

Biología molecular del metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos. Expresión de genes heterólogos de ornitina y arginina decarboxilasa en *Trypanosoma cruzi*.

I.D.Algranati, M.P.Serra, C.Carrillo y N.S.González.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires-Fundación Instituto Leloir (Av. Patricias Argentinas 435, Buenos Aires C1405BWE)

Recibido:

Recibido en: 24/07/2006

| Aceptado:

Aceptado en: 09/08/2006

Contacto: I.D.Algranati - ialgranati@leloir.org.ar

RESUMEN

El protozoario *Trypanosoma cruzi* es el agente causante de la enfermedad de Chagas que afecta a millones de personas en Latino América. Muchos estudios sobre la bioquímica y biología molecular de este parásito intentan investigar las posibles diferencias entre los caminos metabólicos utilizados por el protozoario y por las células de los hospedadores mamíferos, con el propósito de detectar blancos potencialmente aptos para el diseño de quimioterapias antiparasitarias. El metabolismo de poliaminas es un buen candidato pues presenta propiedades únicas en *Trypanosoma cruzi*.

Las poliaminas son un grupo de sustancias básicas de bajo peso molecular que están presentes en prácticamente todos los organismos vivos y cumplen múltiples funciones esenciales tanto en la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas como en la proliferación y diferenciación celular. La inhibición de la biosíntesis de poliaminas es una de las estrategias más adecuadas en la búsqueda de drogas antiproliferativas eficientes. Las concentraciones endógenas de poliaminas en células de mamíferos están reguladas por mecanismos de retroinhibición e interconversión que pueden contrarrestar el bloqueo del metabolismo de dichas sustancias en las células mencionadas. Contrariamente, los protozoarios *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y diferentes especies de *Leishmania* tienen un metabolismo de poliaminas más simple y carecen de capacidad para regularlo. Esto explica la dependencia de los parásitos del transporte de poliaminas desde el medio externo. Por otra parte el compuesto bis-glutationil espermidina (tripanotiona), un cofactor esencial para mantener el equilibrio intracelular de óxido-reducción, se ha encontrado exclusivamente en protozoarios tripanosomátidos y este hecho también contribuye al efecto selectivo antiparasitario de algunas drogas que inhiben la biosíntesis de poliaminas. *Trypanosoma cruzi* es el único organismo eucariótico incapaz de sintetizar poliaminas “de novo” pues carece de las decarboxilasas de ornitina y arginina que son las enzimas que catalizan el primer paso de los dos posibles caminos metabólicos en la síntesis de poliaminas. Investigaciones de nuestro laboratorio han demostrado que la carencia mencionada no se debe a factores inhibitorios del medio interno del parásito sino a la ausencia de los genes correspondientes en el genoma de *T. cruzi*. Por esta razón el protozoario se comporta como una mutante de delección natural de los genes que codifican las enzimas de biosíntesis de putrescina, sustancia precursora de las demás poliaminas. Después de transformar *T. cruzi* con plásmidos

recombinantes que contienen genes exógenos que codifican ornitina o arginina decarboxilasa de otros organismos, estudiamos la expresión de los genes heterólogos en los parásitos transgénicos.

Palabras Clave: biosíntesis de poliaminas; epimastigotes de *T. cruzi*; ornitina decarboxilasa; arginina decarboxilasa; parásitos transgénicos.

Molecular Biology of polyamine metabolism in trypanosomatid parasites.
Expression of heterologous ornithine and arginine decarboxylase genes in *T. cruzi*.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease, which affects millions of people in Latin America. Many studies on the biochemistry and molecular biology of parasites try to find whether their metabolic pathways are markedly different from those of the mammalian host in order to detect appropriate targets useful for the design of antiparasitic chemotherapies. Polyamine metabolism in *T. cruzi* is a good candidate due to its unique properties.

