

## Tesis de Posgrado

# Estructura, organización y expresión de los genes que codifican la trans-sialidasa de trypanosoma cruzi

Pollevick, Guido Daniel

1993

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Pollevick, Guido Daniel. (1993). Estructura, organización y expresión de los genes que codifican la trans-sialidasa de trypanosoma cruzi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2597\\_Pollevick.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2597_Pollevick.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Pollevick, Guido Daniel. "Estructura, organización y expresión de los genes que codifican la trans-sialidasa de trypanosoma cruzi". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2597\\_Pollevick.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2597_Pollevick.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires.  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**ESTRUCTURA, ORGANIZACION Y EXPRESION DE LOS GENES QUE  
CODIFICAN LA TRANS-SIALIDASA DE *Trypanosoma cruzi***

**Guido D. Pollevick**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS.

**DIRECTOR: Alberto C. C. Frasch**

**Instituto de Investigaciones Bioquímicas  
"Fundación Campomar"**

1993

Fern  
2597  
1/2

## ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ATP	adenosina trifosfato
BSA	sero albúmina bovina
cpm	cuentas por minuto
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
g	aceleración de la gravedad
Gal	galactosa
Glc	glucosa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
kb	kilobase
kDa	kiloDaltons
kpb	kilopares de bases
BME	2-mercaptoetanol
MU-NANA	(2'-(4-methylumbelliferyl)-N-acetil ácido neuramínico)
PBS	"buffer" fosfato salino
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	polivinilidendivinilfluoruro
SDS	dodecil sulfato de sodio
SSC	solución citrato salina
TBE	tris borato EDTA
TEMED	N, N, N', N' tetrametil etilendiamina
TLCK	tosil-lisil-clorometilcetona
Tris	tris-(hidroximetil) aminometano

## TRABAJOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE TESIS

Variable number of repeat units in genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens

Roberto A. Macina, José L. Affranchino, Guido D. Pollevick, Elena E. Jazin and Alberto C. C. