

TRYPANOSOMA CRUZI: TRANSPORTE DE METABOLITOS ESENCIALES OBTENIDOS DEL HOSPEDADOR

CLAUDIO A. PEREIRA¹, CAROLINA CARRILLO², MARIANA R. MIRANDA¹,
LEON A. BOUVIER¹, GASPAR E. CANEPA¹

¹Laboratorio de Biología Molecular de *Trypanosoma cruzi*, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo P. Lanari, (UBA-CONICET) Facultad de Medicina; ²Fundación Instituto Leloir, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, (UBA-CONICET), Universidad de Buenos Aires

Resumen El *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, endémica en Argentina y en toda América Latina. Presenta numerosas características metabólicas diferenciales respecto a sus hospedadores insectos y mamíferos. Algunas de estas diferencias fueron consecuencia de millones de años de adaptación al parasitismo en los cuales estos organismos protozoarios reemplazaron, a lo largo de su evolución, muchas rutas metabólicas de biosíntesis por sistemas de transporte de metabolitos desde el hospedador. En esta revisión se describen los avances en el conocimiento de los sistemas de transporte tanto bioquímicos como también de las moléculas involucradas en dichos procesos. Se aborda con especial énfasis los transportadores de aminoácidos y poliaminas de *T. cruzi* de la familia AAAP (Amino Acid/Auxin Permeases) ya que parece ser exclusiva de los tripanosomátidos. Teniendo en cuenta que estas moléculas se encuentran completamente ausentes en mamíferos podrían ser consideradas como potenciales blancos contra el *Trypanosoma cruzi*.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, mal de Chagas, aminoácidos, poliaminas, transportadores, permeasas

Abstract *Trypanosoma cruzi*: Transport of essential metabolites acquired from the host. *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease, a disease endemic not only in Argentina but also in all of Latinamerica. *T. cruzi* presents several metabolic characteristics which are completely absent in its insect vectors and in mammalian hosts. Some of these differences were acquired after millions of years of adaptation to parasitism, during which this protozoan replaced many biosynthetic routes for transport systems. In the present review, we describe the advances in the knowledge of *T. cruzi* transport processes and the molecules involved. In particular, we focus on aminoacid and polyamine transporters from the AAAP family (Amino Acid/Auxin Permeases), because they seem to be exclusive transporters from trypanosomatids. Taking into account that these permeases are completely absent in mammals, they could be considered as a potential target against *Trypanosoma cruzi*.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, aminoacids, polyamines, transporters, permeases

Aspectos generales del *Trypanosoma cruzi* y su relación con el transporte de metabolitos

Según los datos del Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén (<http://www.fac.org.ar/fec/chagas/fatala/>), en la Argentina existen aproximadamente 2.3 millones de personas infectadas con *T. cruzi*. Por otro lado, luego de programas sanitarios de control de la

enfermedad en los países del Cono Sur (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay), la OMS anunció la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas en diferentes períodos: Uruguay en 1997, Chile en 1999 y Brasil en 2001¹. A pesar de esto, se han registrado brotes recientes de la enfermedad, por ejemplo en marzo de 2005 en el estado de Santa Catarina, Brasil².

En la actualidad, las posibilidades de tratamiento quimioterapéutico de la enfermedad de Chagas se restringen básicamente a tratamientos sintomáticos ya que sólo se cuenta con dos drogas de limitada efectividad, desarrolladas hace más de tres décadas³. La identificación y caracterización de nuevas rutas metabólicas en los parásitos, con especial énfasis en aquellas que se encuentran ausentes en mamíferos, son el primer paso en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que

Recibido: 20-XI-2007

Aceptado: 16-I-2008

Dirección postal: Dr. Claudio A. Pereira, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Combatientes de Malvinas 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina

Fax: (54-11) 4514-8708

e-mail: cpereira@mail.retina.ar

complementen las indispensables políticas sociales y de vigilancia sanitaria. Algunas moléculas que cumplen con los requisitos mencionados se encuentran asociadas a los procesos de transporte y al metabolismo energético de los parásitos.

Los organismos denominados genéricamente tripanosomátidos pertenecen a la familia Trypanosomatidae, la cual incluye protozoarios parásitos de gran importancia sanitaria. En nuestro país, y en las Américas en general, el más relevante de esta familia es el *Trypanosoma cruzi* ya que es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. A su vez, en África el *Trypanosoma brucei* es responsable de la enfermedad del sueño, mientras que parásitos del género *Leishmania* causan diferentes enfermedades en el cinturón del trópico⁴. Estos tres parásitos comparten diversas características comunes que en muchos casos son exclusivas de esta familia como algunos grupos de transportadores de metabolitos⁵.

El género *Trypanosoma* tuvo su origen hace 600 millones de años y probablemente los primeros hospedadores de estos parásitos primitivos fueron insectos del género *Hemiptera*, al cual pertenece la vinchuca. Comenzaron a infectar mamíferos primitivos desde hace 150 millones de años y los primeros humanos hace 15 000-20 000 años^{6, 7, 8}. En tantos millones de años de adaptación al parasitismo estos organismos protozoarios reemplazaron, a lo largo de su evolución, muchas rutas metabólicas de biosíntesis por sistemas de transporte de metabolitos esenciales que adquieren desde el medio extracelular del hospedador. En consecuencia, en muchas vías metabólicas la disponibilidad intracelular de sustratos e intermediarios depende únicamente de esos procesos de transporte. Esto hace mecanismos fundamentales para la supervivencia del parásito y convierte a las moléculas involucradas en potenciales blancos terapéuticos.

El ciclo vital del *Trypanosoma cruzi* es conocido desde hace ya casi un siglo⁹. La infección de los mamíferos hospedadores ocurre cuando el vector infectado, el triatomíneo, se alimenta de un hospedador vertebrado y después de succionar la sangre el vector defeca los parásitos infectantes (tripomastigotes metacíclicos). El prurito causado por la lesión cutánea de la picadura facilita el contacto de los parásitos con la lesión y se produce así la infección. Otras vías de infección son a través de las mucosas bucal y conjuntiva¹⁰. Los tripomastigotes metacíclicos invaden células de varios tejidos, donde se diferencian a amastigotes, los cuales tienen ciclos de división binaria. Una porción de los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, que luego retornan al torrente sanguíneo por la lisis de la célula hospedadora. Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar otras células o bien ser ingeridos por el insecto vector durante la picadura al hospedador. En el intestino medio del insecto los tripomastigotes sanguíneos se diferencian a

epimastigotes, que son la forma replicativa y no infecciosa dentro del insecto, y a lo largo del tracto digestivo se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, completándose de esta manera el ciclo vital del parásito¹¹.

Este resumen del complejo ciclo vital del *T. cruzi* tiene por objeto resaltar la capacidad del parásito de sobrevivir en ambientes muy diferentes en calidad y disponibilidad de nutrientes, como son el intestino del insecto transmisor, el torrente sanguíneo y el medio intracelular del hospedador. Durante este ciclo los mecanismos de transporte de nutrientes y la plasticidad metabólica cumplen un papel esencial ya que permiten al parásito adaptar rápidamente su metabolismo y sobrevivir en tan diferentes condiciones.

Transporte de metabolitos en el *Trypanosoma cruzi*

Los procesos de transporte son el primer paso de una ruta metabólica y de ellos depende la disponibilidad de sustratos dentro de la célula. Esto es importante en los tripanosomátidos porque en muchos casos los procesos de biosíntesis fueron parcial o totalmente reemplazados en la evolución por procesos de transporte. Un ejemplo de ello son las purinas, cuya obtención depende exclusivamente de diversos sistemas de transporte desde el medio extracelular, o bien mediante rutas de "salvataje", ya que los tripanosomátidos no pueden sintetizarlas *de novo*, mientras que conservan la capacidad de sintetizar pirimidinas¹². Siguiendo lo expuesto anteriormente, los diferentes transportadores de membrana plasmática que facilitan el ingreso de purinas y pirimidinas han sido objeto de numerosos trabajos¹³. Entre los estudios realizados se clonó y caracterizó un transportador de adenosina en *Trypanosoma brucei*, el cual, además, resultó ser la principal vía de ingreso de drogas como melarsoprol y pentamidina, utilizadas en el tratamiento contra este parásito¹⁴. También se ha demostrado que los arsenicales basados en melamina y las diamidinas, utilizados actualmente en terapias para las tripanosomiasis africanas, ingresan al medio intracelular exclusivamente a través de transportadores de membrana¹⁵.

