

## METABOLISMO ENERGÉTICO EN PARÁSITOS

### ***Dependencia metabólica***

El concepto de dependencia metabólica está estrechamente ligado al de parasitismo. De hecho, puede definirse como parásito a un organismo que, no solo se halla en una continua e íntima asociación con otro (el hospedador), sino que además es metabólicamente dependiente de él.

Pueden definirse los siguientes tipos de dependencia metabólica:

- a) ***estímulo del desarrollo:*** por ejemplo, la alta presión parcial de CO<sub>2</sub> en el intestino, induce el desenquistamiento de ooquistes de coccidios y quistes metacercarios de trematodos o induce el desarrollo de larvas de nematodos (*Haemonchus contortus*) que se encuentran en estado letárgico. Estos mismos procesos pueden ser acelerados por el bajo potencial redox del hábitat o la presencia de bilis.
- b) ***control de la maduración:*** muchos parásitos coordinan sus ciclos de vida con los de su hospedador, censando metabolitos u hormonas del mismo. El protozoo *Opalina ranarum* responde a los niveles de hormonas sexuales de su anfibio hospedador sincronizando la liberación de quistes en el momento en que las ranas están en su etapa de reproducción. Esto garantiza que los quistes puedan dispersarse infectando renacuajos.
- c) ***necesidad de enzimas digestivas:*** organismos como los cestodos, carentes de aparato digestivo, necesitan absorber compuestos simples como monosacáridos y aminoácidos, como fuentes de energía, carbono o nitrógeno. Esto los hace dependientes de las enzimas digestivas presentes en el intestino del huésped.
- d) ***dependencia nutricional:*** esta es la más común de las dependencias metabólicas, donde tejidos o secreciones del hospedador constituyen elementos nutritivos para el parásito, o incluso la misma comida del hospedador, antes o después de ser digerida. Esto conduce frecuentemente, a una simplificación metabólica en el parásito.

Para ejemplificar en detalle, especialmente este último caso de dependencia metabólica se describirán las adaptaciones de distintos grupos de parásitos en su metabolismo energético.

### ***Metabolismo energético en protozoos***

#### **Protozoos aeróbicos. Trypanosomátidos:**

Se utilizarán como modelos los distintos estadios metabólicos (y del ciclo de vida) de *T. brucei*. Lo descrito para la forma procíclica (presente en el invertebrado vector) puede ser extendido a *T. cruzi* (epimastigotes y tripomastigotes) y promastigotes de *Leishmania* sp.

*T. brucei* posee un ciclo de vida complejo, comprendiendo la forma tripomastigota alargada replicativa en mamíferos y la intermedia o “stumpy” no replicativa en mamíferos, infectiva para el insecto. En la mosca vector pueden describirse las formas procíclica de intestino medio, epimastigota y tripomastigota metacíclica muy similar a la forma alargada de mamíferos.

El ciclo de vida sigue el orden descrito, como así también el grado de complejidad metabólica. La **forma sanguínea** alargada es absolutamente dependiente de glucosa como recurso energético, la cual cataboliza mediante la glucólisis. No parece haber material de reserva (glucógeno, trehalosa, etc.) en estos organismos. La glucosa es cuantitativamente convertida en piruvato en la forma sanguínea, con la obtención de dos moles de ATP netos por mol de glucosa consumida. No existe lactato deshidrogenasa ni alcohol deshidrogenasa, por lo que la regeneración de poder oxidativo en forma de NAD<sup>+</sup> se lleva a cabo mediante un sistema de lanzadera que involucra una glicerol fosfato deshidrogenasa extramitocondrial, que interconvierte dihidroacetona fosfato y NADH en glicerol fosfato y NAD<sup>+</sup>, y una glicerol fosfato oxidasa acoplada a una oxidasa alternativa, ambas mitocondriales, donde el glicerol fosfato es reoxidado a dihidroacetona fosfato con reducción de oxígeno molecular.

Un aspecto exclusivo de los Kinetoplastidos es la existencia de una organela denominada glicosoma, que aloja a las primeras enzimas glucolíticas. El glicosoma es impermeable a nucleótidos, cofactores y fosfoazúcares, por lo que posee un pool exclusivo de nucleótidos de adenosina y NAD(H). Dado que la piruvato quinasa, última enzima glucolítica, tiene localización citoplasmática, la obtención neta de ATP se lleva a cabo en el citosol, donde estará disponible para los diversos procesos metabólicos de la célula.

La glucólisis es un tipo de metabolismo descrito como poseedor de un “efecto turbo”. Esto implica que la vía debe invertir energía al comienzo, para acumular intermediarios suficientes que empujen el equilibrio hacia la última etapa productora de energía neta (piruvato quinasa). De no existir control en la expresión de las enzimas y disponer de un exceso de glucosa, todo el ATP disponible será invertido en la producción de intermediarios fosforilados. Esto tiene dos consecuencias: la depleción del contenido energético celular y la acumulación de compuestos fosforilados tóxicos. El consumo de energía se lleva a cabo en la primer (hexoquinasa) y tercer (fosfofructoquinasa 1) reacción enzimática, lo que está balanceado por la generación de energía a nivel de la fosfoglicerato quinasa. Las enzimas glucolíticas comprendidas desde hexoquinasa a fosfoglicerato quinasa son de localización glicosomal, lo que asegura que el balance neto de energía dentro del glicosoma sea nulo. El NAD<sup>+</sup> consumido por la gliceraldehido deshidrogenasa glicosomal es contrabalanceado por el sistema de lanzadera descrito anteriormente, dado que el NAD<sup>+</sup> es regenerado por la glicerol deshidrogenasa, que tiene localización glicosomal.

Estos organismos poseen una única y gran mitocondria, extendida a lo largo de todo el cuerpo celular. En la forma sanguínea la mitocondria posee muy pocas invaginaciones, y sus funciones están

reducidas a un mínimo. Carece de la mayoría de las enzimas del ciclo de Krebs y de cadena electrónica, por lo que el piruvato acumulado en la glucólisis no es ulteriormente utilizado y se excreta al medio.

Esta aparente falta de eficiencia en la obtención de energía (comparada con la respiración mitocondrial presente en la mayoría de los eucariotas) no es tal, si se considera que el organismo posee una fuente inagotable de glucosa. La concentración de glucosa en sangre es en promedio de 5 mM, no muy elevada, pero constante. *T. brucei* consume 8 micromoles de glucosa por minuto por gramo de peso celular, que lo convierte como uno de los flujos glucolíticos más elevados de la naturaleza. El transportador de glucosa de la membrana plasmática del parásito es altamente eficiente. Este es el primer punto de control del flujo glucolítico. El segundo lo representa la piruvato quinasa citosólica, que es regulada alostéricamente por fructosa 2, 6 difosfato. La hexoquinasa y fosfofructo quinasa, enzimas reguladas alostéricamente en otros organismos y puntos de control primordiales de la glucólisis, no presentan ningún tipo de control en tripanosomátidos, lo que resulta lógico considerando su localización glicosomal. De hecho, se estima que la función de esta organela es convertir glucosa rápidamente y sin limitaciones, en fosfoenolpiruvato disponible en el citosol. Otra función es la de suplir la clásica regulación alostérica de las primeras enzimas de la glucólisis por la compartimentalización.

La anoxia no es una condición natural para estos organismos, sin embargo podrían ocurrir cortos períodos de anaerobiosis en situaciones de alta parasitemia y cuando el protozoo ha invadido otros tejidos. Esto hace interesante analizar qué tipo de estrategia presenta *T. brucei* ante esta situación. Experimentalmente pueden reproducirse estas condiciones en el laboratorio, mediante una atmósfera controlada o por inhibición de la oxidasa alternativa por la droga SHAM o ácido salicilhidroxámico. En estas condiciones el parásito es capaz de sobrevivir por 48 hs y se aprecia la acumulación equimolar de glicerol y piruvato. El rendimiento energético se reduce a la mitad, dado que para balancear el consumo de NAD<sup>+</sup>, una de las triosafosfato producidas por la aldolasa sigue vía a piruvato y un mol de ATP, pero la otra es convertida en glicerol fosfato y NAD<sup>+</sup>. El glicerol fosfato es convertido en glicerol y ATP, con balance energético nulo en el glicosoma. Esto se logra mediante la glicerol quinasa glicosomal, una quinasa de propiedades inusuales y exclusiva de estos organismos, capaz de actuar en sentido inverso.

La **forma intermedia** de *T. brucei* presenta un leve grado de activación mitocondrial, por la expresión de algunas enzimas del ciclo de Krebs. Está muy pobremente estudiada, pero se ha visto acumulación de piruvato (75%), glicerol (5%), acetato (9%) y succinato (1%) como productos finales de la glucólisis.

Cuando esta última forma es ingerida por una mosca, se produce una diferenciación celular a la **forma procíclica** replicativa en el intestino del insecto. La activación metabólica y especialmente mitocondrial llega a su máximo. Todas las enzimas del ciclo de Krebs están presentes y también una cadena de transporte electrónico similar a la de otros eucariotas. Aún así, la fosforilación oxidativa es mínima y la producción de energía está muy por debajo de los 36 moles de ATP, tal vez cercano a los 4 moles por mol de glucosa. El catabolismo de glucosa conduce a la acumulación de succinato, acetato y alanina, en lugar de ser

totalmente degradada a  $\text{CO}_2$ , como sería de esperar. La glucosa es un recurso escaso y esporádico en el insecto, donde ahora abunda la prolina, utilizable como fuente de carbono. Esta es inmediatamente convertida en glutamato por el parásito y luego en 2-cetoglutarato, un intermediario del ciclo de Krebs, con acumulación de succinato.

La producción de ATP en mitocondria es fundamentalmente a nivel de sustrato, especialmente mediante la producción de acetil CoA desde piruvato (piruvato deshidrogenasa) y la transferencia de CoA a succinato. El succinil CoA resultante es hidrolizado a succinato y CoA con la concomitante producción de ATP mediante la enzima succinil CoA sintetasa, perteneciente al ciclo de Krebs. Otros aminoácidos utilizables son el glutamato, la glutamina y la treonina, que es convertida en acetil CoA. Una pequeña proporción de acetil CoA ingresa al ciclo de Krebs, solo para generar los intermediarios del mismo, ya que las enzimas del ciclo involucradas en el catabolismo de los aminoácidos descritos son solo la cetoglutarato deshidrogenasa y succinil CoA sintetasa.

El piruvato utilizado por la mitocondria puede provenir del exterior o del citosol, producto de la glucólisis. Esta se sigue llevando a cabo en el glicosoma, aunque algunas enzimas han cambiado su localización subcelular. La fosfoglicerato quinasa es ahora citosólica, lo que hace que se genere una molécula adicional de ATP en el citosol. Para mantener nulo el balance energético glicosomal, el fosfoenolpiruvato (PEP) puede ser carboxilado a oxaloacetato por una PEP-carboxiquinasa glicosomal, con producción de ATP. El PEP también puede ser convertido a piruvato y ATP por la piruvato quinasa citosólica y por una piruvato fosfato diquinasa glicosomal. La recuperación de  $\text{NAD}^+$  vía la lanzadera descrita al comienzo, es ahora reemplazada mayoritariamente por otra estrategia. Dentro del glicosoma, el oxaloacetato es reducido a malato con producción de  $\text{NAD}^+$  mediante una malato deshidrogenasa. El malato se convierte en fumarato y este en succinato y  $\text{NAD}^+$  por una fumarato reductasa glicosomal. Esta es la única representante soluble y dependiente de  $\text{NADH}$  de este tipo de enzimas en la naturaleza. En conjunto con la malato deshidrogenasa proporcionan dos moles de  $\text{NAD}^+$  por mol de PEP, lo que permite utilizar solo la mitad de PEP para mantener el poder oxidativo glicosomal, utilizando el PEP restante en la producción de energía en citosol, o eventualmente en glicosoma.

### **Protozoos aeróbicos. Plasmonios:**

Solo se conoce con algún detalle el metabolismo energético del estadio intraeritrocitario, el cual es altamente dependiente de glucosa. Su catabolismo se realiza vía glucólisis, la cual no está compartimentalizada. Todas las enzimas glucolíticas parecen ser citosólicas. La regeneración de  $\text{NAD}^+$  se produce vía lactato deshidrogenasa. Recordemos que la célula hospedadora carece de mitocondria y por tanto de ciclo de Krebs y cadena electrónica. El parásito sí posee mitocondria y aparentemente varias de las enzimas del ciclo están presentes. Sin embargo, en forma similar a lo descrito para los tripanosomátidos, la obtención de energía no parece ser a nivel de fosforilación oxidativa, sino a nivel de sustrato. Podemos concluir que estos organismos consumen glucosa básicamente como fermentación láctica.

Los plasmodios degradan con avidez la hemoglobina, descomponiéndola en aminoácidos y hemo. El grupo hemo es altamente tóxico, ya que es una fuente generadora de radicales libres. Estos parásitos reducen

esta fuente de estrés oxidativo, en primera instancia, polimerizando los grupos hemo en un compuesto conocido como Hemozoína, la que proporciona los característicos gránulos oscuros que son utilizados como método de diagnóstico diferencial entre especies de plasmodios. Los aminoácidos resultantes serían utilizados en la biosíntesis de proteínas y probablemente, una porción de los mismos, como fuente de carbono y energía. Estos podrían ser metabolizados en forma equivalente a la descrita para tripanosomátidos, justificando en parte, la actividad mitocondrial. No existen evidencias firmes al respecto.

Todas las enzimas del camino de las pentosas fosfato están presentes, aunque curiosamente la actividad glucosa 6 fosfato deshidrogenasa no cubriría todas las necesidades del parásito, por lo que la isoenzima del eritrocito hospedador contribuiría marcadamente. Esta enzima y la 6 fosfogluconato deshidrogenasa, generan NADPH, cofactor esencial en vías biosintéticas y en los mecanismos de control del estrés oxidativo. Las infecciones con plasmodios en hospedadores deficientes en glucosa 6 fosfato deshidrogenasa eritrocítica, no prosperan, y estos individuos son resistentes a la enfermedad. Este tipo de “anemia” es endémica en regiones del viejo mundo donde la malaria ha sido endémica históricamente, como la cuenca del Mar Mediterráneo. Otros tipos de anemias relacionadas con defectos en la calidad o producción de hemoglobina (talasemia, etc.) presentan una distribución geográfica similar y proporcionan ventajas equivalentes, en individuos heterocigotas. Este es un claro ejemplo de coevolución parásito-hospedador.

#### **Protozoos anaeróbicos. *Giardia* y *Entamoeba*:**

*Giardia* y *Entamoeba* representan un ejemplo de conversión evolutiva, en cuanto a su estrategia metabólica. Ambos géneros son filogenéticamente distantes, sin embargo poseen un esquema glucolítico similar que les permite utilizar glucosa como fuente energética en condiciones anaeróbicas. Por tal motivo se los estudia juntos, aunque por supuesto existen diferencias en detalles. Son organismos amitochondriados (no presentan mitocondrias), y la glucólisis no está compartimentalizada. Presentan material de reserva (glucógeno) y utilizan no solo glucosa exógena sino también, maltosa y otros polisacáridos, que deben ser previamente degradados por el hospedador, dado que solo internalizan glucosa vía un único transportador de membrana.

La primera etapa de la glucólisis, hasta piruvato, presenta el esquema clásico. Las características más notables son: i) una fosfofructoquinasa que utiliza pirofosfato en lugar de ATP para la producción de fructosa 1,6 difosfato, con el concomitante ahorro de ATP; ii) la existencia de una piruvato fosfato diquinasa (en reemplazo de la clásica piruvato quinasa) que utiliza PEP, AMP y pirofosfato con la producción de piruvato y ATP; iii) Como alternativa a esta última reacción, existe un “loop” en el que el PEP puede ser convertido en oxaloacetato y pirofosfato, utilizando fosfato inorgánico y fijación de CO<sub>2</sub>, por la PEP carboxi-fosfotransferasa, y el oxaloacetato reducido a malato con producción de NAD<sup>+</sup>. El malato es luego descarboxilado a piruvato con producción de NADPH por la enzima málica.

Como se ve, la estrategia es utilizar enlaces de alta energía en compuestos inorgánicos (pirofosfato), para aumentar el rendimiento global en energía como compuestos orgánicos (ATP). Además, la célula puede optar por la producción directa de ATP con la acumulación de piruvato por la piruvato fosfato diquinasa o, usando el “loop”, la regeneración de pirofosfato a partir de fosfato y síntesis de NADPH, también con

piruvato como producto final. Dado que no existe compartimentalización, esta alternativa permite obtener NADPH en el citosol para procesos biosintéticos y NAD<sup>+</sup>, reutilizable en la glucólisis.

La segunda etapa implica la conversión de piruvato en acetil CoA. Esta reacción no es llevada a cabo por el clásico complejo mitocondrial piruvato deshidrogenasa, sino por una enzima denominada piruvato-ferredoxina oxidoreductasa. Esta es una proteína de Fe-azufre, similar a las de bacterias anaeróbicas, y utiliza como aceptor de electrones otra proteína Fe-azufre, la ferredoxina de tipo bacteriana con un “cluster” del tipo 2[4Fe-4S]. El acetil CoA puede ser convertido a acetato y ATP por una acetato tioquinasa (también presente en unos pocos procariontes) o a acetaldehído y etanol con regeneración de NAD<sup>+</sup> por una enzima bifuncional, la acetil CoA reductasa-alcohol deshidrogenasa. Esto lleva a la acumulación de acetato, CO<sub>2</sub> y etanol como productos finales de la glucólisis.

### **Protozoos anaeróbicos. *Trichomonas*:**

Una forma de caracterizar metabólicamente a los eucariotas depende del tipo de compartimentalización del metabolismo energético:

- Los organismos **mitocondriados** están representados por la mayoría de los eucariotas conocidos, conteniendo mitocondrias con grado variable de funcionalidad, desde aquellos capaces de oxidar totalmente piruvato a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, hasta los que solo convierten piruvato a CO<sub>2</sub>, acetato y otros ácidos orgánicos. Estos incluyen a los protozoos aeróbicos que hemos visto aquí.
- Los organismos **amitocondriados**, incluyen protozoos microaerófilos, como los que describimos aquí y algunos anaerobios estrictos, como los ciliados del rúmen. Todos acumulan CO<sub>2</sub>, acetato y otros ácidos orgánicos en distinta proporción. Estos pueden dividirse a su vez en **Amitocondriados de tipo I**, carentes de todo tipo de organela para la oxidación de piruvato (*Giardia* y *Entamoeba* son excelentes ejemplos) y los **Amitocondriados de tipo II**, que poseen organelas relacionadas a las mitocondrias, pero que a lo largo de la evolución han perdido las funciones que las caracterizan (ciclo de Krebs o cadena electrónica) pero han adquirido (o conservado ¿?) otras que les han permitido adaptarse a la falta de oxígeno. Estas organelas son denominadas **hidrogenosomas**, debido al tipo de compuesto que producen (H<sub>2</sub>) y un género típico de este grupo es *Trichomonas*.

Las *Trichomonas* son organismos microaerófilos que utilizan glucosa como recurso energético y presentan material de reserva en forma de glucógeno. La primera etapa de la glucólisis es equivalente a la descrita para *Entamoeba*, incluyendo la fosfofructo quinasa dependiente de pirofosfato. La primera diferencia reside en la forma en que el PEP es ulteriormente metabolizado. En este caso existe una verdadera piruvato quinasa, dependiente de ADP. Alternativamente el PEP puede carboxilarse a oxaloacetato por una típica PEP carboxiquinasa, ADP dependiente, y este a malato, que es excretado.

Las notables diferencias residen en la utilización ulterior del piruvato generado en el citosol. Este es mayoritariamente metabolizado en el hidrogenosoma. Un mol de piruvato es convertido a acetil CoA por una piruvato-ferredoxina oxidoreductasa hidrogenosomal, similar a la citosólica descrita en *Entamoeba* y

*Giardia*. De esta manera, se produce un mol de CO<sub>2</sub>, con reducción de ferredoxina (en este caso del tipo mitocondrial o [2Fe-2S]). Esta es reoxidada por la ferredoxina oxidoreductasa dependiente de NAD<sup>+</sup> y la hidrogenasa (otra proteína de Fe-S, presente en varias eubacterias anaeróbicas y en otros protozoos, como ciliados del rúmen o simbioses de algunos insectos). Esta usa como aceptor final de electrones a protones, con la formación de H<sub>2</sub>, que es excretado. Otro mol de piruvato es carboxilado a oxaloacetato y luego reducido a malato en el hidrogenosoma, proporcionando el NAD<sup>+</sup> requerido por la ferredoxina oxidoreductasa. El acetyl CoA es finalmente convertido en acetato, por transferencia de CoA a succinato. El succinil CoA, finalmente es hidrolizado a succinato, con producción de ATP.

En este organismo se ha detectado que existe regulación de la glucólisis a nivel de la piruvato quinasa. Los reguladores alostéricos parecen ser la ribosa 5 fosfato (no descrito anteriormente como regulador en otros organismos) y glicerato 3 fosfato (modulador negativo de la piruvato quinasa de *Escherichia coli*).

### ***Metabolismo energético en helmintos:***

Los helmintos suelen acumular glucógeno y trehalosa como material de reserva. Estos y la glucosa obtenida directamente de su hábitat son consumidos vía glucólisis, la cual presenta puntos de regulación equivalentes a los presentes en células de mamíferos. El PEP acumulado es metabolizado de dos formas distintas. Puede ser convertido en piruvato (y ATP) por la piruvato quinasa y éste en lactato y NAD<sup>+</sup> por la lactato deshidrogenasa. Otra posibilidad es su conversión en oxaloacetato con fijación de CO<sub>2</sub>, por la PEP-carboxiquinasa, con producción de GTP. El oxaloacetato es luego reducido a malato y NAD<sup>+</sup> por la malato deshidrogenasa. Ambas vías coexisten. En *Schistosoma* y filarias, cuyos ciclos de vida incluyen el sistema circulatorio o un ambiente aeróbico, el compuesto acumulado en mayor proporción es el lactato. En helmintos intestinales como *Ascaris* y *Fasciola hepatica*, de ambientes microaeróbicos, la vía que conduce a la producción de malato es la preferida. La elección de la vía está parcialmente condicionada a las propiedades cinéticas de la PEP-carboxiquinasa. En *Ascaris*, por ejemplo, esta enzima tiene una afinidad por CO<sub>2</sub> tres a cuatro veces mayor a la de mamíferos y la alta presión parcial de CO<sub>2</sub> en el intestino dirige la glucólisis hacia malato.

Respecto a la función mitocondrial, nuevamente la baja actividad es la regla. En helmintos aeróbicos, solo una pequeña porción del piruvato es metabolizado en ella, pero con alto rendimiento energético. Algunos aminoácidos como glutamina pueden ser metabolizados vía ciclo de Krebs.

Los helmintos anaeróbicos no poseen ciclo de Krebs y presentan cadenas electrónicas modificadas que suelen utilizar fumarato como aceptor electrónico final. El malato es dismutado en la mitocondria, esto es, al mismo tiempo una molécula es convertida en fumarato y otra en piruvato. En la segunda reacción se genera NADH, que se compensa con la regeneración de NAD<sup>+</sup> por la fumarato reductasa o complejo mitocondrial II, etapa en la que el fumarato es convertido en succinato con producción de ATP. El piruvato es convertido en acetyl CoA por el complejo piruvato deshidrogenasa. Hasta aquí llega el metabolismo de *Himenolepis diminuta*, excretando succinato y acetato.

En *F. hepatica*, el succinato es decarboxilado a propionil CoA, acumulando propionato y acetato. *Ascaris suum* metaboliza acetil CoA y propionil CoA a una serie de ácidos ramificados con acumulación de acetato, propionato, succinato, metilbutanoato y metilpentanoato. Cada estrategia depende de los requerimientos energéticos y balanceo redox de las diversas especies.