la trypanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas.

El *Trypanosoma cruzi*, así como otros Kinetoplastidae, desarrolla un ciclo vital cuyas etapas están caracterizadas por formas celulares de morfología particular (Esquema I). Parte de este ciclo se desarrolla en el hospedante invertebrado, un triatomino conocido comunmente como vinchuca, y parte en el huésped vertebrado, un mamífero. El parásito es transmitido al vertebrado por medio de las heces del insecto vector, él que a su vez lo adquiere a través de la ingesta de la sangre de algún mamífero infectado. Durante su tránsito a lo largo del tubo digestivo del insecto, los parásitos sufren transformaciones. Así, en las células del

ESQUEMA I



FORMAS CELULARES DE T. CRUZI



CICLO VITAL DE T. CRUZI

hospedante invertebrado se encuentran dos formas celulares características: a) los epimastigote, que son una forma celular proliferativa localizada en la porción media del intestino, y b) los trypomastigote metacíclicos, que son células que no se multiplican y que se ubican hacia la región distal de intestino del insecto.

Los trypomastigote metacíclicos son infectivos y constituyen la forma celular que es transmitida al huésped vertebrado, teniendo como vía de ingreso las mucosas o las lesiones de la piel. Poco tiempo después de la infección, los parásitos abandonan la circulación sanguínea penetrando las células de diversos tejidos. Dentro de la célula que los aloja se transforman nuevamente, adquieren la forma esférica amastigote y reinician la proliferación. Cuando el número de células en estado amastigote es elevado se observa su reversión a trypomastigote, forma en la cual los parásitos son liberados a la circulación, al producirse la destrucción de la célula hospedante.

Las formas celulares que se diferencian en el curso del ciclo vital del *Trypanosoma cruzi* se distinguen no sólo del punto de vista morfológico, sino que también metabólico. En lo que respecta a la capacidad de multiplicación, se identifican dos formas proliferativas, epimastigote y amastigote, y una forma que no prolifera, trypomastigote. Esta aptitud proliferativa se relaciona con la síntesis del

DNA. Es así, como en los trypomastigote la duplicación del DNA nuclear está detenida (Gutteridge y col., 1978) y sólo se reinicia diez horas después de la infección de las células blanco y de su subsecuente transformación a la forma amastigote (Crane y Dvorak, 1979) (Crane y Dvorak, 1980).

2. Forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi*.

La mayoría de los estudios bioquímicos se ha desarrollado en la forma epimastigote obtenida en medio de cultivo líquido. Aparentemente, estas células son idénticas a los epimastigote presentes en el intestino medio del insecto.

En cultivos mantenidos a 28° es posible obtener entre 3 y 6×10^6 células/ml, cuando éstas se cosechan durante la fase estacionaria del cultivo (De Souza, 1984). Las formas trypomastigote y amastigote se obtienen en cantidades significativamente inferiores, hecho que limita el desarrollo de estudios bioquímicos en estas formas del parásito.

3. Replicación del DNA en Trypanosomatidae.

La mayor cantidad de información disponible se refiere al mecanismo de replicación del DNA kinetoplastídico (KDNA). EL KDNA está constituido por dos poblaciones de DNA circular de hebra doble, los maxicírculos y los minicírculos, que en conjunto constituyen cerca del 20% del DNA celular total. Los maxicírculos, equivalentes al DNA mitocondrial convencional, son los componentes

minoritarios del kDNA. Sólo existen algunas decenas de unidades por red. Los minicírculos, de función aún desconocida, están presentes en varias decenas de miles de unidades y forman la mayor parte del kDNA. Los estudios más detallados acerca de la replicación del kDNA han sido realizados en *Crithidia fasciculata*. Tanto *in vivo* (Kitchin y col., 1984) como *in vitro* (Birkenmeyer y Ray, 1986) se ha demostrado que la replicación de los minicírculos comienza con la liberación de éstos de la red, aparentemente mediante la acción de una topoisomerasa de tipo II (Shlomai y Zadok, 1983). El proceso de replicación ocurriría en los minicírculos aislados, resultando especies intermediarias que presentan discontinuidades en la hebra de DNA naciente. Así, en este estado relajado, los minicírculos serían incorporados en la periferia de la red parental. Solamente después de completada la replicación de la red, se produciría la unión covalente de los minicírculos y la separación de la red parental de la red "hija".

Por otra parte, hay pruebas que la replicación de los maxicírculos ocurriría mediante el mecanismo del círculo rodante (Hajduk y col., 1984).

La información que existe acerca de la replicación del genoma en los miembros de la familia Trypanosomatidae es escasa y prácticamente se limita a la caracterización parcial de algunas DNA polimerasas. Así, se ha descrito

dos actividades DNA polimerásicas en las especies *Trypanosoma brucei* (Marcus y col., 1980) y *Crithidia fasciculata* (Holmes y col., 1984). En *Trypanosoma cruzi* se ha aislado solamente una DNA polimerasa, que tendría algunas características de una enzima mitocondrial (Solari y col., 1983).

Siendo de gran interés el estudio de los factores involucrados en la regulación de la proliferación y particularmente de la replicación del DNA en las formas multiplicativas y no multiplicativas de *T. cruzi*, resulta indispensable ampliar el conocimiento de las DNA polimerasas en este sistema.

B. LA ACTIVIDAD DNA POLIMERASICA

1. Características generales.

Las DNA polimerasas (Desoxirribonucleotidiltransferasa (E.C. 2.7.7.7.)) catalizan la polimerización de los desoxirribonucleósidos monofosfato según la secuencia señalada por la matriz y basándose en la complementariedad de las bases púricas y pirimidínicas. Algunas DNA polimerasas poseen también actividad exonucleolítica y además pueden catalizar reacciones de pirofosforólisis y de intercambio de pirofosfato (Chang y Bollum, 1973).

Estas enzimas participan en las funciones de replicación, de reparación y de recombinación del DNA, actuando habitualmente asociadas a otras enzimas, proteínas y factores que constituyen complejos

funcionales, como el complejo de replicación del DNA cromosómico o replisoma (Ottiger y Hubscher, 1984).

La actividad DNA polimerásica se encuentra en todos los organismos tanto eucariotes como procariotes y es más, en la mayoría de ellos existen varias DNA polimerasas, que desempeñan funciones específicas in vivo. En lo referente a la síntesis del DNA (ya sea en el proceso de replicación o en él de reparación), la actividad de las DNA polimerasas es esencialmente igual en todo el espectro evolutivo. Es decir, todas las DNA polimerasas requieren una matriz o molde con un partidor RNA o DNA hibridado a dicha matriz. El partidor debe presentar, en su extremo 3', un nucleótido con un grupo hidroxilo libre en la posición 3' de la ribosa, a fin que la DNA polimerasa inicie la reacción de polimerización, en la dirección 5' → 3'. Además requieren un catión divalente que habitualmente es Mg^{+2} , pero que puede ser reemplazado por Mn^{+2} (Loeb y Kunkel, 1982).

Si bien todas las DNA polimerasas comparten algunas características relativas a su función, no es menos cierto que difieren en propiedades físicas, químicas e inmunológicas.

Los conocimientos más acabados acerca de las DNA polimerasas se refieren a aquellas de algunas bacterias, de los mamíferos y de algunos virus. Se ha estudiado exhaustivamente las DNA polimerasas codificadas por algunos bacteriófagos como T4 (Goulian y col., 1969), T7 (Hori

y col., 1979), T5 (Fujimura y Ropp, 1976); asimismo, las DNA polimerasas de *E. coli* denominadas I (Jovin y col., 1969), II (Gefter y col., 1972) y III (Mc Henry y Crow, 1979). También se ha purificado y caracterizado las DNA polimerasas de otros procariotes como *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Salmonella typhimurium*.

A nivel de los eucariotes, el mayor interés se ha centrado en el estudio de las DNA polimerasas de los vertebrados, particularmente de los mamíferos. Entre éstos se ha encontrado tres tipos de DNA polimerasas, denominadas α , β y γ de acuerdo al orden de su descubrimiento. A éstas se ha agregado una cuarta DNA polimerasa, denominada δ , hallada sólo en algunos tipos de células (Byrnes y col., 1976) (Byrnes y Black, 1978). Entre los vegetales y los eucariotes inferiores, la información que se dispone es aún parcial y a menudo objeto de controversia.

La función de polimerización empleando un sustrato natural como molde (por ejemplo el DNA de los bacteriófagos G4 o M13) requiere, junto a la DNA polimerasa, un conjunto de proteínas accesorias constituyentes del complejo multipéptidico que se ha denominado holoenzima (Hubscher, 1983) (Ottiger y Hubscher, 1984). Estas proteínas auxiliares modulan la actividad DNA polimerásica, influyendo en la procesividad (número de nucleótidos polimerizados cada vez que la enzima se une a la matriz), en la fidelidad con que copia

el molde, en el reconocimiento del partidor, en el reconocimiento del sitio de término, etc. Las proteínas que componen el complejo holoenzima están bien caracterizadas en los procariotes, mientras que a nivel de los eucariotes sólo se dispone de conocimientos fragmentarios al respecto (Ottiger y Hubscher, 1984) (Mc. Henry y Kornberg, 1982) . Este hecho ha dificultado la identificación y la clasificación de las DNA polimerasas en estos organismos, puesto que su interacción con otros factores proteicos origina una multiplicidad de especies moleculares (Hubscher, 1973) que a menudo presentan propiedades catalíticas diferentes (Hockensmith y Bambara, 1981).

Los criterios tradicionales para la clasificación de las DNA polimerasas tales como tamaño molecular, el efecto de la concentración salina en la actividad catalítica o la sensibilidad a reactivos bloqueadores de los grupos sulfhidrilo, resumidos en la Tabla I, aún siguen siendo aplicados. A éstos se agrega una gama creciente de inhibidores selectivos de la actividad que constituyen herramientas útiles para aunar los criterios de clasificación *in vitro* de las DNA polimerasas. Sin embargo, el criterio principal de clasificación es la función que desempeñan estas enzimas *in vivo*. La tarea de conocer la función específica de una DNA polimerasa sólo puede ser abordada en forma indirecta cuando no se dispone de mutantes condicionales letales. Por ejemplo, se ha

Tabla I

Las DNA polimerasas de E.coli y de vertebrados

Propiedad vertebrados	DNA pol. E.coli			DNA pol.		
	I	II	III	α	β	γ
Físico-química:						
PM desnatur.(KDa)	109	120	140	120-180	45	47
p. isoeléctrico	ac	ac	ac	ac	ac	ac
Catalítica:						
pH óptimo	7,0	7,5	7,2	7,2	8-9	8-9
KCl 100 mM	est	inh	inh	inh	est	est
bloqueadores SH	s/efec	inh	inh	inh	s/efec	inh
óptimo catión						
Mg ⁺² (mM)	2	10	6-15	2-7	5-25	5-12
Mn ⁺² (mM)	0,1	0,1	1	0,5	0,3-0,8	0,1
Funcional:						
uso matrices						
DNA hs	-	-	-	-(+)	-	-
DNA hd	-	-	-	-	-	-
DNA activado	+	(+)	+	+	+	+
matriz-partidor						
polidN-oligodN	+	+	+	+	+	+
polidN-oligorN	(+)	?	+	+	-	(+)
polirN-oligodN	+	?	-	-	(+)	+
Biológica:						
polimeriz. 5'→3'	+	+	+	+	+	+
exonucl. 5'→3'	+	-	+	-	-	?
exonucl. 3'→5'	+	+	+	-	-	?
pirofosforolisis	+	+	+	+	-	?
intercambio PPI	+	+	+	+	-	?
procesividad (nuc. inc./molec.enzima)	188	?	>5000	9-17	1	4000

Extractado de Hubscher, U. (1983) DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes: Mode of action and biological implications. *Experientia* 39: 1-25.

ac : ácido
 est : estimula
 inh : inhibe
 s/efec : sin efecto
 DNA hs : DNA de hebra simple
 DNA hd : DNA de hebra doble
 nuc : nucleótidos

recurrido a determinar la localización subcelular de las enzimas y a relacionar su actividad con una etapa del ciclo celular o con un estado metabólico particular de la célula o del tejido. Este tipo de enfoque, pese a algunas controversias que ha suscitado (Fry, 1983), ha permitido alcanzar cierto consenso respecto a las clases de DNA polimerasas y a la función *in vivo* que éstas realizan.

2. Clases de DNA polimerasas.

a) DNA polimerasas involucradas en la replicación del DNA cromosómico.

La replicación del DNA cromosómico procariótico y eucariótico requiere de la acción concertada de muchas proteínas y enzimas como primasa, topoisomerasa, RNasa, ligasa, DNA polimerasa, etc. En todos los seres vivos, desde los bacteriófagos hasta los mamíferos, se encuentra una DNA polimerasa que participaría primordialmente en la replicación del genoma (Geuskens y col., 1981) (Sala y col., 1981) (Miller y col., 1985). Esta corresponde a la DNA polimerasa de tipo α de los eucariotes y a la DNA polimerasa III de *E.coli*. Una comparación de las propiedades de estas enzimas purificadas, ha permitido establecer que comparten algunas características: i) las actividades catalíticas residen en un polipéptido de peso molecular 120.000 a 180.000, ii) tienen carácter ácido, iii) poseen grupos sulfhidrilo importantes para la actividad catalítica, iv) muestran una inhibición marcada

de la actividad con concentraciones de KCl alrededor de 100 mM y v) son activadas por proteínas que poseen afinidad por el DNA de hebra simple. Además estas DNA polimerasas utilizan eficientemente los mismos tipos de matrices artificiales, presentan semejanzas en el pH óptimo para la reacción de polimerización y en el valor de la Km para los desoxirribonucleósidos trifosfato (Hubscher, 1983) (Fisher y col., 1981).

En el proceso de replicación del cromosoma de E.coli, existen pruebas de la participación no sólo de la DNA polimerasa III, sino también de la DNA polimerasa I (Kuempel y Veomett, 1981) (Okazaki y col., 1971). Se atribuye a ésta última la función de eliminar los partidores RNA de los fragmentos de Okazaki, mediante su actividad exonucleolítica 5' → 3', y de reponer luego los nucleótidos escindidos.

Al igual que la DNA polimerasa I de E.coli, a la enzima de tipo β de los eucariotes también se le atribuye participación en el proceso de replicación del DNA, extendiendo las cadenas polinucleotídicas iniciadas por la DNA polimerasa α a medida que avanza la horquilla de replicación (Matsukage y col., 1980).

b) La DNA polimerasa que replica el genoma mitocondrial. La DNA polimerasa de tipo γ es la enzima involucrada en la replicación del genoma mitocondrial. Esta enzima también se encuentra en el núcleo de las células, desconociéndose la función que allí desempeña; su

participación en el proceso de amplificación génica es solamente especulativa (Geuskens y col., 1981).

La DNA polimerasa de tipo γ es una enzima que presenta un peso molecular alto en su estado nativo y que se diferencia de las otras DNA polimerasas por su capacidad para emplear matrices de polirribonucleótidos, como polirA-oligodT, con alta eficiencia (Sala y col., 1980) (Yamaguchi y col. 1980 a).

A diferencia de las DNA polimerasas α y β , la DNA polimerasa γ es una enzima procesiva (la enzima no se suelta de la matriz hasta completar la replicación), que duplica el genoma mitocondrial mediante el mecanismo de desplazamiento de hebra, en forma continua y unidireccional (Yamaguchi y col., 1980 b) (Geuskens y col., 1981) (Scovassi y col., 1979). Una enzima con estas características también ha sido encontrada en las mitocondrias y en los cloroplastos de las plantas (Sala y col., 1981) (Litvak y Castroviejo, 1985).

c) DNA polimerasas que participan en la reparación del DNA.

Se entiende por daño al DNA, cualquier modificación que altere su propiedad codificadora o su normal funcionamiento en los procesos de replicación y de transcripción. Este daño puede ser de naturaleza muy variada, así como son diversos los mecanismos que participan en el reconocimiento y en la reparación de las alteraciones. El mecanismo de escisión y de reparación es uno de los que opera para

proteger a las células de las consecuencias de las modificaciones espontaneas o inducidas del DNA. En *E. coli*, la DNA polimerasa I tendría una participación fundamental en la función de escisión-reparación (Gross y Gross, 1969) (Cooper y Hanawalt, 1972). Esta enzima, además de la actividad DNA polimerásica, posee una actividad exonucleolítica en sentido 5'→3' y 3'→5'. Esto le permitiría actuar como "corrector de pruebas" durante el proceso de síntesis del DNA, eliminando los nucleótidos escindidos.

Se piensa que la DNA polimerasa de tipo β de los mamíferos sería la principal enzima involucrada en la reparación del DNA, no obstante, al igual que las otras DNA polimerasas eucarióticas carece de actividad nucleolítica intrínseca (Waser y col., 1979) (Hanawalt y col., 1979). La DNA polimerasa β es la única DNA polimerasa de los eucariotes superiores que presenta actividad exonucleolítica en sentido 3'→5' (Byrnes y col., 1976) (Byrnes y Black, 1978).

Se ha propuesto que la DNA polimerasa β asociada a una exonucleasa bidireccional (como la DNAsa V de las células del hepatoma de Novikoff) y a otros factores, probablemente constituiría el complejo de reparación en los eucariotes (Mousbaug y Meyer, 1980).

La DNA polimerasa de tipo β es una enzima de peso molecular 50.000 aproximadamente, cuya actividad es

resistente a N-etilmaleimida (NEM). Un análisis evolutivo de la β -polimerasa ha permitido establecer que ésta sólo aparece a nivel de los equinodermos; una enzima con estas características no es detectada en las plantas (Litvak y Castroviejo, 1985), en los hongos ni en los protozoos (Chang y col., 1976) (Chang y Bolum, 1981) (Chang y col., 1982). En algunos eucariotes inferiores se encuentra una actividad DNA polimerásica con baja sensibilidad relativa a NEM, pero en la mayoría de los casos la enzima tiene un peso molecular mayor que la DNA polimerasa β de los mamíferos (Ross y Harris, 1978) (Furukawa y col., 1979) (Aoshima y col., 1984).

3. Las DNA polimerasas de los eucariotes inferiores.

La existencia de al menos tres tipos de DNA polimerasas entre los eucariotes superiores, es un hecho ampliamente aceptado; sin embargo, la situación es muy diferente cuando se refiere a las DNA polimerasas de los eucariotes inferiores (Hubscher, 1983). Sus DNA polimerasas difieren de modo considerable respecto de las de los vertebrados; es más, las propiedades de las enzimas varían según la especie analizada. La variabilidad surge, en gran medida, al comparar enzimas con distinto grado de pureza y cuya caracterización se basa en criterios dispares. Con frecuencia los autores se remiten a determinar un número restringido de propiedades de las

enzimas aisladas, dificultando así su comparación y su clasificación.

A pesar de los inconvenientes mencionados, es posible establecer algunas características generales de las DNA polimerasas de los eucariotes inferiores.

En primer término, al igual que en plantas y en bacterias, no se encuentra una enzima del tipo β . Resulta una excepción a lo anterior, el hallazgo en *Crithidia fasciculata* de una DNA polimerasa que es resistente a N-etilmaleimida y que además tiene bajo peso molecular (Holmes y col., 1984). Sin embargo, esta enzima no es reconocida por los anticuerpos contra la DNA polimerasa β de timo de ternera (Chang y col., 1982). Además, en *Chlamydomonas reinhardtii* (Ross y Harris, 1978), en *Tetrahymena pyriformis* (Furukawa y col., 1979) y en *Chlorella* (Aoshima y col., 1984) se describe una actividad polimerásica con una sensibilidad relativamente baja a N-etilmaleimida.

Otro aspecto que caracteriza a las DNA polimerasas de los eucariotes inferiores es su alto peso molecular. En *Cylindrotheca fusiformis* (Okita y Volcani, 1977), *Tetrahymena pyriformis* (Crear y Pearlman, 1974), *Trypanosoma brucei* (Marcus y col., 1980), *Dictyostelium discoideum* (Loomis y col., 1976), *Euglena gracilis* (Mc Lennan y Keir, 1975), *Paramecium* (Tait y Cummings, 1975) y levadura (Wintersberger, 1974), se ha encontrado que

todas las especies moleculares que presentan actividad DNA polimerásica son de gran tamaño.

En general, todas estas especies son activas indistintamente con Mg^{+2} o Mn^{+2} como catión bivalente; aunque cuando se emplea DNA activado (DNA que tiene segmentos de hebra doble y de hebra simple) como matriz, la actividad enzimática en presencia del ión Mg^{+2} es varias veces superior a la que se encuentra con Mn^{+2} .

El número de especies moleculares con actividad de DNA polimerasa en los diversos organismos es variable, desde una, en *Dictyostelium discoideum* (Loomis y col., 1976) y en *Ustilago maydis* (Banks y col., 1976), hasta tres y cuatro en *Paramecium* (Tait y Cummings, 1975) y en *Cylindrotheca fusiformis* (Okita y Volcani, 1977), respectivamente. No obstante, en la mayoría de los organismos eucariotes unicelulares se encuentran dos actividades DNA polimerásicas. Una de ellas, además de la actividad de polimerización, posee una función de exonucleasa, al igual que en los procariotes y en los bacteriófagos (Helfman, 1973) (Chang, 1977) (Crear y Pearlman, 1974) (Banks y Yarrington, 1976). Esta actividad exonucleolítica tendría por objeto la mantención de la fidelidad de copia, corrigiendo los errores producidos durante la polimerización de los nucleótidos (Loeb y Kunkel, 1982).

Entre los miembros de la familia Trypanosomatidae, la especie *Crithidia fasciculata*, presenta dos tipos de

actividad DNA polimerásica. Una de ellas comparte las propiedades esenciales de la β -polimerasa de los mamíferos. La otra actividad reside en varias entidades moleculares, algunas de ellas interconvertibles (Holmes y col., 1984). En los extractos crudos de la especie *Trypanosoma brucei*, fraccionados mediante una centrifugación en gradiente de glicerol, se detectan dos especies moleculares con actividad DNA polimerásica. Ninguna de ellas tiene reacción cruzada con sueros anti DNA polimerasa α ni anti DNA polimerasa β de mamífero (Chang y col., 1980). El fraccionamiento cromatográfico de los extractos de *T. brucei* también revela dos DNA polimerasas. Ambas resultan semejantes en cuanto a su peso molecular y a las propiedades catalíticas. Sólo son diferenciables según el efecto que sobre ellas ejerce el KCl y de las poliaminas espermina y espermidina (Marcus y col., 1982).

A partir de la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi* se ha descrito la purificación de una sola DNA polimerasa (Solari y col., 1983). La enzima no es clasificable fácilmente, ya que presenta propiedades mixtas de α , β y γ polimerasa. Sobre la base de la acción de los inhibidores bromuro de etidio y Berenil, que actuarían selectivamente sobre el DNA kinetoplastídico, los autores sugieren que la DNA polimerasa aislada sería del tipo γ o mitocondrial.

C. OBJETIVOS

La regulación de la replicación, tanto a nivel del DNA como a nivel celular, es un área en la cual se ha renovado el interés de los investigadores en los últimos años (Thyberg, 1984) (Delfini y col., 1985) (Van der Ende y col., 1985) (Schneider y col., 1985) (Krauss y Linn, 1986).

Según los antecedentes expuestos, el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* podría proporcionar un sistema adecuado para desarrollar este tipo de estudios. En el curso de su ciclo vital, el parásito pasa por etapas de activa multiplicación, así como por etapas de receso proliferativo, hecho que se relacionaría de manera directa con la síntesis del DNA, determinada *in vivo*. Los mecanismos que determinan el paso de un estado proliferativo a otro aún son desconocidos, por lo que resulta relevante estudiar si la replicación del DNA tiene alguna participación en dicho control.

Para abordar el problema es requisito disponer de un conocimiento más profundo, que el existente hasta ahora, de la "maquinaria replicativa" del parásito.

Enmarcado en este contexto, el propósito específico de este trabajo de investigación es determinar el número de DNA polimerasas dependientes del DNA en *Trypanosoma cruzi* y caracterizarlas de acuerdo a los criterios generales establecidos.

Como material de estudio se ha seleccionado la forma epimastigote del parásito, ya que las condiciones para su cultivo in vitro están bien establecidas, lo que permite obtener cantidades de células apropiadas para la purificación y la caracterización de las enzimas.

MATERIALES Y METODOS.

1. Reactivos.

De Sigma Chemical Co. provenían los siguientes reactivos: hemina, Tris, DTT, seroalbúmina de bovino, Nonidet P-40, TLCK, PMSF, glucosa, DMSO, EDTA, DNA-celulosa, afidicolina, N-etilmaleimida y los desoxirribonucleósidos trifosfato.

Los componentes del medio de cultivo "Tryptose", "Tryptone", el suero fetal de bovino y el extracto de levaduras, se obtenían de DIFCO Laboratories.

Los polinucleótidos (400 a 600 unidades) y los oligonucleótidos (12 a 18 unidades) se obtenían de Pharmacia, al igual que el ddTTP. Los nucleósidos y los nucleótidos marcados radiactivamente procedían de New England Nuclear Corp. o de ICN Biomedicals Inc. El araCTP procedía de PL-Biochemicals.

La resina de intercambio aniónico DE-52 era obtenida de Whatman Biochemicals, al igual que los filtros de fibra de vidrio GF/A. El "Sephadex G-25" (Pharmacia) fue donado por el Dr. Carlos Jerez. La fosfoceulosa (Whatman P-11) fue facilitada por la Dra. Catherine Connelly.

Los inhibidores de DNA polimerasas Berenil, bromuro de etidio, ácido fosfonacético y BuPdGTP fueron donaciones del Dr. Simón Litvak.

La DNA agarosa fue donada por el Dr. Rafael Vicuña y por el Dr. Simón Litvak.

Los reactivos y materiales fotográficos fueron facilitados por el Dr. Jorge Sans y por el Dr. Crisanto Gutiérrez.

Los reactivos inorgánicos, de grado analítico eran de las compañías Merk, Baker, Sigma, BDH Chemicals, Fluka y May and Baker.

2. Cultivo de las células.

Se utilizó la forma epimastigote del parásito *Trypanosoma cruzi*, cepa Tulahuén (Pizzi, 1957), mantenida en cultivo.

Los parásitos fueron cultivados a 28° en el medio líquido de Diamond (Diamond, 1968) modificado, que contiene: "Tryptosa" 6,25 g/l, "Tryptona" (digerido pancreático de caseína) 6,25 g/l, extracto de levaduras 6,25 g/l, NaCl 6,25 g/l, KH_2PO_4 4,06 g/l, K_2HPO_4 4,06 g/l. Este medio de cultivo era suplementado con hemina a una concentración de 19 μM y con suero fetal de bovino al 5 % con el complemento inactivado, además de glucosa al 1 % . Esta modificación permitía un aumento hasta un 50 % en la velocidad de crecimiento de las células (figura 1).

En el momento de iniciar el cultivo, el medio se completaba con penicilina 100 UI/ml, estreptomycinina 100 $\mu\text{g/ml}$ y ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$.

Las células se cultivaban, en botellas de vidrio que contenían un volumen de 100 ml de medio de cultivo, durante siete días hasta alcanzar una densidad aproximada de 4 a 6 $\times 10^6$ células/ml. En este momento se iniciaba un

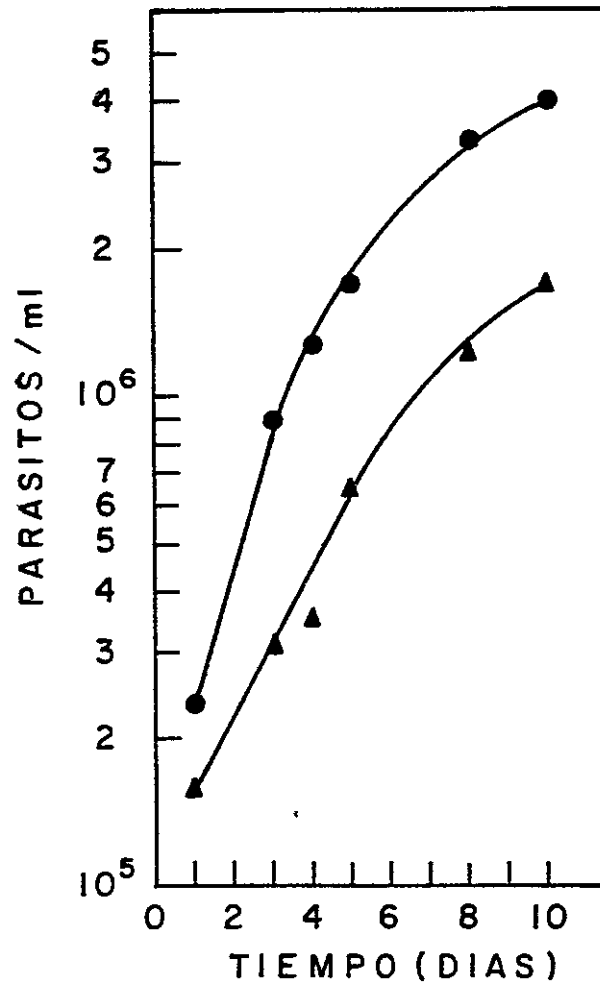


Figura 1. Efecto de la glucosa en la curva de crecimiento de un cultivo de la forma epimastigote de *T. cruzi*.

Las células fueron cultivadas según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos, en presencia (●) y en ausencia (▲) de glucosa al 1 %. En el transcurso del cultivo se extrajeron alícuotas del medio, en las que se determinó la concentración de células de acuerdo a la metodología referida en el capítulo respectivo de la sección Materiales y Métodos.

cultivo nuevo, traspasando la décima parte del volumen total a un medio de cultivo fresco.

3. Determinación de la concentración de células.

La concentración de las células en suspensión se determinaba mediante una Cámara de Neubauer. La cámara se llenaba con una alícuota de una dilución de la suspensión de células en la solución PBS, que contenía fosfato de potasio 30 mM a pH 7,4 y cloruro de sodio 107 mM.

4. Ensayo de la actividad DNA polimerásica.

In vitro, la actividad DNA polimerásica normalmente se ensaya elongando un partidón hibridado a una matriz de hebra simple. Este tipo de sustrato es preparado mediante la digestión parcial con una desoxirribonucleasa de un DNA de hebra doble, generando en éste segmentos de hebra simple que sirven de molde y partidones susceptibles de ser elongados. El DNA con estas características se denomina DNA activado. También es posible construir sustratos apropiados para las DNA polimerasas mediante la hibridación de homopolímeros de nucleótidos complementarios de longitud apropiada .

Ensayo estándar de la actividad DNA polimerásica:

El ensayo de la actividad DNA polimerásica consiste en cuantificar la incorporación de un nucleótido radiactivo a una matriz con las características antes descritas.

En este trabajo, la actividad DNA polimerásica se determinaba en un medio de reacción que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8, DTT 10 mM, $Mg(CH_3COO)_2$ 10 mM (o $MnCl_2$ 1mM en los casos señalados), seroalbúmina de bovino 100 $\mu g/ml$, DNA activado 20 a 40 $\mu g/ml$, tres de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato en una concentración de 50 μM (concentración que es saturante para la actividad DNA polimerásica), 3H -desoxitimidina trifosfato (3H -TTP) 10 a 12 μM (ae= $1,4 \times 10^4$ cpm/pmol a $1,9 \times 10^4$ cpm/pmol) y la fracción enzimática, en un volumen final de 0,05 ml.

Cuando se utilizaba polímeros análogos del DNA como matriz, su concentración en el medio de ensayo era 0,48 unidades A_{260}/ml . Además sólo se agregaba el 3H -dNTP complementario a la matriz, en una concentración y actividad específica equivalente a la del ensayo con DNA activado.

La reacción se iniciaba mediante la adición de la mezcla de los nucleótidos, se incubaba durante 30 minutos (período durante el cual la reacción progresaba linealmente) a 37° , excepto en los casos señalados expresamente, y se detenía agregando ácido tricloroacético al 10 % de concentración, en frío. Con el propósito de permitir una precipitación completa de los ácidos nucleicos, se incubaba a 4° durante 20 a 30 minutos. Posteriormente se cuantificaba la radiactividad en el precipitado. Para ello se filtraba a través de filtros de fibra de vidrio GF/A (Whatman),

mediante un dispositivo conectado a un sistema generador de vacío, lavando con 20 ml de TCA al 2%. Se determinaba la radiactividad retenida en los filtros, secados previamente, mediante un contador de centelleos para sistema líquido. Se empleaba 5 ml de una mezcla de centelleo compuesta por 4 g de PPO y 96 mg de POPOP en un litro de tolueno.

En los ensayos de caracterización de la actividad DNA polimerásica se empleaba 2,5 a 4 μ g de proteínas, cantidades con las cuales la actividad enzimática resultaba proporcional a la concentración de proteínas.

Se define como unidad de actividad DNA polimerásica, la cantidad de enzima necesaria para incorporar 1 pmol de dNMP a la matriz en 30 minutos a 37°, de acuerdo al ensayo estándar.

5. Preparación del DNA activado.

Mediante una digestión parcial con la DNAsa I pancreática se preparaba un DNA con segmentos de hebra simple, que servía como molde para la reacción de polimerización catalizada por la DNA polimerasa.

La preparación del DNA activado se realizaba de acuerdo al procedimiento modificado de Aphosian (Aphosian y Kornberg, 1962). El DNA nativo se incubaba, a una concentración de 450 μ g/ml, durante 15 minutos a 30° con 2 μ g/ml de DNAsa pancreática (Worthington Biochemical Corporation), en un medio de reacción que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5 , MgCl₂ 10 mM, 2-mercaptoetanol 10

mM, KCl 5 mM y seroalbúmina de bovino 10 µg/ml. Se ponía término a la reacción mediante un calentamiento a 75° durante 15 minutos, luego de lo cual la solución se dejaba enfriar lentamente.

El DNA era precipitado mediante la adición de cuatro volúmenes de etanol absoluto, seguido de una incubación a -20° por un período de 12 a 18 horas. Luego de centrifugar a 15.000 x g por 20 minutos se eliminaba el sobrenadante y el alcohol se evaporaba por medio de una corriente de aire. El precipitado se resuspendía a una concentración de 0,5 mg/ml en una solución de Tris-HCl 30 mM pH 8 y NaCl 30 mM. La solución se dividía en alícuotas que se conservaban a -20°.

La calidad como matriz del DNA activado así preparado es variable, debido a la dificultad que existe para controlar con precisión la magnitud de la acción nucleolítica de la DNAsa I. La diferencia en el tamaño de los segmentos de hebra simple generados hace que la actividad DNA polimerásica, medida con DNA activado proveniente de distintas preparaciones, no sea comparable directamente. Con el propósito de facilitar la comparación de los resultados obtenidos empleando diferentes DNA activados, en cada experimento se incorporaba como estándar la actividad de la DNA polimerasa de tipo α obtenida del ovario de *Xenopus laevis*. Esta actividad presentaba un grado de estabilidad adecuado para utilizarla como un control en los ensayos.

6. Preparación de los polímeros análogos del DNA activado.

Los polímeros sintéticos de doble hebra, análogos del DNA activado, se obtienen por hibridación de un polinucleótido con un oligonucleótido cuyas bases son complementarias.

Los polímeros sintéticos, con una concentración final de 2,4 U A_{260}/ml , se preparaban mezclando el polinucleótido y el oligonucleótido apropiado en una proporción de 5:1 en una solución que contenía Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Esta se calentaba durante 10 minutos a 90° y se dejaba enfriar lentamente para permitir el apareamiento de las bases complementarias.

Las soluciones de polidA-oligodT, polidC-oligodG, polirA-oligodT y polidT-oligorA, así preparadas, se conservaban a -20°.

7. Preparación de extractos de la forma epimastigote de Trypanosoma cruzi.

a) Cosecha de las células en cultivo.

Para preparar los extractos, los parásitos se cosechaban al cuarto día, cuando los cultivos estaban en la fase logarítmica de su curva de crecimiento y habían alcanzado una concentración aproximada de $1,3 \times 10^6$ células/ml.

Las células eran lavadas tres veces con la solución PBS, centrifugando a 2.000 x g durante 15 minutos, en una centrifuga Sorvall RC-2 empleando un rotor GSA.

El sedimento final de células era guardado a -80° o utilizado inmediatamente para preparar el extracto.

b) Lisis de las células.

El sedimento de las células era resuspendido mediante una pipeta Pasteur en la solución A compuesta por Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 2 mM, que se suplementaba con KCl 400 mM y con el detergente no iónico Nonidet P40 (NP-40) al 1 %, en presencia de los siguientes inhibidores de proteasas: TLCK 0,5 mM y PMSF 0,8 mM.

c) Obtención del extracto.

Los lisados de los epimastigote eran centrifugados durante 10 minutos a 10.000 g en una centrifuga Sorvall RC-2, en un rotor SS-34.

El sobrenadante de esta centrifugación (S_{10}) constituye el extracto crudo de epimastigote.

8. Fraccionamiento con fines analíticos de las actividades DNA polimerásicas de los epimastigote.

a. Primer esquema de fraccionamiento con fines analíticos.

i. Obtención del S_{10} .

Con el propósito de preparar la fracción S_{10} , se homogeneizaba 0,4 a 0,6 g de T. cruzi en 4 a 6 ml de la solución empleada en la etapa de lisis, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en esta sección.

ii. Filtración a través de geles de "Sephadex G-25".

Con la finalidad de disminuir la concentración de las sales y de los nucleótidos, la fracción S_{10} era filtrada por una columna de 9,4 ml (1,2 x 8,3 cm) de gel "Sephadex G-25 medio" equilibrada con la solución A suplementada con NP-40 al 1 %, $MgCl_2$ 2 mM, PMSF 0,1 mM y TLCK 0,05 mM. Las condiciones de esta filtración (volumen de la muestra, tamaño de la columna y flujo) se ajustaban empíricamente, de manera de lograr una separación apropiada de las proteínas y de las moléculas de tamaño pequeño.

Las fracciones que contenían las moléculas excluidas del gel se colectaban y se medía su conductividad. Esta se ajustaba de manera de igualarla con aquella de la solución de equilibrio de la columna de DEAE-celulosa, que constituía el siguiente paso en este esquema de fraccionamiento.

iii. Cromatografía de intercambio aniónico en una columna de DEAE-celulosa "DE-52".

Las fracciones recogidas del filtrado en geles de "Sephadex G-25" se sometían a una cromatografía en DE-52, en una columna que contenía 12 ml (1,2 x 10,6 cm) de resina equilibrada previamente con solución A que además tenía $MgCl_2$ 2 mM, NP-40 al 1 %, PMSF 0,1 mM, TLCK 0,05 mM y KCl 20 mM. Posteriormente a la adsorción de la fracción referida, la columna se lavaba profusamente con la solución de equilibrio. La elución se realizaba mediante un gradiente lineal de concentración de KCl en el

rango de 20 a 200 mM, en la misma solución de equilibrio. Se recogían fracciones de 1,5 ml, en las cuales se medía la conductividad con el propósito de verificar la linealidad del gradiente salino y además, se determinaba la actividad enzimática en alícuotas de 5 μ l.

Las fracciones con actividad enzimática se juntaban y se concentraban tres veces mediante diálisis contra una solución de la siguiente composición: Tris-HCl 50 mM pH8, 2-mercaptoetanol 2 mM, EDTA 0,1 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 2 mM y glicerol al 40 %. Estas fracciones se conservaban a -20°.

b. Segundo esquema de fraccionamiento con fines analíticos.

i. Preparación del S₁₀.

El extracto se preparaba empleando entre 2,5 y 3 g de peso húmedo de células, las que se lisaban en 5 volúmenes de la solución que contenía el detergente, según la metodología antes descrita. Además se incorporaba NaHSO₃ como inhibidor de proteasas, en una concentración 9 mM.

ii. Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-celulosa DE-52.

El extracto se sometía a una cromatografía en DE-52, empleando una columna con un volumen de 10 ml (1,2 x 8,9 cm) de resina que se equilibraba con la solución A, que además contenía: PMSF 1 mM, TLCK 0,5 mM y KCl 400 mM. Luego de aplicada la muestra, se lavaba con la misma solución de equilibrio de la columna, recogiendo las

fracciones que contenían las proteínas que no se unían a la resina en esas condiciones.

iii. Filtración a través de geles de "Sephadex G-25".

La fracción del extracto que no era retenida en la columna de DE-52 equilibrada a una concentración de cloruro de potasio de 400 mM, era filtrada por una columna que contenía 30 ml (2 x 9,5 cm) de "Sephadex G-25" grueso, equilibrado con la solución A suplementada con los inhibidores de proteasas TLCK 15 μ M y PMSF 100 μ M.

Las fracciones que eran excluidas del gel se juntaban y se ajustaba su conductividad con el fin de equipararla con la de la solución de equilibrio de la columna de fosfocelulosa, que era el siguiente paso de purificación.

iv. Cromatografía de intercambio catiónico en una resina de fosfocelulosa "P-11".

El filtrado a través de geles de "Sephadex G-25" era adsorbido en una columna de P-11. Esta columna contenía 30 ml (2 x 9,5 cm.) de resina equilibrada anteriormente con la solución A a la que se incorporaba KCl 50 mM y los inhibidores de proteasas TLCK 15 μ M y PMSF 100 μ M. Posteriormente a la adsorción de la muestra, la resina era lavada con la misma solución empleada para equilibrarla. La elución se realizaba mediante diez volúmenes de columna de un gradiente lineal de concentración de KCl entre 50 y 600 mM preparado en la solución de equilibrio. Se colectaban fracciones de 3 ml, de las cuales se sacaba

alícuotas de 5 μ l para los ensayos de actividad DNA polimerásica.

La linealidad del gradiente de KCl, empleado para eluir la actividad enzimática retenida en la columna de P-11, se controlaba midiendo la conductividad de cada una de las fracciones recogidas.

9. Purificación con fines preparativos de las actividades DNA polimerásicas de T.cruzi.

Con el propósito de caracterizar las actividades DNA polimerásicas de la forma epimastigote de T. cruzi, se realizó preparaciones de enzima a escala mayor que aquellas con fines analíticos. En las primeras etapas se siguió esencialmente la metodología aplicada en el segundo esquema de purificación (punto 7.b). Las diferencias se mencionan a continuación:

a. Preparación del extracto.

La única modificación al procedimiento antes descrito consistió en el aumento de la masa de células. Se utilizaba entre 6 y 10 g de peso húmedo de células y 18 a 30 ml de la solución de homogeneización.

b. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa "DE-52".

Se empleaba columnas con 20 ml (2 x 6,4 cm.) o 30 ml (2 x 9,5 cm.) de volumen de resina.

c. Filtración a través de geles de "Sephadex G-25".

El volumen total de las fracciones que no eran retenidas en "DE-52" se dividía en dos. Cada uno de estos volúmenes era filtrado a través de una columna de "Sephadex G-25"

que contenía 35 ml (2,1 x 10,2 cm.) o 38 ml (2,1 x 11,0 cm.) del gel.

d. Cromatografía de intercambio iónico en fosfocelulosa "P-11".

El filtrado a través de "Sephadex G-25" se sometía a una cromatografía de intercambio catiónico en fosfocelulosa, en columnas conteniendo 40 ml (2,2 x 10,6 cm.) o 60 ml de resina (2,2 x 15,8 cm.).

Las fracciones correspondientes a los picos de actividad DNA polimerásica eluida de la columna de fosfocelulosa se juntaban y se precipitaban con sulfato de amonio al 70 % de saturación. Los precipitados así obtenidos se guardaban a -20°

e. Cromatografía de afinidad en DNA agarosa

Las fracciones provenientes de diversas preparaciones, conservadas al estado de precipitado con sulfato de amonio, eran juntadas y resuspendidas en un volumen de 0,2 a 0,5 ml de la solución A. En seguida, se eliminaba el sulfato de amonio por medio de una filtración en geles de "Sephadex G-25" grueso. El filtrado, cuya conductividad se igualaba con la de la solución de equilibrio de la DNA agarosa, se adsorbía en una columna de 6 ml (1,2 x 5,3 cm.) o de 4 ml (1,2 x 3,5 cm.) de esta resina. Luego de la adsorción, se lavaba con la solución A que contenía KCl 50 mM y luego con la misma solución A suplementada con KCl 100 mM. La elución de la DNA polimerasa unida a la resina se realizaba con un gradiente lineal de concentración de KCl

entre 100 y 600 mM en la solución A. Se colectaban fracciones de 2 ml en las cuales se determinaba la conductividad y se ensayaba la actividad DNA polimerásica empleando alícuotas de 5 μ l.

De acuerdo con el perfil de elución de la actividad enzimática, se juntaban aquellas fracciones más activas y se precipitaban las proteínas mediante sulfato de amonio al 70 % de saturación. La actividad DNA polimerásica fue conservada de esta forma hasta su caracterización. Para estos efectos, los precipitados se resuspendieron en la solución A y se filtraron a través de columnas de "Sephadex G-25" para eliminar el sulfato de amonio. A los filtrados se agregó glicerol hasta una concentración final del 50 % y se les dividió en alícuotas que se guardaron a -20° hasta su utilización.

10. Centrifugación en gradientes de glicerol.

El análisis de la sedimentación de la actividad DNA polimerásica se realizó en un gradiente de concentración de glicerol de 15 a 45 %, centrifugando a 36.500 rpm durante 46 horas a 4° en el rotor Beckman SW 41 Ti. La enzima se aplicó en un volumen de 0,5 ml sobre 12 ml del gradiente de glicerol preparado en una solución compuesta por Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 0,1 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM y KCl 300 mM.

La linealidad del gradiente de concentración de glicerol se comprobó agregando el colorante azul de metileno a la solución más concentrada, durante la

confección del gradiente. Al finalizar la centrifugación el gradiente fue colectado desde el fondo del tubo mediante una bomba peristáltica, recogiendo alícuotas de 0,5 ml. Luego de fraccionar el gradiente se determinó la absorbancia a 650 nm de cada una de las alícuotas.

Como marcadores, se utilizó 700 µg de cada una de las siguientes proteínas: catalasa (240 KDa), aldolasa (150KDa) y ovoalbúmina (45 KDa). La posición de las proteínas marcadoras luego de la centrifugación se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm en las fracciones colectadas.

La actividad DNA polimerásica se ensayó en alícuotas de 5 µl del gradiente fraccionado después de la centrifugación.

11. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de las proteínas se determinaba según el método de Lowry (Lowry y col., 1951), usando seroalbúmina de bovino como proteína estándar.

12. Autorradiografía en células intactas.

Las células marcadas in vivo con ^3H -timidina se colectaban mediante una centrifugación de 2 minutos en una centrífuga "Eppendorf" de mesón. Posteriormente, se resuspendían en una concentración aproximada de 1×10^6 células/ml en el mismo medio utilizado en los cultivos.

Con alícuotas de 10 µl de la suspensión se realizaba extendidos sobre portaobjetos gelatinados. Estos se

dejaban secar al aire y luego se procedía a su fijación en una mezcla de etanol y ácido acético (3:1) durante 60 min. a temperatura ambiente; prosiguiendo con lavados de 30 minutos en etanol y finalmente en agua. Se continuaba con una hidrólisis en HCl 5 N a 20° durante 60 min., finalizando con lavados exhaustivos en agua destilada.

Los portaobjetos así tratados se cubrían con la emulsión radiográfica Kodak NTB2 diluida en igual volumen de agua destilada. Estando completamente seca la emulsión, se exponía durante el tiempo necesario a -80°. Finalmente se revelaba con la solución D-19 y se teñía las muestras con Giemsa al 4 % a pH 7,1. El revelador D-19 contenía: Elón 2,2 g/l, sulfito de sodio 72 g/l, hidroquinona 8,8 g/l, carbonato de sodio 48 g/l y bromuro de potasio 4 g/l.

En las células marcadas se cuantificaba el número de granos de plata, tanto en el núcleo como en el kinetoplasto.

RESULTADOS

A Actividad DNA polimerásica en la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi*.

1. Preparación de los extractos de epimastigote.

Trypanosoma cruzi posee una red de microtúbulos bajo su membrana plasmática, que le confiere una gran resistencia a las fuerzas mecánicas (Mc. Ghee y Crosgrove, 1980) y que dificulta su ruptura.

De los diversos procedimientos más comunes para lisar células, el que utilizaba el detergente no iónico NP-40 brindó los mejores resultados. Este se empleaba en las condiciones descritas en la sección Métodos.

Con la finalidad de asegurar la extracción de las proteínas que pudieran estar asociadas al DNA, se adicionaba KCl 400 mM al medio de lisis (Grosse y Krauss, 1980) (Aoshima y col., 1984). Así, al someter el lisado a una centrifugación a 10.000 x g, se constataba que la actividad DNA polimerásica remanente en el sedimento era mínima. El sobrenadante de esta centrifugación (S₁₀) constituía el extracto utilizado para los diversos propósitos de estos estudios.

2. Medición de la actividad DNA polimerásica en los extractos.

La medición de la actividad DNA polimerásica en la fracción S_{10} resultaba en la subestimación de la actividad total, según constaba en las determinaciones de actividad realizadas en etapas posteriores del fraccionamiento. Algunos de los factores que influyen probablemente en el hecho se analizan a continuación:

a. Concentración de los nucleótidos en el extracto.

El desconocimiento de la concentración de los nucleótidos en los extractos de epimastigote impedía la cuantificación de la actividad DNA polimerásica, ya que no era posible conocer la actividad específica del nucleótido radiactivo en el ensayo.

Diversas observaciones sugerían que la concentración de los nucleótidos era saturante para la(s) actividad(es) DNA polimerásica(s) medibles en el extracto, ya que la incorporación de ^3H -dTTP al DNA activado, catalizada por alícuotas del extracto, no variaba significativamente con o sin la adición al ensayo de los cuatro desoxirribonucleótidos en una concentración de 50 μM .

b. Pérdida de la actividad DNA polimerásica.

La actividad DNA polimerásica detectable en el extracto disminuía en corto tiempo. En el transcurso de 4 horas a 4^o se producía una pérdida del 30 al 40 % de la actividad medida inicialmente en el S_{10} . Al cabo de 24

horas a 4°, el extracto carecía de actividad DNA polimerásica medible de acuerdo al ensayo estándar.

c. Factores que interferían con el ensayo de la actividad DNA polimerásica.

La presencia en el extracto de factores que interferían con el ensayo de la actividad DNA polimerásica quedaba de manifiesto en experimentos como el que se muestra en la Tabla II. Alicuotas del extracto de epimastigote, adicionadas al ensayo de actividad de una DNA polimerasa de ovario de *Xenopus laevis*, provocaban una disminución notoria en la cantidad de $^3\text{H-dTMP}$ incorporado al DNA activado. Dicho efecto era anulado si el extracto de *T. cruzi* era precalentado a 90° durante 2 minutos. Al hecho que cantidades crecientes del extracto no ocasionaran un aumento proporcional en la inhibición podrían contribuir diversos factores, cuyo estudio excede los propósitos de este trabajo.

3. Fraccionamiento del extracto con fines analíticos

a. Primer esquema de fraccionamiento del extracto con fines analíticos.

Con el propósito de identificar y cuantificar la o las actividades DNA polimerásicas presentes en los extractos de *T. cruzi*, se intentó el primer esquema de purificación descrito en la sección Métodos.

Este esquema de fraccionamiento contemplaba una filtración a través de geles de "Sephadex G-25" para

Tabla II

Presencia de factores que interfirieran con la determinación de la actividad DNA polimerásica en los extractos crudos de *T. cruzi*.