Polyamines, a group of low molecular weight basic substances, are present in practically all living organisms and play essential roles in the biosynthesis of nucleic acids and proteins as well as in cell proliferation and differentiation. The inhibition of polyamine biosynthesis is a promising strategy in the search for antiproliferative drugs. The endogenous concentrations of polyamines in mammalian cells are regulated by several mechanism of retroinhibition and interconversion which can compensate the effect of specific inhibitors. In contrast, polyamine metabolism in many parasites such as *T. brucei*, *T. cruzi* and different species of *Leishmania*, is simpler and cannot be regulated. Therefore, these protozoa need the uptake of polyamines from the external medium for their proliferation. On the other hand, bis-glutathionyl spermidine (trypanothione), a cofactor responsible for the endogenous redox balance, has been found exclusively in trypanosomatid protozoa; this fact can explain the selective antiparasitic effect of some drugs blocking polyamine biosynthesis.

Trypanosoma cruzi is the only eukaryotic organism unable to synthesize polyamines “de novo” due to the absence of ornithine and arginine decarboxylases, the enzymes catalysing the first step of both metabolic pathways in polyamine biosynthesis. Studies carried out in our laboratory have shown that the lack of these enzymatic activities is not caused by internal inhibitory factors in the parasite, but to the absence of the corresponding genes in the *T. cruzi* genome. Therefore, this parasite behaves as a natural deletion mutant of genes coding for putrescine biosynthetic enzymes. We have prepared transformed *T. cruzi* by electroporation with recombinant plasmids bearing exogenous ornithine and arginine decarboxylase genes from other organisms, and the expression of the heterologous genes in the transgenic parasites have been investigated.

Key words: polyamine biosynthesis; *T. cruzi* epimastigotes; ornithine decarboxylase; arginine decarboxylase; transgenic parasites.

Introducción

Las poliaminas son un grupo de sustancias básicas de bajo peso molecular que están presentes en prácticamente todas las células procarióticas, eucarióticas y arqueobacterias con muy pocas excepciones. Desempeñan múltiples funciones esenciales tanto en la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas, como en la proliferación y diferenciación celular (1-3). Su flexible esqueleto alifático y su naturaleza policatiónica con cargas positivas distanciadas entre sí (Figura 1) les permite interactuar con diferentes regiones de macromoléculas o estructuras cargadas negativamente como el DNA, RNA, nucleoproteínas, fosfolípidos, partículas ribosomales y membranas, lo que explica su participación en procesos tan diversos como la replicación del DNA, transcripción, síntesis proteica y multiplicación celular. La determinación de los niveles de poliaminas y de la enzima que cataliza el primer paso de su biosíntesis durante el ciclo celular ha indicado que aumentan significativamente en

la interfase G1/S y durante G2 antes del comienzo de la mitosis. Estos resultados confirman la importancia de las poliaminas en la proliferación celular (4-6).

image003.gif

Figura 2: Metabolismo general de las poliaminas.

La concentración endógena de poliaminas en las células de mamíferos se encuentra estrictamente regulada por una serie de mecanismos de homeostasis que comprende tanto su biosíntesis y transporte desde el medio externo como su degradación y excreción. Las enzimas limitantes de la biosíntesis son la ODC y la S-adenosil metionina decarboxilasa (SAMDC). Ambas tienen una reducida estabilidad metabólica con vidas medias del orden de 30 minutos y tanto su inducción como su degradación varían por mecanismos compensatorios que responden a la reducción o aumento de los niveles intracelulares de poliaminas (9). La ODC de células animales, como otras proteínas metabólicamente inestables contienen en su estructura regiones PEST que son segmentos ricos en los aminoácidos prolina, ácido glutámico, serina y treonina. En general en estos casos las secuencias PEST se encuentran ubicadas cerca del extremo C-terminal de la cadena polipeptídica. La degradación de la enzima está regulada por una proteína específica llamada antizima, que al unirse a los monómeros de ODC impide la formación de los dímeros activos, dejando expuestas las regiones PEST. Los monómeros unidos a antizima son entonces reconocidos por el proteosoma 26S que degrada rápidamente la enzima ODC liberando al mismo tiempo la antizima en un proceso independiente de ubiquitina (10-12). La cantidad de antizima aumenta en las células cuando se incrementan los niveles endógenos de poliaminas, que de esta manera tienden a regularse por destrucción de ODC.

