

CINCUENTA Y TRES AÑOS CON MICROORGANISMOS Y ENZIMAS: DE LEVADURAS A BACTERIAS Y A TRYPANOSOMAS

Palabras clave: Enzimología; Levaduras; Bacterias termófilas; Bacterias halófilas moderadas y extremas; Trypanosoma cruzi; Enfermedad de Chagas.
Key words: Enzymology; Thermophilic bacteria; Moderate and extreme halophilic bacteria; Trypanosoma cruzi; Chagas Disease.

■ Juan José Cazzulo

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas “Dr. Rodolfo A. Ugalde” – Instituto Tecnológico de Chascomús
(IIB-INTECH, Universidad Nacional de San Martín – CONICET)

jcazzulo@iibintech.com.ar

■ 1. MI INFANCIA Y ADOLESCENCIA.

Nací el 29 de Noviembre de 1941 en General Alvear, en el centro de la Provincia de Buenos Aires, donde mi padre, Juan José, Maestro Normal Nacional, era Director de la Escuela Nacional. Mi madre, Gregoria Marmissolle, fue una muy buena ama de casa. Como tantos otros argentinos, desciendo de inmigrantes, y soy, en cuanto a mi ascendencia, mitad piamontés y mitad vasco... Cuando yo tenía unos cuatro años, mi padre fue transferido a Las Varillas, en la Provincia de Córdoba, como Director de la Escuela Nacional No 23, la más grande del pueblo, donde permaneció en ese cargo hasta su jubilación. Fui hijo único, de padres ya bastante mayores, lo cual hizo que me cuidaran mucho y los primeros años fui bastante solitario. Esto probablemente fue muy bueno para mí, pues comencé a leer muy chico y leía todo lo que me llegaba a las manos, que no era poco,

pues mi padre siempre tenía buena lectura a mano, y cuando ya tuve alrededor de 10 años, él mismo se ocupaba de conseguirme libros en la Biblioteca del pueblo; además, cuando tenía esa edad la Escuela se mudó a un nuevo edificio, una de las escuelas que se hicieron durante el primer gobierno de Perón, y allí había casa del Director dentro del mismo predio, lo que me permitió tener siempre a mano la biblioteca de la escuela. En Las Varillas cursé la escuela primaria, en la escuela que dirigía mi padre, y la secundaria, en el Colegio Nacional Dalmacio Vélez Sarsfield, del cual mi padre era también Profesor de Dibujo.

■ 2. MIS ESTUDIOS UNIVERSITARIOS.

En Marzo de 1958, con 16 años y tres meses, ingresé a la Universidad Nacional de Córdoba, para estudiar Bioquímica. Desde chico me habían interesado tanto la Biología como la Química, y por lo tanto

fue una elección lógica, de la cual nunca me arrepentí. Al poco tiempo de mi ingreso se creó el Instituto de Ciencias Químicas, actualmente Facultad de Ciencias Químicas, y gracias a los cambios que tuvieron lugar después de 1955, tuve muy buenos Profesores, de los cuales recuerdo en particular al Dr. Oscar Busciglio, Profesor de Biología, y al entonces Jefe de Trabajos Prácticos, el Dr. Ramón de Torres, que me invitaron a ingresar a su Cátedra como Ayudante en 1959, dando comienzo así a una carrera docente que todavía continúa. Cuando ingresé a la Universidad todavía había que ser Farmacéutico primero (cuatro años) y después cursar dos años mas para ser Bioquímico. Cuando estaba terminando el segundo año se cambió el plan de estudios, y pude cursar la carrera de Bioquímica completa en cinco años, sin necesidad de ser Farmacéutico antes. Alcancé a cursar y aprobar una sola materia de Farmacia, Botánica, que dictaba el Ing. Armando Hunziker, un gran Profesor y

ya muy involucrado en el CONICET, fundado por el Dr. Bernardo Houssay poco antes. La relación con el Ing. Hunziker fue muy importante para mi desarrollo futuro como investigador, pues él, cuando ya estaba por recibirme, me llevó a Buenos Aires y me presentó al Dr. Andrés O. M. Stoppani, quien me aceptó como futuro becario.

Mi experiencia como estudiante en Córdoba fue muy buena en todo sentido. A partir de fines de 1958 me fui a vivir con varios compañeros, primero a una pensión y luego alquilamos una casa en las afueras de Córdoba, donde viví hasta terminar mi carrera. Entre los compañeros de casa estaba el futuro brillante investigador Hugo Maccioni, con quien trabé una gran amistad que todavía se mantiene, aunque ya no nos vemos muy frecuentemente.

Continué siendo Ayudante de la Cátedra de Biología hasta recibirme en Marzo de 1963, y allí el que despertó mi interés por la investigación fue Ramón de Torres, quien me invitó, cuando ya estaba en el cuarto año, a acompañarlo en el Instituto de Virología, donde él trabajaba. Esto fue fundamental para mi decisión de dedicarme a la investigación científica. La Cátedra de Biología fue muy importante para mi futuro, pues no sólo despertó mi vocación docente, probablemente heredada de mi padre, sino que me hizo conocer a una compañera que también era Ayudante, Berta María Franke, con quien me casé en 1966; Hugo Maccioni fué uno de nuestros testigos de casamiento civil. A principios de Febrero celebramos nuestras Bodas de Oro, con nuestras tres hijas, cinco nietos y tres yernos...

Durante esos años también tuve participación en la política estudiantil, y fui en dos oportunidades Secretario General del Centro de Estudian-

tes de Ciencias Químicas, la segunda vez cuando ya estaba en quinto año. Mi interés fue exclusivamente de tipo gremial, y no político, pese a pertenecer a la Unión Reformista Franja Morada, que tenía relación directa con la Unión Cívica Radical del Pueblo. En 1962 integré la Junta Representativa de la Federación Universitaria de Córdoba, como representante de Ciencias Químicas, lo cual fue bastante instructivo para mí y me terminó de convencer de que mi futuro estaba en la investigación y no en la política.

En Marzo de 1963 me recibí de Bioquímico y me trasladé de inmediato a Buenos Aires, donde comencé mi Beca de Iniciación del CONICET en la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Medicina, bajo la dirección del Dr. Stoppani. A fines de ese año recibí mi diploma de Bioquímico, en el acto de Colación de Grados que coincidió con el 350 aniversario de la Universidad Nacional de Córdoba; por esa razón, y por recibirme con promedio 10, tuve el alto honor de que el diploma y la medalla de oro me los entregara el Presidente, Dr. Arturo Illia.

El Dr. Stoppani me dio como tema de trabajo completar la caracterización fisicoquímica de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de levadura, que había sido purificada y caracterizada por el Dr. Joaquin J. B. Cannata, en cuyo laboratorio entré a trabajar, aunque lo conocí más de un año después, pues él estaba haciendo su Beca Postdoctoral en el laboratorio del Dr. Severo Ochoa, en la New York University. Trabajé mucho durante todo el año 1963, pero las cosas no funcionaban ni para atrás ni para adelante; después nos enteramos de que la Compañía Argentina de Levaduras S.A., que nos daba la levadura, había cambiado el método de producción, y aho-

ra la levadura tenía algún cambio en su composición que impedía aplicar el método de purificación desarrollado por Cannata. Por ese entonces leí que el Dr. Merton Utter, en Cleveland, había descubierto otra enzima que llamó carboxilasa pirúvica. Como eso estaba bien relacionado con la línea de fijación de CO₂ que Stoppani había comenzado años antes, pude convencerlo de cambiar mi tema y dedicarme a la carboxilasa pirúvica de levadura como tema de Tesis Doctoral (Cazzulo y Stoppani, 1965, 1967). Eso sí funcionó, pude purificar la enzima y caracterizarla bioquímicamente lo que resultó en la presentación de mi Tesis Doctoral en el Instituto de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, en Octubre de 1966. La Tesis la escribí en muy buena parte en mi departamento, porque en ese año comenzó la dictadura de Onganía y, después de la tristemente célebre Noche de los Bastones Largos, la Facultad de Medicina estuvo clausurada durante por lo menos un mes (ya no recuerdo bien). Por suerte alcancé a llevarme mis papeles de trabajo y los *papers* necesarios para poder trabajar en casa...

Desde el punto de vista humano, los años que trabajé en la Cátedra de Química Biológica (de Marzo de 1963 a Noviembre de 1968) fueron también muy buenos. Cuando ingresé al laboratorio había otros tesistas, uno de ellos Rubén Héctor Vallejos; al año siguiente ingresaron otros dos becarios, Juan Carlos Vidal y Alberto Boveris, y los cuatro nos hicimos muy amigos. Rubén fue el primero en terminar su Tesis y dirigirse a Ámsterdam, para hacer su postdoctorado en el laboratorio del profesor E. C. Slater. Ya habíamos comenzado a hablar de la posibilidad de intentar la creación de un nuevo lugar de trabajo, cuando volviéramos de nuestros postdoctorados, eso se concretaría en 1970, en

la Universidad Nacional de Rosario.

Después de presentar mi Tesis, el Dr. Stoppani me hizo ingresar en la Carrera del Investigador, en el escalón más bajo de todos, por cierto, y por eso seguí en el laboratorio por dos años más, antes de iniciar el postdoctorado. Por ese tiempo entró al laboratorio un joven francés, Maurice Claisse, que había venido (con status diplomático) a trabajar en investigación para cumplir con su servicio militar (curiosa costumbre francesa de esa época...). Stoppani lo puso a trabajar conmigo y nos hicimos amigos; era una gran persona, que desgraciadamente falleció hace ya algunos años. En 1966, poco después de casarme con Berta, sucedió otra cosa muy importante para el futuro de mi investigación: había quedado vacante un cargo técnico en el laboratorio, dirigido por la Dra. Julia Fedorovsky de Boiso, en el cual se empezó a trabajar en la bioquímica del *Trypanosoma cruzi*, y Stoppani me preguntó si Berta podría estar interesada en el cargo. Aceptamos alegremente, y así fue como Berta comenzó a trabajar en Chagas 10 años antes que yo... En 1967 sucedió otra cosa muy importante: el 19 de Mayo nació nuestra primera hija, María Cristina Cazzulo Franke, actualmente Doctora en Bioquímica de la UBA y escultora en cerámica. Pese a eso Berta siguió trabajando, hasta que iniciamos mi postdoctorado en Inglaterra.

■ 3. EL PERÍODO POSTDOCTORAL EN INGLATERRA.

A mediados de la década del '60 un joven investigador inglés, Hans Kornberg, había propuesto el concepto de reacciones anapleróticas, que son aquéllas que sirven para la reposición de metabolitos que son utilizados para diferentes vías metabólicas. Una de las primeras reacciones de este tipo identificadas

era justamente la catalizada por la carboxilasa pirúvica, que permite reponer el oxaloacetato esencial para el funcionamiento del Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos, y que es utilizado para transformarlo en L-aspartato, que tiene diversas funciones metabólicas. Decidimos con Stoppani escribirle a Hans, que había descubierto el Ciclo del Glioxilato trabajando con Sir Hans Krebs, y era el Profesor Titular mas joven de Inglaterra, en la Universidad de Leicester, para ver si podía ir a trabajar en su laboratorio. Me aceptó, y allí partimos, a fines de Noviembre de 1968, Berta, Cristina y yo, como becario externo del CONICET. Antes de eso había hecho a marchas forzadas los cursos de la Cultural Inglesa, que me sirvieron de mucho, aunque al llegar a Londres comprobé que a los únicos que podía entender bien sería a Sir Lawrence Olivier o a Sir Michael Redgrave... Cumplí 27 años en Londres y seguimos viaje para Leicester, donde me presenté a Hans y tuve la agradable sorpresa de que también había llegado hacía muy poco tiempo, en año sabático, Merton Utter, el descubridor de la carboxilasa pirúvica y una gran autoridad en gluconeogénesis. Hans me presentó a Trichur Krishna Sundaram, un investigador indio, originario de Madrás y que había hecho ya un postdoctorado en Estados Unidos, y me puso a trabajar con él sobre la carboxilasa pirúvica de *Bacillus stearothermophilus*, una bacteria termófila moderada. Pude purificar la enzima hasta homogeneidad proteica y caracterizarla bioquímicamente, en particular sus propiedades regulatorias. La carboxilasa pirúvica es una de las enzimas que utilizan la vitamina biotina, unida covalentemente como grupo prostético. En esa época se sabía muy poco acerca del proceso enzimático que llevaba a la incorporación de la biotina al futuro sitio activo de la apoenzima. Como había de-

mostrado que la acetil-CoA activaba alostéricamente a la enzima, y esta activación era contrarrestada por el L-aspartato, razonamos que, dado que el efecto alostérico debería implicar un cambio conformacional en el sitio activo de la proteína, podría ser que la acetil-CoA también fuera requerida para la incorporación de la biotina. Esto resultó correcto, y nos permitió dilucidar el mecanismo de la reacción de incorporación de la biotina a la apoenzima por la holoenzima sintetasa, y su regulación. Esto resultó en la publicación de dos trabajos en *Nature* (Cazzulo y col., 1969, 1970), de los que fui primer autor, y otros en *Biochemical Journal* y *Proceedings of the Royal Society of London* (Hans Kornberg ya era entonces *Fellow of the Royal Society*). En total, el año y diez meses que permanecimos en Leicester fueron la etapa más productiva de mi carrera, pues resultaron en la publicación de ocho trabajos en revistas de primer nivel.

Mientras estábamos en Leicester me mantuve en contacto con Rubén Vallejos, quien había seguido activamente la idea de instalar un nuevo grupo de investigación. En esa época no había investigación bioquímica en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, y se había formado una comisión integrada por los Dres. Luis F. Leloir, Alejandro C. Paladini y Carlos Gómez, para intentar el establecimiento allí de un grupo de investigación. Varios Profesores de la Universidad de Buenos Aires viajaban periódicamente a Rosario para dictar las clases teóricas de las dos materias cuatrimestrales, Química Biológica I y II. Rubén entró en tratativas con la comisión, y como resultado fuimos nombrados, a fines de 1969, él como Profesor Titular y yo como Profesor Asociado. Esto forzó mi regreso anticipado a la Argentina, en Septiembre de 1970,

sin completar los dos años de beca, para comenzar a dictar clases de intermediato.

■ 4. EL DESARROLLO DE LA QUÍMICA BIOLÓGICA EN ROSARIO.

A fines de 1970 se llevaron a cabo nuestros concursos para los cargos que ocupábamos interinamente y comenzamos a organizar el Departamento de Química Biológica (que después de algunos años pasó a ser el CEFBI, dependiente de la UNR y del CONICET), y a formar nuestros grupos de investigación, que, dadas las diferentes temáticas en que Rubén y yo estábamos formados, serían independientes. Estando todavía en Inglaterra, me había enterado de la existencia de bacterias capaces de vivir y proliferar en presencia de concentraciones salinas absurdamente altas (5 M NaCl...), las halófilas extremas. En esa época no se sabía casi nada (había un solo ejemplo en la literatura) de la posible regulación alostérica de la actividad de sus enzimas, que en general requerían concentraciones de 3 a 4 M KCl (la concentración salina intracelular...) para ser estables y activas. Estudiar estas enzimas me pareció un desafío interesante, y decidí comenzar con ese tema mi trabajo como investigador independiente (aunque todavía el Dr. Stoppani era mi jefe ante el CONICET, debido a mi posición en la Carrera del Investigador). Así que le escribí a uno de los investigadores cuyos trabajos había consultado, el Dr. D.J. Kushner, de la Universidad de Ottawa, Canadá, y le pedí que me enviara una cepa de *Halobacterium cutirubrum*, que era probablemente la halófila extrema más estudiada hasta entonces. Por la misma época, hablando con el Dr. Raúl Trucco me enteré de que había aislado una cepa de *Pseudomonas* marina, que era psicrófila (criófila), y crecía bien a 20°C. Me interesó y se la solicité, recibéndola de inme-

diato. Los primeros trabajos que publicamos, que dirigí y escribí solo, fueron cuatro, publicados en 1972, dos en *Journal of Bacteriology* y dos en *FEBS Letters*, (Cazzulo y Vidal, 1972; Cazzulo y Massarini, 1972; Vidal y Cazzulo, 1972a, 1972b) con mis primeras colaboradoras, María Cristina Vidal y Esther Massarini, dos trabajos con cada microorganismo, referentes a enzimas fijadoras de CO₂, en particular a la enzima málica. Poco después se agregó al grupo una tercera colaboradora, Azucena Higa, y agregamos al repertorio enzimático la citrato sintasa, que estudiamos en los mismos organismos. También incorporamos otra bacteria, una halófila moderada, *Vibrio costicola*, capaz de crecer en presencia de concentraciones medianas de NaCl (0.5 a 3.5 M; la crecíamos en medio rico con NaCl 1 M); también nos la envió Kushner. Estudiamos en esta bacteria enzimas como la ATPasa y la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica. Los estudios efectuados sobre estas enzimas durante los casi diez años que trabajé en Rosario demostraron claramente que las enzimas halofílicas podían estar reguladas alostéricamente, y, en el caso de las citrato sintasas, demostramos dos cosas interesantes: 1) la de la halófila extrema, que en ese entonces se consideraba una bacteria Gram negativa, presentaba propiedades (peso molecular y regulación) similares a las de Gram positivas y eucariotes (Cazzulo, 1973); esto pudo explicarse poco después, cuando Woese propuso la existencia de un nuevo Reino, el de las Arqueobacterias, ahora llamadas Arqueas, que presentan algunas características intermedias entre las bacterias y los eucariotes. 2) la citrato sintasa de la *Pseudomonas* marina presentaba dos formas, con diferente peso molecular y regulación, que podían interconvertirse por asociación o disociación; una, que llamamos CS I, era similar a las de Gram positivas

y eucariotes, y la otra, la CS II, era similar a las de bacterias Gram negativas (Massarini y Cazzulo, 1975).

En 1976 decidí comenzar una nueva línea de investigación, que era una asignatura pendiente desde que Berta comenzó a trabajar con *T. cruzi*: el estudio de diversas enzimas del parásito, cuya bioquímica era muy poco conocida en esa época. Como no nos era posible cultivar en el Departamento de Química Biológica un patógeno como *T. cruzi*, entré en contacto con la Dra. Elsa Segura, a quien conocía desde mis años de estudiante en la Universidad de Córdoba, y en ese momento era la Jefa del Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén" (actualmente Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chabén", conocido vulgarmente como "el Fatala"). Elsa estuvo muy contenta de saber que quería entrar a trabajar con el *T. cruzi*, y me ofreció darme cantidades no muy grandes de la forma de cultivo del parásito, llamada epimastigote, que es equivalente a la que prolifera en el intestino de la vinchuca infectada. Así que empecé a viajar periódicamente a Buenos Aires para llevarme los preciosos epimastigotes. Mi primera tesista rosarina en el tema fue Silvia Marina Juan, con quien purificamos hasta homogeneidad proteica y caracterizamos bioquímicamente la glutamato dehidrogenasa NADP dependiente (GluDH-NADP), que de hecho fue la primera enzima purificada hasta ese grado de pureza de este parásito, y lo hicimos por métodos convencionales de la época a partir de 1 gramo de epimastigotes, ayudados por la abundancia de la enzima en la célula y su considerable estabilidad (Juan y col., 1978). Hasta comienzos de 1980 seguimos trabajando, parte de mi grupo con bacterias y parte en la

nueva línea de trabajo. En esos años sucedieron varias cosas muy importantes: 1) la Dra. Julia Boiso renunció a dirigir el laboratorio de Chagas en la Cátedra del Dr. Stoppani, y este me ofreció dirigirlo. Acepté, manteniendo mi cargo en Rosario con dedicación simple y todo el año 1977 estuve viajando a Buenos Aires, quedándome en la casa de mis padres tres días por semana. Esto fue bastante cansador, pero resultó muy provechoso para mí, entre otras cosas porque Stoppani puso a trabajar conmigo a un joven Doctor en Odontología, Alberto Carlos Frasch, que, terminada su Tesis Doctoral dirigido por el Dr. Rómulo Cabrini en la CNEA, quería iniciarse en investigación bioquímica. Con Frasch iniciamos el estudio de la ATPasa mitocondrial de epimastigotes de *T. cruzi*, que originó dos publicaciones (Frasch y col., 1978a y b). Además, durante esos viajes iniciamos una colaboración con Joaquín Cannata, que todavía, casi 40 años después, continúa. 2) Berta comenzó a trabajar de nuevo, con *T. cruzi*, en Rosario, como miembro de la Carrera del Personal de Apoyo del CONICET, en mi grupo de investigación. 3) En 1979 el Director fundador del Fatala, Dr. José Alberto Cerisola, uno de los más grandes pioneros de la investigación en Chagas en la Argentina, renunció y Elsa, que pasó a ser la Directora, me invitó a volver a Buenos Aires como Jefe del Departamento de Investigación. Acepté, y volvimos, con Berta y ya con tres hijas, las dos menores rosarinas, en Marzo de 1980.

Los años pasados en Rosario fueron para mí muy positivos, pese a las notorias vicisitudes políticas de la década del '70, que sin duda fueron lo suficientemente desgastantes como para contribuir significativamente a mi decisión de volver a Buenos Aires, además del interés científico...

■ 5. DE VUELTA EN BUENOS AIRES.

Ya instalado en el Fatala, desde mi oficina del 5° piso, con la ayuda de Berta y de dos de mis colaboradoras rosarinas que decidieron acompañarnos, y contando con total apoyo de Elsa Segura, comencé a armar un grupo de investigación bioquímica; hasta entonces el trabajo de Elsa y sus colaboradores se había referido a antígenos del *T. cruzi*, importantes para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Uno de los problemas que tenía la producción de los mismos era su inestabilidad, que me sugirió la posible contaminación con proteinasas que los podrían degradar. Por ese entonces, había sólo un trabajo, publicado por un conocido investigador brasileño, el Dr. Erney Camargo, sobre actividades proteolíticas en extractos crudos de epimastigotes. Decidí ensayar la posible autoproteólisis en extractos obtenidos por el mismo procedimiento usado para aislar los antígenos, a diferentes valores de pH y en presencia de posibles activadores e inhibidores, siguiendo condiciones similares a las determinadas por Camargo. Los resultados indicaron que una de esas actividades, con un pH óptimo ácido, alrededor de 3 a 5, era la candidata más probable para los efectos observados (Cazzulo y Franke de Cazzulo, 1982). Purificamos hasta homogeneidad y comenzamos su caracterización bioquímica (Bontempi y col., 1984), ya con la colaboración de un joven biólogo, Esteban Bontempi, de esa proteínasa que años después llamé cruzipaína. Continuamos trabajando con otras enzimas, y estudiamos también, en colaboración con Joaquín Cannata, la producción y excreción de productos reducidos del catabolismo de la glucosa (Cazzulo y col., 1985; Engel y col., 1987), en el proceso que más de 20 años antes el pionero de la bioquímica de parásitos, Theodor von Brand, había llamado, para di-

versos parásitos, "fermentación aeróbica de la glucosa". Si bien el trabajo en el Fatala era gratificante, mi posición como Jefe del Departamento de Investigación me hacía en la práctica equivalente a Sub-Director del Instituto (cargo que en ese entonces no existía) y ello comenzó a implicar una carga burocrática cada vez más pesada. Seguía colaborando con Cannata y Frasch, y comencé a trabajar también en conexión con otro joven investigador en la Facultad de Medicina, el Dr. Roberto Docampo, con quien hemos mantenido una muy fructífera relación a lo largo de los años. A raíz de un seminario que dicté en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar (hoy Fundación Instituto Leloir), Armando J. Parodi se interesó en el parásito. Comenzamos entonces una colaboración que llevó a la dilucidación de la síntesis de glicoproteínas en el *T. cruzi* y otros trypanosomátidos (Parodi y col., 1981; Parodi y Cazzulo, 1982), y al descubrimiento por Parodi de la glucosilación transitoria de las glicoproteínas de alta manosa, proceso fundamental para el control de calidad de las mismas en el lumen del retículo endoplásmico.

Al poco tiempo de mi regreso a Buenos Aires el Dr. Stoppani se jubiló y dejó la Cátedra de Química Biológica de Medicina, pasando a dirigir el CIBIERG, un Instituto del CONICET y la Facultad, en el Piso 16. A fines de 1982 se llamó a concurso el cargo de Profesor Titular que había quedado vacante, y decidí presentarme. Éramos tres postulantes, y el Consejo Directivo designó un jurado integrado por tres Profesores, ninguno de los cuales tenía relación con la Química Biológica. Esto provocó una reacción de las autoridades de las Facultades de Farmacia y Bioquímica y Ciencias Exactas y Naturales, que llevó finalmente a la incorporación al jurado de los Dres.

Luis F. Leloir y Alejandro C. Paladini. El concurso se llevó a cabo y dio un resultado inesperado: uno de los otros candidatos y yo tuvimos dos votos cada uno, y el tercero un voto, con lo cual había un empate que el Consejo Directivo debía definir de alguna manera. Eso llevó casi todo el año 1983, y fue emocionalmente muy desgastante; algunos decían que la decisión final dependería del resultado de las elecciones presiden-

ciales a fines de ese año, y, para bien de la Argentina, ganó el Dr. Raúl Alfonsín. De inmediato, el Consejo Directivo de la Facultad de Medicina declaró desierto el concurso...

El año siguiente comenzamos a hablar con Parodi y con Frasch acerca de la posibilidad de que tanto Frasch como yo pudiéramos ingresar a Campomar, que ya estaba instalado en el nuevo edificio de

Parque Centenario. A Parodi le llevó un tiempo convencer a los cuerpos directivos de Campomar, pero finalmente, con el apoyo del Dr. Leloir, Frasch se mudó a Parque Centenario y Berta y yo a los laboratorios que Campomar había conservado en el edificio de Obligado y Monroe. Esto se debió a que algunos de los directivos de Campomar no estaban de acuerdo con que trabajáramos con patógenos en el nuevo Institu-

Cuadro 1: La Cruzipaina

Nuestro grupo purificó en 1984 la enzima a partir de epimastigotes (forma replicativa en el insecto vector y cultivable con facilidad en medio axénico) de la cepa Tul2; en 1990 la denominé cruzipaina, para indicar que se trata de una cisteína proteinasa de la familia de la papaína (C1) que se encuentra en este parásito. A lo largo de las décadas del 80 y el 90 determinamos la secuencia de uno de los genes que la codifican (1992), sus propiedades bioquímicas, en particular su especificidad de sustrato, algunos rasgos estructurales, y nos orientamos hacia posibles funciones de la enzima.

A comienzos de la década del 90 Julio Scharfstein, en Río de Janeiro, identificó a la cruzipaina con el antígeno GP57/51 que estaba estudiando, y comenzó estudios que llevaron a su caracterización como un factor de virulencia del parásito, al demostrar que la enzima es capaz de producir bradiquinina a partir del quinínogeno, y ésta favorece la penetración del trypomastigote (forma no replicativa e infectiva del parásito) en la célula huésped. Estos estudios llevaron a considerar a la cruzipaina como un factor de virulencia del parásito.

James McKerrow, en San Francisco, determinó en 1992 la secuencia de un gen codificante de la enzima y expresó en *Escherichia coli* una forma truncada de la misma (cruzain Δ c), cuya estructura 3D determinó más tarde en colaboración con Charles Craik. Luego enfocó sus estudios particularmente al desarrollo de inhibidores, que puedan ser compuestos líderes para el desarrollo de drogas.

La cruzipaina es una proteína muy abundante en los epimastigotes, y está codificada por un número elevado de genes colocados en tándem (alrededor de 130 en Tul2). Su estructura consiste en una parte catalítica, altamente homóloga con la cathepsina L y la papaína, y un dominio C-terminal (C-T), presente sólo en tripanosomátidos. La enzima se expresa como una mezcla de isoformas, que dan microheterogeneidad en cromatografía de intercambio iónico, RP-HPLC, IEF, SDS-PAGE. Presenta diversas modificaciones post-traduccionales (N-glicosilación, sólo de alta manosa en la parte catalítica y oligosacáridos de alta manosa, híbridos monoantennarios o complejos biantennarios en el único sitio de N-glicosilación del C-T); O-glicosilación, en el C-T (N-acetilglucosamina); ácido siálico y/o fucosa, en el C-T; sulfatación en la cadena de alta manosa, en el C-T).

La enzima se expresa en los cuatro estadios principales, a diferentes niveles. En los epimastigotes se encuentra en los reservosomas, organelas de tipo lisosomal. En los amastigotes, la forma intracelular en el mamífero, se expresa en la superficie del parásito, además del sistema lisosomal. Los trypomastigotes son capaces de secretarla al medio. Es un antígeno inmunodominante en chagásicos crónicos, y su inmunogenicidad reside en el C-T. Entre las funciones propuestas para la cruzipaina están la digestión de proteínas endocitadas; su participación en la diferenciación del epimastigote a trypomastigote metacíclico, la forma infectiva natural; su participación en la penetración del trypomastigote en la célula de mamífero; es capaz de degradar las inmunoglobulinas liberando el fragmento Fc, por lo cual se ha sugerido que podría participar en un mecanismo de "fabulación", involucrado en la protección contra el sistema inmune del hospedador mamífero.

Desde los primeros estudios, realizados por los grupos de McKerrow, Scharfstein y el nuestro, que demostraron que diversos inhibidores eran capaces de interferir con el ciclo de vida del parásito y eventualmente matarlo, diversos grupos de investigadores han desarrollado inhibidores más potentes y más específicos de la enzima, con la finalidad de obtener una nueva droga contra la enfermedad de Chagas.

Más información puede encontrarse en Cazzulo (2012) y en Alvarez y col. (2012).

to, pero finalmente sus objeciones se levantaron y pudimos instalarnos en el nuevo edificio, en el 3er. Piso, que por entonces estaba muy poco ocupado.

Ya en Campomar, continuamos algunos estudios sobre el catabolismo de la glucosa, incluyendo la caracterización de las propiedades regulatorias de la piruvato quinasa de *T. cruzi* (Cazzulo y col., 1989) y estudios de NMR llevados a cabo con ¹³C-glucosa (Frydman y col., 1990), en colaboración con los Dres. Benjamin Frydman y Joaquín Cannata, pero a partir de 1986 buena parte de nuestros esfuerzos se concentraron en la cruzipaína (Cazzulo y col., 1990; ver Cuadro 1). Una parte importante de estos estudios dio como frutos las Tesis Doctorales de Javier Martínez, actualmente jefe de un grupo de investigación en Viena, Austria, y de Carlos Labriola (co-dirigido con Armando Parodi), actualmente en la FIL.

Con la vuelta de la democracia en 1983, una institución sueca de cooperación internacional, SAREC, comenzó a explorar la posibilidad de hacer un convenio bilateral con la entonces Secretaría de Ciencia y Tecnología. Este convenio, que fue firmado y comenzó a ejecutarse en 1986, incluía apoyo a las investigaciones sobre varios temas importantes en Salud, entre ellos la Enfermedad de Chagas, y permitía cubrir, con fondos suecos, el viaje y la estadía en Suecia de científicos argentinos, por tiempos limitados. Así comenzó, en nuestro caso en 1987, una muy fructífera colaboración entre mi grupo y el de Frasch con los Dres. Ulf Pettersson y Lena Aslund, del *Department of Medical Genetics, University of Uppsala*, y el Dr. Ulf Hellman y el Ing. Christer Wernstedt, del *Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala Branch*. Con los primeros, pudimos clonar

y secuenciar un gen que codifica a la cruzipaína (hay alrededor de 130 genes en la cepa del parásito que utilizábamos para purificarla, Campetella y col., 1992), y con los segundos efectuar estudios de química de proteínas que fueron esenciales para completar la caracterización bioquímica de la enzima (Cazzulo y col., 1989). Estas colaboraciones permitieron acelerar considerablemente nuestros trabajos, empleando equipos por entonces inexistentes en la Argentina, como un secuenciador automático de péptidos aplicando el reactivo de Edman. De hecho, la instalación del LANAIS Pro del CONICET en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, con la dirección del Dr. José A. Santomé, se vio muy beneficiada por la colaboración con Ulf Hellman, quien recibió en su laboratorio, aconsejó y ayudó a entrenar al personal que operaba el secuenciador. Los lazos que se crearon entre nuestros grupos y los otros involucrados en estudios relacionados con Chagas, en Campomar los de los Dres. Israel Algranati y Armando Parodi y en el Fatala el de Elsa Segura, así como de investigadores chilenos y uruguayos, con los investigadores suecos, permitieron que, al terminar la colaboración binacional, se creara el *Network for Research and Training in Parasitic Diseases in the Southern Cone of Latin America*, financiado íntegramente con fondos suecos, que incluyó a investigadores de Argentina, Chile, Uruguay, Paraguay, Perú, Bolivia y el estado brasileño de Rio Grande do Sul; actué como Coordinador Regional de esta Red desde Julio de 1995 hasta Diciembre de 2001.

Mi experiencia de los 11 años que permanecimos en la entonces Fundación Campomar fue sumamente positiva, desde todo punto de vista, y me permitió desarrollar estudios e interactuar con investigadores, que en otro sitio hubieran sido

mucho más difíciles.

A fines de 1995 el Rector Organizador de la entonces muy recientemente fundada Universidad Nacional de General San Martín (UNSAM), Daniel Malcolm, invitó a Carlos Frasch y a Rodolfo Ugalde a formar un Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB). Yo me sumé a la empresa, haciéndome cargo de la organización docente (con la designación de Director Docente), que incluiría desde el comienzo la implementación de una Licenciatura en Biotecnología y un Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología. Ya en 1996 comencé a dictar clases de Química Biológica, viajando desde Parque Centenario; en Abril de 1997 los tres grupos de investigación, los de Frasch, Ugalde y el mío, nos mudamos al nuevo edificio, terminado unos meses antes, adaptando un galpón quonset de la Segunda Guerra Mundial; la estructura, ubicada en el predio del INTI, donde se encontraban instalados los quonsets desde la época en que toda esa zona era del Ejército Argentino, fue adaptada por dos jóvenes arquitectos de la UNSAM, que ganaron premios por su diseño arquitectónico. Parte del equipamiento lo adquirimos a través de un Proyecto FOMECA, que coordiné. Un segundo Proyecto FOMECA nos permitió renovar y unir al edificio original un segundo quonset, en el que se instalaron mi grupo de investigación y el de Armando Parodi, que se nos sumó poco antes, y permaneció con nosotros hasta su regreso a la Fundación Instituto Leloir. La organización del nuevo Instituto no fue una tarea fácil, pero sí muy gratificante en todo sentido; la habilitación del segundo edificio permitió la constitución de nuevos grupos de investigación, inicialmente los dirigidos por investigadores formados en los grupos de Frasch y Ugalde. Fernán Agüero presentó su Tesis Doctoral en la FCEyN, UBA,

dirigida por mí e iniciada en Campomar, sobre la caracterización de las malato dehidrogenasas del helminto parásito *Echinococcus granulosus*, causante de la hidatidosis (Agüero y col., 1995, 2004), y más adelante formó un excelente grupo de Bioinformática en nuestro Instituto.

A partir de 2008 y gracias sobre todo a la iniciativa y esfuerzos de Rodolfo Ugalde, se comenzó la construcción de un nuevo edificio para el IIB, en el Campus Miguelete de la UNSAM, al que el Instituto se mudó a mediados de 2012. Esta mudanza significó un gran avance para el IIB, al aumentar significativamente el espacio disponible, lo que permitió incorporar nuevos grupos de investigación, y hacer más fluida la relación con el Rectorado y las otras Unidades Académicas de la UNSAM.

La prematura muerte de Rodolfo en 2009 fue un gran golpe para todos nosotros, pero el Instituto, que ahora lleva con orgullo su nombre, siguió adelante y honra su memoria.

El trabajo de mi grupo continuó con estudios complementarios sobre la cruzipaína, que incluyeron la expresión de la enzima recombinante completa, con su dominio C-terminal (ver Cuadro 1), expresada en un sistema de células de insecto y baculovirus (Álvarez y col., 2002); este trabajo constituyó la primera parte de la Tesis Doctoral de Vanina Eder Álvarez, actualmente investigadora del CONICET y Co-Directora conmigo de nuestro grupo de investigación. También se efectuaron estudios ulteriores sobre los carbohidratos unidos a la molécula de cruzipaína nativa, con la Dra. Vilma Duschak, de mi grupo, y las Dras. Rosa Muchnik de Lederkremer y Alicia Couto, de la FCEyN, UBA (Barboza y col., 2003, 2005).

Desde 1988 he mantenido una muy productiva colaboración con la Dra. Cristina Nowicki, del IQUIFIB (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET), en la que participó inicialmente el Dr. José Alberto Santomé. Esta colaboración incluyó estudios sobre la GluDH NADP de *T. cruzi*, las malato dehidrogenasas, las enzimas málicas NADP-dependientes, las isocitrato dehidrogenasas NADP-dependientes y varias aminotransferasas de varios Trypanosomátidos, así como la dilucidación del catabolismo de aminoácidos aromáticos en *T. cruzi* (Nowicki y Cazzulo, 2008).

Nuestros estudios sobre peptidasas adquirieron mayor impulso y diversificación, sobre todo después de nuestra mudanza a la UNSAM. Así se purificó y caracterizó una serina carboxipeptidasa (Parussini y col., 2003), que dio origen a la Tesis Doctoral, iniciada en Campomar y terminada en la UNSAM, de Fabiola Parussini. Vanina Álvarez, conjuntamente con un becario esloveno, Gregor Kosec, me convenció de iniciar el estudio de las metacaspasas de *T. cruzi*, cisteína proteinasas muy diferentes de la cruzipaína (Kosec y col., 2006); este tema, cuya parte inicial fue la segunda parte de la Tesis de Vanina, sigue siendo actualmente uno de los temas principales de nuestro grupo; también resultó en la Tesis Doctoral de un joven biólogo suizo francés, Marc Laverriere, con la dirección de Vanina y mi co-dirección (Laverriere y col., 2012). Vanina también me convenció de atacar otro tema que incluía proteinasas, el proceso de autofagia, del cual no se conocía prácticamente nada en el parásito, y que incluía dos cisteína proteinasas, las autofaginas. Este tema fue llevado adelante por Vanina y Gregor, y resultó en la Tesis Doctoral de Gregor, presentada en Ljubljana, co-dirigido por el Director del *Jozef Stefan Institute*, Dr.

Vito Turk, y por mí (Álvarez y col., 2008 a, b). Pero todo esto no fue aún suficiente para Vanina, que me convenció de iniciar estudios sobre la SUMOilación de proteínas en *T. cruzi*, pues el SUMO, proteína reguladora similar a la ubiquitina, debe ser procesado proteolíticamente por una cisteína proteinasa específica para ser activo. Este tema resultó en la Tesis Doctoral de Julio Bayona, dirigida por Vanina y co-dirigida por mí (Bayona y col., 2011). El tema de SUMOilación se extendió al parásito causante de la Enfermedad del Sueño en África, el *Trypanosoma brucei*, que posee características que lo hacen mucho más sencillo para trabajar comparado con *T. cruzi* y ya resultó en la Tesis Doctoral de una excelente joven colaboradora, Paula Iribarren, también dirigida por Vanina y co-dirigida por mí (Iribarren y col., 2015 a, b).

Otra adición muy importante al repertorio de peptidasas que estudiamos fueron las metalocarboxipeptidasas pertenecientes a la familia M32, presentes en *T. cruzi* y en *T. brucei*, que no presentan ortólogos en eucariotes, salvo unas pocas algas unicelulares, y constituyen por eso un blanco prometedor para el desarrollo de agentes quimioterápicos. Este tema resultó en la Tesis Doctoral de Gabriela Niemirowicz, dirigida por mí, y en la de Alejandra Frasch, dirigida por Gabriela y co-dirigida por mí (Niemirowicz y col., 2007, 2008; Frasch y col., 2012). Más información sobre todas estas enzimas se incluye en el Cuadro 2.

Desde 2000 incorporamos, a través de un proyecto financiado por la Unión Europea y coordinado por el Dr. Michael Barrett, de la *University of Glasgow*, Escocia, un nuevo tema de estudio, relacionado también con el metabolismo de la glucosa: el estudio de la vía de las pentosas fosfato, tanto en *T. cruzi*

Cuadro 2. Otras peptidasas estudiadas por nuestro grupo.**1) Otras cisteína peptidasas:**

a) Metacaspasas: Las metacaspasas son homólogos lejanos de las caspasas. Fueron descritas *in silico*, por homología, y se las clasificó en el Clan CD, familia C14. Se las encuentra en plantas, hongos y protozoarios, cuyos genomas no predicen la existencia de caspasas verdaderas, presentes en los animales. El genoma de *T. cruzi* predice dos metacaspasas, que denominamos TcMCA3 y TcMCA5, por homología con las proteínas correspondientes presentes en *T. brucei*, que tiene 5. Tienen una especificidad de sustrato muy diferente de la de las verdaderas caspasas, que clivan proteínas en residuos de ácido aspártico, en tanto que la metacaspasas lo hacen en arginina o lisina. Hemos demostrado que pueden cumplir funciones múltiples en el parásito, estando involucradas en muerte celular programada y en el control del ciclo celular. Recientemente hemos podido identificar un sustrato proteico de la TcMCA5, una proteína homóloga a la *DNA damage inducible protein* (Ddi1) de levadura, que contiene un dominio de aspartil peptidasa, similar a la proteinasa del HIV. Hemos demostrado que la TcMCA5 es capaz de clivar esta proteína en un residuo de arginina, y hemos desarrollado sustratos sintéticos basados en la secuencia del sitio de corte, que podrían permitirnos desarrollar inhibidores específicos de esta enzima.

b) Autofaginas: La autofagia es un proceso mediante el cual porciones del citoplasma se encierran en vesículas de doble membrana, llamadas autofagosomas, que se fusionan con el lisosoma permitiendo así la degradación y el reciclado de las macromoléculas presentes. Esta vía, si bien opera en condiciones normales, se activa ante diferentes tipos de estrés, y participa también en el remodelamiento celular durante el desarrollo y la diferenciación celular. La formación de los autofagosomas involucra dos sistemas de conjugación de proteínas, que incluyen a dos proteínas similares a ubiquitina, Atg12 y Atg8, así como las enzimas activadoras de las mismas. Hemos demostrado que la maquinaria de conjugación de Atg8 es funcional en *T. cruzi*, caracterizando dos isoformas de TcAtg8 y dos enzimas activadoras, las autofaginas (TcAtg4), demostrando también la participación del proceso autofágico en la metacicloogénesis, el proceso por el cual los epimastigotes se transforman, al final del tubo digestivo de la vinchuca, en trypomastigotes metacíclicos, la forma infectiva natural.

c) Sistema de SUMOilación de proteínas en *T. cruzi* y en *T. brucei*: Además de los sistemas de ubiquitinación, ligado al proteasoma, y de Atg8 implicada en la autofagia, existen otras proteínas que siguen un procesamiento similar, en este caso con finalidades regulatorias. Una de ellas es la denominada SUMO (Small Ubiquitin-like MODifier), que debe ser procesada de manera similar a la ubiquitina y a Atg8, y luego liberada de la proteína a la cual se unió, pues el proceso es reversible. Ambos procesos son efectuados, como en el caso de Atg4 y Atg8, por una cisteína proteinasa, perteneciente al Clan CE, familia C48. Los genomas de *T. cruzi* y *T. brucei* predicen la existencia de una proteína SUMO y de una proteinasa activante/deSUMOilante, de modo que estos sistemas serían apreciablemente más simples que el presente en las células de mamífero. Hemos caracterizado recientemente el sistema de SUMOilación en ambos parásitos, identificado blancos fisiológicos de esta modificación post-traducciona, y obtenido un sistema de SUMOilación de proteínas *in vivo*, expresando las enzimas activadoras y la proteína SUMO de *T. brucei* en *Escherichia coli*.

2) Serina carboxipeptidasa: Hemos descrito y caracterizado bioquímicamente a la serina carboxipeptidasa (TcSCP) perteneciente al clan SC, familia S10 presente en *T. cruzi*. La enzima, que expresamos como proteína recombinante en el sistema baculovirus/células de insecto, es una glicoproteína presente en los reservosomas (sistema lisosomal de los epimastigotes), donde coexiste con la cruzipaina, que presumiblemente sería la enzima que activa proteolíticamente a la TcSCP, liberando su pro-dominio.

3) Metalocarboxipeptidasas: Hemos demostrado y caracterizado en *T. cruzi* dos metalocarboxipeptidasas, TcMCP1 y TcMCP2, homólogas a la carboxipeptidasa de *Thermus aquaticus*, estudiando su localización subcelular, especificidad de sustrato y obteniendo la estructura 3D de la TcMCP1, que nos permitió identificar los residuos involucrados en la unión del sustrato y en la catálisis. Ambas enzimas tienen diferente especificidad de sustrato, y la información estructural obtenida nos permitió intercambiar sus especificidades, empleando mutagénesis sitio dirigida. Más recientemente caracterizamos el ortólogo de TcMCP1 presente en *T. brucei* (TbMCP1), y efectuamos estudios noqueando el gen que la codifica o disminuyendo su expresión en el parásito por la técnica de RNAi, con resultados que sugieren una participación importante en la regulación del ciclo celular. Debe destacarse que estas enzimas, pertenecientes al clan MA, familia M32, de las metalopeptidasas, se han demostrado hasta ahora en bacterias, Arqueas y trypanosomátidos, y están ausentes en todos los genomas eucarióticos secuenciados hasta ahora, lo cual las sugiere como posibles blancos para quimioterapia.

Más información sobre estas enzimas puede encontrarse en Álvarez y col. (2012) e Iribarren y col. (2015 a y b).

como en *Leishmania mexicana*. Pudimos demostrar la presencia de las siete enzimas de la vía y su funcionalidad en ambos parásitos (Maugeri y col., 2003; Maugeri y Cazzulo, 2004), lo cual constituyó la segunda parte de la Tesis Doctoral de Dante Maugeri, co-dirigida con Joaquín Cannata. La incorporación de Mariana Igoillo Esteve en 2000 resultó en su Tesis Doctoral, que consistió en la purificación y caracterización bioquímica y funcional de las dos dehidrogenasas de la vía, la glucosa 6-fosfato dehidrogenasa y la 6-fosfogluconato dehidrogenasa (Igoillo Esteve y Cazzulo, 2004, 2006). Luego Ana Laura Stern presentó su Tesis Doctoral sobre la expresión recombinante, caracterización bioquímica y determinación de la estructura 3D por cristalografía de rayos X, de la ribosa 5-fosfato isomerasa (Stern y col., 2007, 2011) y la transaldolasa; actualmente la Lic. Soledad González está terminando su Tesis Doctoral, co-dirigida por Dante Maugeri y por mí, sobre las dos isoformas de la ribulosa 5-fosfato epimerasa (ver Cuadro 3).

■ 6. OTRAS ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA INVESTIGACIÓN.

Además de mis tareas docentes y de investigación, he tenido una participación bastante activa en Sociedades Científicas y en la organización de Congresos y reuniones científicas. Fui Presidente de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), entre 1989 y 1991, y Presidente de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias (SAP), entre 1984 y 1986. Además fui miembro del Comité Coordinador del Foro de Sociedades Científicas Argentinas, como representante de la SAIB, desde 1989 hasta 1993. También representando a la SAIB fui miembro del *Executive Committee* de la *Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology* (PABMB, miembro de la IUBMB), como *Secretary-General* (1997 a 1999); *Vice-Chairman* (2000 a 2002); *Chairman* (2003 a 2005), y *Past-Chairman* (2006 a 2008). Todas estas experiencias fueron muy enri-

quecedoras, aunque también significaron en algunos casos un considerable insumo de tiempo...

■ 6. AQUÍ Y AHORA.

Estamos en el Año del Señor 2016. Lo empecé cumpliendo 50 años de casado con Berta, lo seguiré en Octubre con el cincuentenario de la presentación de mi Tesis Doctoral y lo casi terminaré con mi cumpleaños 75, cuando, según digo algo irreverentemente, el CONICET te da la despedida final... ¿Qué me queda por hacer? Ya no recibo becarios o tesis, como no sea como co-Director, pues por una parte debo reconocer que puedo no estar aquí para cuando la Tesis termine, y por otra parte, considero esencial que alguien de mi edad promueva, tanto como le sea posible, la carrera científica de sus discípulos. Porque los tengo, y muy buenos. Hace ya algún tiempo que no firmo publicaciones como primero o último autor, lo cual no significa que no participe activamente en los trabajos. Creo que una persona de mi edad y con

Cuadro 3. La vía de las pentosas fosfato en *T. cruzi*.

Diversos organismos utilizan la glucosa a través de dos vías principales: la vía glucolítica, cuya finalidad es la conservación de energía a través de la síntesis de ATP, y la vía de las pentosas fosfato (VPP), cuyo objetivo primario es biosintético. La VPP consta de dos partes: a) una rama oxidativa, que lleva a la oxidación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona, y luego a la oxidación, con concomitante decarboxilación, del 6-fosfogluconato a ribulosa 5-fosfato, en ambos casos con reducción de NADP a NADPH, utilizado en reacciones biosintéticas y en la protección contra el estrés oxidativo, y b) una rama de interconversión de azúcares, que lleva a la producción de ribosa 5-fosfato, imprescindible para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, y en forma mediata, a la regeneración de hexosa 6-fosfato. La vía puede operar completa o no, según las necesidades de la célula, y su regulación se lleva a cabo primariamente a través de la relación NADP/NADPH, siendo tanto mayor su actividad cuanto mayor es esta relación, por ejemplo si la célula es sometida a un estrés oxidativo, que lleva a la oxidación de NADPH a NADP, con aumento del valor de esa relación. Las siete enzimas de la VPP se encuentran presentes, con niveles diferentes, en epimastigotes, trypomastigotes metacíclicos, trypomastigotes de cultivo celular y amastigotes y pudimos demostrar también que la vía, o al menos su rama oxidativa, es operativa en el parásito, pues aumenta el flujo de glucosa a través de la VPP en presencia de stress oxidativo. Hemos clonado y secuenciado genes que codifican las siete enzimas de la vía de las pentosas fosfato. En el caso de la 6-fosfogluconato dehidrogenasa (6-PGDH) la proteína recombinante fue tan poco estable como la proteína natural, pero pudimos estabilizarla por mutagénesis dirigida, restituyendo dos puentes salinos que participan en la formación del dímero activo, presentes en la enzima de *T. brucei* pero ausentes en la de *T. cruzi*. La 6-PGDH está codificada por un gen de copia única, y sería un blanco adecuado para quimioterapia, pues su inhibición lleva a la muerte de cualquier célula

por acumulación del 6-fosfogluconato, que inhibe tanto la VPP como la glucólisis. La glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH) está codificada por varios genes por genoma haploide, que presentan dos posibles ATG alternativos, de los cuales demostramos que el que lleva a la expresión de la enzima funcional en el parásito, es el primero. Pudimos demostrar también que la G6PDH presente en los trypomastigotes metacíclicos, pero no la presente en los epimastigotes, es fuertemente inducida en términos tanto de proteína como de actividad, alrededor de 40 veces, en presencia de stress oxidativo provocado con H_2O_2 . Es de destacar que se puede esperar que el metacíclico, pero no el epimastigote, se enfrente naturalmente al estrés oxidativo, al invadir células de mamífero, incluidos los macrófagos. Los genes que codifican a las cinco enzimas restantes de la PPP, a saber la 6-fosfogluconolactonasa (6-PGL), la ribosa 5-fosfato isomerasa (RPI), la ribulosa 5-fosfato epimerasa (RPE), la transaldolasa (TAL) y la transcetolasa (TKT) ya han sido clonados y secuenciados. Las proteínas han sido expresadas solubles y activas en *Escherichia coli*; y algunas ya han sido caracterizadas. La RPI presenta especial interés, pues es de tipo B, procariótico, y no hay genes homólogos en los genomas de animales superiores secuenciados hasta el momento; hemos demostrado la ausencia de una RPI de tipo A, similar a la de mamífero, en el parásito. Como los dos tipos de RPI difieren completamente en secuencia y estructura 3D, la RPIB sería un buen candidato como posible blanco para quimioterapia. Pudimos avanzar en el conocimiento del mecanismo de reacción de las RPI de tipo B, a través de la obtención de mutantes por mutagénesis sitio-dirigida, que permitieron confirmar la participación de ciertos residuos de aminoácidos, propuestos pero no demostrados por otros autores, en el mecanismo de reacción. También estudiamos los efectos de inhibidores y determinamos la estructura tridimensional de la RPI, en complejos con sustrato o inhibidor.

La ribulosa 5-fosfato epimerasa, que cataliza la interconversión de ribulosa 5-fosfato y xilulosa 5-fosfato, presenta dos isoformas en el parásito. Una de estas isoformas predice una señal de direccionamiento a glicosoma de tipo PTS_1 (SHL), y recientemente hemos podido demostrar que esta isoforma se encuentra efectivamente en los glicosomas, en tanto que la otra isoforma es citosólica. Estamos avanzando en su caracterización bioquímica y funcional.

El estudio de la TKT se encuentra medianamente avanzado. Los estudios en marcha sugieren que la enzima tendría una doble localización subcelular, una mayoritaria en citosol y una minoritaria en el glicosoma; esta última está de acuerdo con la presencia de una secuencia C-terminal VHL, que sugiere un direccionamiento al glicosoma. La TKT se expresa en las cuatro formas principales del ciclo biológico del parásito, siendo la expresión mayor en las formas presentes en el insecto vector. Su alta identidad (67 %) con la enzima similar que hemos estudiado en *L. mexicana*, incluyendo la determinación de su estructura tridimensional, permitirá el modelado molecular de la enzima de *T. cruzi*, para tener una primera aproximación a la conformación de su sitio activo.

El estudio de la TAL se encuentra más avanzado, habiéndose efectuado ya su caracterización cinética y demostrado la presencia de isoformas, pese a que (como en el caso de la enzima humana) se trata de un gen de copia única, lo que sugiere la presencia de modificaciones post-traduccionales que podrían tener importancia regulatoria. Pudimos cristalizar la TAL recombinante de *T. cruzi* y dilucidar su estructura 3D con una resolución de 1.1 Å.

En el caso de la 6-PGL se la expresó activa y pudieron determinarse sus parámetros cinéticos. Es de destacar que el estudio de esta enzima es difícil, pues el sustrato debe ser generado *in situ* por la reacción de la G6PDH. Su localización subcelular podría ser en parte glicosomal, pues la secuencia indica la presencia de una posible PTS_1 interna. Más información sobre estas enzimas se encuentra en Igoillo-Esteve y col. (2007) y en Stern y col. (2011).

mis antecedentes debe seguir trabajando mientras esté en condiciones de hacerlo, pero concentrado en la promoción de los jóvenes, que son el futuro y nuestros herederos. De alguna manera, los investigadores de mi edad somos el *link* entre el pasado glorioso de la Bioquímica y el estallido de la Biología Molecular y las ómicas del presente. Conocí personalmente a Sir Hans Krebs, el de los tres Ciclos (Urea, Ácidos Tricar-

boxílicos y Glioxilato), a Feodor Lynen, el del metabolismo de lípidos, a Fritz Lipmann, que descubrió la Coenzima A, a Severo Ochoa, que cerró el Ciclo de Krebs y descubrió el código genético. Todos Premios Nobel. Hice mi postdoctorado con Sir Hans Kornberg, que descubrió con Krebs el Ciclo del Glioxilato. Y conocí a nuestros tres Premios Nobel en Ciencias, de los cuales al que más traté, y a quien recuerdo con

gran aprecio y agradecimiento, fue Luis F. Leloir. Y a los grandes que hicieron la Bioquímica en la Argentina, además de Leloir, Caputto, Stoppani, Paladini, Brenner. Mi primera reunión científica fue en Tucumán, en 1965; un Simposio sobre Hidratos de Carbono, con la presencia, entre otros, de Houssay y Leloir. Mi primer Congreso internacional fue en Madrid, en 1969, la sexta reunión de la FEBS, donde, vencien-

do un miedo bastante considerable, presenté mi primera presentación en Inglés, en una sesión de Enzimología que presidía Hugo Theorell, Premio Nobel de Química... Ha sido una larga vida científica, de la cual no puedo arrepentirme ni quejarme, compartida en parte con Berta y con Cristina, mi hija mayor, y una muy buena vida personal. No me arrepiento, y en verdad me enorgullecó, de haber hecho casi la totalidad de mi carrera científica en la Argentina, tratando de devolver de alguna manera la muy buena educación gratuita que recibí. Y he disfrutado, y todavía disfruto, de la posibilidad de transmitir conocimientos a estudiantes de grado y de postgrado.

■ BIBLIOGRAFIA

- Agüero, F., Noé, G., Hellman, U., Repetto, Y., Zaha A., Cazzulo, J.J. (2004) *Purification, cloning and expression of the mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH) from protoscolices of Echinococcus granulosus*. Mol. Biochem. Parasitol. **137**, 207 - 214.
- Agüero, F., Repetto, Y., Hellman, U., Cazzulo, J.J. (1995) *Purification and partial characterization of the cytosolic malate dehydrogenase from protoscolices of Echinococcus granulosus*. Mol. Biochem. Parasitol. **72**, 247 - 251.
- Alvarez V.E., Kosec G., Sant Anna C., Turk V., Cazzulo J.J., Turk B. (2008b) *Blocking autophagy to prevent parasite differentiation: a possible new strategy for fighting parasitic infections?* Autophagy. **4**, 361 - 363.
- Alvarez V.E., Kosec G., Sant Anna C., Turk V., Cazzulo J.J., Turk B. (2008a) *Autophagy Is Involved in Nutritional Stress Response and Differentiation in Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. , **283**, 3454-3464
- Alvarez V.E., Niemirowicz G.T., Cazzulo J.J. (2012) *The peptidases of Trypanosoma cruzi: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death*. Biochim Biophys Acta.; **1824**, 195-206.
- Alvarez, V., Parussini, F., Åslund, L., Cazzulo, J.J. (2002) *Expression in insect cells of active mature cruzipain from Trypanosoma cruzi, containing its C-terminal domain*. Protein Expr. Purif. **26**, 467 - 475.
- Barboza, M., Duschak, V., Cazzulo, J.J., Lederkremer, R.M. de Couto, A. (2003) *Presence of sialic acid in N-linked oligosaccharide chains and O-linked N-acetylglucosamine in cruzipain, the major cysteine proteinase of Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., **126**, 293 - 296.
- Barboza, M., Duschak, V.G., Fukuyama, Y., Nonami, H., Erra-Balsells, R., Cazzulo J.J., Couto A.S. (2005) *Structural analysis of the N-glycans of the major cysteine proteinase of Trypanosoma cruzi. Identification of sulfated high-mannose type oligosaccharides*. FEBS J. **272** 3803 - 3815.
- Bayona J.C., Nakayasu E.S., Laverriere M., Aguilar C., Sobreira H. Choi A.I. Nesvizhskii A.I., Almeida I.C., Cazzulo J.J., Alvarez V.E. (2011) *SUMOylation pathway in Trypanosoma cruzi: Functional characterization and proteomic analysis of target proteins*. Mol Cell Proteomics. **10.12 (2011) 10.1074/mcp.M110.007369-1**.
- Bontempi, E., Franke de Cazzulo, B.M., Ruiz, A.M., Cazzulo, J.J. (1984) *Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of Trypanosoma cruzi*. Comp.Biochem.Physiol. **77 B**, 599 - 604.
- Campetella O., Henriksson J., Åslund L., Frasch A.C.C., Pettersson U., Cazzulo J.J. (1992) *The major cysteine proteinase (Cruzipain) from Trypanosoma cruzi is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes*. Mol. Biochem. Parasitol. **50** 225 - 234.
- Cazzulo J.J. (1973) *On the regulatory properties of a halophilic citrate synthase*. FEBS Lett. **30**, 339 - 342.
- Cazzulo J.J. (2012) *Cruzipain*. Handbook of Proteolytic Enzymes, 3rd. Ed. (J. Rawlings, Ed.). Chapter 437, pp. 1909 - 1914, Elsevier, U.K.
- Cazzulo, J.J., Cazzulo Franke, M.C., Franke de Cazzulo, B.M. (1989) *On the regulatory properties of the pyruvate kinase from Trypanosoma cruzi epimastigotes*. FEMS Microbiol. Lett., **59**, 259 - 264.
- Cazzulo, J.J., Cazzulo Franke, M.C., Martínez, J., Franke de Cazzulo, B.M. (1990) *Some kinetic properties of a cysteine proteinase (Cruzipain) from Trypanosoma cruzi*. Biochim.Biophys.Acta, **1037**, 186 - 191.
- Cazzulo J.J., Couso R., Raimondi A, Wernstedt C., Hellman U. (1989) *Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. **33**, 33 - 41.
- Cazzulo, J.J., Franke de Cazzulo, B.M. (1982) *Proteolytic activity on endogenous substrates*

- in cell-free extracts of Trypanosoma cruzi*. *Experientia* (Basel) **38**, 1335 - 1337.
- Cazzulo, J.J., Franke de Cazzulo, B.M., Engel, J.C., Cannata, J.J.B. (1985) *End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in Trypanosomatids*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **16**, 329 - 343.
- Cazzulo J.J., Massarini E. (1972) *Inhibition of NADP-linked malic enzyme by glyoxylate*. *FEBS Lett.* **22**, 76 - 79.
- Cazzulo J.J., Stoppani A.O.M. (1965) *Enzyme reactions for carbon dioxide fixation in baker's yeast*. *Biochim.Biophys. Acta*, **100**, 276 - 280.
- Cazzulo J.J., Stoppani A.O.M. (1967) *Purification and properties of pyruvate carboxylase from baker's yeast*. *Arch.Biochem.Biophys.*, **121** 596 - 608.
- Cazzulo J.J., Sundaram T.K., Kornberg H.L. (1969) *Regulation of pyruvate carboxylase formation from the apo-enzyme and biotin in a thermophilic Bacillus*. *Nature* **223**, 1137 - 1138.
- Cazzulo J.J., Sundaram T.K., Kornberg H.L. (1970) *Mechanism of pyruvate carboxylase formation from the apo-enzyme and biotin in a thermophilic Bacillus*. *Nature* **227**, 1103 - 1105.
- Cazzulo J.J., Vidal, M.C. (1972) *Effect of monovalent cations on the malic enzyme of the extreme halophile, Halobacterium cutirubrum*. *J.Bacteriol.* **109**, 437 - 439.
- Engel, J.C., Franke de Cazzulo, B.M., Stoppani, A.O.M., Cannata, J.J.B. Cazzulo, J.J. (1987) *Aerobic glucose fermentation by Trypanosoma cruzi axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **25**, 1 - 10.
- Frasch A.P., Carmona A.K., Juliano L., Cazzulo J.J., Niemirowicz: G.T. (2012) *Characterization of the M32 metallo-carboxypeptidases of Trypanosoma brucei: Differences and similarities with its orthologue in Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **184**, 63-70.
- Frasch, A.C.C., Cazzulo, J.J., Stoppani, A.O.M. (1978a) *Solubilization and some properties of the Mg²⁺-activated adenosine triphosphatase from Trypanosoma cruzi*. *Comp.Biochem.Physiol.* **61B**, 207 - 212.
- Frasch, A.C.C., Segura, E.L., Cazzulo, J.J., Stoppani, A.O.M. (1978b): *Adenosine triphosphatase activities in Trypanosoma cruzi*. *Comp.Biochem.Physiol.* **60B**, 271 - 275. ISSN 0305-0491
- Frydman, B., de los Santos, C., Cannata, J.J.B., Cazzulo, J.J. (1990) *Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of (1-13C)glucose metabolism in Trypanosoma cruzi. Evidence of the presence of two alanine pools and of two CO₂ fixation reactions*. *Eur. J. Biochem.* **192**, 363 - 368.
- Igoillo Esteve M., Cazzulo J.J. (2004) *The 6-phosphogluconate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi: the absence of two intersubunit salt bridges as a reason for enzyme instability*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **133**, 197 - 207.
- Igoillo-Esteve M., Cazzulo J.J. (2006) *The glucose-6-phosphate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi: its role in the defense of the parasite against oxidative stress*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **149**, 170-181.
- Igoillo-Esteve M., Maugeri D., Stern A.L., Beluardi P., Cazzulo J.J. (2007) *The pentose phosphate pathway in Trypanosoma cruzi: a potential target for the chemotherapy of Chagas disease*. *Anais Acad. Brasil. Ciencias* **79**, 649 - 663.
- Iribarren P.A., Berazategui M.A., Cazzulo J.J., Alvarez V.E. P.A. (2015a) *Biosynthesis of SUMO-ylated proteins in bacteria using the Trypanosoma brucei enzymatic system*. *PLoS One*. 2015 Aug 10;10(8):e0134950. doi: 10.1371
- Iribarren P.A., Berazategui M.A., Bayona J.C., Almeida I.C., Cazzulo J.J., Alvarez V.E. (2015b) *Different proteomic strategies to identify genuine Small Ubiquitin-like MODifier targets and their modification sites in Trypanosoma brucei procyclic forms*. *Cell. Microbiol.*, **17**, 1413-1422.
- Juan, S.M., Segura, E.L., Cazzulo, J.J. (1978) *Purification and some properties of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi*. *Int.J.Biochem.* **9**, 395 - 400.
- Kosec G., Alvarez V.E., Agüero F., Sánchez D., Dolinar M., Turk B., Turk V., Cazzulo J.J. *Metacaspases of Trypanosoma cruzi: (2006) Possible candidates for programmed cell death mediators*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **145**, 18 - 28.
- Laverriere M., Cazzulo J.J., Alvarez V.E. (2012) *Antagonic activities of Trypanosoma cruzi metacaspases affect the balance between cell proliferation, death and differentiation*

- rentiation. Cell Death Differentiation, **19**, 1358 – 1369.
- Maugeri D., Cazzulo J.J. (2004) *The pentose phosphate pathway in Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol. Lett., **234**, 117 - 123.
- Maugeri D.A., Cazzulo J.J., Burchmore R.J.S., Barrett MP, Ogbunude P.O.J. (2003) *Pentose phosphate metabolism in Leishmania mexicana*. Mol. Biochem. Parasitol., **130**, 117 - 125.
- Massarini E., Cazzulo J.J. (1975) *Two forms of citrate synthase in a marine Pseudomonad*. FEBS Lett. **57**, 134 - 138.
- Niemirowicz G., Fernández D., Solà M., Cazzulo J.J., Avilés F.X., Gomis-Rüth F.X. (2008) *The molecular analysis of Trypanosoma cruzi metallo-carboxypeptidase 1 provides insight into fold and substrate specificity*. Mol. Microbiol. **70**, 853-866.
- Niemirowicz G., Parussini F., Agüero F., Cazzulo J.J. (2007) *Two metallo-carboxypeptidases from the protozoan Trypanosoma cruzi belong to the M32 family, found so far only in prokaryotes*. Biochem. J. **401**, 399-410
- Nowicki C., Cazzulo J.J. (2008) *Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids*. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. **151**, 381-390.
- Parodi, A.J., Cazzulo, J.J. (1982) *Protein glycosylation in Trypanosoma cruzi. II. Partial characterization of protein-bound oligosaccharides labeled "in vivo"*. J. Biol. Chem. **257**, 7641 - 7645.
- Parodi, A.J., Quesada-Allué, L.A., Cazzulo, J.J. (1981) *The pathway of protein glycosylation in the Trypanosomatid Crithidia fasciculata*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.- Biol.Sci, **78**, 6201 - 6205.
- Parussini, F., García, M., Mucci, J., Agüero, F., Sánchez, D., Hellman, U., Åslund, L., Cazzulo, J.J. (2003) *Characterization of a lysosomal serine carboxypeptidase from Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., **131**, 11 - 23.
- Stern A.L., Burgos E., Salmon L., Cazzulo J.J. (2007) *Ribose 5-phosphate isomerase type B from Trypanosoma cruzi: kinetic properties and site-directed mutagenesis reveal information about the reaction mechanism*. Biochem. J. **401**, 279-285.
- Stern A.L., Naworyta A., Cazzulo J.J., Mowbray. S.L. (2011) *Structures of type B ribose 5-phosphate isomerase from Trypanosoma cruzi shed light on the determinants of sugar specificity in the structural family*. FEBS J. **278**, 793 – 808.
- Vidal M.C., Cazzulo J.J. (1972a) *CO₂-fixing enzymes in a marine psychrophile*. J.Bacteriol. **112**, 427 – 433.
- Vidal M.C., Cazzulo J.J. (1972b) *Allosteric inhibition of NADP-linked malic enzyme from an extreme halophile by acetyl-CoA*. FEBS Lett. **26**, 257 - 260.

¡¡Oferta!!
Pipetas y
Artículos
Plásticos



ThermoForma

ThermoLabsystems



Nikon



ThermoSorvall



ThermoSorvall



buscamos para publicidad

Oferta promocional. Precios especiales de pipetas, frascos y artículos plásticos. Valida del 30/6-2007.

Para encontrar todas las soluciones
en instrumental, no hace falta investigar.

 **microlat**
instrumental científico

Carlos Pellegrini 755 - Piso 9 - Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Tel/Fax: 4326 5205 - 4322 6341 - www.microlat.com.ar



Thermo

TMC



FOTODYNE

conviron

HITACHI

TELEDYNE (ECO)
A Systems Technology Company



Molecular Devices