Experimento A

DNA polimerasa de ovario de <i>X. laevis</i>	Extracto de <i>T. cruzi</i> (S_{10})	Actividad DNA polimerásica (cpm)	Disminución incorporac. (%)
-	10 μ l	95	-
+	-	4700	0
+	10 μ l	3203	31
+	10 μ l(d)	3038	35

Experimento B

DNA polimerasa de ovario de <i>X. laevis</i>	Adición	Actividad DNA polimerásica (cpm)	Disminución incorporac. (%)
+	ninguna	11000	0
+	2 μ l S_{10}	8200	27
+	2 μ l " (90°)	11300	0
+	5 μ l S_{10}	6900	41
+	5 μ l " (90°)	11800	0
+	10 μ l S_{10}	5000	52
+	10 μ l " (90°)	10500	0

La actividad DNA polimerásica de ovario de *Xenopus laevis* fue medida de acuerdo al ensayo estándar descrito en la sección Materiales y Métodos. Cada ensayo contenía el extracto de ovario (3 μ l en el experimento A y 5 μ l en el experimento B) y las cantidades indicadas de la fracción S_{10} de *T. cruzi*. La fracción S_{10} , conteniendo el equivalente a 5 mg de células (peso fresco) por ml de solución, fue obtenida de acuerdo a lo señalado en Materiales y Métodos. Como control se usó S_{10} calentado a 90° durante dos minutos.

d. : dializado

eliminar los nucleótidos y el exceso de cloruro de potasio del extracto, seguido por una cromatografía de intercambio aniónico en una columna de DEAE-celulosa. El perfil de elución de la actividad DNA polimerásica se muestra en la figura 2. Se observa que la actividad enzimática se distribuye tanto en las fracciones que eran retenidas en la resina como en aquellas que no se unían a ella. Cabe indicar que parte de la actividad DNA polimerásica era recuperada en el volumen no retenido, aún cuando se incrementara la razón entre la cantidad de resina (considerando su capacidad de unión) y la cantidad de proteína aplicado a la columna.

El ensayo estándar que utiliza DNA activado como molde o matriz para la reacción de polimerización, revelaba un pico mayoritario de actividad que elufa con una concentración de KCl 80 mM, aproximadamente y una actividad de magnitud inferior que elufa a menor fuerza iónica. Por otra parte, cuando se utilizaba polidC-oligodG como matriz, se detectaba un pico adicional de actividad DNA polimerásica que elufa con una concentración de KCl alrededor de 120 mM. La figura 3 muestra el resultado del ensayo de la actividad de las fracciones dializadas provenientes de la columna de DE-52 con las matrices DNA activado y polidC-oligodG. Esta última servía como matriz para el ensayo de actividad tanto de la enzima que quedaba en el lavado de la columna, como de aquellas que eran retenidas en la columna. Se

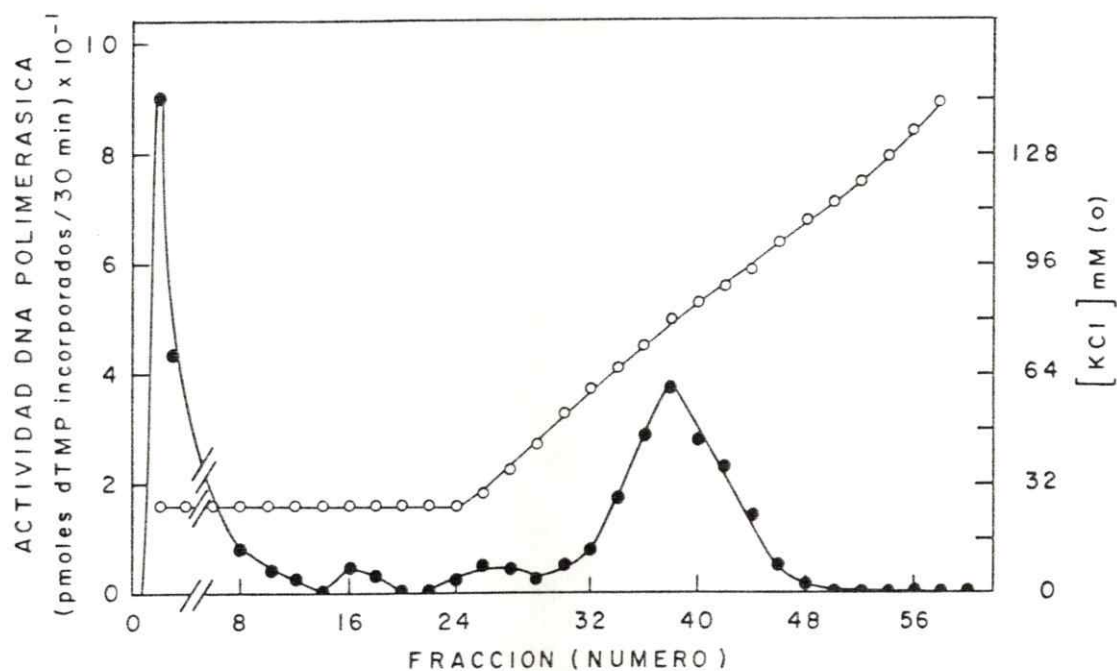


Figura 2. Cromatografía en DEAE-celulosa (DE-52) de la actividad DNA polimerásica de epimastigote.

La actividad enzimática se determinaba de acuerdo a las condiciones estándar, con DNA activado como matriz y $MgCl_2$ 5mM. Se utilizaba 5 μ l de cada fracción colectada como fuente de enzima. Los resultados están expresados como actividad DNA polimerásica total por fracción colectada.

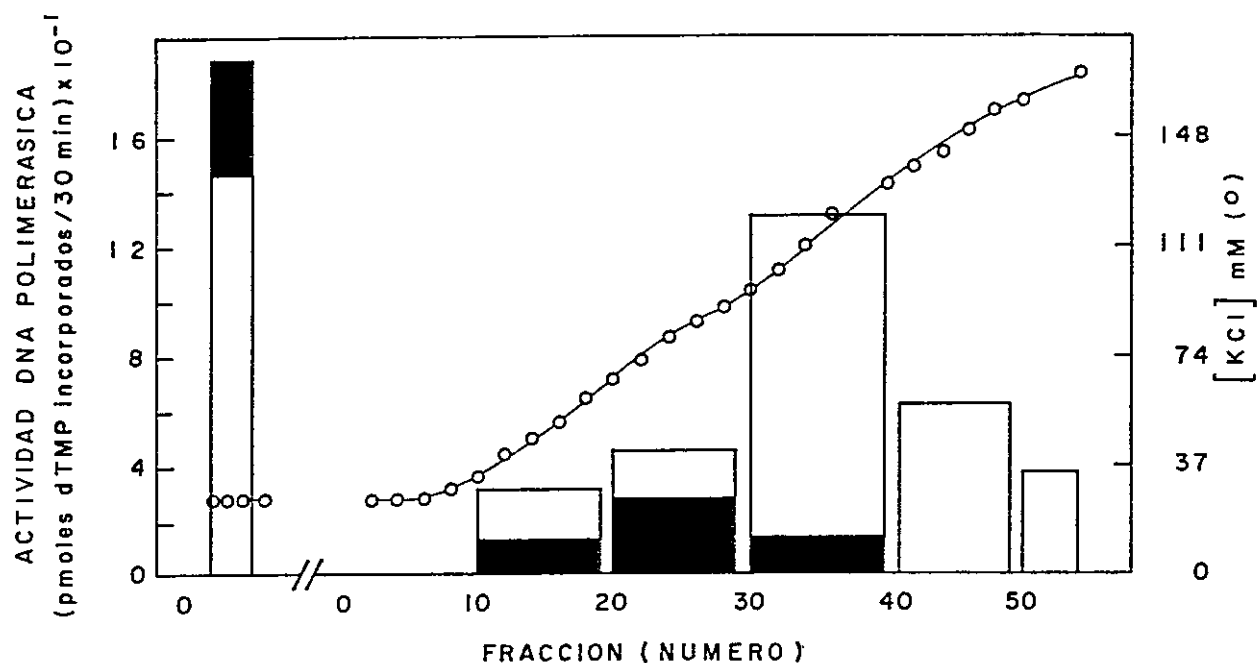


Figura 3. Ensayo de la actividad DNA polimerásica eluida de la columna de DEAE-celulosa, con dos matrices diferentes.

Se juntó cada diez fracciones eluidas de la columna de DEAE-celulosa y se las dializó durante 18 horas a 4° contra glicerol al 40 % en la solución A. Posteriormente a la diálisis, se ensayó paralelamente la actividad DNA polimerásica con la matriz DNA activado y MgCl₂ 5mM (■) y con la matriz polidC-oligodG en presencia de MnCl₂ 1 mM (□). Los resultados se expresan como actividad DNA polimerásica total por fracción dializada.

corroboraba así las observaciones anteriores, en cuanto a la existencia de una segunda actividad retenida en DEAE-celulosa, que quedaba de manifiesto sólo cuando se usaba polidC-oligodG como molde para la incorporación de los desoxirribonucleótidos.

Las fracciones correspondientes a los picos de actividad DNA polimerásica, concentradas por diálisis contra glicerol al 40 % y mantenidas a -20° , conservaban la actividad enzimática durante algunos días.

La curva de progreso de la reacción de polimerización, catalizada por las fracciones con actividad enzimática eluidas de DE-52, mostraba un incremento lineal de la incorporación de ^3H -dTMP al DNA activado por tiempos cortos (alrededor de 10 min.). Luego se observaba una disminución rápida de la radiactividad insoluble en ácido tricloroacético, indicativa de la desaparición del producto formado. El análisis del experimento, cuyos resultados se muestran en la Tabla III, indica que en aquellas fracciones retenidas en DEAE-celulosa en presencia de concentraciones de KCl inferiores a 150 mM, se encontraba una actividad de tipo nucleolítica que degradaba el ^3H -DNA de timo de ternera. Esta actividad sería responsable, al menos en parte, de la disminución del producto formado (^3H -DNA) en el curso de la reacción de polimerización catalizada por las fracciones con actividad DNA polimerásica derivadas de la cromatografía en DEAE-celulosa.

Tabla III

Actividad de tipo nucleolítica que coelufa con la actividad DNA polimerásica en la cromatografía en DEAE-celulosa (DE-52).

Adición al ensayo	³ H-DNA remanente	
	radiactividad insoluble en TCA 10 % (cpm)	(%)
ninguna	2942	100
0,1 µl fracción D	2748	93
1 µl fracción D	2122	72
5 µl fracción D	1944	66
10 µl fracción D	1537	52
15 µl fracción D	1213	41
5 µl extr. ovario	2723	93
10 µl extr. ovario	2662	91

El conjunto de las fracciones que se unían a la columna de DEAE-celulosa en presencia de KCl, en concentraciones inferiores a 150 mM, fue dializado contra glicerol al 40 % en solución A durante 18 horas a 4°. Diferentes alícuotas de esta fracción (fracción D) fueron incubadas con 5 µl de ³H-DNA por 15 minutos a 37° en un medio de incubación que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8, DTT 10 mM, MgCl₂ 5 mM, seroalbúmina de bovino 100 µg/ml y dNTPs 50 µM. La reacción se detuvo mediante la adición de 1 ml de TCA al 10 % y se determinó la radiactividad insoluble retenida en filtros de fibra de vidrio GF/A.

b. Segundo esquema de fraccionamiento con propósitos analíticos.

El segundo esquema de fraccionamiento constaba esencialmente de las mismas etapas que el primero para la obtención del extracto S_{10} , exceptuando la eliminación del $MgCl_2$ de las soluciones usadas con el fin de evitar cualquier interferencia del ión Mg^{+2} en los ensayos con diferentes cationes bivalentes.

Para proseguir, el S_{10} se cromatografiaba en una columna de DEAE-celulosa (DE-52) equilibrada con KCl 400 mM. En estas condiciones de cromatografía, los ácidos nucleicos quedaban retenidos en la columna. En tanto, la actividad DNA polimerásica sólo se detectaba en aquellas fracciones que contenían las proteínas no unidas a la resina.

La cuantificación de la actividad DNA polimerásica en esta etapa se dificultaba debido a la interferencia en el ensayo de los nucleótidos y a la alta concentración salina contenida en la fracción. Ambos factores se superaban después de la filtración de la fracción proveniente de DEAE-celulosa a través de geles de "Sephadex G-25" grueso.

El filtrado era sometido posteriormente a una cromatografía en una columna de fosfocelulosa "P-11". El perfil de la actividad DNA polimerásica eluida de la columna de fosfocelulosa se señala en la figura 4. La actividad retenida en la columna se distribuía en tres picos denominados I, II y III, de acuerdo al orden de

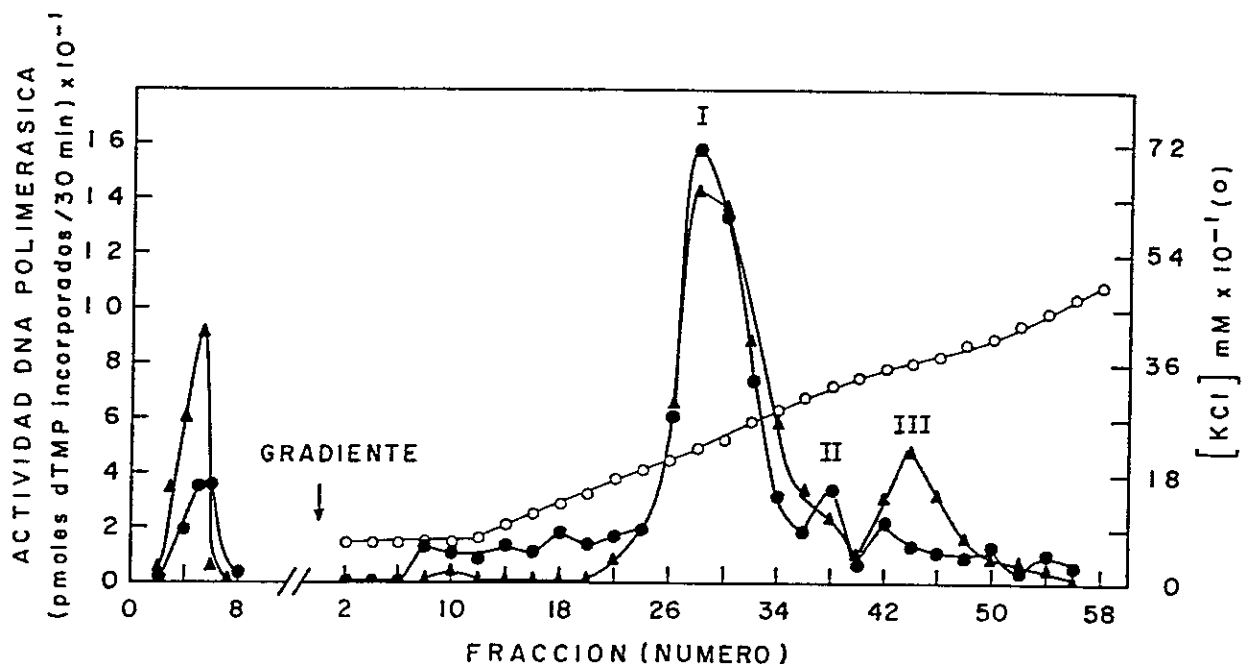


Figura 4. Cromatografía en columna de fosfocelulosa (P-11) de la actividad DNA polimerásica, ensayada con DNA activado.

La fracción correspondiente al filtrado a través de geles de "Sephadex G-25" fue cromatografiada en una columna de fosfocelulosa, tal como se describe en Materiales y Métodos. La actividad DNA polimerásica se midió de acuerdo a las condiciones descritas para el ensayo estándar, en presencia de MgCl_2 5 mM (▲) o MnCl_2 1 mM (●), empleando una alícuota de 5 μl de cada fracción colectada. Los resultados están expresados con actividad DNA polimerásica total por fracción colectada.

elución. Cabe señalar que en algunas preparaciones el pico II sólo aparecía como un hombro del pico I. Por otra parte, una fracción de la actividad DNA polimerásica total era recuperada siempre en el lavado de la columna, por razones no atribuibles a una sobrecarga de ésta.

El ensayo de las fracciones eluidas de la columna de fosfocelulosa con DNA activado como matriz y Mg^{+2} como catión, revelaba la actividad DNA polimerásica de los picos I, II y III. Al sustituir el Mg^{+2} por el Mn^{+2} en el medio de ensayo, el pico III resultaba prácticamente inactivo. Este hecho era independiente de la matriz utilizada para ensayar la actividad DNA polimerásica. Así lo señalan los resultados que se ilustran en la figura 5. En ésta, la actividad DNA polimerásica eluida de la columna de fosfocelulosa se ensayó en paralelo con DNA activado como molde, usando Mg^{+2} o Mn^{+2} como catión divalente y con la matriz polidC-oligodG en presencia de Mn^{+2} . Se observa que con el catión Mn^{+2} se detectaba claramente la actividad de los picos I y II, mientras que la actividad del pico III era mínima. Esta característica de la actividad DNA polimerásica del pico III fue corroborada posteriormente, mediante ensayos con diversos tipos de matrices.

4. Estudio de estabilización de la actividad DNA polimerásica.

Las fracciones enzimáticas correspondientes a los picos I, III y no retenido en fosfocelulosa fueron sometidos a

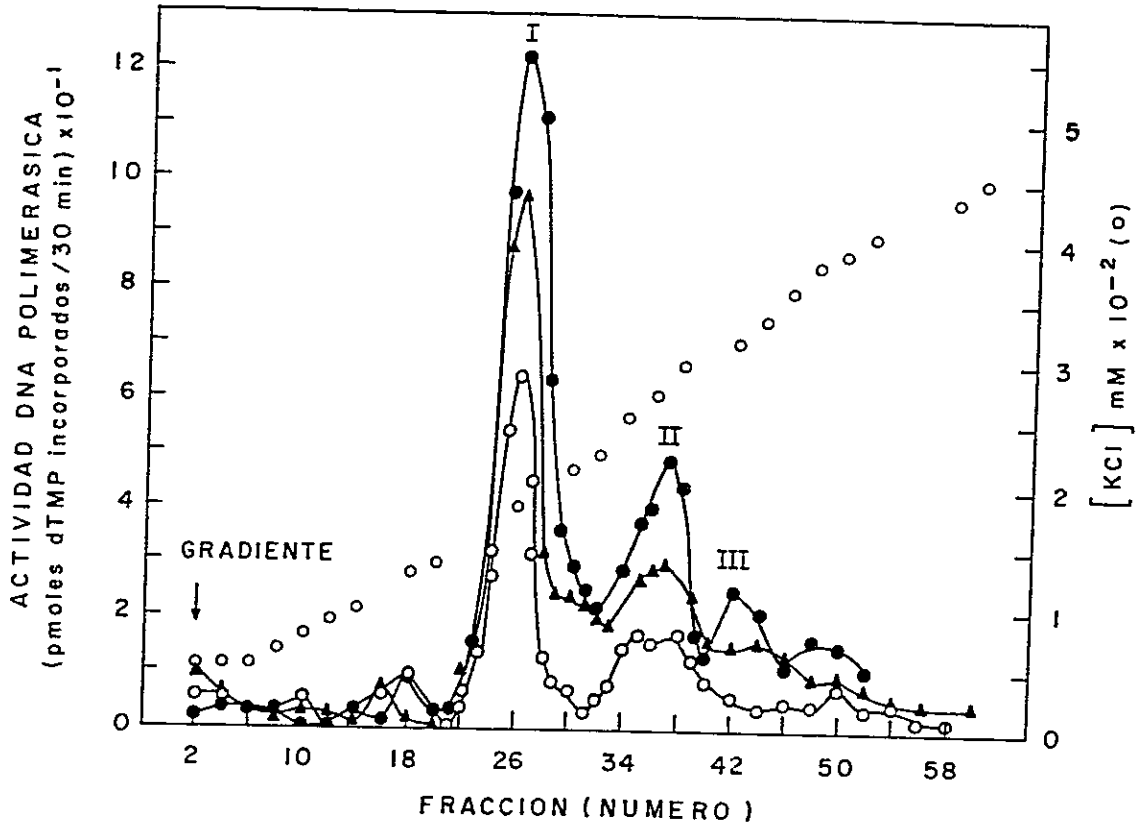


Figura 5. Ensayo de la actividad DNA polimerásica eluida de la columna de fosfoCelulosa, con diferentes matrices.

El filtrado a través de la columna de "Sephadex G-25", se sometió a una cromatografía en una columna de fosfoCelulosa, según se describe en Materiales y Métodos. La actividad DNA polimerásica fue medida en las condiciones estándar, utilizando las siguientes matrices y cationes bivalentes: DNA activado con $MgCl_2$ 5mM (●), DNA activado con $MnCl_2$ 1 mM (○) y polidC-oligodG con $MnCl_2$ 1mM (▲). Los resultados están expresados como actividad total por fracción colectada.

los procedimientos señalados en la Tabla IV, a fin de establecer cual de ellos permitía una preservación mejor de la actividad DNA polimerásica. Según los resultados obtenidos, la precipitación con sulfato de amonio era el método más apropiado para conservar la actividad DNA polimerásica eluida de la columna de fosfocelulosa, pese a que se verificaba una disminución de la actividad luego de períodos prolongados en esta condición. Aquella actividad enzimática recuperada en las fracciones que no eran retenidas en la columna de fosfocelulosa mostraba una disminución considerable en todas las condiciones analizadas.

El hallazgo de un procedimiento que permitía conservar parte importante de la actividad DNA polimerásica, aún por períodos de dos a tres meses, hizo posible abordar una purificación con fines preparativos de la actividad DNA polimerásica de los picos I y III obtenidos de la cromatografía en fosfocelulosa.

B. Purificación con fines preparativos de las actividades DNA polimerásicas de *Trypanosoma cruzi*

El procedimiento de purificación preparativo incluyó las etapas detalladas en Métodos, que eran esencialmente las mismas aplicadas en el segundo esquema de

Tabla IV

Estabilización de la actividad DNA polimerásica.

Actividad DNA polimerásica

Fracción	Inicial (pmoles dTMP/ 30 min.)	Después del tratamiento señalado (%)			
		ninguno	A	B	C
no retenida	1420	42	41	14	13
Pico I	1200	11	24	29	130
Pico III	1100	24	42	44	84

Las fracciones obtenidas después de la cromatografía en fosfocelulosa, cuya actividad DNA polimerásica inicial se señala en la tabla, fueron divididas en cuatro alícuotas. Una de las alícuotas de cada muestra fue sometida a uno de los tratamientos que se describe a continuación:

- Tratamiento A:** Se agregó seroalbúmina de bovino hasta una concentración final de 100 µg/ml.
- Tratamiento B:** Se dializó las fracciones durante 18 horas a 4° contra una solución que contenía Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0,1 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM y glicerol al 40 %.
- Tratamiento C:** Se precipitó las muestras con sulfato de amonio al 70 % de saturación. Luego de mantener los precipitados durante 18 horas a 4°, fueron resuspendidos en solución A y se eliminó el sulfato de amonio mediante filtración a través de "Sephadex G-25".

Las alícuotas no tratadas (ninguno), así como las tratadas, fueron mantenidas a 4° por 18 horas. Al cabo de este período, se determinó la actividad DNA polimerásica con la matriz polidC-oligodG en las condiciones del ensayo estándar, utilizando alícuotas de 5 µl de cada fracción. La actividad remanente se expresó como porcentaje de la inicial.

fraccionamiento con fines analíticos, hasta la cromatografía en fosfocelulosa.

No obstante el aumento en la cantidad de células y por consiguiente en el volumen del extracto y de las columnas cromatográficas, el fraccionamiento se desarrolló en un mismo día a fin de evitar la inactivación de las DNA polimerasas. Con el propósito de disminuir el tiempo empleado en las etapas iniciales del fraccionamiento, el volumen total eluido de la columna de DEAE-celulosa fue dividido en dos partes, las que fueron filtradas simultáneamente a través de dos columnas equivalentes de "Sephadex G-25".

Pese a las modificaciones especificadas anteriormente, el perfil de actividad DNA polimerásica eluida de la columna de fosfocelulosa no se distinguía de aquel obtenido al aplicar el segundo esquema de fraccionamiento analítico.

Posteriormente, se continuó la purificación de los picos I y III de actividad DNA polimerásica eluidos de la columna de fosfocelulosa. Para ello, se juntó las fracciones correspondientes a los picos I y III que provenían de diferentes preparaciones (a partir de un total de 40 g de peso húmedo de células), conservadas a la forma de precipitado con sulfato de amonio. El conjunto de los precipitados que correspondían al pico I, se resuspendió en solución A y se los filtró en columna a través de geles de "Sephadex G-25" con el objeto de

eliminar el sulfato de amonio. Con los precipitados correspondientes a las fracciones del pico III, se procedió de forma análoga.

Las fracciones correspondientes al pico I y al pico III se sometieron, independientemente, a una cromatografía de afinidad en una columna de DNA agarosa. El perfil de actividad DNA polimerásica eluida de la columna de DNA agarosa se señala en las figuras 6A y 6B. Las actividades DNA polimerásicas del pico I y del pico III elufan con fuerza iónica semejante, alrededor de una concentración de KCl 195 mM. Este perfil de elución se repetía al utilizar otras matrices para ensayar la actividad DNA polimerásica. Esta figura muestra el perfil de actividad con la matriz polidC-oligodG/Mg²⁺, puesto que era aquella que permitía los niveles más altos de incorporación de los nucleótidos.

Las fracciones con mayor actividad se juntaban y las proteínas se precipitaban con sulfato de amonio al 70 % de saturación.