En células de plantas y en bacterias se ha descrito una segunda vía biosintética de poliaminas que comprende dos etapas: la decarboxilación de arginina por arginina decarboxilasa (ADC) para dar agmatina, y la posterior hidrólisis de esta sustancia dando lugar a la formación de putrescina mediante una reacción catalizada por la enzima agmatinasa (Figura 2).

La síntesis de difluormetilornitina (DFMO) permitió disponer del primer inhibidor específico e irreversible de ODC (13-15). Esta droga análoga a ornitina causa la supresión del contenido intracelular de poliaminas, y como consecuencia la detención de la proliferación celular en cultivos “in vitro”. Estos resultados llevaron a probar DFMO como posible agente antitumoral, pero los ensayos en modelos “in vivo” indicaron que en estas condiciones el inhibidor sólo ejerce efectos citostáticos y no citotóxicos, debido a mecanismos celulares compensatorios como el aumento del transporte de poliaminas o la inducción de las enzimas responsables de su biosíntesis (16,17).

Metabolismo de poliaminas en parásitos.

Los tripanosomátidos constituyen un grupo de protozoarios parásitos que utilizan uno o dos organismos hospedadores para completar su ciclo de vida. Entre los tripanosomátidos monogenéticos cuyos únicos huéspedes son insectos se han caracterizado diversas especies de los géneros *Crithidia*, *Leptomonas* y *Herpetomonas*. Los tripanosomátidos digenéticos utilizan como hospedadores a insectos y a vertebrados (o plantas) y tienen ciclos de vida complejos durante los cuales sufren procesos de diferenciación que involucran grandes cambios fisiológicos y bioquímicos que les permiten adaptarse a los ambientes que encuentran en sus hospedadores (18,19). El grupo de protozoarios tripanosomátidos digenéticos incluye parásitos patógenos para el hombre que causan graves enfermedades como el Mal de Chagas producido por *Trypanosoma cruzi*, la Enfermedad del Sueño causada por *Trypanosoma brucei* y varios tipos de leishmaniasis originadas por la infección con diferentes especies del género *Leishmania*.

Los organismos parásitos se caracterizan porque muchas veces no poseen caminos metabólicos que están presentes en sus hospedadores mamíferos de los cuales pueden obtener metabolitos que necesitan para su supervivencia y proliferación sin necesidad de sintetizarlos *de novo*. Se ha demostrado que durante la evolución el genoma de algunos parásitos ha perdido conjuntos de genes que codifican las enzimas responsables de las vías metabólicas cuyos productos sintetizados por los

hospedadores son internalizados y utilizados directamente por los parásitos. Este es el caso de la putrescina en *T. cruzi*, que la transporta a su interior y la usa como precursor de espermidina y tripanotiona.

Numerosos estudios sobre la bioquímica y biología molecular de los tripanosomátidos digenéticos intentan buscar diferencias en el metabolismo entre los parásitos y las células de sus hospedadores mamíferos, con el propósito de detectar blancos adecuados para el diseño de estrategias quimioterapéuticas efectivas contra las enfermedades parasitarias. El metabolismo de poliaminas de los parásitos presenta propiedades significativamente diferentes al de las células humanas. Por lo tanto se puede esperar que algunas drogas antipoliámínicas puedan eliminar selectivamente los parásitos sin mayores efectos sobre los hospedadores.

Trabajos realizados en diferentes laboratorios sobre protozoarios tripanosomátidos han demostrado que la biosíntesis de poliaminas en *Trypanosoma brucei*, *Crithidia fasciculata* y distintas especies de *Leishmania* ocurre mediante la acción inicial de la enzima ornitina decarboxilasa (18-20), y que el transporte de putrescina y espermidina desde el medio externo es relativamente reducido pero puede inducirse significativamente al disminuir los niveles endógenos de poliaminas. Es interesante señalar que algunas propiedades de la enzima ODC en tripanosomátidos digenéticos son muy diferentes a la de la misma enzima en células animales y parásitos monogenéticos. La ODC de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* es metabólicamente estable, con una vida media mayor a 8 horas en contraposición a lo que sucede en células de mamíferos y en *Crithidia fasciculata* donde es inestable (vida media de 30 minutos). Coffino y su grupo (21-24) demostraron que aunque la ODC de *T. brucei* y de células de ratón tienen una estructura relativamente homóloga, a la primera le falta el segmento del extremo C-terminal del polipéptido de aproximadamente 35 aminoácidos, presente en la enzima de células de mamíferos, que contiene la región PEST responsable de la rápida degradación de la proteína. Esta conclusión fue confirmada al preparar moléculas recombinantes con la estructura de ODC de *T. brucei* fusionada a la región del extremo C-terminal de la enzima de ratón, que resultó inestable. En el caso de la ODC de *Crithidia fasciculata* se determinó que aunque tiene una alta identidad de secuencia (69 %) con la enzima de *Leishmania donovani*, y tampoco contiene la región PEST del extremo C-terminal, sin embargo es inestable, indicando que las señales de degradación pueden estar en regiones aún no determinadas de su estructura (24). La diferencia de estabilidad de la ODC de parásitos digenéticos y de células animales parece ser la razón del efecto antiparasitario selectivo de la droga DFMO, inhibidor específico de ODC. El rápido recambio de la enzima en células de mamíferos determina la continua síntesis de nueva enzima que permite eludir el efecto del DFMO; en cambio la ODC estable del *T. brucei* permanece permanentemente inhibida por la droga, produciendo la drástica reducción de los niveles endógenos de poliaminas y el consecuente bloqueo de la proliferación del parásito (25). Estas consideraciones están de acuerdo con resultados de Bacchi y colaboradores que encontraron que la inhibición de la actividad de ODC por DFMO puede curar infecciones agudas de conejos con *Trypanosoma brucei brucei* (26,27). La misma droga ha sido efectiva en el tratamiento de la enfermedad del sueño en humanos provocada por *el Trypanosoma brucei gambiense* (28).

El compuesto bis-glutationil espermidina (tripanotiona) se ha encontrado exclusivamente en parásitos tripanosomátidos (29). Esta sustancia mantiene el balance endógeno de oxido-reducción de los parásitos y es su principal defensa contra superóxidos y radicales libres (30), por lo que el bloqueo de su síntesis puede ser un punto clave de terapias antiparasitarias específicas (Figura 3).

image006.gif

Figura 4: Crecimiento de *T. cruzi* en medio semisintético SDM₇₉ con distintos suplementos.

Existe una correlación entre el crecimiento de *T. cruzi* en diversas condiciones y los correspondientes niveles intracelulares de poliaminas. Se pudo determinar que la proliferación del parásito depende exclusivamente de las concentraciones endógenas de espermidina, ya que el agregado al cultivo de putrescina junto con ciclohexilamina, que inhibe su conversión a espermidina, no permite la multiplicación de *T. cruzi* aunque el nivel de putrescina se encuentre marcadamente aumentado. La espermidina debe ser indispensable, porque además de cumplir las múltiples funciones de las poliaminas, es el sustrato obligado para sintetizar tripanotiona (35) (Figura 5).

image008.gif

Figura 5: Metabolismo de poliaminas en *T. cruzi*.

1: ornitina decarboxilasa; 2: arginina decarboxilasa; 3: arginasa; 4: agmatinasa; 5: espermidina sintetasa; 6: tripanotiona sintetasa; 7: tripanotiona reductasa.

Ornitina decarboxilasa, arginina decarboxilasa, arginasa y agmatinasa están ausentes en *T. cruzi*.

La ausencia de las actividades enzimáticas de ODC y ADC en *T. cruzi* pueden deberse a varias causas (Tabla 1).

Tabla 1: Causas de falta de actividad enzimática de ADC en *T. cruzi*

- Transporte deficiente de arginina
- Presencia de inhibidores de ADC en *T. cruzi*
- Represión del gen de ADC
- Ausencia del gen de ADC en el genoma de *T. cruzi*

Hemos investigado todas estas posibilidades y encontramos que los aminoácidos ornitina y arginina se transportan eficientemente y son normalmente utilizados por los parásitos. Además no se han podido detectar inhibidores de las enzimas ODC o ADC en los extractos de epimastigotes de *T. cruzi*. También se ha descartado que el medio interno del parásito pudiera contener represores de la expresión de los genes de ODC y ADC. Esta conclusión se basa en experimentos de transformación de cepas salvajes de *T. cruzi* con plásmidos recombinantes que contenían las regiones codificantes de genes heterólogos de ODC o ADC. En ambos casos se obtuvo parásitos transformados con altos niveles de expresión de los genes exógenos (31, 33, 36).

Los análisis de bioinformática basados en los datos disponibles de la secuenciación del genoma de *T. cruzi* y los ensayos de hibridización del DNA total del parásito con sondas específicas homólogas a regiones conservadas en genes de ODC o ADC de muchos organismos indicaron que el genoma de cepas salvajes de *T. cruzi* no contiene secuencias de nucleótidos relacionadas a las presentes en los genes de ODC y ADC (33, 36).

Transformación de *Trypanosoma cruzi* con genes exógenos de ODC y ADC

Dado que el *Trypanosoma cruzi* se comporta como una mutante de delección natural de los genes de ODC y ADC, hemos transformado parásitos salvajes con plásmidos recombinantes que contienen la región codificante completa del gen de ODC de *Crithidia fasciculata* o de ADC de avena. Para ambas construcciones se usó el vector de expresión pRIBOTEX, específico para transformaciones de *T. cruzi*, y las regiones polinucleotídicas correspondientes a los genes de ODC o ADC obtenidas por amplificación PCR con los templados de DNA y los “primers” adecuados (Figura 6).

Figura 6 Plásmido p-ODC7

Los parásitos transfectados con el gen exógeno de ODC mostraron altos niveles de actividad enzimática. Al mismo tiempo se volvieron autótrofos para putrescina ya que podían proliferar continuamente en medios de cultivo sintéticos sin necesidad del agregado de poliaminas. Asimismo se pudo observar que los *T. cruzi* transformados que expresaban ODC se volvían sensibles a la droga DFMO que entonces podía bloquear la proliferación de estos parásitos cultivados en medios sintéticos (Figura 7). Pero después de un período de inhibición del crecimiento de varias semanas y en presencia continua de DFMO a altas concentraciones se producía la reiniciación espontánea del crecimiento de los *T. cruzi* transformados que se habían vuelto resistentes a la droga (Figura 8).

image016.gif

image018.gif

Figura 9A

Hibridización con sonda específica

Figura 9B

Actividad enzimática

Al transfectar *T. cruzi* con un plásmido recombinante que contiene el gen de ADC de avena, se observó actividad enzimática a los pocos días de la transformación y los valores fueron decreciendo en las semanas siguientes. Pero la presencia continuada de geneticina (antibiótico usado para seleccionar parásitos transformados) en los cultivos, provocó la reaparición de la actividad ADC que aumentó posteriormente hasta niveles elevados cuando se alcanzó la transformación estable (Figura 10).

image021.gif

image023.gif

Figura 10 Actividad de ADC después de electroporación.

Organización genómica de los parásitos transgénicos.

Con el propósito de determinar si el plásmido transformante se integra al genoma del parásito o queda libre como un episoma, realizamos ensayos de PCR con DNA obtenido de *T. cruzi* transgénicos cosechados a distintos tiempos después de la transformación y dos pares de “primers”: 1) T7 que es específico para la región promotora del vector pRIBOTEX junto al “primer” RIB que corresponde al locus ribosomal del genoma del parásito y 2) el mismo T7 y el “primer” 7C, que es específico para la región codificante del gen de ODC. Se puede predecir que si el plásmido recombinante queda libre, el producto de PCR con los “primers” T7 y 7C debiera ser un segmento amplificado de DNA de alrededor de 2500 pares de bases, sin ningún producto con el otro par de “primers”. En cambio después de una integración total de una copia del plásmido en el genoma del parásito, el único producto de amplificación de los dos ensayos de PCR sería un segmento de 890 pares de bases obtenido con el par de “primers” T7 y RIB. Si dos o más copias del plásmido se integraran en “tandem” al genoma se obtendrían los dos productos mencionados en los experimentos de PCR (Figura 11A y 12 A). Los ensayos descritos sólo produjeron el segmento de 890 pares de bases con el DNA de parásitos obtenidos después de la transformación estable (Figura 11B). Estos resultados indican la integración de una copia del plásmido en el genoma.