La glucosa es la principal fuente de carbono para algunos estadios de estos parásitos que presentan una característica única basada en la compartimentalización de la maquinaria responsable de la glucólisis entre el citoplasma y una organela denominada glicosoma¹⁶. Estos organismos poseen también las proteínas necesarias para la adquisición de glucosa desde el medio externo y *T. cruzi* posee además transportadores de hexosas fosfato tal como existen en bacterias¹⁷. Hasta ahora se ha descrito un único sistema de transporte de glucosa en *T. cruzi*, presente tanto en epimastigotes como en tripomastigotes. Se trata de un sistema de difusión facili-

tada, con alta afinidad por la glucosa, que también reconoce D-fructosa¹⁸ y está relacionado con los que se han encontrado en *Leishmania sp.*, *T. brucei*, *T. vivax* y *Crithidia fasciculata*^{17,19}.

Gran parte del metabolismo de *T. cruzi* está basado en la utilización de aminoácidos, no sólo como fuente de carbono sino también como reservorio de energía. El *T. cruzi* requiere principalmente de prolina²⁰ como fuente exógena de carbono, sin embargo también es capaz de utilizar asparagina, glutamina, glutamato, leucina, e isoleucina²¹. Por otro lado, estos parásitos carecen de enzimas para la síntesis de todos los aminoácidos esenciales humanos²². Finalmente, el aspartato, junto con la prolina y el glutamato, revisten particular importancia en el *Trypanosoma cruzi* ya que se encuentran involucrados en la diferenciación *in vitro* del estadio epimastigote a tripomastigote metacíclico (metacicloogénesis) por mecanismos aún desconocidos²³.

Nuestro laboratorio estudió las características bioquímicas del transporte de aspartato y sus mecanismos de regulación. Simultáneamente se realizó una predicción mediante estrategias bioinformáticas de los destinos metabólicos del aspartato y se identificaron siete enzimas que utilizan el aspartato como sustrato²⁴; sin embargo, no se pudieron establecer los mecanismos que podrían inducir la metacicloogénesis, más allá del estrés nutricional. Adicionalmente, otros grupos demostraron que existen dos sistemas específicos de transporte activo de prolina en epimastigotes: uno dependiente de H⁺ y otro dependiente de ATP²⁵.

La cisteína puede ser producida a partir de homocisteína por procesos de trans-sulfuración, además la síntesis *de novo* también puede obtenerse a partir de serina²⁶. Pero debido a la alta demanda de fuentes de grupos sulfhidrilos, *T. cruzi* posee un sistema de transporte de alta afinidad para cisteína (datos de nuestro laboratorio no publicados). Otro rasgo importante del metabolismo de los aminoácidos en tripanosomátidos es la necesidad de cisteína, glutamato, glicina y metionina como precursores para la síntesis de glutatión. Dicha molécula se conjuga en relación 2:1 con una molécula de espermidina para formar el tripanotión que, como veremos más adelante, posee un papel único en tripanosomátidos para las defensas contra el estrés oxidativo²⁷.

La arginina puede ser utilizada como un reservorio de energía en su forma fosforilada, como fosfoarginina, en donde acumula un fosfato de alta energía que puede transferir rápidamente al ADP para regenerar ATP en situaciones de alto consumo energético celular. Esto es particularmente relevante ya que: a) los tripanosomátidos carecen de sustancias de reserva en forma de hidratos de carbono; b) esta ruta metabólica se encuentra completamente ausente en mamíferos²⁸.

Nuestro grupo de trabajo ha caracterizado bioquímicamente un transportador específico y de alta afinidad

para arginina en *T. cruzi*, y hemos descrito parte de los mecanismos que lo regulan²⁹. Dicho transportador presenta características muy particulares, lo que permitió postular que la arginina cumpliría un papel central en el metabolismo del parásito. Estudiando el destino metabólico, posterior a su incorporación por esta vía de transporte, se describió la presencia de fosfoarginina y se identificó a la arginina quinasa, enzima involucrada en su síntesis³⁰.

Más recientemente, nuestro grupo describió en *T. cruzi* una nueva permeasa de arginina de baja afinidad. Estos dos componentes, uno de alta y otro de baja afinidad, tendrían un papel complementario, siendo posiblemente funcionales en las diferentes condiciones que el parásito enfrenta durante su ciclo de vida como parte de un mecanismo de adaptación a las distintas concentraciones que este aminoácido presenta en los hospedadores mamíferos e insectos³¹.

Las poliaminas son moléculas sencillas esenciales para la supervivencia de *T. cruzi*. En relación a su transporte, fueron caracterizados bioquímicamente dos sistemas con alta afinidad para las diaminas putrescina y cadaverina y de baja afinidad para espermina y espermidina^{32,33}. Estos transportadores se regulan por las condiciones de crecimiento y son de particular importancia ya que las poliaminas son precursoras en la biosíntesis de tripanotión, un conjugado de glutatión-espermidina fundamental para el equilibrio redox intracelular en tripanosomátidos²⁷. Es interesante resaltar que *T. cruzi* es auxótrofo (incapaz de sintetizar un compuesto determinado) para poliaminas ya que carece de las enzimas ornitina decarboxilasa y arginina decarboxilasa involucradas en el primer paso de la biosíntesis de poliaminas^{34,35}. Esto destaca la importancia de los sistemas de transporte para cubrir las necesidades metabólicas del parásito.

Hasta el presente, se ha identificado, clonado y caracterizado una permeasa de poliaminas en el parásito *Leishmania major* que se encuentra predominantemente expresada en el estadio dentro del insecto vector³⁶. Nuestro laboratorio ha caracterizado funcionalmente el gen de *T. cruzi* ortólogo al transportador de poliaminas de *L. major*. Este gen, denominado TcPAT12, se expresó en ovocitos de *Xenopus* y demostró ser un transportador de alta afinidad de espermidina (con valores de Km en el orden de μM) con características cinéticas similares a las medidas en epimastigotes de *T. cruzi*³⁷.

Debido a su papel y su posible utilización en el desarrollo de nuevas terapias, existe un profundo interés en conocer las características moleculares y funcionales de los transportadores de metabolitos en tripanosomátidos. Por la importancia del transporte, en particular de aminoácidos y poliaminas, existe una gran cantidad de análogos que se encuentran en uso o en proceso de prueba para el tratamiento de tripanosomiasis o leishmaniasis

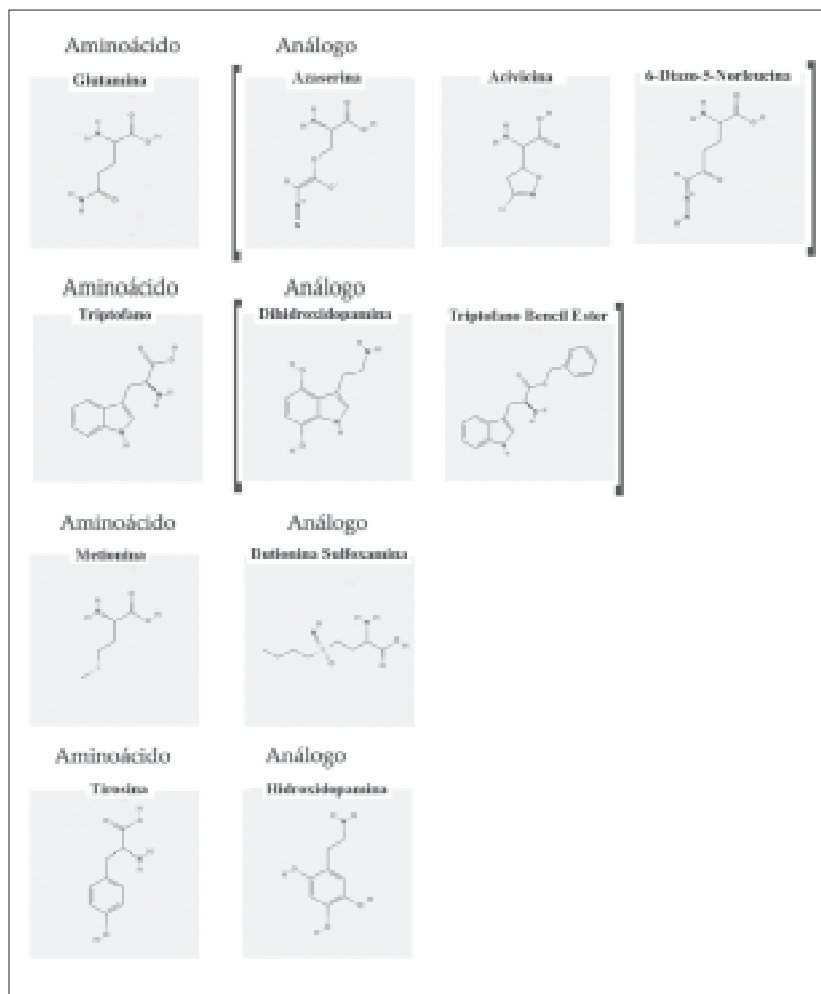


Fig. 1.– Algunos de los análogos de aminoácidos que están en desarrollo como posibles agentes quimioterapéuticos contra las tripanosomiasis (Barrett y Gilbert, 2006)¹⁵; en la figura se puede observar el aminoácido junto con su análogo.

(Fig. 1); entre ellos: eflornitina (análogo de ornitina), acivicina (análogo de glutamina), 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (análogo de glutamina), azaserina (análogo de glutamina), triptofano bencil éster (análogo de triptofano), butionina sulfoxamina (análogo de metionina), hidroxidopamina (análogo de tirocina), dihidroxitriptamina (análogo de triptofano)¹⁵.

Resumiendo, en el transporte de aminoácidos y poliaminas en el *T. cruzi* hasta el presente se han descrito los procesos de transporte de sólo cuatro aminoácidos: arginina, prolina, aspartato y glutamato^{24, 25, 29, 31, 38}, dos de los cuales fueron realizados por nuestro grupo (arginina y aspartato). Sin embargo, ninguna molécula involucrada en el transporte de aminoácidos en el *T. cruzi* ha podido aún ser caracterizada desde el punto de vista molecular, siendo los transportadores de hexosas¹⁸ y de espermidina³⁷ los únicos caracterizados molecularmente.

La familia AAP (*Amino Acid-Auxin Permeases*) del *Trypanosoma cruzi*

Luego de la reciente secuenciación del genoma de *T. cruzi* se estima que existen al menos 374 genes que codifican para distintos transportadores (Fig. 2) distribuidos en tres grupos principales: de los canales iónicos, los transportadores dependientes de ATP y los transportadores secundarios (Para más información ver: www.membranetransport.org). Debido a la escasa información que relacione a estas moléculas con procesos de transporte ya descritos, se decidió analizar los datos preliminares del proyecto genoma de *T. cruzi* en busca de familias de secuencias que codifiquen para posibles transportadores de aminoácidos. Para ello se diseñaron algoritmos que facilitarían la identificación y ensamblado de las secuencias, y también la predicción de los marcos

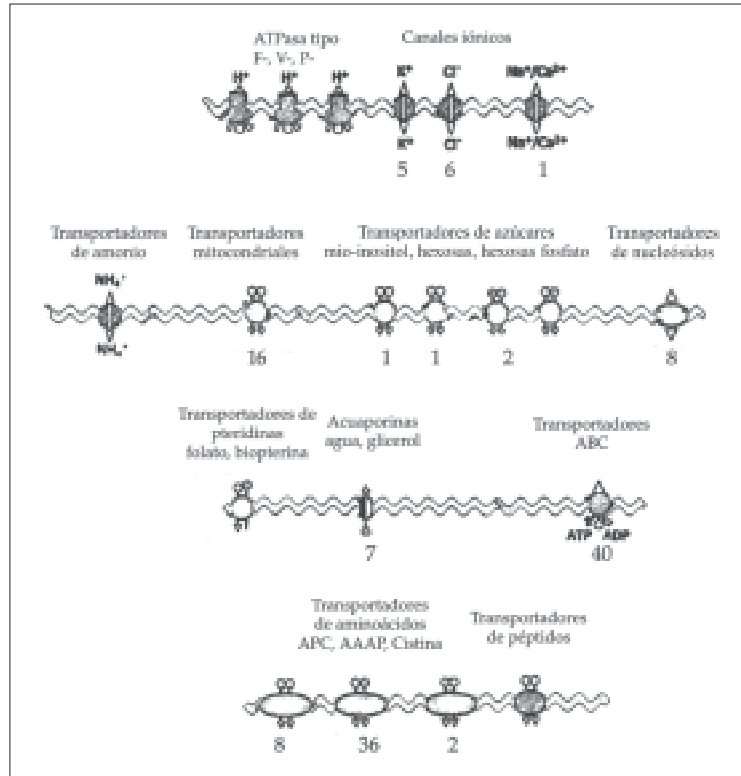


Fig. 2.- Esquema de transportadores de metabolitos hallados en el genoma de *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de Berriman et al. 2005²². ABC: ATP Binding Cassette, APC: amino acid/polyamine/organocation, AAAP: amino acid/auxin permease.

abiertos de lectura de genes pertenecientes a familias numerosas. De esta manera, se llevó a cabo una caracterización bioinformática de una de las mayores familias de posibles transportadores de aminoácidos de *T. cruzi* que podría incluirse en la superfamilia denominada AAAP (Amino Acid/Auxin Permeases)³⁹. Se identificaron al menos 60 miembros distribuidos en 12 subgrupos definidos por identidad de secuencia. Se realizaron predicciones de distintas características de esta familia, por ejemplo, el número de genes por subgrupo, la topología de las moléculas y la presencia de ortólogos en otros tripanosomátidos; por último, se verificó la expresión de los miembros de cada uno de los subgrupos predichos como un control de la estrategia utilizada⁴⁰. Posteriormente, dentro de la familia AAAP se caracterizó también una secuencia ortóloga en *Leishmania amazonensis* que posee expresión diferencial dentro del ciclo de vida del parásito⁴¹. Como ya se mencionó, uno de los aspectos interesantes de esta familia de permeasas es que no se encuentra representada en otros organismos.

Luego de la publicación de los genomas de *Trypanosoma cruzi*²², *Trypanosoma brucei*²² y *Leishmania major*⁴³, nuestros hallazgos respecto a esta familia de transportadores fueron confirmados por otros grupos⁵. Mediante un

análisis exhaustivo se demostró que esta familia de transportadores se encuentra en los tres tripanosomátidos y que, además, posee una alta fluidez génica, ya que, según la especie, a pesar de haberse originado de un ancestro tripanosomátido común, ocurrieron expansiones unilaterales en el número de *loci* de transportadores por mecanismos de transposición y duplicación en tándem, así como también pérdida de genes⁵. Nuestro grupo de trabajo realizó recientemente el clonado y caracterización del primer transportador de poliaminas de *T. cruzi*, hecho relevante ya que el transporte de poliaminas desde el medio extracelular es el único mecanismo que tiene el parásito para cubrir sus necesidades vitales: el *T. cruzi* es el único tripanosomátido auxótrofo para poliaminas³⁷. Se encuentra pendiente la caracterización funcional de todos los miembros de la familia AAAP de *T. cruzi*.