Esta etapa de purificación eliminaba una cantidad considerable de las proteínas carentes de afinidad por el DNA, según se apreciaba en el perfil de proteínas obtenido mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Además, las fracciones enzimáticas recuperadas después de la cromatografía en DNA agarosa, conservadas en la forma de precipitado con sulfato de amonio, mantenían prácticamente el total de la actividad inicial

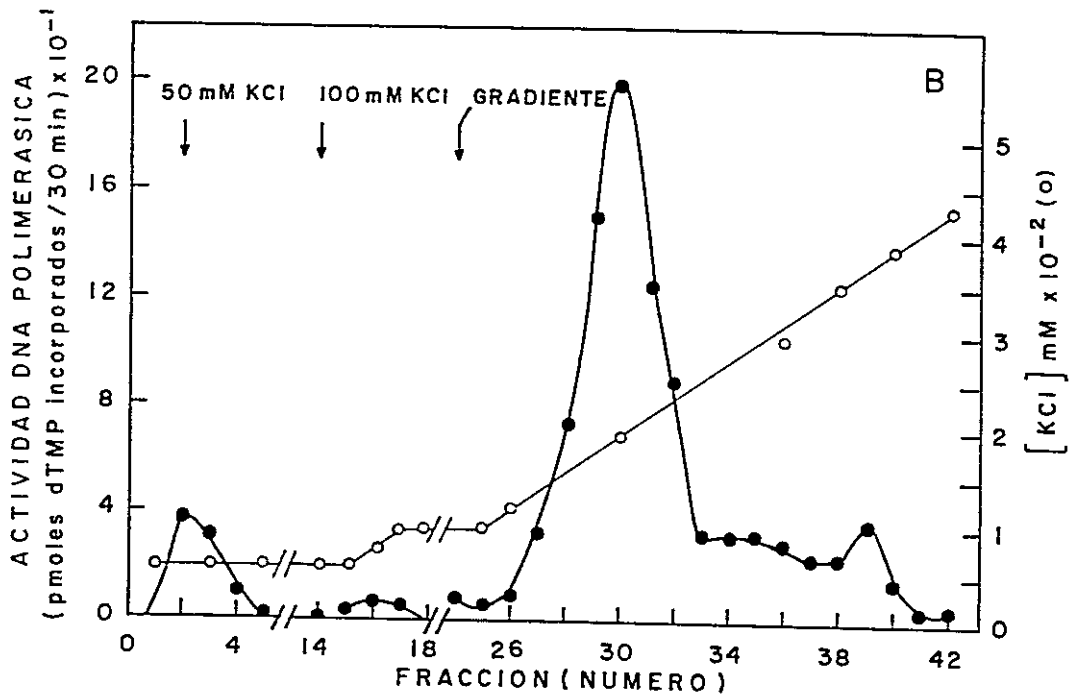
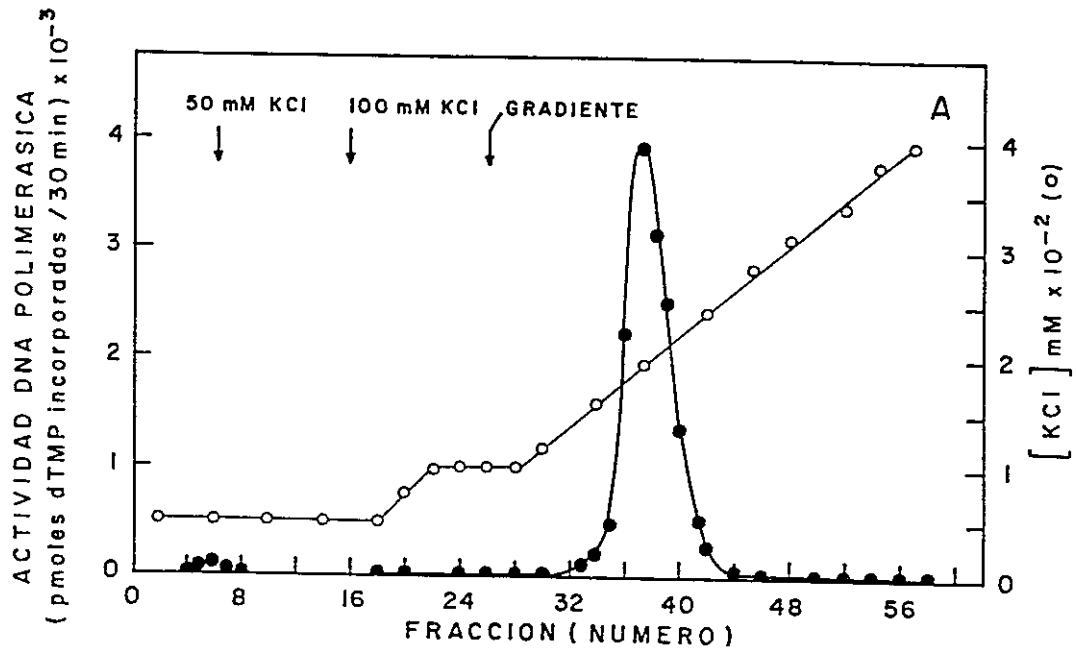


Figura 6. Cromatografía de afinidad en columnas de DNA agarosa de la actividad DNA polimerásica.

La actividad DNA polimerásica correspondiente al pico I (parte A) y al pico III (parte B) eluidos de fosfocelulosa, se sometió a una cromatografía de afinidad en una columna de DNA agarosa de 6 ml (1,2 x 5,3 cm.) y de 4 ml (1,2 x 3,5 cm.), respectivamente. La actividad eluida de esta columna se ensayó con polidC-oligodG en presencia de $MgCl_2$, siguiendo el procedimiento para el ensayo estándar descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como actividad total por fracción colectada.

durante varios meses. Esto no ocurría con aquellas fracciones provenientes de la etapa de fosfocelulosa; éstas, mantenidas en las mismas condiciones, mostraban una disminución significativa de la actividad en el transcurso de algunos días.

El esquema de fraccionamiento señalado proporcionaba, para la Fracción I, una purificación de 2,4 veces en la etapa de fosfocelulosa y de 12,6 veces en la de DNA agarosa, con un rendimiento del 56 % y del 28 %, respectivamente. Para la Fracción III, la purificación obtenida era de 1 vez mediante la cromatografía en fosfocelulosa y de 2,2 veces en la cromatografía en DNA agarosa, siendo los rendimientos respectivos del 19 % y del 4 % . Estos valores están referidos a la actividad contenida en el extracto filtrado a través de "Sephadex G-25" y determinados a base del ensayo estándar con DNA activado/ Mg^{+2} . Para su análisis es preciso considerar que a la actividad DNA polimerásica total del extracto contribuían, en diferente proporción, varias actividades que eran separadas mediante la cromatografía en fosfocelulosa. Este hecho se refleja en los valores antes indicados, particularmente en el caso de la Fracción III que constituye una actividad minoritaria en el extracto.

C. Caracterización de las actividades DNA polimerásicas de las Fracciones I y III.

La caracterización de las actividades DNA polimerásicas de *T. cruzi* se circunscribió a las Fracciones I y III, correspondientes a las actividades recuperadas después de la cromatografía en DNA agarosa de los picos I y III provenientes de la cromatografía en fosfocelulosa. El estudio de la actividad obtenida en el lavado de la columna de fosfocelulosa no fue abordado debido a su inestabilidad. Asimismo, la dificultad encontrada en la obtención de la Fracción II libre de contaminación con la Fracción I fue el mayor impedimento para su caracterización.

1. Requerimientos de la reacción de polimerización

a. Efecto de cloruro de potasio.

El cloruro de potasio ejerce un efecto diferenciador sobre la actividad de las DNA polimerasas de las células eucarióticas, por lo cual se utiliza como un parámetro para la caracterización de éstas.

Se estudió el efecto de cloruro de potasio sobre la actividad DNA polimerásica de la Fracción I y de la Fracción III. Los resultados ilustrados en la figura 7 indican que el KCl estimulaba la actividad de la Fracción I en un rango de concentraciones de 5 a 80 mM, observándose el efecto máximo en el rango de 20 a 40 mM;

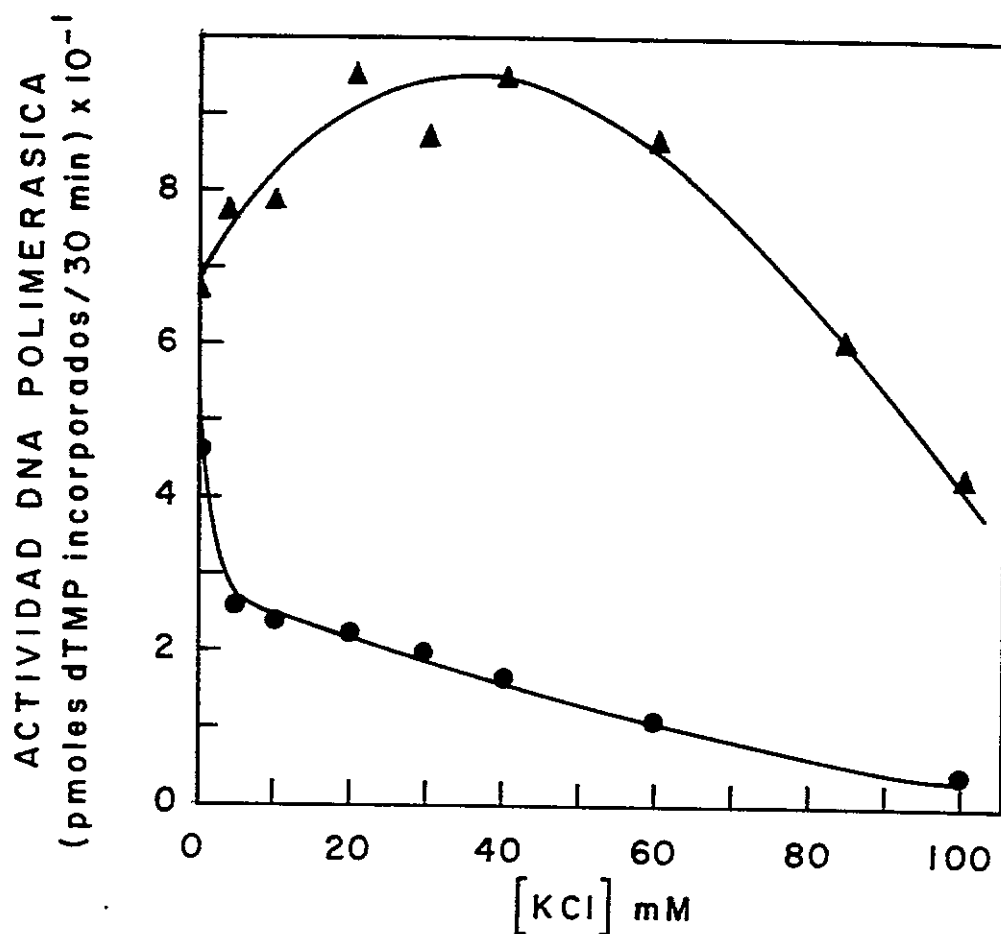


Figura 7. Efecto de cloruro de potasio.

La actividad DNA polimerásica fue determinada en presencia de distintas concentraciones de cloruro de potasio, en las condiciones descritas para el ensayo estándar en la sección Materiales y Métodos. La matriz utilizada fue DNA activado, con $Mg(CH_3COO)_2$. Fracción I (▲) y Fracción III (●).

en tanto, la actividad de la fracción III disminuía marcadamente en ese mismo rango de concentraciones.

b. Efecto de los cationes Mg^{+2} y Mn^{+2} .

Las DNA polimerasas catalizan la polimerización de los desoxirribonucleótidos en presencia de un catión divalente, habitualmente Mg^{+2} en concentraciones de 10^{-3} a 10^{-2} M. Mn^{+2} puede sustituir al Mg^{+2} pero en concentraciones menores, alrededor de 10^{-4} a 10^{-3} M.

Con Mg^{+2} como catión, las Fracciones I y III de T. cruzi alcanzaban la actividad máxima a una concentración alrededor de 15 mM, según se señala en la figura 8.

Coincidentemente con las observaciones anteriores (en los perfiles de actividad eluida de fosfocelulosa), el nivel de actividad de la Fracción III era muy bajo en presencia del catión Mn^{+2} . Por el contrario, la Fracción I era activa aún con concentraciones alrededor de 5 mM de este catión. Estos resultados se muestran en la figura 9.

c. Efecto de pH en la actividad DNA polimerásica.

Los experimentos desarrollados denotaban un efecto de la solución amortiguadora sobre el nivel de la actividad DNA polimerásica. Tanto para la Fracción I como para la Fracción III, la actividad máxima era obtenida cuando se empleaba la solución amortiguadora Tris-HCl. No obstante, esta solución amortiguadora no fue utilizada para estudiar la variación de la actividad de la Fracción III en función del pH, porque en el rango de 7 a 8 unidades de pH se

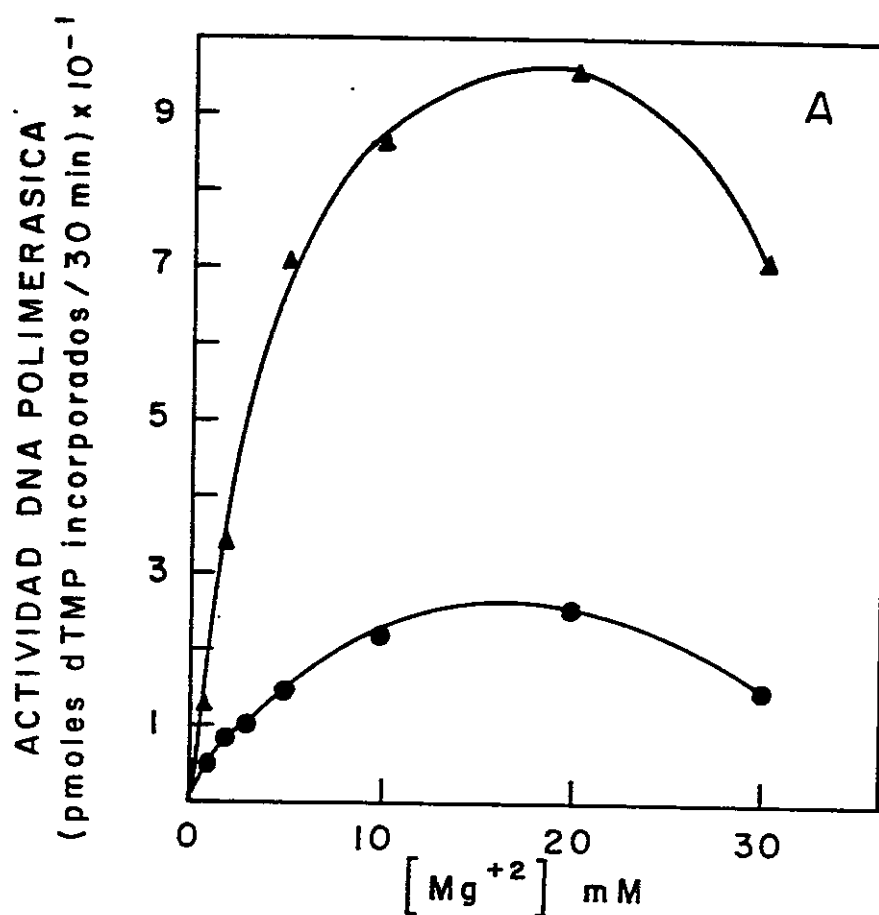


Figura 8. Efecto del catión Mg^{+2} en la actividad de DNA polimerasa de la Fracción I y de la Fracción III.

La actividad DNA polimerásica de la Fracción I (▲) y de la Fracción III (●) se determinó según el ensayo estándar descrito en Materiales y Métodos, empleando DNA activado como matriz, en presencia de diferentes concentraciones de $Mg(CH_3COO)_2$.

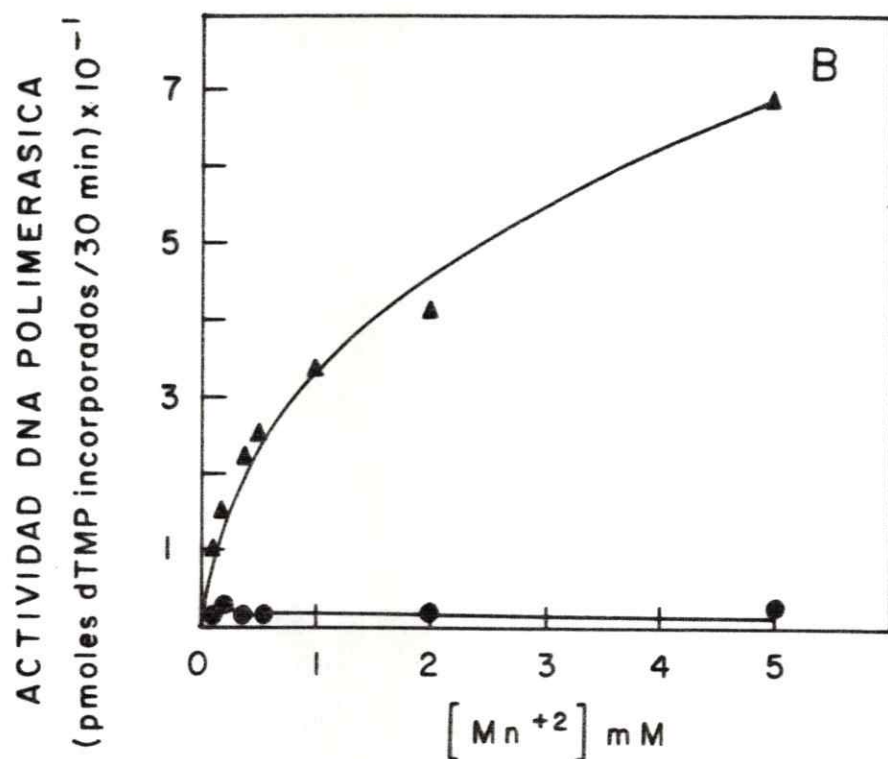


Figura 9. Efecto del catión Mn^{+2} en la actividad DNA polimerásica de la Fracción I y de la Fracción III.

La actividad DNA polimerásica de la Fracción I (▲) y de la Fracción III (●) se determinó según el ensayo estándar descrito en Materiales y Métodos, empleando DNA activado como matriz, en presencia de diferentes concentraciones de $MnCl_2$.

observaba una disminución en la actividad que no era detectada con otras soluciones amortiguadoras.

La actividad DNA polimerásica de la Fracción I presentaba una dependencia clara del pH, alcanzando su nivel máximo en el rango de pH 8,5 a 9, tal como lo ilustra la figura 10. Por el contrario, la actividad DNA polimerásica de la Fracción III no era significativamente dependiente del pH, en el rango de 6 a 9,9 unidades de pH. Este hecho fue corroborado empleando diferentes soluciones amortiguadoras, tales como fosfato de potasio 20mM, glicilglicina 20 mM, imidazol-HCl 20mM y Hepes-NaOH 20 mM.

2. Capacidad de utilización de matrices.

Se estudió la capacidad de las Fracciones I y III, obtenidas después de la cromatografía en DNA agarosa, para utilizar diferentes polímeros análogos del DNA activado como matriz para la reacción de polimerización.

Pese a que las concentraciones de los cationes Mg^{+2} y Mn^{+2} empleadas en el ensayo no fueron las óptimas, los resultados de la Tabla V establecen que, desde un punto de vista cualitativo, las Fracciones I y III empleaban básicamente las mismas matrices. Estas eran del tipo polidesoxinucleótido (matriz) - oligodesoxinucleótido (partidor) y polidesoxinucleótido (matriz) - oligorribonucleótido (partidor), además del DNA activado de timo de ternera y del propio T. cruzi.

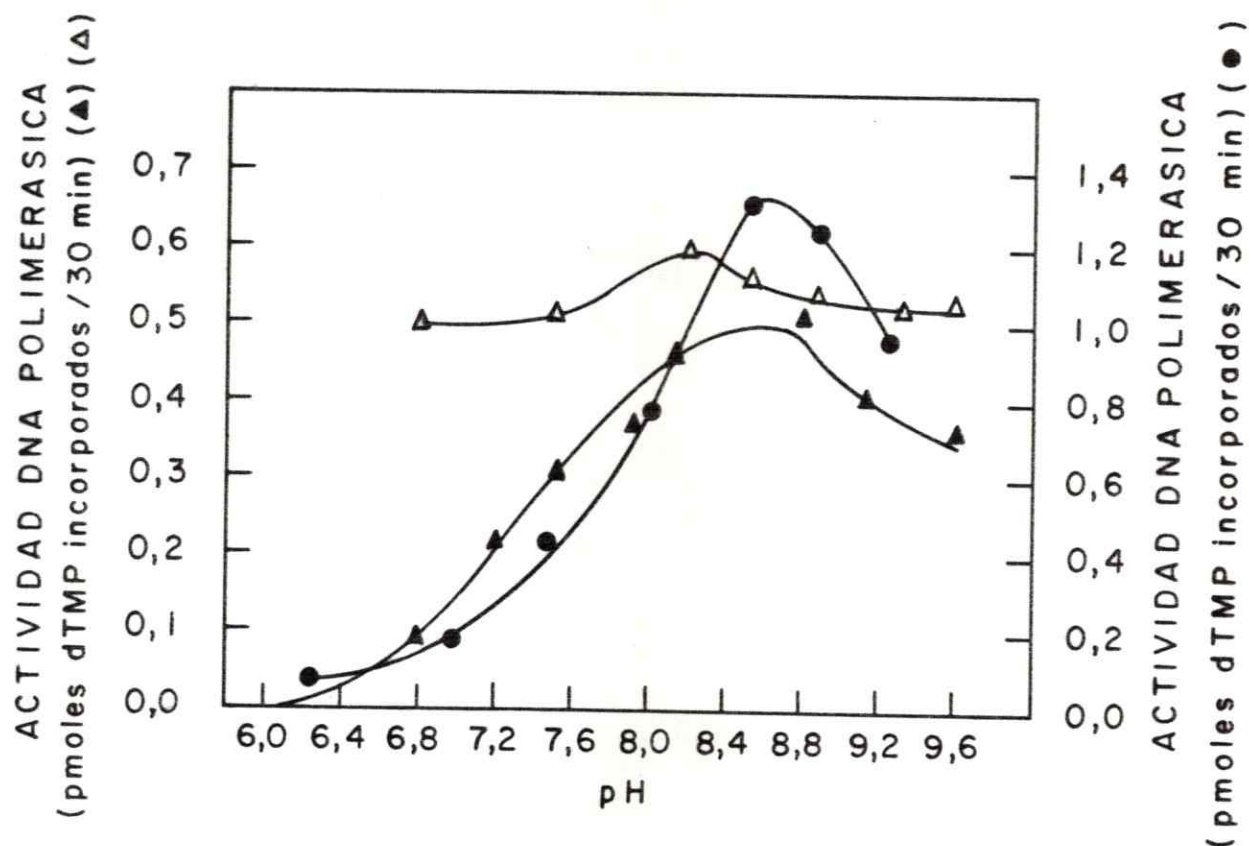


Figura 10. Efecto del pH sobre la actividad de DNA polimerasa.

La actividad DNA polimerásica de la Fracción I (símbolos negros) y de la Fracción III (símbolos blancos) se midió de acuerdo a las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, utilizando la matriz DNA activado y $Mg(CH_3COO)_2$ 10 mM. Como soluciones amortiguadoras se empleó: Tris-HCl 50 mM (●) y fosfato de potasio 20 mM (Δ, ▲).

Tabla V

Utilización de matrices

		Fracción I		Fracción III	
		Actividad DNA polimerásica (pmoles dNTP incorporado/ μ g de proteína)			
matriz-partidor	^3H -dNTP	Mg ⁺²	Mn ⁺²	Mg ⁺²	Mn ⁺²
DNA timo activ.	dTTP	1,13 (4,52)	0,46 (1,84)	0,12 (0,48)	0
DNA T.cruzi act.	dTTP	0,44 (1,76)	0,29 (1,16)	0,04 (0,16)	0,01 (0,04)
DNA T.cruzi nat.	dTTP	0	N.D	N.D	N.D
polidA-oligodT	dTTP	0,04	0,03	0	0,01
polirA-oligodT	dTTP	0	0,01	0	0
polidC-oligodG	dGTP	6,24	0,56	0,15	0,02
polidT-oligorA	dATP	0,67	1,39	0,30	0,02

La actividad específica de la Fracción I y de la Fracción III con cada una de las matrices se determinó según el ensayo estándar en presencia de $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10 mM o de MnCl_2 1 mM. Entre paréntesis se señala el valor estimado para la incorporación de los 4 dNTPs al DNA activado, suponiendo que equivale a 4 veces el valor determinado para el dTTP.

Ninguna de las Fracciones utilizaba polirA-oligodT, matriz que es usada preferencialmente por las DNA polimerasas mitocondriales.

Un aspecto destacable es el hecho que la Fracción III, cualquiera fuese la matriz empleada en el ensayo, tenía una actividad DNA polimerásica muy reducida con Mn^{+2} como ión divalente. Aunque, la actividad específica de la Fracción I era mayor con Mg^{+2} practicamente con todas las matrices ensayadas, en el caso de la reacción de polimerización con polidT-oligorA, Mn^{+2} era el mejor cofactor. La actividad específica de la Fracción III era significativamente inferior a la de la Fracción I con todas las matrices estudiadas.

3. Velocidad de sedimentación en gradiente de glicerol.

El perfil de actividad resultante de someter la Fracción I a una centrifugación en un gradiente de concentración de glicerol entre 15 y 45 %, se muestra en la figura 11. La actividad enzimática se distribuía en tres picos que sedimentaban en las fracciones más pesadas del gradiente. El pico mayoritario, que representaba alrededor del 60 % de la actividad recuperada, sedimentaba con una velocidad un poco mayor que la del marcador catalasa. Esto es, con la velocidad de sedimentación de una proteína globular de peso molecular 250.000 aproximadamente (valor extrapolado de la gráfica). El pico minoritario, correspondiente al 10 % de

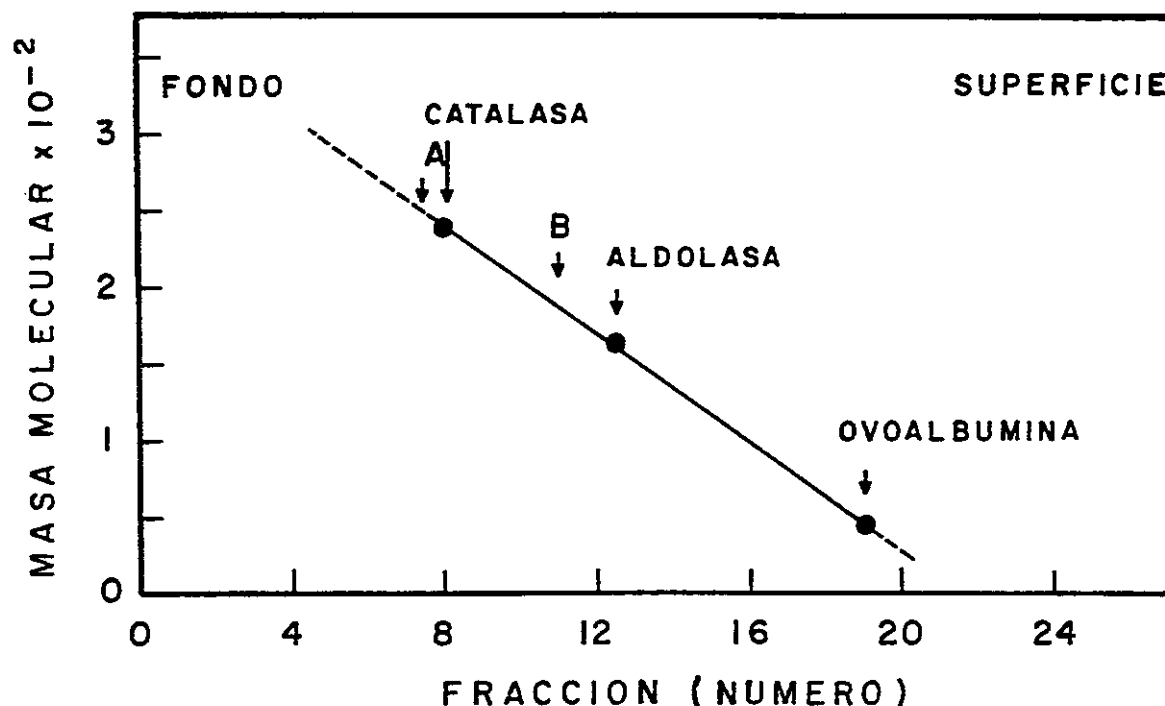


Figura 11. Sedimentación en gradiente de glicerol.

El procedimiento seguido para los estudios de sedimentación se detalla en Materiales y Métodos. La actividad DNA polimerásica se determinó según el ensayo de incorporación de ^3H -dGTP a la matriz polidC-oligodG en presencia de $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10 mM, realizado en las condiciones del ensayo estándar. Sobre el gradiente de glicerol se aplicó 370 μg de proteínas, equivalente a 36 unidades de la actividad DNA polimerásica de la Fracción I. La posición de sedimentación de las proteínas marcadoras se señala mediante flechas, lo mismo que los picos mayoritario (A) y minoritario (B) de actividad DNA polimerásica derivados de la Fracción I.

la actividad total recuperada, sedimentaba con una velocidad equivalente a la de una proteína globular de peso molecular alrededor de 180.000. La actividad DNA polimerásica restante, se recuperaba en el fondo del gradiente.

Este análisis de velocidad de sedimentación no se pudo realizar con la Fracción III debido a que su bajo nivel de actividad DNA polimerásica impedía medirla después de la centrifugación.

4. Efecto de inhibidores de la actividad DNA polimerásica.

Las DNA polimerasas son inhibidas selectiva o específicamente por ciertos compuestos, hecho que proporciona uno de los criterios actualmente más difundidos para la caracterización de las actividades DNA polimerásicas.

En este tipo de análisis de las actividades DNA polimerásicas de la forma epimastigote de *T. cruzi*, se utilizó los inhibidores más comunes de las DNA polimerasas de los eucariotes superiores.

a. Efecto de Berenil y de bromuro de etidio.

La droga N-1,3-diamidinfeniltriazinacetato, conocida con el nombre de Berenil, se aplica como agente antiparasitario en el ganado infectado con la especie africana *T. brucei* (Newton y Le Page, 1967). Esta droga administrada a los animales se intercala en el DNA del parásito, principalmente en el DNA "kinetoplastídico",

siendo a esta propiedad que se atribuye su acción antiparasitaria.

Se estudió el efecto de Berenil sobre la actividad DNA polimerásica de la Fracción I y de la Fracción III. Los resultados que se muestran en la figura 12 A señalan que, en el rango de concentraciones ensayado, Berenil provoca una inhibición aproximadamente equivalente en la actividad DNA polimerásica de las Fracciones I y III.

Otra droga intercalante, bromuro de etidio, ha sido señalada como un inhibidor potente de la DNA polimerasa mitocondrial (Tarragó-Litvak y col., 1978) en el rango de concentración de 10^{-5} a 10^{-6} M, que tiene un efecto escaso sobre las DNA polimerasas nucleares.

La figura 12 B ilustra el efecto inhibitorio de bromuro de etidio sobre la actividad de las Fracciones I y III. Se observa que el 50 % de inhibición de la actividad DNA polimerásica se obtiene con concentraciones de bromuro de etidio entre 15 a 20 μ M para las Fracciones III y I, respectivamente.

b. Efecto 2',-3',-didesoxitimidinatrifosfato (ddTTP) y de 1- β -D-arabinofuranosilcitosina-5',-trifosfato (araCTP).

El análogo de dTTP, ddTTP, es un inhibidor tanto de las DNA polimerasas procarióticas como de las eucarióticas. Sin embargo, las distintas clases de DNA polimerasas difieren en el grado de susceptibilidad al ddTTP. La DNA polimerasa más sensible es la mitocondrial, que resulta la única de las enzimas eucarióticas que

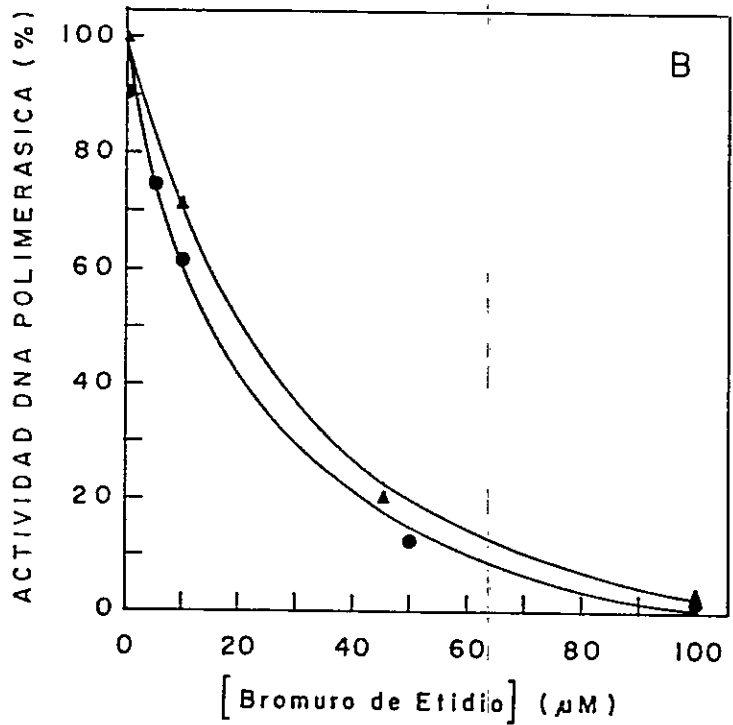
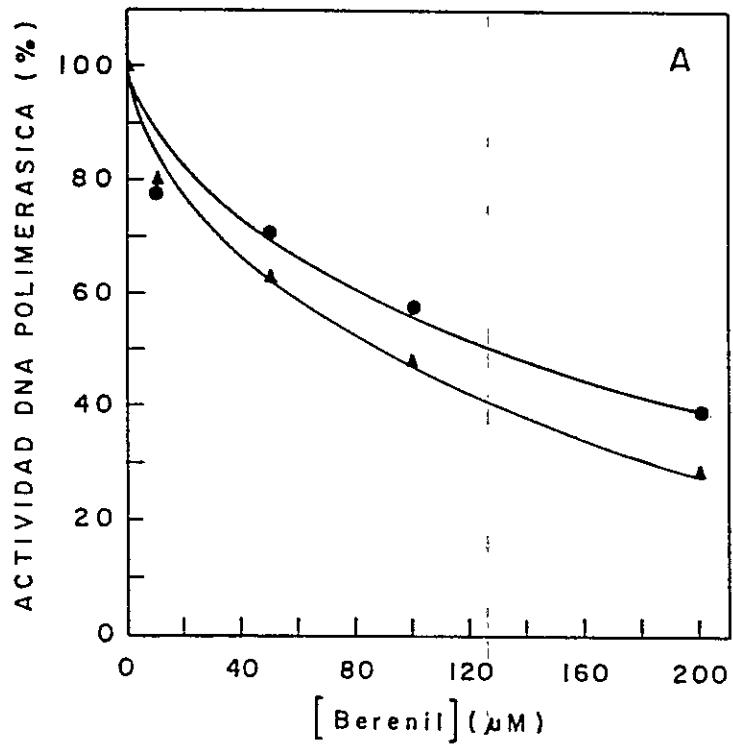


Figura 12. Efecto de la concentración de Berenil y de bromuro de etidio en la actividad DNA polimerásica de las Fracciones I y III.

Alícuotas de las Fracciones I y III fueron preincubadas con diferentes concentraciones de Berenil (parte A) y de bromuro de etidio (parte B), durante 30 minutos a 4° en el mismo medio de reacción descrito para el ensayo estándar de actividad DNA polimerásica. La incubación, en presencia del inhibidor respectivo, se prolongó por 30 minutos a 37°, luego de adicionar la mezcla de los dNTPs. El 100 % de actividad DNA polimerásica equivale a 0,64 unidades (en la parte A) y a 0,98 unidades (en la parte B) de la Fracción I. Para la Fracción III, el 100 % de actividad corresponde a 0,25 (en la parte A) y a 0,54 unidades (en la parte B). Fracción I (▲) y Fracción III (●).

incorpora el ddTTP a la cadena polinucleotídica naciente, interrumpiendo la elongación de ésta. De las enzimas nucleares, las de tipo α requieren una proporción alta de ddTTP respecto a dTTP para la inhibición de su actividad, en comparación a las de tipo β .

En el experimento mostrado en la figura 13 A se señala que ddTTP, en concentraciones de 15 μ M (ddTTP/dTTP = 1,5) y de 50 μ M (ddTTP/dTTP = 5), disminuye en un 50 % la actividad de la Fracción III y de la Fracción I, respectivamente.

Todos los análogos arabinofuranósido de los desoxirribonucleótidos son inhibidores competitivos de las DNA polimerasas. El análogo habitualmente más usado es araCTP, que inhibe competitivamente respecto a dCTP la actividad de las DNA polimerasas eucarióticas y virales (Yoshida y col., 1977) (Matsukage y col., 1978).

Según señala la figura 13 B, tanto para la Fracción I como para la Fracción III se produce una disminución del 50 % en la actividad DNA polimerásica con araCTP en concentraciones de 0,4 mM a 1 mM. Aparentemente, éste es el nivel máximo de inhibición provocado por el análogo de dCTP en la actividad DNA polimerásica de las Fracciones I y III de *T. cruzi*.

c. Efecto de N-etilmaleimida (NEM).

NEM, como agente bloqueador de los grupos sulfhidrilo suprime la actividad de las DNA polimerasas, excepto la de

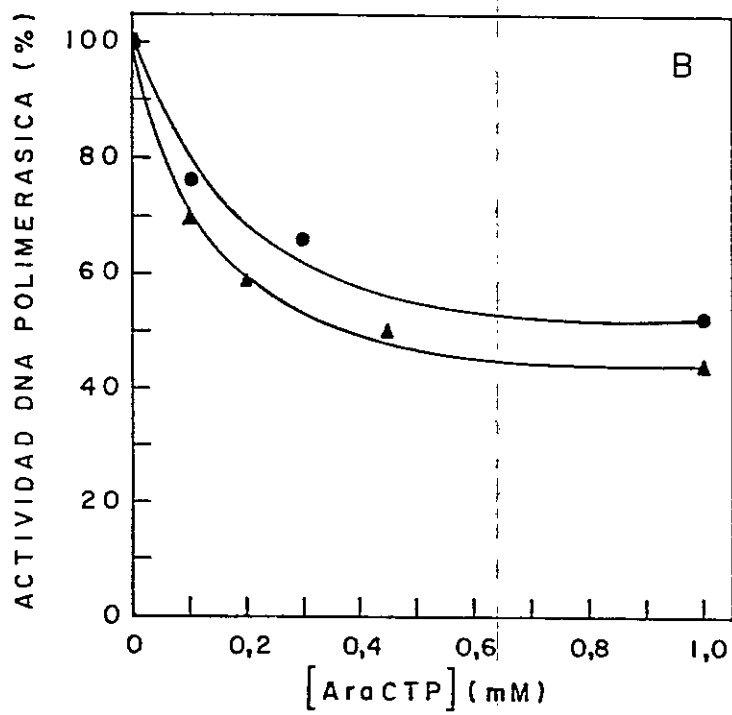
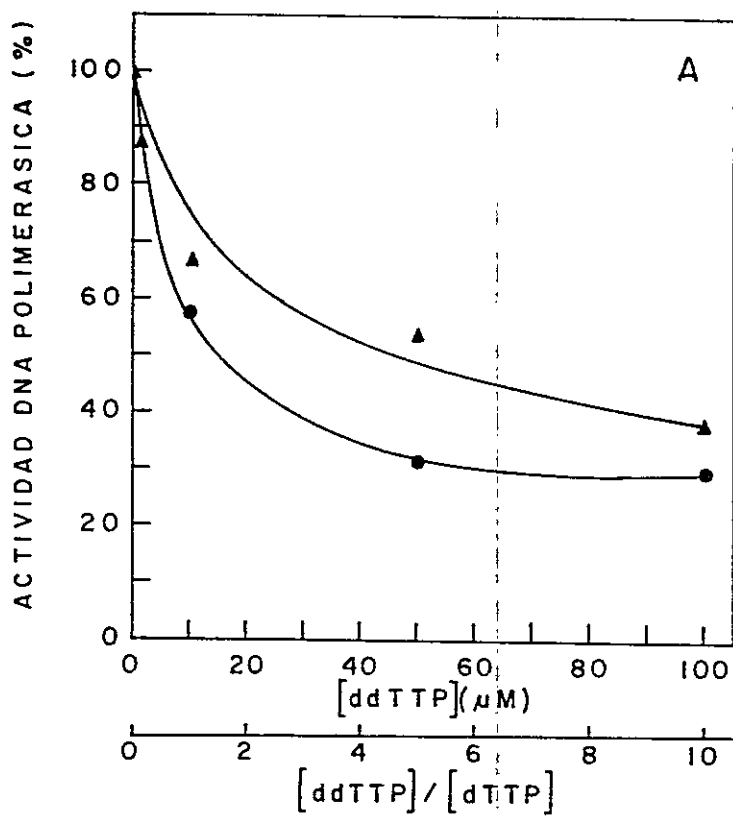


Figura 13. Efecto de la concentración de 2',-3', didesoxitimidina trifosfato (ddTTP) y de 1- β -D-arabinofuranosilcitosina-5',trifosfato (araCTP) en la actividad DNA polimerásica de las Fracciones I y III.

La actividad DNA polimerásica, en presencia de diferentes concentraciones ddTTP (parte A) y de araCTP (parte B), fue determinada según las condiciones del ensayo estándar con la matriz DNA activado y $MgCH_3(COO)_2$ 10 mM. En el experimento destinado a ensayar el efecto de araCTP, se disminuyó la concentración de dCTP desde 50 μ M a 10 μ M, mientras la concentración de los desoxinucleótidos restantes se mantuvo como se describe para el ensayo estándar. El 100 % de la actividad de la Fracción I corresponde a 0,61 unidades (en la parte A) y a 0,98 unidades (en la parte B). El 100 % de la actividad de la Fracción III es equivalente a 0,23 unidades (en la parte A) y a 0,45 unidades (en la parte B). Fracción I (\blacktriangle) y Fracción III (\bullet).

la enzima del tipo β , lo que constituye normalmente un parámetro para la identificación de esta DNA polimerasa en los eucariotes superiores (Chang, 1976) (Weissbach, 1977).

Según lo observado, las actividades DNA polimerásicas en estudio eran afectadas de manera diferente por NEM. Como muestra la figura 14, a una concentración de NEM 10 mM, suficiente para inhibir en más de un 90 % la actividad de todas las DNA polimerasas sensibles, la Fracción I conservaba más del 40 % de su actividad y la Fracción III se inhibía completamente.

d. Efecto del ácido fosfonacético.

Se ha descrito que la actividad DNA polimerásica del tipo β es más resistente al efecto inhibitorio del ácido fosfonacético que las otras DNA polimerasas (Fry, 1983).

Del análisis de la figura 15 se deduce que la actividad de la Fracción I es más resistente al inhibidor que la de la Fracción III. Concentraciones de éste de 200 $\mu\text{g/ml}$ sólo provocaban una disminución en la actividad de la Fracción I de un 25 %; en tanto, concentraciones de 10 a 20 $\mu\text{g/ml}$ disminuían la actividad de la Fracción III alrededor de un 50 %.

e. Efecto de butilfenildesoxiguanosina 5'-trifosfato (BuPdGTP).

El análogo de dGTP, BuPdGTP, ha sido descrito como un inhibidor selectivo de las DNA polimerasas de tipo α de los eucariotes (Khan y col., 1984) (Khan y col., 1985).

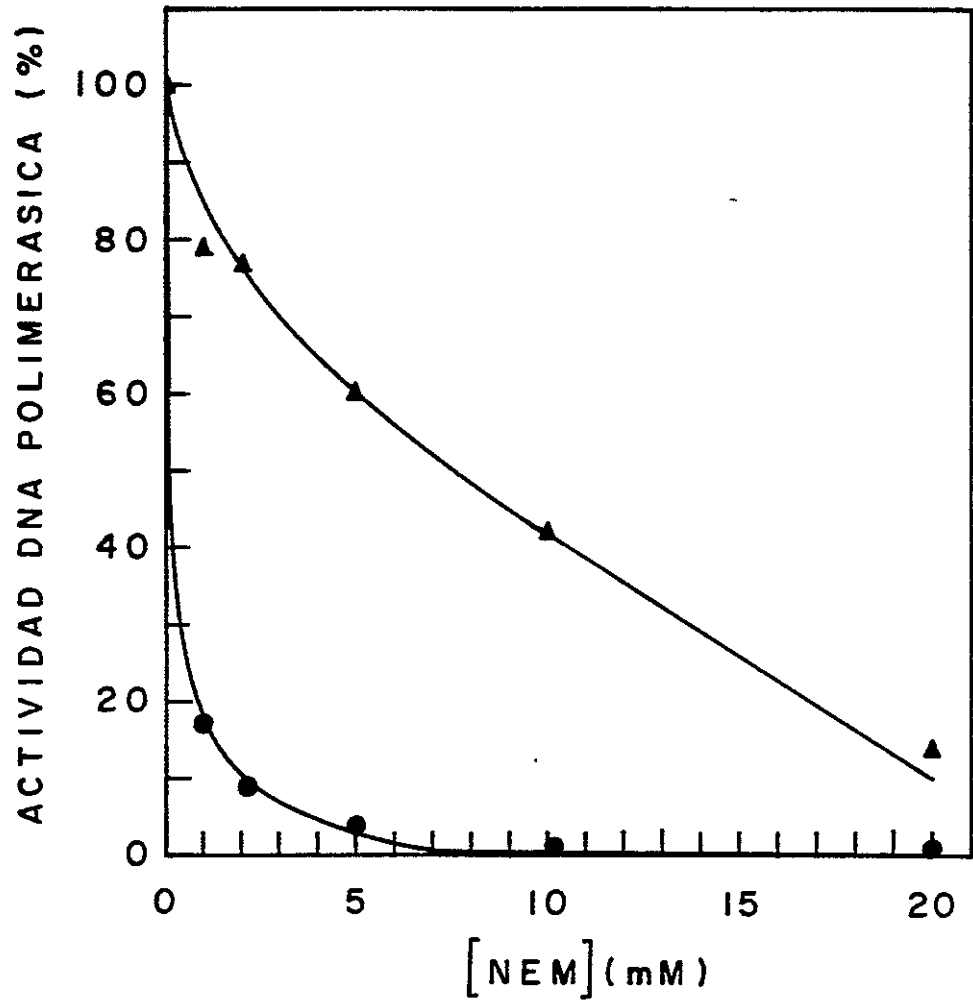


Figura 14. Efecto de la concentración de N-etilmaleimida.

El ensayo de la actividad DNA polimerásica se desarrolló según las condiciones estándar, con excepción de la eliminación del DTT del medio de incubación. Las fracciones enzimáticas se preincubaron durante 30 minutos a 4° con diferentes concentraciones de N-etilmaleimida (NEM). Se dió inicio a la reacción mediante la adición de los dNTPs y se incubó durante 30 minutos a 37°. El 100 % de la actividad equivale a 0,3 unidades de la Fracción I y a 0,1 unidades de la Fracción III. Fracción I (▲) y Fracción III (●).

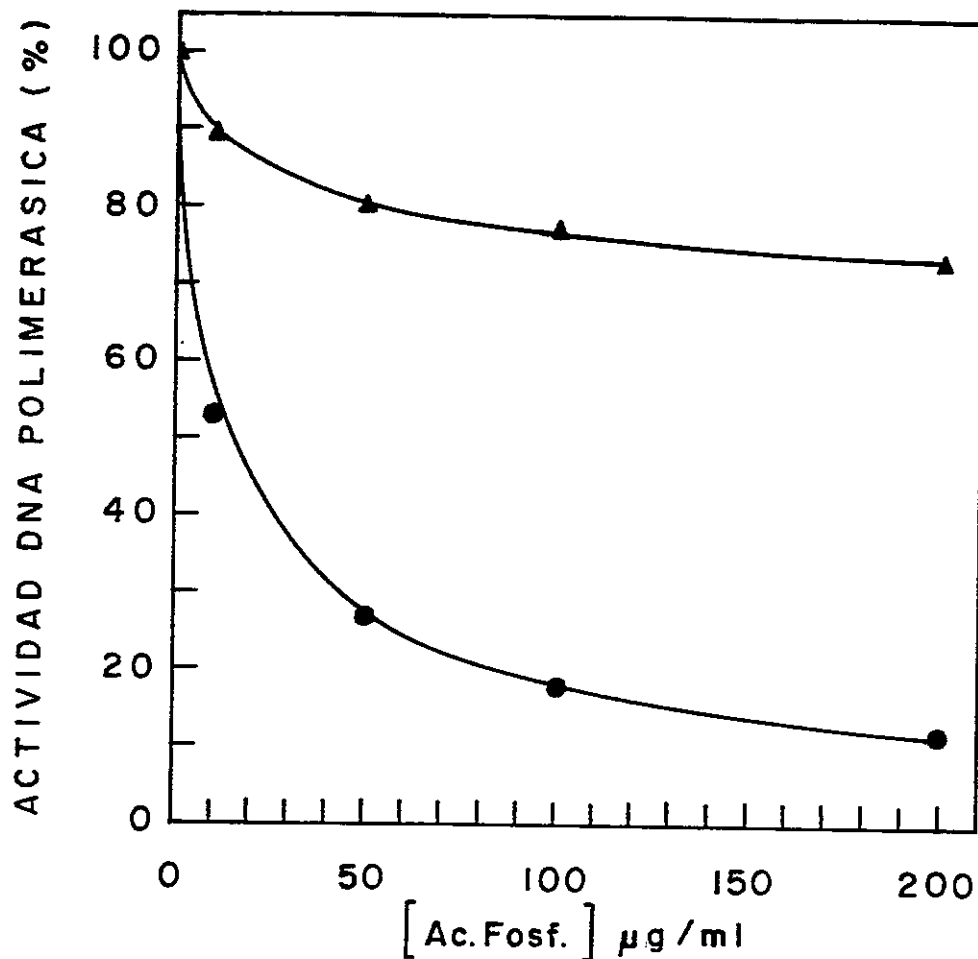


Figura 15. Efecto de la concentración del ácido fosfonacético.

La actividad DNA polimerásica fue determinada en presencia de diferentes concentraciones del ácido fosfonacético. Aliquotas de la Fracción I y de la Fracción III fueron preincubadas por 30 minutos a 4° con el ácido fosfonacético. La reacción de polimerización se inició mediante la adición de los dNTPs y la mezcla final se incubó durante 30 minutos. 0,9 unidades de la Fracción I y 0,5 unidades de la Fracción III correspondían al 100 % de la actividad DNA polimerásica. Fracción I (\blacktriangle) y Fracción III (\bullet).

Para estas enzimas, la inhibición de tipo competitivo respecto al dGTP, ocurriría con concentraciones de BuPdGTP del orden de 10^{-9} a 10^{-8} M, mientras que la actividad de las otras DNA polimerasas no sería afectada por concentraciones hasta 4×10^{-4} M del inhibidor.

El estudio del efecto de BuPdGTP sobre la actividad DNA polimerásica de la Fracción I y de la Fracción III indicó que, con concentraciones de BuPdGTP comprendidas entre 10^{-8} y 10^{-4} M, solamente era inhibida la actividad de la Fracción I. Del análisis de la figura 16 se desprende que la actividad DNA polimerásica de la Fracción I se reducía en un 50 % cuando la concentración de BuPdGTP en el medio de ensayo era cercana a 1×10^{-6} M. En contraposición, la actividad DNA polimerásica de la Fracción III denotaba claramente insensibilidad al inhibidor, en todo el rango de concentraciones ensayado.