Figura 11 A

Figura 11B

image025.gif

A Esquemas posibles de organización génica. **B** Productos de PCR obtenidos

El estudio por PCR de la organización genómica de los parásitos transfectados con el gen exógeno de ADC mostró una estricta correlación con la expresión del gen indicada en la Figura 10. Los resultados señalaron que durante los primeros días después de la transfección el plásmido recombinante queda como episoma libre, porque el único producto originado en uno de los ensayos de amplificación con dos pares de “primers” similares a los descritos anteriormente fue un segmento de 2030 pares de bases, generado cuando se usó el par de “primers” T7 y ADC2 (correspondiente a una secuencia interna del gen de ADC) (Figura 12B calles 1 y 2). En el período siguiente de 2 a 3 semanas después de la transformación posiblemente ocurre la degradación del plásmido recombinante hasta niveles casi no detectables (calles 3 y 4 de Figura 12B). Luego, durante la presión selectiva del antibiótico, se induce la integración de dos o más copias del plásmido transformante hasta alcanzar una estructura estable entre 6 a 8 semanas después de la transfección, como lo demuestra la producción de los dos segmentos de amplificación en los experimentos de PCR con los distintos pares de “primers” (calles 7 y 8 de Figura 12B) (36).

image032.gif

Figura 13: Sensibilidad a alfa-amanitina de la transcripción de ADC y cruzipaina

Conclusiones

a) El protozooario *Trypanosoma cruzi* no contiene las actividades enzimáticas de ODC y ADC, por lo que es incapaz de sintetizar poliaminas “de novo”.

b) La falta de las actividades enzimáticas se debe a la ausencia de los genes correspondientes en su genoma.

c) Los parásitos transformados con plásmidos recombinantes adecuados pueden expresar genes heterólogos de ODC y ADC, demostrando que el medio intracelular de *T. cruzi* no inhibe la expresión de los genes mencionados.

d) La presencia de DFMO por períodos prolongados en los cultivos de parásitos transformados con el gen de ODC induce la amplificación del gen exógeno y la aparición de *T. cruzi* resistentes a la droga.

e) Ambos genes heterólogos se integran al genoma del parásito aunque posiblemente con diferentes mecanismos: 1) los *T. cruzi* transformados con ODC muestran una integración temprana de una copia del plásmido; 2) en cambio, en los parásitos transfectados con ADC, el plásmido recombinante permanece como episoma por varias semanas. Durante este período la actividad de la enzima es transitoria y posteriormente, a las 4 o 6 semanas, la expresión se vuelve estable con la concomitante integración de dos o más copias en “tandem” del plásmido transformante en el genoma de *T. cruzi*.

Agradecimientos

Los experimentos descriptos realizados en nuestro laboratorio fueron financiados en parte por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, la Universidad de Buenos Aires, la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica y el International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB, Trieste, Italia).

Bibliografía

1. Cohen S, 1998. A guide to the polyamines. Oxford University Press, Oxford.
2. Pegg AE, 1988. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. Cancer Res. 48: 759-774.
3. Wallace HM, 1998. Polyamines: specific metabolic regulators or multifunctional polycations? Biocem. Soc. Trans. 26: 569-571.
4. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A, 2003. A perspective of polyamine metabolism. Biochem. J. 376: 1-14.

5. Igarashi K, Kashiwagi K, 2000. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 559-564.
6. Tabor CW, Tabor H, 1984. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 749-790.
7. Pegg AE, 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 234: 249-262.
8. Bolkenius FN, Seiler N, 1981. Acetyl derivatives as intermediates in polyamine catabolism. *Int. J. Biochem.* 13: 287-292
9. Heby O, Persson L, 1990. Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 15: 153-158.
10. Hayashi S, Murakami Y, 1995. Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase. *Biochem. J.* 306: 1-10.
11. Hayashi S, Murakami Y, Matsufuji S, 1996. Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *Trends. Biochem. Sci.* 21: 27-30.
12. Murakami Y, Matsufuji S, Hayashi S, Tanahashi N, Tabaka K, 2000. Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 1-6.
13. Metcalf BW, Bey P, Danzin C, Jung MJ, Casara P, Vever JP, 1978. Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase by substrate and product analogs. *J. Am. Chem. Soc.* 100: 2551-2553.
14. Marton LJ, Pegg AE, 1995. Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 55-91.
15. Wang CC, 1995. Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of African trypanosomiasis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 93-127.
16. Pegg AE, McCann PP, 1982. Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.* 243: C212-C221.
17. Saydjari R, Alexander RW, Upp Jr JR, Barranco SC, Townsed Jr. CM, Thompson JC, 1991. Differential sensitivity of various human tumors to inhibition of polyamine biosynthesis in vivo. *Int. J. Cancer.* 47: 44-48.
18. Fairlamb AH, 1981. Alternate metabolic pathways in protozoan energy metabolism. *Parasitology.* 82: 1-30.
19. Pegg AE, McCann PP, 1988. Polyamine metabolism and function in mammalian cells and protozoans. *ISI Atlas of Science: Biochemistry* 11-18.
20. Sánchez CP, González NS, Algranati ID, 1989. Stable ornithine decarboxylase in promastigotes of *Leishmania mexicana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161: 754-761.
21. Phillips MA, Coffino P, Wang CC, 1987. Cloning and sequencing of the ornithine decarboxylase gene from *T. brucei*. *J. Biol. Chem.* 262: 8721-8727.
22. Goda L, Phillips MA, Bass KE, Wang CC, Coffino P, 1990. Trypanosome ornithine decarboxylase is stable because it lacks sequences found in the carboxyl terminus of the mouse enzyme which target the latter for intracellular degradation. *J. Biol. Chem.* 265: 11823-11826.

23. Goda L, Sidney D, Macrae M, Coffino P, 1992. Structural elements of ornithine decarboxylase required for intracellular degradation and polyamine-dependent regulation. *Mol. Cell. Biol.* 12: 2178-2185.
24. Svanson F, Ceriani C, Lövkvist Wallström E, Kockum I, Algranati ID, Heby O, Persson L, 1997. Cloning of a trypanosomatid gene cloning for an ornithine decarboxylase that is metabolically unstable even though it lacks the C-terminal degradation domain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94: 397-402.
25. Carrillo C, Cejas S, Cortés M, Ceriani C, Huber A, González NS, Algranati ID, 2000. Sensitivity of trypanosomatid protozoa to DFMO and metabolic turnover of ornithine decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279: 663-668.
26. Bacchi CJ, Nathan HC, Hutner SH, McCann PP, Sjoerdsma A, 1980. Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes, *Science* 210: 332-334.
27. Bacchi CJ, McCann PP, 1987. Inhibition of polyamine metabolism. Biological significance and bases for new therapies. Academic Press, Inc, pp 317-344.
28. Van Nieuwenhove S, Schechter PJ, Declercq J, Boné G, Burke J, Sjoerdsma A. 1985. Treatment of gambiense sleeping sickness in the Sudan with oral DFMO, an inhibitor of ornithine decarboxylase: first field trial. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 692-698.
29. Fairlamb AH, Cerami A, 1985. Identification of a novel thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14: 187-198.
30. Shames SL, Fairlamb AH, Cerami A, Walsh CT, 1986. Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly discovered member of the family disulfide-containing flavoprotein reductases. *Biochemistry* 25: 3519-3526.
31. Carrillo C, Cejas S, González NS, Algranati ID, 1999. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. *FEBS Lett.* 454: 192-196.
32. Algranati ID, Sánchez CP, González NS, 1990. Polyamines in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. The biology and chemistry of polyamines. IRL Press, pp 137-146.
33. Carrillo C, Serra MP, Pereira CA, Huber A, González NS, Algranati ID, 2004. Heterologous expression of a plant arginine decarboxylase gene in *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1674: 223-230.
34. Carrillo C, Cejas S, Huber A, González NS, Algranati ID, 2003. Lack of arginine decarboxylase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50: 312-316.
35. González NS, Huber A, Algranati ID, 2001. Spermidine is essential for normal proliferation of trypanosomatid protozoa. *FEBS Lett.* 508: 323-326.
36. Serra MP, Carrillo C, González NS, Algranati ID, 2006. Modulation of oat arginine decarboxylase gene expression and genome organization in transgenic *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *FEBS Journal* 273: 628-637.