Perspectivas

La evolución a la vida parasitaria necesita la adaptación a un nicho especializado. Ejemplos de adaptaciones comunes incluyen sistemas de interacción con el hospede-

dador, caminos metabólicos que permiten la adquisición de nutrientes y mecanismos de evasión de las defensas. Si bien estos rasgos pueden originarse por un proceso de cambio gradual, existen mecanismos como la transferencia horizontal de genes que permitiría a potenciales parásitos adaptarse rápidamente a los nuevos nichos.

Debido a su naturaleza de parásito, el *Trypanosoma cruzi* es incapaz de sintetizar numerosos componentes celulares. Esta incapacidad metabólica se compensa mediante sistemas de transporte de múltiples metabolitos del hospedador. El *T. cruzi* consume 692 metabolitos que es capaz de producir y otros 152 que no puede sintetizar, es decir que los obtiene del medio extracelular⁴⁴. La evolución del parásito dentro del hospedador ha resultado en la pérdida de ciertos caminos metabólicos y la adquisición de otros procesos bioquímicos exclusivos de *T. cruzi*. Podrían entonces explotarse las diferencias entre el parásito y el hospedador para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos. Por lo tanto son necesarios nuevos estudios sobre la capacidad biosintética de aminoácidos en *T. cruzi*.

Algunas preguntas surgen observando la redundancia en esta familia de transportadores y su plasticidad génica: ¿Cada molécula transportaría un grupo de aminoácidos, un único aminoácido o existirán ambos casos? ¿Todos los transportadores se expresan en todas las células, estadios del ciclo de vida y condiciones extracelulares? ¿Se trata de transportadores de membrana plasmática o también están presentes en membranas de organelas? ¿La presencia de esta familia multigénica le facilita la adaptación a los diferentes ambientes? ¿Los pseudogenes de transportadores permiten una adaptación a nuevos nichos a lo largo de la evolución?

Para comenzar a responder alguna de estas preguntas es necesario el estudio de diferentes transportadores en los distintos estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, así como también determinar la especificidad de sustrato y las características bioquímicas de cada uno de ellos, para lo cual estos genes deben ser clonados y expresados en un contexto genético apropiado.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 5492), la Universidad de Buenos Aires (UBACyT X073) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT-PICT REDES 2003-00300, PICT 2004-26108 y PICT 2005-33431). C.A.P. y C.C. son miembros de la carrera de investigador científico del CONICET, C.C. es docente del Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA, M.R.M. es becaria doctoral de la Fundación YPF, G.E.C. es becario doctoral de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y L.A.B. es becario doctoral del CONICET. Finalmente, un agradecimiento especial al Dr. Juan Antonio Barcat por su paciencia con las correcciones del manuscrito.

Bibliografía

1. Tropical disease research: progress 1999-2000, <http://www.who.int/tdr>
2. Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 25-32.
3. Reddy M, Gill SS, Kalkar SR, Wu W, Anderson PJ, Rochon PA. Oral drug therapy for multiple neglected tropical diseases: a systematic review. *JAMA* 2007; 298: 1911-24.
4. Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, et al. The trypanosomiasis. *Lancet* 2003; 362:1469-80.
5. Jackson AP. Origins of amino acid transporter loci in Trypanosomatid parasites. *BMC Evol Biol* 2007; 7: 26.
6. Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 104: 219-32.
7. Ghedin E, Bringaud F, Peterson J, et al. Gene synteny and evolution of genome architecture in Trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 134: 183-91.
8. Vazquez MP. The genetics and genomics of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biomed Pharm Sci* 2007; 1: 1-11.
9. Chagas C. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909; 1: 159-218.
10. Romaña C. Enfermedad de Chagas. Lopez Libreros Ed., 1963, Buenos Aires.
11. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001; 31: 472-81.
12. Bellofatto V. Pyrimidine transport activities in trypanosomes. *Trends Parasitol* 2007; 23: 187-9.
13. Landfear SM. Molecular genetics of nucleoside transporters in Leishmania and African trypanosomes. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 149-55.
14. Maser P, Sutterlin C, Kralli A, Kaminsky R. A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance. *Science* 1999; 285: 242-4.
15. Barrett MP, Gilbert IH. Targeting of toxic compounds to the trypanosome's interior. *Adv Parasitol* 2006; 63: 125-83.
16. Cazzulo JJ. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J Bioenerg Biomembr* 1994; 2: 157-65.
17. Tetaud E, Barrett MP, Bringaud F, Baltz T. Kinetoplastid glucose transporters. *Biochem J* 1997; 325: 569-80.
18. Tetaud E, Bringaud F, Chabas S, Barrett MP, Baltz T. Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8278-82.
19. Barrett MP, Tetaud E, Seyfang A, Bringaud F, Baltz T. Trypanosome glucose transporters. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 91: 195-205.
20. Bringaud F, Riviere L, Coustou V. Energy metabolism of Trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* 2006; 149: 1-9.
21. Zeledon R. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. II. Effect of carbohydrates and related substances and some amino compounds on the respiration. *J Parasitol* 1960; 46: 541-51.
22. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 2005; 309: 416-22.

23. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* 1985; 3: 315-27.
24. Canepa GE, Bouvier LA, Urias U, et al. Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 247: 65-71.
25. Tonelli RR, Silber AM, Almeida-de-Faria M, Hirata IY, Colli W, Alves MJ. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol* 2004; 8: 733-41.
26. Nozaki T, Ali V, Tokoro M. Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. *Adv Parasitol* 2005; 60: 1-99.
27. Krauth-Siegel RL, Meiering SK, Schmidt H. The parasite-specific trypanothione metabolism of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Biol Chem* 2003; 384: 539-49.
28. Pereira CA, Alonso GD, Torres HN, Flawia MM. Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated Trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol* 2002; 49: 82-5.
29. Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Flawia MM, Torres HN. L-arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol* 1999; 46: 566-70.
30. Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, et al. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. *J Biol Chem* 2000; 275: 1495-501.
31. Canepa GE, Silber AM, Bouvier LA, Pereira CA. Biochemical characterization of a low-affinity arginine permease from the parasite *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 236: 79-84.
32. Gonzalez NS, Ceriani C, Algranati ID. Differential regulation of putrescine uptake in *Trypanosoma cruzi* and other Trypanosomatids. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 120-8.
33. Le Quesne SA, Fairlamb AH. Regulation of a high-affinity diamine transport system in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem J* 1996; 316: 481-6.
34. Carrillo C, Cejas S, Gonzalez NS, Algranati ID. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. *FEBS Lett* 1999; 454: 192-6.
35. Carrillo C, Cejas S, Huber A, Gonzalez NS, Algranati ID. Lack of arginine decarboxylase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Eukaryot Microbiol* 2003; 50: 312-6.
36. Hasne MP, Ullman B. Identification and characterization of a polyamine permease from the protozoan parasite *Leishmania major*. *J Biol Chem* 2005; 280: 15188-94.
37. Carrillo C, Canepa GE, Algranati ID, Pereira CA. Molecular and functional characterization of a spermidine transporter (TcPAT12) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344: 936-40.
38. Silber AM, Rojas RL, Urias U, Colli W, Alves MJ. Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 2006; 36: 157-63.
39. Young GB, Jack DL, Smith DW, Saier MH Jr. The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1415: 306-322.
40. Bouvier LA, Silber AM, Galvao Lopes C, et al. Post genomic analysis of permeases from the amino acid/auxin family in protozoan parasites. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 547-56.
41. Geraldo MV, Silber AM, Pereira CA, Uliana SR. Characterization of a developmentally regulated amino acid transporter gene from *Leishmania amazonensis*. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 242: 275-80.
42. El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005; 309: 409-15.
43. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 2005; 309: 436-42.
44. Pinney JW, Papp B, Hyland C, Wambua L, Westhead DR, McConkey GA. Metabolic reconstruction and analysis for parasite genomes. *Trends Parasitol* 2007; 23: 548-54.

El hombre atraviesa el presente con los ojos vendados. Sólo puede intuir y adivinar lo que de verdad está viviendo. Y después, cuando le quitan la venda de los ojos, puede mirar al pasado y comprobar qué es lo que ha vivido y cual era su sentido.

Milan Kundera

El libro de los amores ridículos (1968)