BuPdGTP es capaz de inhibir acompetitivamente respecto al dTTP, la incorporación de ^3H -dTTP a la matriz polidA-oligodT, catalizada por DNA polimerasas de tipo α (Khan y col., 1984) (Lee y col., 1985). Concordantemente con estos resultados, en los experimentos realizados se observaba un efecto inhibitorio del BuPdGTP sobre la actividad de la Fracción I cuando ésta se ensayaba con una matriz que carecía del nucleótido complementario, dCMP. Como lo ilustra la figura 17, BuPdGTP inhibía la incorporación de dAMP a la matriz

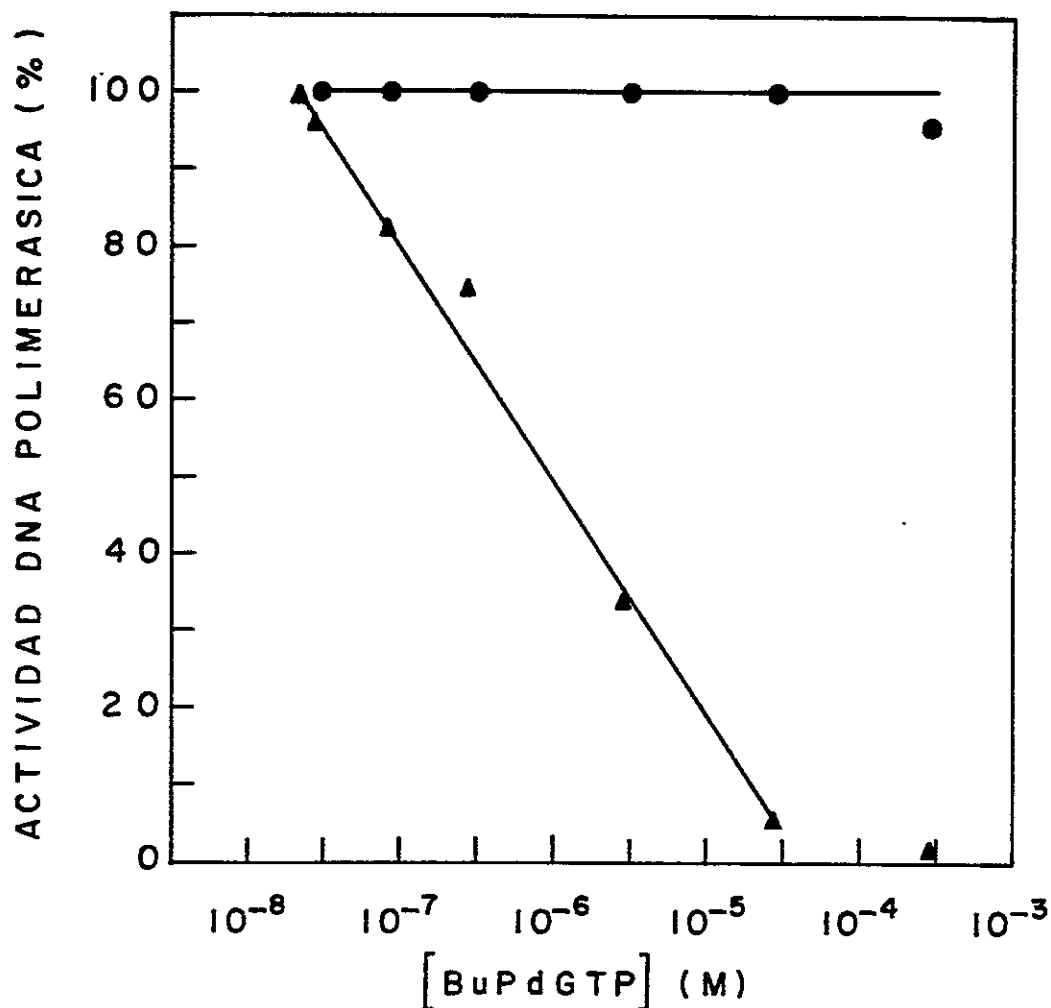


Figura 16. Efecto de la concentración de butilfenildesoxiguanosina trifosfato (BuPdGTP).

La actividad DNA polimerásica de las Fracciones I y III fue medida en presencia de diferentes concentraciones de BuPdGTP, en las condiciones antes descritas para el ensayo estándar, con DNA activado como matriz y $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10 mM. La concentración de dGTP utilizada en este ensayo fue 10 μM . El 100 % de actividad correspondía a 0,8 unidades de la Fracción I y a 0,2 unidades de la Fracción III. Fracción I (▲) y Fracción III (●).

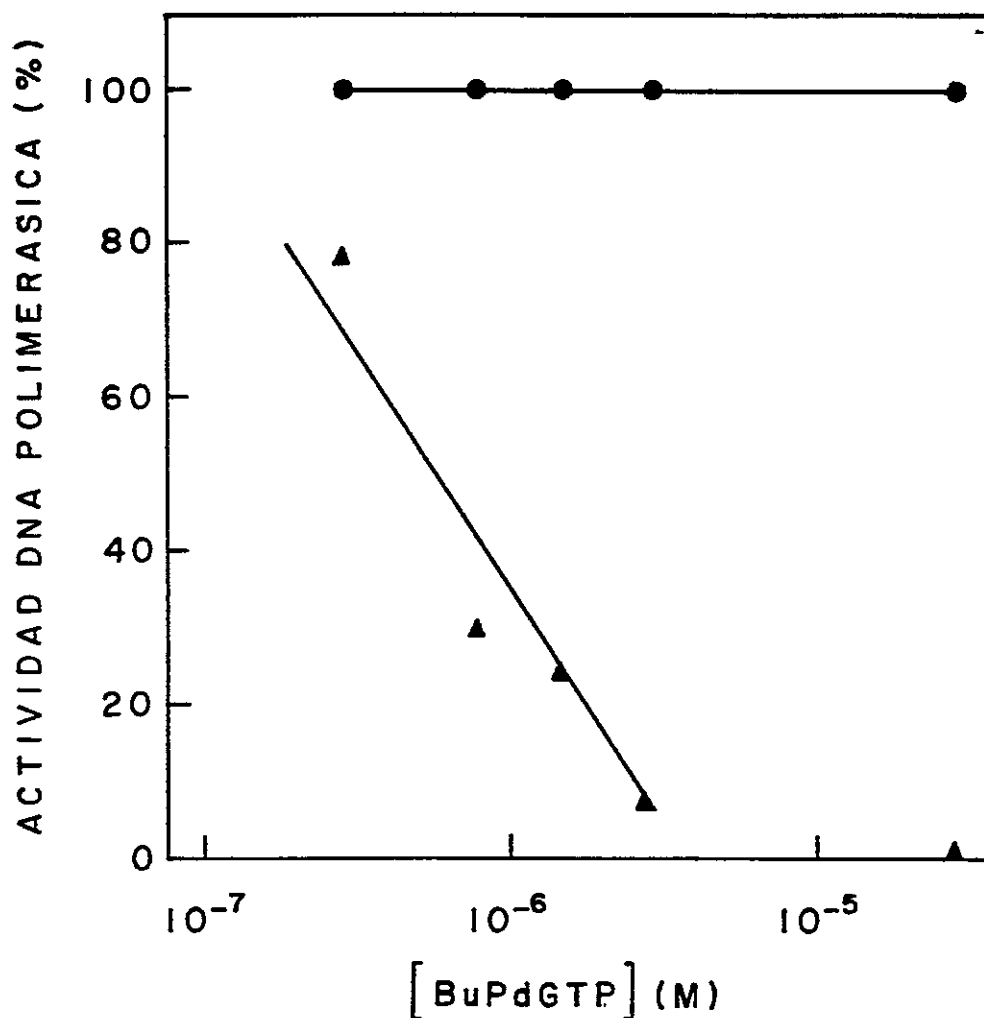


Figura 17. Efecto de BuPdGTP en la incorporación de dAMP a la matriz polidT-oligorA

La actividad DNA polimerásica de las Fracciones I y III fue ensayada, en presencia de distintas concentraciones de BuPdGTP, midiendo la incorporación de ³H-dAMP a la matriz polidT-oligorA. La reacción de polimerización se inició agregando ³H-dATP 13 μ M ($a_e = 1,5 \times 10^{-4}$ cpm/pmol) a la mezcla de reacción que contenía la matriz, el inhibidor y la fracción enzimática. La incubación se realizó a 30° durante 30 minutos. El 100 % de la actividad correspondía a 0,3 unidades de la Fracción I y a 0,8 unidades de la Fracción III. Fracción I (▲) y Fracción III (●).

polidT-oligorA, en ausencia de los tres desoxirribonucleótidos restantes.

5. Efecto de afidicolina.

La inhibición por afidicolina, un diterpeno tetracíclico producido por los hongos *Cephalosporium aphidicola* y *Nigrospora oryzae*, ha sido el criterio más divulgado para la identificación de la principal actividad DNA polimerásica involucrada en la replicación del DNA nuclear, la DNA polimerasa α (Huberman, 1981) (Spadari y col., 1982). Esta droga no inhibe a las otras DNA polimerasas eucarióticas como tampoco a las enzimas de los procariotes.

Todos los estudios realizados durante el desarrollo de este trabajo, revelaron que ninguna de las actividades DNA polimerásicas aisladas de los extractos de epimastigote era sensible a afidicolina, ensayada en concentraciones hasta 200 $\mu\text{g/ml}$. No fue posible detectar la enzima inhibible en ninguna de las fracciones representativas de las diferentes etapas de purificación, obtenidas según el primer o el segundo esquema de fraccionamiento.

Sin embargo, experimentos *in vivo* señalaban que afidicolina disminuía significativamente la incorporación de ^3H -timidina al DNA total (figura 18) y particularmente al DNA nuclear (figura 19). La posibilidad que los resultados obtenidos *in vivo*, se debieran a un efecto de afidicolina sobre la entrada de la timidina a las células, quedaría descartada si se considera que la incorporación de

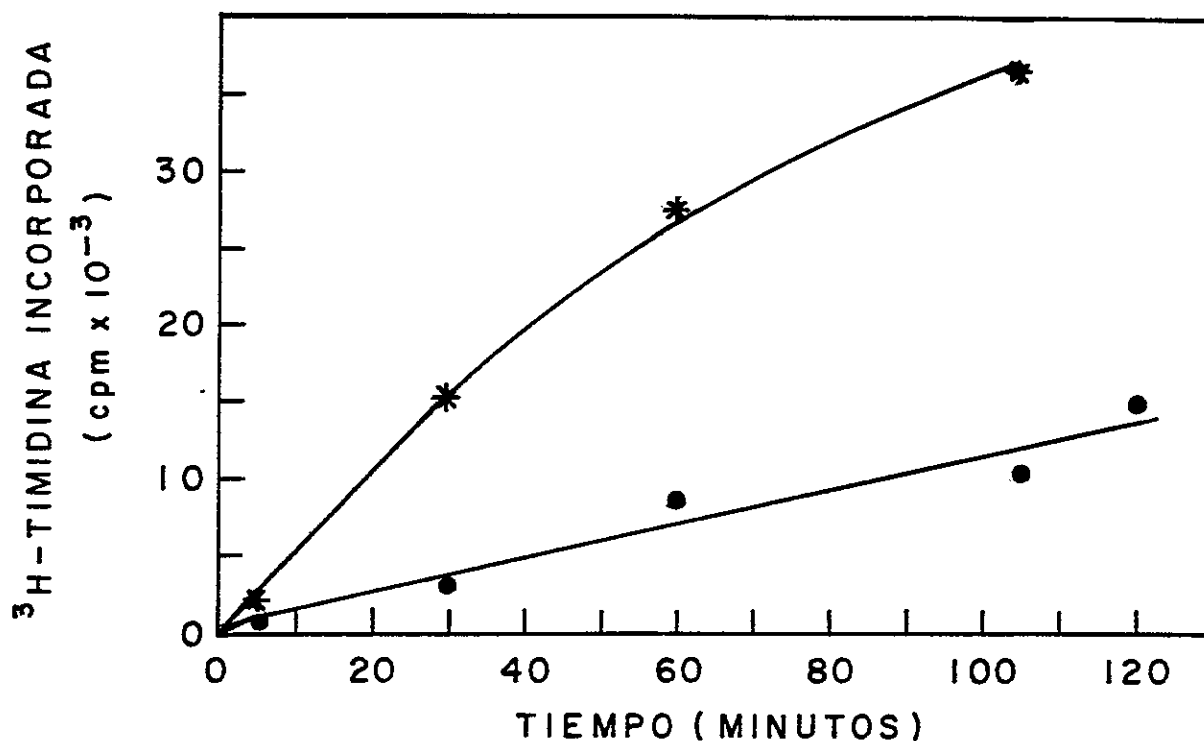


Figura 18. Efecto de afidicolina en la incorporación de ^3H -timidina al DNA in vivo.

Una suspensión de $2,2 \times 10^6$ células/ml fue preincubada durante 60 minutos a 28° en medio PBS, en ausencia (*--*) o en presencia (●--●) de afidicolina $169 \mu\text{g/ml}$. Posteriormente se agregó ^3H -timidina $8 \mu\text{Ci/ml}$ ($\text{ae} = 60 \text{ Ci/mmol}$) y se prosiguió la incubación a 28° . A diferentes tiempos se extrajo alícuotas de $100 \mu\text{l}$ de la suspensión de células que se depositaron sobre 1 ml de TCA al 10% a 4° . La radiactividad incorporada al material insoluble en TCA, retenida en filtros de fibra de vidrio GF/A, se cuantificó mediante un contador de centelleos para muestras líquidas.

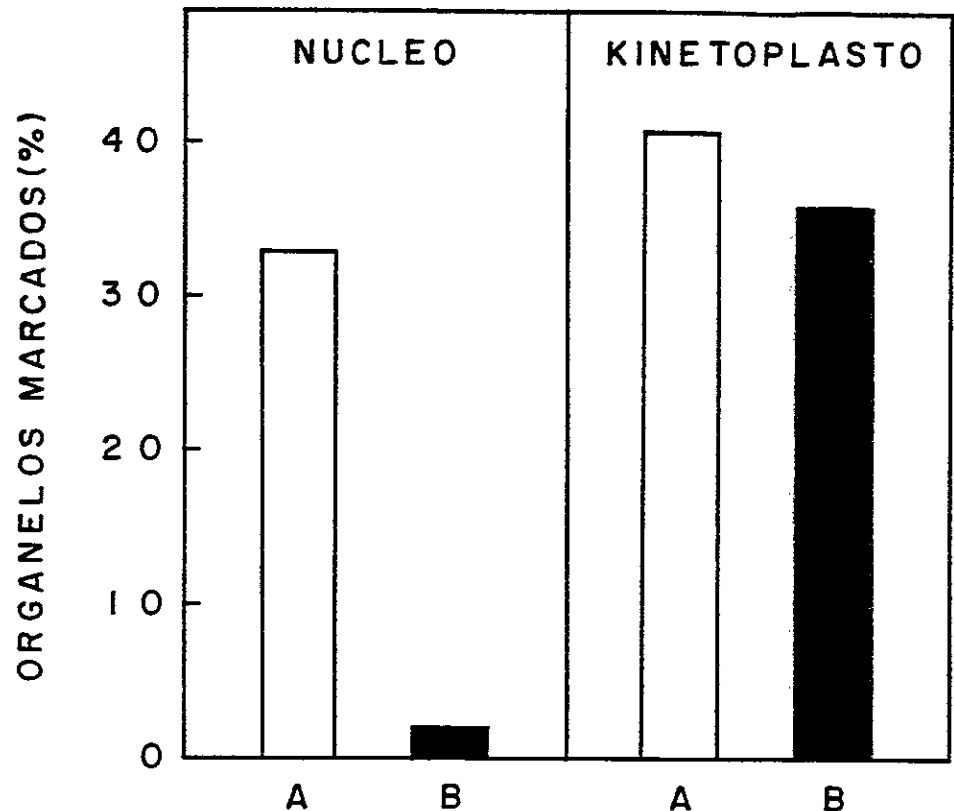


Figura 19. Efecto de afidicolina en la incorporación de ^3H -timidina al DNA nuclear y al DNA kinetoplastídico.

Una suspensión de $3,5 \times 10^6$ epimastigotes/ml fue preincubada durante 60 minutos a 28° en presencia (A) o en ausencia (B) de afidicolina $100 \mu\text{g/ml}$. Posteriormente se agregó ^3H -timidina $100 \mu\text{Ci/ml}$ ($\text{ae} = 25 \text{ Ci/m mol}$) y se prosiguió la incubación por 120 minutos más. La incorporación de ^3H -timidina se detuvo por dilución del medio de reacción con medio de cultivo fresco. Las células se trataron para autorradiografía según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se expresaron como porcentaje de las células cuyos organelos (núcleo o Kinetoplasto) contenían entre 2 y 7 granos de plata. El tamaño de la muestra para la cuantificación de los resultados fue de 315 células en el experimento control y de 292 células en el caso de las células incubadas con afidicolina.

^3H -timidina al DNA kinetoplástitico no se modificaba por la presencia de afidicolina en el medio de ensayo.

Estos resultados apoyaban la idea de la existencia de la actividad DNA polimerásica sensible a la afidicolina en las células intactas. Para encontrar una explicación a la falta de concordancia entre los resultados de los experimentos *in vivo* e *in vitro*, se planteó las siguientes alternativas:

a. La existencia de algún factor que modificase a la afidicolina en su capacidad inhibitoria de la actividad DNA polimerásica. Sin embargo, tal hipótesis quedaba descartada del análisis de los resultados presentados en la Tabla VI; ya que la preincubación de afidicolina con alcuotas de la Fracción I y de la Fracción III no modificaba su acción inhibitoria sobre una DNA polimerasa heteróloga, sensible.

b. La posibilidad que la enzima, hipotéticamente sensible al inhibidor, sufriera alguna alteración durante las etapas iniciales de fraccionamiento del extracto, perdiendo así su capacidad de ser inhibida. La presencia del inhibidor, desde la primera etapa de purificación, podría ejercer una función protectora que preservara la capacidad de la enzima referida de ser inhibible por afidicolina. Con ese propósito, se realizó una preparación con fines analíticos siguiendo el segundo esquema de fraccionamiento en presencia de afidicolina.

Tabla VI

Capacidad inhibitoria de afidicolina pretratada con la Fracción I y la Fracción III.

Actividad DNA polimerásica	Adición al ensayo	Preincubación		Actividad %
		37°x10'	85°x5'	
Fracción I	DMSO	-	-	100
Fracción I	afidicolina	-	-	94
Fracción III	DMSO	-	-	100
Fracción III	afidicolina	-	-	116
ovario <i>X.laevis</i>	DMSO	-	-	100
"	afidicolina	-	-	5
"	afidicolina	-	+	5
"	Fracción I	+	-	156
"	Frac. I + afid.	+	-	139
"	Frac. I + afid.	+	+	3
"	Fracción III	+	-	110
"	Frac. III + afid.	+	-	110
"	Frac. III + afid.	+	+	3

El efecto inhibitorio de afidicolina se ensayó con la DNA polimerasa de tipo obtenida del ovario de *X.laevis*. El ensayo de actividad se realizó según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, exceptuando la disminución de la concentración de dCTP a 5×10^{-7} M. Se agregó 2 μ l de una solución de afidicolina 1 mg/ml en DMSO, lo que resultaba en una concentración final de 40 μ g/ml. En los casos en los que se adicionaba afidicolina pretratada, se procedió de la siguiente forma: en un volumen final de 35 μ l de mezcla de reacción, se incubó afidicolina con 3 μ l de la Fracción I (4,5 μ g de proteínas) o con 5 μ l de la Fracción III (2,5 μ g de proteínas), durante 10 minutos a 37°. Luego de esta preincubación, la mezcla de reacción se calentó por 5 minutos a 85° (inactivación de la actividad DNA polimerásica de *T. cruzi*). Finalmente se agregaba la enzima de ovario y la mezcla de los dNTPs para iniciar la reacción de polimerización.

Según los resultados de la Tabla VII, la presencia del inhibidor en el curso de la purificación no tuvo efecto en revelar alguna actividad DNA polimerásica sensible a afidicolina.

D. Efecto de algunos inhibidores de las DNA polimerasas en la incorporación de ^3H -timidina al DNA nuclear y al DNA kinetoplastídico

Se desarrolló un análisis preliminar destinado a determinar la factibilidad de aplicación de la técnica autorradiográfica para el estudio de la síntesis del DNA in vivo, en *T. cruzi*.

Esta técnica permitía distinguir la incorporación de un precursor radiactivo, en este caso ^3H -timidina, en el DNA nuclear y en el DNA kinetoplastídico de la forma epimastigote. De esta manera, proporcionaba una herramienta para el estudio del efecto in vivo de los inhibidores de las DNA polimerasas.

De acuerdo a los resultados señalados anteriormente en la figura 19, el inhibidor afidicolina tenía un efecto marcado sobre la síntesis del DNA en el núcleo y muy escaso en el kinetoplasto.

En las condiciones de ensayo utilizadas en el experimento indicado en la figura 20, didesoxitimidina y aracitidina, precursores de los respectivos nucleótidos inhibidores de las DNA polimerasas, al ser suministrados en

Tabla VII

Efecto de afidicolina en la actividad DNA polimerásica medida en el curso del fraccionamiento de los extractos.

Alicuota representativa de la fracción:	afidicolina (µg/ml)	Actividad (cpm)
1. Eluida de DEAE-celulosa	<2,2 (*) 200	4762 4444
2. Filtrado "Sephadex G-25"	<0,06(*) 200	4205 4349
3. No unida a fosfocelulosa	0 (*) 200	2723 2741
4. Pico I de fosfocelulosa	0 (*) 200	8169 9310
Ovario de <i>X.laevis</i>	0 20	33141 6852

El fraccionamiento de la actividad DNA polimerásica se desarrolló según el segundo esquema de fraccionamiento con fines analíticos descrito en Materiales y Métodos, excepto por la incorporación de afidicolina a todas las soluciones. Las concentraciones de afidicolina utilizadas en las etapas que se especifican fueron las siguientes:

<u>Etapas</u>	<u>afidicolina</u>
Lisis	22 µg/ml
DEAE-celulosa	11 µg/ml
Sephadex G-25	3 µg/ml
Fosfocelulosa	0 µg/ml

Con el objeto de ensayar la actividad DNA polimerásica en ausencia de afidicolina en las distintas etapas del fraccionamiento, alícuotas de las respectivas fracciones fueron diluidas en solución A. La concentración estimada de afidicolina después de la dilución de cada fracción se señala en la tabla (*).

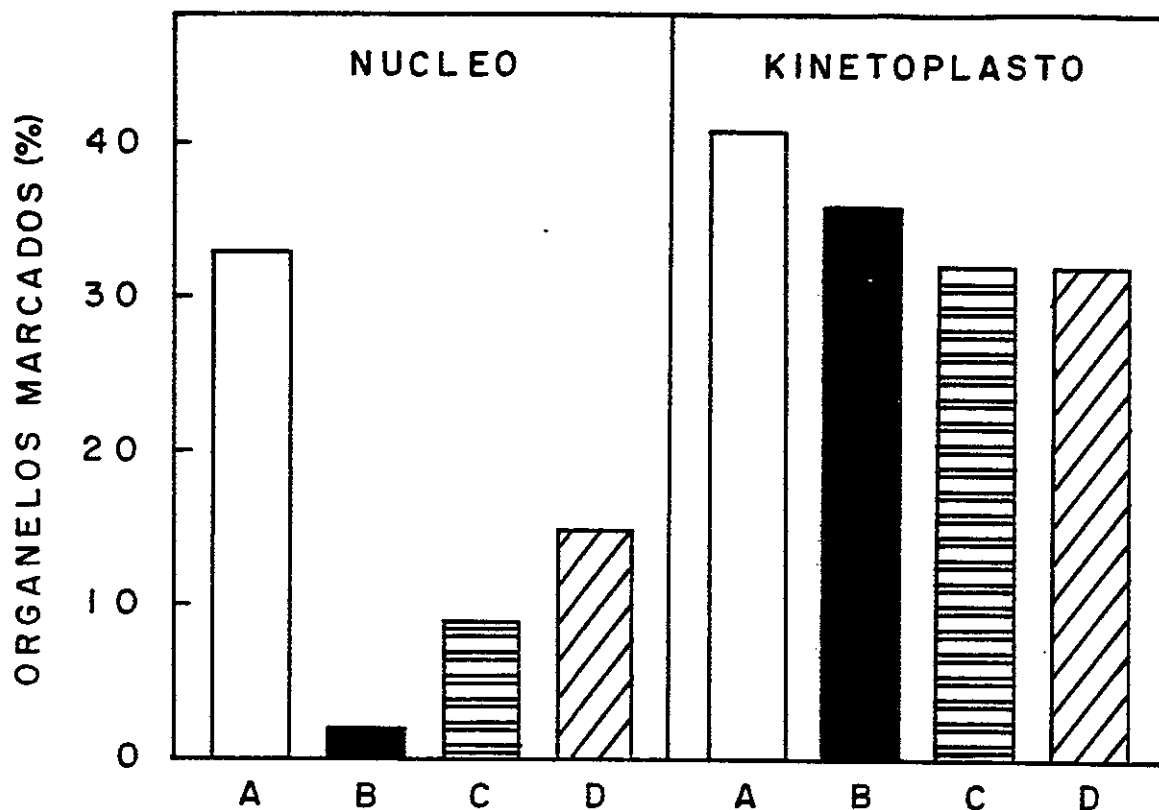


Figura 20. Efecto de algunos inhibidores de las DNA polimerasas en la incorporación de ^3H -timidina al DNA nuclear y al DNA kinetoplastídico.

El procedimiento experimental corresponde a aquel detallado en la figura 19. La incorporación de ^3H -timidina al DNA nuclear y al DNA kinetoplastídico se determinó en ausencia de inhibidor (A) o en presencia de afidicolina 100 $\mu\text{g/ml}$ (B), didesoxitimidina 100 μM (C) o ara-citidina 100 μM (D). Los resultados se expresaron como porcentaje de células cuyo núcleo o cuyo kinetoplasto presentaba entre 2 y 7 granos de plata. Los tamaños de las muestras considerados para la cuantificación de los resultados fue: 315 células en la condición control, 292, 448 y 436 células en los experimentos realizados en presencia de afidicolina, didesoxitimidina y aracitidina, respectivamente.

el medio de cultivo de los epimastigote ejercían un efecto significativamente mayor sobre la incorporación de ^3H -timidina en el DNA nuclear. Resulta inesperado el efecto escaso de didesoxitimidina en la incorporación de ^3H -timidina al DNA kinetoplastídico, en una concentración en la cual normalmente inhibe a las DNA polimerasas mitocondriales. Este hecho podría atribuirse a una relativa insensibilidad a la droga de la enzima que participa en la síntesis del kDNA; sin embargo no es posible descartar que la falta de efecto se origine en una accesibilidad limitada de la didesoxitimidina al interior de la mitocondria.

DISCUSION

A. Actividad DNA polimerásica en la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi*.

El objetivo de este trabajo ha sido la identificación y la caracterización de las actividades DNA polimerásicas de *T.cruzi*. Los antecedentes disponibles al inicio de este trabajo provenían de una publicación describiendo el aislamiento de una DNA polimerasa única, a partir de los extractos de la forma epimastigote de este parásito (Solari y col., 1983). De acuerdo a las propiedades estudiadas, la enzima resultaba difícil de clasificar en los tipos α , β o γ de DNA polimerasa de los eucariotes superiores. Sin embargo, los autores sugirieron que se trataría de una DNA polimerasa mitocondrial, basándose para ello en el efecto inhibitorio producido por las drogas Berenil y bromuro de etidio, a las que se les ha atribuido una acción selectiva a nivel de la replicación del DNA kinetoplastídico.

Por otra parte, la información recopilada en la literatura señalaba que en los tipos celulares más diversos se encuentra normalmente más de una DNA polimerasa. Al respecto, se han producido discrepancias entre algunos autores; sin embargo, en muchos casos éstas se originan principalmente en los esquemas de fraccionamiento aplicados (Crear y Pearlman, 1974) (FuruKawa y col, 1979) (Dube y col., 1979) (Marcus y col., 1980).

Enmarcado en este contexto, en la primera parte de este trabajo se abordó la búsqueda de un esquema de fraccionamiento de los extractos, que pusiera de manifiesto las diferentes actividades DNA polimerásicas existentes en la forma epimastigote de *T. cruzi*, obtenida de cultivos en crecimiento exponencial.

El método de ruptura de las células, escogido en términos de eficiencia y de rapidez, contemplaba la resuspensión de las células en una solución que contenía el detergente Nonidet-P40 e inhibidores de proteasas. En la literatura, se documenta ampliamente el efecto de las proteasas en la obtención de múltiples especies moleculares poseedoras de actividad DNA polimerásica (Grosse y Kraus, 1980) (Fry, 1983) (Masaki y col., 1984). *T. cruzi* se caracteriza precisamente por poseer un nivel elevado de actividad proteolítica, causante de la degradación rápida de las proteínas observada en los extractos celulares. El grupo de las cisteinil proteasas (Cazzulo, 1984), de las cuales tres han sido purificadas a homogeneidad (Bongertz y Hubscher, 1978) (Rangel y col., 1981) (Bontempi y col., 1984), desempeñarían un papel fundamental en esta actividad lítica. De la caracterización de estas enzimas surgió la recomendación de incorporar el inhibidor TLCK en el curso de la purificación de enzimas o de otras proteínas a partir de *T. cruzi*, con el propósito de evitar la degradación de éstas. El NaHSO_3 , que es un inhibidor usado habitualmente

en el curso de la purificación de las DNA polimerasas de tipo , solamente fue incorporado en la etapa de lisis de las células, ya que interfería con el ensayo de la actividad DNA polimerásica. Los inhibidores TLCK y PMSF estaban presentes en todas las etapas del fraccionamiento del extracto.

Un índice del grado de protección contra la acción proteolítica, alcanzado en el curso del fraccionamiento realizado, surge del análisis de la Fracción I mediante ultracentrifugación en gradiente de glicerol. Este experimento reveló que la actividad DNA polimerásica de dicha fracción aparecía asociada sólo a las proteínas que sedimentaban junto a los marcadores de alto peso molecular.

El primer esquema de fraccionamiento del extracto de *T.cruzi* contemplaba una cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-celulosa, que permitía detectar dos actividades DNA polimerásicas principales que eran retenidas en la resina. Estas eran diferenciables mediante los ensayos de actividad que utilizaban DNA activado o polidC-oligodG como matriz para la incorporación de los desoxirribonucleótidos.

Sin embargo, la resolución de ambas actividades en la columna de DEAE-celulosa no era satisfactoria, hecho que podría atribuirse en parte a la interferencia de los ácidos nucleicos presentes en la fracción adsorbida en la resina (Aoshima y col., 1984) (Okita y Volcani, 1977).

La caracterización de estas actividades fue impedida por su inestabilidad, aún en presencia de glicerol al 40 % de concentración.

El segundo esquema, que consistía en el fraccionamiento cromatográfico del extracto en una columna de fosfocelulosa, contemplaba la eliminación previa de los ácidos nucleicos remanentes mediante su adsorción en DEAE-celulosa. La fosfocelulosa, que agrega a su propiedad de intercambiador catiónico la capacidad de ligar proteínas poseedoras de un sitio de unión para el grupo fosfato, permitía resolver la actividad DNA polimerásica en tres picos de actividad retenida y en uno recuperado en el lavado de la columna. A diferencia de lo encontrado en la cromatografía en DEAE-celulosa (en el primer esquema de fraccionamiento), ninguna de las fracciones enzimáticas recuperadas de la columna de fosfocelulosa presentaba la propiedad de ser detectable exclusivamente con el ensayo polidC-oligodG/Mn⁺².

Con el propósito de realizar una caracterización de las actividades separadas mediante la cromatografía en fosfocelulosa, este segundo esquema de fraccionamiento se aplicó en escala preparativa. Con frecuencia, la actividad DNA polimerásica II elufa de la columna de fosfocelulosa muy próxima a la actividad I (como un hombro de ésta). Esta dificultad para obtener la actividad II libre de contaminación, determinó que la caracterización se circunscribiera sólo a las actividades I y III.

En el procedimiento de purificación con fines preparativos, se agregó una etapa de cromatografía de afinidad en DNA agarosa. Este paso permitía la eliminación de una cantidad considerable de proteínas, carentes de afinidad por el DNA, que coelufan de la columna de fosfocelulosa con las actividades I y III. Cabe señalar, que la utilización de DNA celulosa en lugar de DNA agarosa, ocasionaba la pérdida total de la actividad adsorbida a la resina.

La siguiente etapa de este trabajo, consistente en la caracterización de las actividades DNA polimerásicas de las Fracciones I y III fue posible debido a la estabilización de estas actividades, en la forma de precipitado con sulfato de amonio, lograda después de la cromatografía en DNA agarosa. En contraposición, la imposibilidad de conservar la actividad DNA polimerásica recuperada en el lavado de la columna de fosfocelulosa fue un impedimento para su estudio.

B. Caracterización de las actividades DNA polimerásicas de la Fracción I y de la Fracción III obtenidas de la forma epimastigote de T.cruzi.

1. Características generales y requerimientos del ensayo.

Uno de los parámetros utilizados habitualmente para distinguir a las DNA polimerasas es el efecto que sobre la actividad ejerce el cloruro de potasio.

Esta sal tenía un efecto marcadamente diferente sobre la actividad polimerásica de la Fracción I y de la Fracción III de *T.cruzi*. La primera, era activada por el KCl en concentraciones inferiores a 100 mM, en tanto la segunda actividad disminuía en más del 50 % con una concentración de KCl 20 mM. En la mayoría de los eucariotes inferiores, las DNA polimerasas son poco afectadas por la concentración salina, incluso cuando ésta es superior a 100 mM. Sólo se describe algunos casos aislados de enzimas que son sensibles a concentraciones bajas de KCl. Es el caso de la DNA polimerasa de *Dictyostelium discoideum* (Loomis y col., 1976) y de una de las DNA polimerasas de *Tetrahymena pyriformis* (Furukawa y col., 1979) y de *Trypanosoma brucei* (Marcus y col., 1980), cuya actividad disminuye en más del 50 % con concentraciones de KCl inferiores a 50 mM.

La reacción de polimerización requiere de un catión divalente, esencialmente Mg^{+2} o Mn^{+2} , cuya concentración óptima depende del tipo de matriz copiado por la DNA polimerasa. Con DNA activado como matriz, tanto la Fracción I como la Fracción III alcanzaban la actividad máxima cuando la concentración del ión Mg^{+2} estaba comprendida entre 10 y 20 mM. El reemplazo del Mg^{+2} por Mn^{+2} provocaba una disminución de varias veces en la actividad específica de la Fracción I, si la matriz empleada era DNA activado o polidC-oligodG; en cambio el efecto observado era un aumento

de actividad, cuando la matriz era polidT-oligorA. La Fracción III era prácticamente inactiva en presencia del ión Mn^{+2} , independientemente de la matriz que se utilizara en el ensayo de actividad. Las concentraciones de Mg^{+2} y de Mn^{+2} requeridas para alcanzar la actividad máxima de las DNA polimerasas de *T.cruzi*, eran superiores a las requeridas por las DNA polimerasas de los vertebrados. Sin embargo, las enzimas aisladas de *Chlorella* (Aoshima y col., 1984), *Crithidia fasciculata* (Holmes y col., 1984), *Cylindrotheca fusiformis* (Okita y Volcani, 1977) y de levadura (Wintersberger, 1974), muestran un requerimiento de los cationes bivalentes igualmente alto.

La dependencia del pH resultaba mucho más marcada para la actividad de la Fracción I que para la de la Fracción III. Ambas fracciones eran activas a pH superiores a 8, presentando la Fracción I un óptimo de actividad en el rango de 8,4 a 8,8 unidades de pH. Una situación semejante se describe para las DNA polimerasas del alga unicelular *Chlorella*. Las dos enzimas de *Chlorella* también presentan un máximo de actividad en el rango alcalino de pH, con óptimos a pH 8 y 8,5 a 9 para las polimerasas II y I, respectivamente (Aoshima y col., 1984).

2. Utilización de matrices artificiales

Tanto la Fracción I como la Fracción III presentaban una dependencia absoluta de una matriz para la incorporación de los nucleótidos. Ambas actividades utilizaban el mismo tipo

de matrices. Así el DNA activado era copiado eficientemente, y entre los complejos matriz-partidor homopoliméricos, sólo eran utilizados aquellos en los cuales la matriz estaba constituida por polidesoxirribonucleótidos. En cuanto al partidor, los resultados señalaban que eran elongados aquellos de naturaleza desoxirribonucleotídica (Ej. polidC-oligodG) o ribonucleotídica (Ej. polidT-oligorA). Cabe señalar que la capacidad de elongar partidores ribopoliméricos, es considerada una propiedad de las DNA polimerasas de tipo α , (Ikeda y col., 1980) que también es compartida por las DNA polimerasas de algunos eucariotes inferiores, como las enzimas de tipo A de *Crithidia fasciculata* (Holmes y col., 1984).

La incorporación del dTMP, catalizada por las Fracciones I y III de *T. cruzi*, era muy deficiente cuando se usaba polidA-oligodT, una matriz que es apropiada para las DNA polimerasas de tipo α . Estos resultados son semejantes a los obtenidos con las DNA polimerasas de *T. brucei* (Marcus y col., 1980). La escasa utilización de polidA-oligodT por las Fracciones I y III de *T. cruzi*, podría ser reflejo de una afinidad muy baja de las enzimas por la matriz, o por el contrario, de una afinidad excesivamente alta. Los experimentos diseñados con el propósito de analizar esta última alternativa, indicaron que aparentemente estas enzimas se unían con baja afinidad a polidA-oligodT. La matriz polidA-oligodT no competía con otras matrices en

ensayos de polimerización catalizados por las actividades DNA polimerásicas de *T.cruzi*.

Por otra parte, el complejo matriz-partidor polirA-oligodT, que es utilizado eficientemente por las DNA polimerasas de tipo γ y en menor medida, por las formas multiméricas de las DNA polimerasas β , no servía como matriz a ninguna de las actividades DNA polimerásicas aisladas de *T.cruzi*.

3. Efecto de los inhibidores de las DNA polimerasas

Berenil, que es utilizado como droga antiparasitaria en la trypanosomiasis africana, reducía en un 50 % la actividad DNA polimerásica de la Fracción I y de la Fracción III con concentraciones de 90 y 130 μ M, respectivamente. Estas concentraciones son mayores que aquellas que inhiben las DNA polimerasas I y II del parásito africano *T. brucei brucei* (Marcus y col., 1982).

Otra droga que se usa como antiparasitario es el bromuro de etidio, cuyo efecto es atribuido a su capacidad para unirse selectivamente al DNA kinetoplastídico cuando su concentración es del orden de 10^{-4} M (Cox y col., 1984). Sin embargo, *in vitro*, bromuro de etidio inhibiría a la actividad DNA polimerásica mitocondrial mediante una interacción directa con la enzima, en el rango de concentraciones de 10^{-5} M a 10^{-6} M (Tarragó-Litvak y col., 1978). Los resultados obtenidos en este trabajo señalan

que la actividad de la Fracción I y de la Fracción III decrecía en un 50 % cuando se alcanzaban concentraciones de bromuro de etidio de 15 a 20 μM en el medio de ensayo. Estos valores indican que las enzimas de *T.cruzi* tienen una sensibilidad inferior a bromuro de etidio que las DNA polimerasas mitocondriales, pero resultan semejantes a los determinados para las DNA polimerasas del alga unicelular *Chlorella* (Aoshima y col., 1984) y de la diatomea *Cylindrotheca fusiformis* (Okita y Volcani, 1977).

Todos los tipos de DNA polimerasas son inhibibles por ddTTP y sólo se diferencian entre sí respecto a la razón ddTTP/dTTP que es necesaria para provocar la inhibición. Los experimentos que se desarrollaron con el propósito de analizar al efecto del ddTTP mostraron que la actividad DNA polimerásica, de las dos fracciones de *T.cruzi* estudiadas, era relativamente resistente al inhibidor; tal como ocurre con las enzimas del parásito de la familia Trypanosomatidae, *Crithidia fasciculata* (Holmes y col., 1984). La razón de concentraciones del ddTTP respecto del dTTP que era necesaria para causar un 50 % de disminución en la actividad DNA polimerásica de la Fracción I y de la Fracción III era 5 y 1,5 , respectivamente. Dichos valores son intermedios en relación a los que provocan el mismo grado de inhibición en las α y β -polimerasas de los mamíferos.

De los análogos arabinofuranósido de los desoxirribonucleótidos, el araCTP es aquel que se utiliza

con mayor frecuencia como criterio para la clasificación de las DNA polimerasas. Según los resultados que se obtuvo, la actividad DNA polimerásica disminuía en 50 % con araCTP 4×10^{-4} M para la Fracción I y 1×10^{-3} M para la Fracción III. Por tanto, el grado de susceptibilidad al araCTP de las actividades DNA polimerásicas de *T.cruzi* parece más cercano al de las DNA polimerasas de tipo β y γ (I_{50} entre 10^{-4} y 10^{-3} M) que al de las DNA polimerasas de tipo α , cuya inhibición se produce con concentraciones del araCTP en el rango de 10^{-6} y 10^{-5} M (Yoshida y col., 1977) (Matsukage y col., 1978).

El agente modificador de los grupos sulfhidrilo, N-etilmaleimida, es la herramienta que permite distinguir a las DNA polimerasas de tipo β , debido a que son las únicas resistentes. Como criterio de resistencia, se considera que la enzima mantenga al menos un 50 % de la actividad DNA polimerásica cuando la concentración del inhibidor es alrededor de 10 mM.

A esa concentración de NEM, la actividad de la Fracción I se reducía cerca de un 60 %, mostrando una resistencia mayor que la Fracción III, cuya actividad era suprimida completamente a concentraciones inferiores. En general, las enzimas aisladas de los eucariotes inferiores presentan una sensibilidad alta a NEM, exceptuando la DNA polimerasa B de *Crithidia fasciculata* (Holmes y col., 1984), la DNA polimerasa I de *Tetrahymena pyriformis* (Furukawa y col.,

1979) y una actividad polimerásica detectada en los extractos crudos de *T.brucei* (Chang y col., 1980).

La acción inhibitoria del ácido fosfonacético, en la reacción catalizada por las DNA polimerasas, se atribuye a su capacidad para unirse al sitio para pirofosfato de estas enzimas (Cozzarelli, 1977). La ausencia de efecto inhibitorio sobre la actividad de las DNA polimerasas β se debería a que este tipo de enzimas no cataliza el intercambio de pirofosfato ni la pirofosforólisis (Chang y Bollum, 1973). El ácido fosfonacético ejercía un efecto diferenciador de las actividades DNA polimerásicas de la Fracción I y de la Fracción III. La primera de éstas resultaba bastante resistente al inhibidor, mientras que la segunda era inhibida en un 50 % con 100 μ M, una concentración del ácido fosfonacético parecida a la que causa un grado de inhibición equivalente en la DNA polimerasa B de *Chlamydomonas reinhardtii* (Ross y Harris, 1979).

El derivado BuPdGTP, sintetizado algunos años atrás, es considerado un inhibidor específico de las DNA polimerasas de tipo α , en el rango de concentración de 10^{-9} a 10^{-8} M. Aún concentraciones del orden de 10^{-3} M no resultan inhibitorias de la actividad de las DNA polimerasas de tipo β o de tipo γ (Khan y col., 1985). Los resultados de los experimentos de inhibición con el BuPdGTP mostraron que la actividad DNA polimerásica de la Fracción III era insensible al inhibidor, ensayado en concentraciones hasta

280 μM . En contraposición, la actividad de la Fracción I se reducía en un 50 % cuando la concentración del BuPdGTP era aproximadamente 1 μM . Tal como ocurre con otras DNA polimerasas sensibles, la Fracción I era inhibida por BuPdGTP aún cuando la actividad se ensayaba con una matriz en la cual no se incorporaría el dGTP.

La actividad DNA polimerásica de la Fracción I era afectada claramente por este inhibidor de las DNA polimerasas de tipo α . Con el objeto de dilucidar si esta enzima de *T.cruzi* compartía otra propiedad fundamental con las α -polimerasas, como es su sensibilidad a afidicolina, se estudió el efecto de este compuesto en la actividad DNA polimerásica de la Fracción I.

C. Estudios del efecto de afidicolina.

Afidicolina es un inhibidor potente de las DNA polimerasas de tipo α de los mamíferos (Spadari y col., 1982) (Wickemasinghe y Hoffbrand, 1983), de las DNA polimerasas de tipo α de las plantas (Sala y col., 1981), de la DNA polimerasa I de levadura (Johnson y col., 1985), además de las DNA polimerasas codificadas por algunos virus (Huberman, 1981).

Todos los intentos por detectar alguna actividad DNA polimerásica sensible a afidicolina, en los extractos crudos o en las fracciones parcialmente purificadas de *T.cruzi*, fueron completamente infructuosos.

Un factor que podría haber contribuido a enmascarar la actividad sensible a afidicolina en los extractos, es la hemina. Esta, que es un inhibidor de la actividad DNA polimerásica de tipo α (Bhattacharya y col., 1981), era proporcionada a los parásitos en los medios de cultivo en una concentración 19 μ M. Sin embargo, la afidicolina empleada en concentraciones hasta 40 μ g/ml carecía de efecto aún sobre la actividad DNA polimerásica de las fracciones sometidas a algunas etapas de purificación.

Por otra parte, araCTP que al igual que afidicolina es un inhibidor competitivo respecto al dCTP de las DNA polimerasas de tipo α , mostraba un efecto inhibitorio de las actividades DNA polimerásicas de T.cruzi que resultaba significativamente inferior al esperado sobre una enzima de tipo α . Normalmente se requiere una concentración de araCTP de 10^{-6} a 10^{-5} M para inhibir en un 50 % las α -polimerasas. En tanto, este mismo grado de inhibición de la actividad DNA polimerásica de las Fracciones I y III se lograba con concentraciones de 4×10^{-4} y 1×10^{-3} M, respectivamente.

Los resultados mencionados indican que la Fracción I ni la Fracción III tendrían las características de una DNA polimerasa de tipo α .

El hecho que afidicolina puede ser transformada en un derivado inactivo por las oxidasas microsomales (Pedrali-Noy y col., 1980), indujo a considerar que alguna actividad de esta naturaleza que co-purificara con las actividades DNA

polimerásicas de *T.cruzi*, fuese causante de la falta de inhibición por afidicolina. Sin embargo, los experimentos demostraron que la afidicolina preincubada con las Fracciones I y III, mantenía su capacidad inhibitoria de la actividad de una DNA polimerasa sensible.

Se buscó la actividad inhibible por afidicolina en todas las etapas de purificación previas a la obtención de las Fracciones I y III. Cabía la posibilidad que en las etapas iniciales del fraccionamiento se dissociase alguna subunidad de la DNA polimerasa que le confiriera a ésta la sensibilidad a afidicolina, no obstante la información disponible no avalaba esta hipótesis. Se piensa que el sitio de interacción con afidicolina reside en la misma cadena polipeptídica que conforma el sitio catalítico de la enzima. Esta idea está sustentada por el hecho que la DNA polimerasa del virus vaccinia, que está constituida por una sola cadena polipeptídica, es sensible a afidicolina (Pedrali-Noy y Spadari, 1980). Además, el mecanismo inhibitorio de tipo competitivo respecto al dCTP (Oguro y col., 1979) (Holmes, 1981), también sugiere la proximidad del sitio de unión de afidicolina y de aquel que une los desoxirribonucleótidos. Por otra parte, afidicolina inhibe la reacción de intercambio de pirofosfato catalizada por las DNA polimerasas. Es más, ciertas mutaciones que modifican la DNA polimerasa del virus herpes simplex, provocando hipersensibilidad a afidicolina, concomitantemente generan

resistencia al ácido fosfonacético (Coen y col., 1983) (Chiou y col., 1985). Pese a las consideraciones anteriores, se investigó la presencia de alguna DNA polimerasa sensible a afidicolina en alícuotas representativas de las primeras etapas de fraccionamiento del extracto. Los resultados fueron reiteradamente negativos; aunque en la interpretación de éstos debe tenerse en cuenta los inconvenientes, detallados anteriormente, que presentaba la cuantificación de la actividad en las primeras etapas del fraccionamiento.

Otra explicación posible a la falta de efecto inhibitorio de afidicolina podría radicar en alguna modificación del sitio de la enzima involucrado en la interacción con la droga, que no tuviese efecto en la actividad DNA polimerásica. Si este fuese el caso, se estimó que el ligando unido a la enzima podría conferir alguna protección a su sitio de unión. Con el objeto de probar esta idea, se incorporó afidicolina en todas las soluciones empleadas en el curso de la purificación de las Fracciones I y III. Sin embargo, ninguno de los enfoques experimentales empleados permitió poner de manifiesto alguna actividad de DNA polimerasa que fuese afectada por afidicolina.

Desafortunadamente existe muy poca información relativa al efecto de afidicolina sobre las DNA polimerasas aisladas de los eucariotes inferiores. Se ha generalizado la afirmación que la replicasa nuclear que es sensible a

afidicolina se encuentra en todos los eucariotes, pese a lo cual no son muchas las especies en las que se ha ensayado el efecto inhibitorio de afidicolina sobre las actividades DNA polimerásicas. Es así, como en el alga unicelular *Chlorella* ninguna de las dos DNA polimerasas aisladas es sensible a este inhibidor (Aoshima y col., 1984), como tampoco lo son las DNA polimerasas del Kinetoplastida *Crithidia fasciculata* (Holmes y col., 1984). Sólo en la DNA polimerasa I de levadura (Johnson, 1985) se ha descrito una respuesta a afidicolina que es comparable con la de la polimerasa de los vertebrados y de las plantas (Spadari y col., 1982).

Es ampliamente conocido el hecho que afidicolina suprime la síntesis *in vivo* del DNA nuclear sin afectar la síntesis del DNA mitocondrial ni la del DNA cloroplastídico (Geuskens y col., 1981). Las observaciones realizadas en los trypanosoma intactos, concuerdan plenamente con lo anterior. Afidicolina, adicionada al medio de cultivo, reduce la incorporación de ^3H timidina al DNA total a un 37 % del valor control. Este resultado ha sido corroborado autorradiográficamente, constatando una disminución marcada de la incorporación del precursor radiactivo en el DNA nuclear en presencia de afidicolina, sin afectar la síntesis del DNA kinetoplastídico.

En aparente contradicción con los resultados obtenidos en este trabajo con las enzimas aisladas, afidicolina ejerce

el efecto esperado *in vivo*. Existen antecedentes indicativos de la influencia del microambiente de la DNA polimerasa en el mecanismo de inhibición por afidicolina. Así, hay diferencias en los resultados obtenidos con enzimas altamente purificadas (Holmes y col., 1980) y aquellos obtenidos *in vivo*, en núcleos o con enzimas parcialmente purificadas (Oguro y col., 1980). Sin embargo, estas diferencias residen en el mecanismo de la inhibición y parecen insuficientes para explicar la ausencia de efecto *in vitro* de afidicolina en *T.cruzi*.

D. Conclusiones y Proyecciones.

Los resultados muestran la obtención de dos fracciones parcialmente purificadas de *T.cruzi* que presentan una actividad DNA polimerásica con características distintas a las de la enzima previamente aislada (Solari y col., 1983). Así, para esta actividad, polidA-oligodT es la mejor matriz. En cambio, tanto la Fracción I como la Fracción III carecen prácticamente de actividad DNA polimerásica con esa misma matriz. Las tres actividades son distinguibles de acuerdo al criterio de los inhibidores. La sensibilidad marcada al bromuro de etidio y a Berenil, que caracteriza a la enzima antes descrita, no es compartida por las actividades DNA polimerásicas de la Fracción I ni de la Fracción III. N-etilmaleimida, que inhibe marcadamente a la DNA polimerasa descrita por Solari (Solari y col., 1983), tiene un efecto semejante sobre la actividad de la

Fracción III de *T.cruzi*, pero solamente en concentraciones más elevadas inhibe la actividad de la Fracción I.

Al igual que las diferentes DNA polimerasas caracterizadas en diversas especies de eucariotes inferiores, las dos actividades polimerásicas estudiadas en *T.cruzi*, comparten entre sí numerosas propiedades. No obstante lo cual, los resultados obtenidos en este trabajo permitieron establecer que estas actividades se diferencian en algunas de las características señaladas en la Tabla VIII; por ejemplo, en su capacidad para catalizar la polimerización de los desoxirribonucleótidos en presencia de Mg^{+2} y/o Mn^{+2} como catión. Asimismo, las actividades son distinguibles a base del efecto de algunos inhibidores como NEM, ácido fosfonacético y BuPdGTP. La fuerza iónica también es un factor que permite discriminar entre ambas actividades.

Se puede decir que, en términos globales, las actividades DNA polimerásicas descritas en este trabajo presentan semejanzas con las del parásito africano *Trypanosoma brucei* y con las del alga unicelular *Chlorella* en cuanto a sus requerimientos en la reacción de polimerización. Tal como ocurre con las DNA polimerasas de *T.cruzi*, las enzimas I y II de *T.brucei* utilizan las matrices polidC-oligodG y DNA activado; resultando prácticamente inactivas con polidA-oligodT y con polirA-oligodT. El KCl también ejerce un efecto diferente sobre las dos actividades de *T.brucei*,

Tabla VIII

Principales Características de las Actividades DNA Polimerásicas de las Fracciones I y III de T.cruzi

Característica	Fracción I	Fracción III
Condiciones ensayo:		
KCl rango 1-70 mM	Aumenta activ.	Disminuye activ.
Catión divalente:		
Mg ⁺²	Activa	Activa
Mn ⁺²	Activa	Inactiva
pH óptimo	8,4 - 8,8	Depend.escasa
Matriz:		
DNA activado	Activa	Activa
polidT-oligoA	Activa	Activa
poliA-oligodT	Inactiva	Inactiva
polidA-oligodT	Activ.Escasa	Activ.Escasa
polidC-oligoG	Activa	Activa
Efecto de inhibidores (Actividad remanente)		
Control	100 %	100 %
Berenil 1 X 10 ⁻⁴ M	48 %	58 %
Br.Et. 2 X 10 ⁻⁵ M	50 %	42 %
ddTTP 5 X 10 ⁻⁵ M	50 %	34 %
araCTP 4 X 10 ⁻⁴ M	49 %	57 %
NEM 5 X 10 ⁻³ M	60 %	0
Ac.Fosf. 1 X 10 ⁻⁴ M	88 %	50 %
BuPdGTP 1 X 10 ⁻⁶ M	50 %	100 %
Afidic. 1-100 µg/ml	100 %	100 %

Br.Et :Bromuro de Etidio
 Ac.Fosf :Acido fosfonacético
 Afidic. :Afidicolina

activando a la DNA polimerasa II e inactivando a la DNA polimerasa I. Por otra parte, las actividades DNA polimerásicas de *T.cruzi* son semejantes a las del alga *Chlorella* en cuanto a las concentraciones de Mg^{+2} y de Mn^{+2} que requieren y a su rango de pH óptimo. Además, coincidiendo con lo descrito para *T.cruzi*, una de las DNA polimerasas de *Chlorella* resulta más sensible que la otra al efecto del reactivo bloqueador de los grupos sulfhidrilo, N-etilmaleimida.

En concordancia con lo observado en otras especies inferiores, la información reunida no permite adscribir las actividades DNA polimerásicas de *T.cruzi* a las clases α , β o γ definidas para los eucariotes superiores, ya que presentan propiedades de tipo mixto. Por este motivo, se hace necesario fundamentar la clasificación de estas enzimas en la función que éstas desempeñan. Sin embargo, la determinación inequívoca de la función de una DNA polimerasa no es un asunto fácil de abordar, a menos que se disponga de mutantes letales condicionales. Este inconveniente ha sido obviado mediante algunos enfoques indirectos, que apuntan a determinar la localización subcelular de las enzimas o a relacionar las variaciones en los niveles de actividad de éstas con los estados metabólicos particulares de las células.

Tradicionalmente, las metódicas de fraccionamiento subcelular han permitido asignar la localización de una

actividad enzimática a un organelo. Desafortunadamente, no existe aún un procedimiento satisfactorio para aislar el núcleo y la mitocondria en trypanosoma. La dificultad radica en encontrar las condiciones que equilibren apropiadamente la ruptura de la resistente cubierta del parásito con la preservación de las estructuras subcelulares.

Las técnicas inmunocitológicas también son una herramienta útil en los estudios de localización subcelular de las enzimas en las células enteras (Bensch y col.,1982) (Miller y col., 1985) (Nakamura y col., 1984). Los anticuerpos producidos contra una DNA polimerasa determinada, se hacen reaccionar con el antígeno en las células previamente fijadas y permeabilizadas. Posteriormente, la localización de los complejos antígeno-anticuerpo, es revelada empleando un segundo anticuerpo marcado radiactivamente o con una molécula fluorescente, o alternativamente, a través de la reacción de la peroxidasa acoplada al segundo anticuerpo. Naturalmente, el factor limitante para el desarrollo de este tipo de enfoques, reside en disponer de anticuerpos altamente específicos, capaces de reaccionar con la DNA polimerasa en las células fijadas.

Numerosos trabajos han abordado la tarea de relacionar los niveles de actividad de las diferentes DNA polimerasas con las situaciones metabólicas de proliferación activa, de inducción de daño al DNA, de entrada al periodo S del

ciclo celular y otras. En el caso de *T.cruzi*, la comparación de los niveles de actividad de las DNA polimerasas estudiadas, en las formas proliferativas y no proliferativas que caracterizan los estados del ciclo vital del parásito, podría proporcionar una idea acerca de la función de estas enzimas *in vivo*.

Otra posibilidad que se plantea, es recurrir a las técnicas autorradiograficas que permiten estudiar la síntesis del DNA *in vivo* (Geuskens y col., 1982) (Sala y col., 1981). *Trypanosoma cruzi* presenta características apropiadas para el desarrollo de estudios de esta naturaleza, puesto que el núcleo y el "kinetoplasto" son distinguibles mediante microscopía óptica. Esta hecho permite diferenciar la incorporación de un percursor radiactivo (^3H -timidina) al DNA de dichos organelos. Así, se puede desarrollar estudios *in vivo* acerca de la acción de determinados inhibidores de las DNA polimerasas, tales como los señalados con afidicolina, didesoxitimidina y ara-citidina, en este trabajo. Resulta de un interés particular, utilizar aquellos inhibidores que presentan un efecto específico sobre las DNA polimerasas aisladas, como el BuPdGTP. Este compuesto como todos los nucleótidos, no atraviesa la membrana plasmática, lo que obligaría a proporcionarlo como el precursor butilfenilguanosina, o a desarrollar previamente alguna metódica de permeabilización controlada en *T.cruzi*.

REFERENCIAS

- Aoshima, A., Kubota, M., Nishimura, T. y Iwamura, T. (1984) DNA Polymerases of *Chlorella*. J. Biochem. 96: 461-473.
- Aposhian, N.V. y Kornberg, A. (1962) Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. J. Biol. Chem. 237: 519-525.
- Banks, G.R., Holloman, W.K., Kairis, M.V., Spanos, A. y Yarranton, G.T. (1976). A DNA Polymerase from *Ustilago maydis*. Eur. J. Biochem. 62: 131-142.
- Bensch, K.G., Tanaka, H.S., Wang, T. y Korn, D. (1982) Intracellular Localization of Human DNA Polymerase α with Monoclonal Antibodies. J. Biol. Chem. 257: 8391-8396
- Bhattacharya, P., Simet, I. y Basu, S. (1981) Differential Inhibition of Multiple Forms of DNA Polymerase α from IMR-32 Human Neuroblastoma Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2683-2687.
- Birkenmeyer, L. y Ray, D.S. (1968) Replication of Kinetoplast DNA in Isolated Kinetoplasts from *Crithidia fasciculata*. J. Biol. Chem. 241: 2362-2368.
- Bongertz, U. y Hungerer, K.D. (1978) *Trypanosoma cruzi*: Isolation and Characterization of a Protease. Exp. Parasitol. 45: 8-18.
- Bontempi, E., Franke de Cazzulo, B.M., Riuz, A.M. y Cazzulo, J.J. (1984) Purification and Properties of an Acidic Protease from Epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol. 77B: 599-604.
- Byrnes, J.J., Downey, K.M., Black, V.L. y So, A.G. (1976) A New Mammalian DNA Polymerase with 3' to 5' Exonuclease Activity: DNA Polymerase δ . Biochemistry 15: 2817-2823.
- Byrnes, J.J. y Black, V.L. (1978) Comparison of DNA Polymerases α and δ from Bone Marrow. Biochemistry 17: 4226-4231.
- Cazzulo, J.J. (1984) Protein and Amino Acid Catabolism in *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol. 79B: 309-320.
- Chang, L.M.S. y Bollum, F.J. (1973) A Comparison of Associated Enzyme Activities in Various Deoxyribonucleic Acid Polymerases. J. Biol. Chem. 248: 3398-3402.
- Chang, L.M.S. (1976) Phylogeny of DNA Polymerase β . Science 191: 1183-1185.

Chang, L.M.S. (1977) DNA Polymerases from Bakers' Yeast. J. Biol. Chem. 252: 1873-1880.

Chang, L.M.S., Cheriathundam, E., Mahoney, E.M. y Cerami, A. (1980) DNA Polymerases in Parasitic Protozoans Differ from Host Enzymes. Science 208: 510-511.

Chang, L.M.S. y Bollum, F.J. (1981) Immunological Reagents for Comparisons of DNA Polymerase α and DNA polymerase β . J. Biol. Chem. 256: 494-498.

Chang, L.M., Plevani, P., Bollum, F. (1982) Evolutionary Conservation of DNA Polymerase β Structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 758-761.

Chiou, H.C., Weller, S.K. y Coen, D.M. (1985) Mutations in the Herpes Simplex Virus Major DNA to DNA Binding Protein Gene Leading to Altered Sensitivity to DNA Polymerase Inhibitors. Virology 145: 213-226.

Coen, D.M., Furman, P.A., Aschman, D.P. y Schaffer, P.A. (1983) Mutation in the Herpes Simplex Virus DNA Polymerase Gene Confering Hypersensitivity to Aphidicolin. Nuc. Acids Res. 11: 5287-5297.

Cooper, P.K. y Hanawalt, P.C. (1972) Role of DNA Polymerase I and the rec System in Excision-repair. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69: 1156-1160.

Cox, B.A., Yielding, L.W. y Yielding, L.K. (1984) Subcellular Localization of Photoreactive Ethidium Analogs in *Trypanosoma brucei* by Fluorescence Microscopy. J. Parasitol. 70S: 6694-702.

Cozzarelli, N.R. (1977) The Mechanism of Action of Inhibitors of DNA Synthesis. Ann. Rev. Biochem. 46: 646-668.

Crear, M. y Pearlman, R.E. (1974) Deoxyribonucleic Acid Polymerase from *Tetrahymena piriformis*. J. Biol. Chem. 249: 3123-3131.

Crane, M.St.J. y Dvorak, J.A. (1979) *Trypanosoma cruzi*: Interaction with Vertebrate Cells. DNA Synthesis and Growth of Intracellular Amastigotes and their Relationship to Host Cell DNA Synthesis and Growth. J. Protozoology 26: 599-604.

Crane, M.St.J. y Dvorak, J.A. (1980) *Trypanosoma cruzi*: Pattern of RNA Synthesis Following Infection of Vertebrate Cells. J. Protozoology 27: 336-338.

Delfini, C., Alfini, E., De Venezia, U., Oberholtzer, G., Tomasello, C., Eremenko, T. y Volpe, P. (1985) Cell-cycle Dependence and Properties of the HeLa Cell DNA Polymerase System. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 2220-2224.

De Souza, W. (1984) Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. Int. Rev. Cytology 86: 197-283.

Diamond, L.S. (1968) Improved Method for Monoaxemi Cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn (1903) and *E. histolytica*-like Amoeba with Trypanosomatids. J. Parasitol. 54: 715-719.

Dube, D., Williams, R.O., Seal, G., Williams, S.G. (1979) Detection and Characterization of DNA Polymerase from *Trypanosoma brucei*. Biochim. Biophys. Acta 561: 10-16.

Fisher, P.A., Chen, J.T. y Korn, D. (1981) Enzymological Characterization of KB Cell DNA Polymerase α . J. Biol. Chem. 256: 133-141.

Fry, M. (1983) Eukaryotic DNA Polymerases in: "Enzymes of DNA Synthesis and Modification" Vol. 1, DNA Synthesis. Samson T. Jacob Ed. pp 39-92. CRC Press, Inc., Boca Raton.

Fujimura, R.K. y Ropp, B.C. (1976) Characterization of DNA Polymerase Induced by Bacteriophage T₅ with DNA Containing Single Strand Breaks. J. Biol. Chem. 251: 2168-2175.

Furukawa, Y., Yamana, R. y Khono, M. (1979) Presence of Two DNA polymerases in *Tetrahymena pyriformis*. Nuc. Acids Res. 7: 2387-2398.

Gefter, M.L., Molineux, I.J., Kornberg, T. y Khorana, H.G. (1972) Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Cell-free Extracts. J. Biol. Chem. 247: 3321-3326.

Geuskens, M., Hardt, N., Pedrali-Noy, G. y Spadari, S. (1981) An Autoradiographic Demonstration of Nuclear DNA Replication by DNA Polymerase α and of Mitochondrial DNA Synthesis by DNA polymerase γ . Nuc. Acids Res. 9: 1599-1613.

Gross, J. y Gross, M. (1969) Genetic Analysis of an *E. coli* strain with a Mutation Affecting DNA Polymerase. Nature 224: 1166-1168.

Grosse, F. y Krauss, G. (1980) Purification and Partial Characterization of a DNA Polymerase Species from Calf Thymus. Nuc. Acids Res. 8: 5703-5714.

- Goulian, M., Lucas, Z.J. y Kornberg, A. (1969) Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. Purification and Properties of Deoxyribonucleic Acid Polymerase Induced by Infection with Phage T₄. J. Biol. Chem. 243: 627-638.
- Gutteridge, W.E., Cover, B. y Caborak, A.M. (1978) Isolation of Blood and Intracellular Forms of *Trypanosoma cruzi* and Preliminary Study of their Metabolism. Parasitology 76: 159-176.
- Hajduk, S.L., Klein, V.A. y Englund, D.T. (1984) Replication of Kinetoplast DNA Maxicircles. Cell 36: 483-492.
- Hanawalt, P.C., Cooper, P.K., Ganesan, A.K. y Smith, C.A. (1979) DNA Repair in Bacteria and Mammalian Cells. Ann. Rev. Biochem. 48: 783-836.
- Helfman, W.B. (1973) The Presence of an Exonuclease in Highly Purified DNA Polymerases from Bakers Yeast. Eur. J. Biochem. 32: 42-50.
- Hockensmith, J. y Bambara, R.A. Kinetic Characteristics which Distinguish Two Forms of Calf Thymus DNA Polymerase α . Biochemistry 29: 227-232.
- Holmes, A.M. (1980) Studies on the Inhibition of Highly Purified Calf Thymus 8 s and 7,35 s DNA Polymerase α by Aphidicolin. Nuc. Acids Res. 9: 161-168.
- Holmes, A., Cheriathundam, E., Kalinski, A y Chang, L.M.S (1984) Isolation and Partial Characterization of DNA Polymerases from *Crithidia fasciculata*. Molec. Biochem. Parasitol. 10: 195-205.
- Hori, K., Mark, D.F. y Richardson, C.C. (1979) Deoxyribonucleic Acid Polymerase of Bacteriophage T₇. J. Biol. Chem. 254: 11591-11597.
- Huberman, J.A. (1981) New Views of the Biochemistry of Eukaryotic DNA Replication Revealed by Aphidicolin, an Unusual Inhibitor of DNA Polymerase α . Cell 23: 647-648.
- Hubscher, U. (1984) DNA Polymerases in Prokaryotes and Eukaryotes: Mode of Action and Biological Implications. Experientia 39: 1-25.
- Ikeda, J.E., Longiaru, M., Horwitz, M. y Hurwitz, J. (1980) Elongation of Purified DNA Templates by Eukaryotic DNA Polymerases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5827-5831.
- Johnson, L.M., Snyder, M. Chang, L.M.S., Davis, R.W. y Campbell, J.L. (1985) Isolation of the Gene Encoding Yeast DNA Polymerase I. Cell 43: 369-377.

Jovin, T.M., Englund, P.T. y Bertsh, L.L. (1969) Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. J. Biol. Chem. 244: 2996-3008.

Khan, N.N., Wright, G., Dudycz, L. y Brown, N.C. (1984) Butylphenil dGTP: a Selective and Potent Inhibitor of Mammalian DNA Polymerase Alpha. Nuc. Acids Res. 12: 3695-3706.

Khan, N.N., Wright, G.E., Dudycz, L. y Brown, N. (1985) Elucidation of the Mechanism of Selective Inhibitor of Mammalian DNA Polymerase Alpha by 2-butylanilinopurines: Development and Characterization of 2-(p-m-butylanilino) adenine and its Deoxyribonucleotides. Nuc. Acids Res. 13: 6331-6342.

Kitchin, P.A., Klein, V.A., Fein, B.I. y Englund, P.T. (1984) Gapped Minicircles. A Novel Replication Intermediate of Kinetoplast DNA. J. Biol. Chem. 259: 2362-2368.

Krauss, S.W. y Linn, S. (1986) Studies of DNA Polymerases Alpha and Beta from Cultured Human Cells in Various Replicative States. J. Cell Physiol. 126: 99-106.

Kuempel, P.L. y Veomett, G.E. (1970) A possible Function of DNA Polymerase in Chromosome Replication. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41: 973-980.

Lee, M.Y.W., Toomey, N.L. y Wright, G.E. (1985) Differential Inhibition of Human Placental DNA Polymerase and by BuPdGTP and BuAdATP. Nuc. Acids Res. 13: 8623-8629.

Litvak, S. y Castroviejo, M. (1985) Plant DNA Polymerases. Plant Molecular Biol. 4: 311-314.

Loeb, L.A. y Kunkel, T.A. (1982) Fidelity of DNA Synthesis. Ann. Rev. Biochem. 51: 429-457.

Loomis, L.W., Rossomando, E.F. y Chang, L.M.S. (1976) DNA Polymerase of *Dictyostelium discoideum*. Biochim. Biophys. Acta 425: 469-477.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Marcus, S.T., Lipschik, G., Trueba, G. y Bacchi, C. (1980) Chromatographic Resolution of Two DNA Polymerase Activities from Bloodstream Forms of *Trypanosoma brucei*: Differential Response to Exogenous Polyamine Addition. Biochem. Biophys. Res. Commun. 93: 1027-1035.

Marcus, S.I., Kopelman, R., Koll, B. y Bacchi, C.J. (1982) Effects of Exogenous Polyamine and Trypanocides on the DNA Polymerase Activities from *Trypanosoma brucei brucei*, Mouse Thymus and Murine Leukemia Virus. Mol. Biochem. Parasitol. 5: 231-243.

Masaki, S., Tanabe, K. y Yoshida, S. (1984) Large Polypeptides of 10s DNA polymerase α from Calf Thymus: Rapid Isolation Using Monoclonal Antibody and Tryptic Peptide Mapping Analysis. Nuc. Acids Res. 12: 4755-4767.

Matsukage, A., Ono, K., Ohashi, A., Takahashi, T., Nakayama, C. y Sanayoshi, M. (1978) Inhibitory Effect of 1- β -D-Arabinofuranosylthymidine-5'triphosphate and 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine-5'triphosphate on DNA Polymerases from Murine Cells and Oncornavirus. Cancer Res. 38: 3076-3079.

Matsukage, A., Nishizawa, M., Takahashi, T. y Hozumi, T. (1980) In vitro Synthesis of Short DNA Pieces by DNA Polymerase α from Mouse Myeloma. J. Biochem. 88: 1869-1877.

Mc.Ghee, R.B. y Crosgrave, W.B. (1980) Biology and Physiology of the Lower Trypanosomatidae. Microbiological Reviews 44: 140-173.

Mc.Henry, C.S. y Crow, W. (1979) DNA Polymerase III of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 254: 1748-1753.

Mc.Henry, C.S. y Kornberg, A. (1982) in *The Enzymes* vol 14 pp. 30-50, Ed P. Boyer Academic Press, New York.

Mc.Lennan, A.G., Keir, H.M. (1975) Deoxyribonucleic Acid Polymerases of *Euglena gracilis*. Biochem. J. 151: 277-247.

Miller, M.R., Ulrich, R.G., Wang, T.S. y Korn, D. (1981) Enzymological Characterization of KB cell DNA Polymerase α . J. Biol. Chem. 260: 134-138.

Mousbaug, D.W., Meyer, R.R. (1980) Interaction of Mammalian Deoxyribonuclease V, a double-strand 3' \rightarrow 5' and 5' \rightarrow 3' Exonuclease with Deoxyribonucleic acid Polymerase β from Novikoff Hepatoma. J. Biol. Chem. 255: 10239-102433.

Nakamura, H., Morita, T., Masaki, S. y Yoshida, S. (1984) Intracellular Localization and Metabolism of DNA Polymerase in Human Cell Visualized with Monoclonal Antibodies. Exp. Cell. Res. 151: 123-133.

Newton, B.A. y Le Page, R.W.F. (1967) Preferential Inhibition of Extranuclear Deoxyribonucleic Acid Synthesis by the Trypanocide Berenil. Proc. Biochemical Soc. Biochem. J. 105: 50P.

- Oguro, M., Suzuki-Hori, C., Nagano, H., Mano, Y. e Ikegami, S. (1979) The Mode of Inhibitory Action by Aphidicolin on Eukaryotic DNA Polymerase α . Eur. J. Biochem. 97: 603-607.
- Oguro, M., Shioda, M., Nagano, H. y Mano, Y. (1980) The Mode of Action of Aphidicolin on DNA Synthesis in Isolated Nuclei. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92: 13-19.
- Okazaki, R., Arisawa, M y Sugino, A. (1971) Slow Joining of Newly Replicated DNA Chains in DNA Polymerase I-Deficient E.coli Mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68: 2954-2957.
- Okita, T.W., Volcani, B.E. (1977) The Deoxyribonucleic Acid Polymerases from the Diatom *Cylindrotheca fusiformis*. Biochem. J. 167: 611-619.
- Ottiger, H.P. y Hubscher, U. (1984) Mammalian DNA Polymerase α Holoenzyme with Possible Functions at the Leading and Lagging of the Replication Fork. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 3993-3997.
- Pedralli-Noy, G., Mazza, G., Focher, F. y Spadari, S. (1980) Lack of Mutagenicity and Metabolic Inactivation of Aphidicolin by Rat Liver Microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 93: 1094-1103.
- Pedralli-Noy, G. y Spadari, S. (1980) Mechanism of Inhibition of Herpes simplex and Vaccinia Virus DNA Polymerases by Aphidicolin, a Highly Specific Inhibitor of DNA Replication in Eukaryotes. J. Virology 36: 457-464.
- Pizzi, T. (1957) Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Colección de Monografías Biológicas de la Universidad de Chile. Ed. Universidad de Chile, Santiago.
- Rangel, H.A., Araújo, P.M.F., Repka, D. y Costa, M.G. (1981) Trypanosoma cruzi: Isolation and Characterization of a Proteinase. Exp. Parasitol. 52: 199-209.
- Ross, C.A. y Harris, W.J. (1978) DNA Polymerases from *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochem. J. 171: 241-249.
- Sala, F., Amileni, A.R., Parisi, B y Spadari, S. (1980) A γ -like DNA Polymerase in Spinach Chloroplasts. Eur. J. Biochem. 112: 211-217.
- Sala, F., Galli, M.G., Levi, M., Burrioni, D., Parisi, B., Pedralli-Noy, G. y Spadari, S. (1981) Functional Roles of the Plant α -like and γ -like DNA Polymerases. FEBS Lett. 124: 112-116.

- Schneider, E., Muller, B. y Schindler, R. (1985) Control of DNA Polymerase α , β and γ in Heat and Cold Sensitive Mammalian Cell Cycle Mutants. Biochim. Biophys. Acta **825**: 375-383.
- Scovasi, A.I., Wicker, R. y Bertazzoni, U. (1979) A Phylogenetic Study on Vertebrate Mitochondrial DNA Polymerase. Eur. J. Biochemistry **100**: 491-496.
- Shlomai, J. y Zadok, A. (1983) Reversible Decatenation of Kinetoplast DNA by a DNA Topoisomerase from Trypanosomatids. Nuc. Acids Res. **11**: 4019-4034.
- Solari, A., Tharaud, D., Repetto, Y., Aldunate, J., Morello, A. y Litvak, S. (1983). In vitro and in vivo Studies of Trypanosoma DNA Polymerase. Biochemistry Int. **2**: 147-157.
- Spadari, S., Sala, F. y Pedrali-Noy, G. (1982) Aphidicolin: a Specific Inhibitor of Nuclear DNA Replication in Eukaryotes. Trends Biochem. Sci. **7**: 29-32.
- Tait, A. y Cummings, D.J. (1975) DNA-Dependent DNA Polymerase Activities from *Paramecia macronuclei*. Biochim. Biophys. Acta **425**: 282-295.
- Tarragó-Litvak, L., Vinatelle, O., Darriet, D., Dalibart, R. y Litvak, S. (1978) The Inhibition of Mitochondrial DNA Polymerase γ from Animal Cells by Intercalating Drugs. Nuc. Acids Res. **5**: 2197-2210.
- Thyberg, J. (1984) The Microtubular Cytoskeleton and the Initiation of DNA Synthesis. Exp. Cell. Res. **155**: 1-8.
- Van der Ende, A., Baker, T.A., Ogawa, T. y Kornberg, A. (1985) Initiation of Enzymatic Replication at the Origin of the *E. coli* Chromosome: Primase as the Sole Priming Enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82**: 3954-3958.
- Waser, J., Hubscher, U., Kuenzle, C.C. y Spadari, S. (1979) DNA Polymerase β from Brain Neurons a Repair Enzyme. Eur. J. Biochem. **97**: 361-368.
- Wickemasinghe, R.G. y Hoffbrand, V.A. (1983) Inhibition by Aphidicolin and Dideoxythymidine Triphosphate of a Multienzyme Complex of DNA Synthesis from Human Cells. FEBS Lett. **159**: 175-179.
- Weissbach, A. (1977) Eukaryotic DNA Polymerases. Ann. Rev. Biochem. **46**: 25-47.
- Wintersberger, E. (1974) Deoxyribonucleic Acid Polymerase from Yeast. Eur. J. Biochem. **50**: 41-47.

Yamaguchi, M., Matsukage, A. & Takahashi, T. (1980 a) Chick Embryo DNA Polymerase γ . J. Biol. Chem. 252: 7002-7009.

Yamaguchi, M., Matsukage, A. & Takahashi, T. (1980 b) Continuous Synthesis of Long DNA Chains by Chick Embryo DNA Polymerase γ . Nature 285: 45-47.

Yoshida, S., Yamada, M. & Masaki, S. (1977) Inhibition of DNA Polymerase α and β of Calf Thymus by 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine-5'-triphosphate. Biochim. Biophys. Acta. 477: 144-150.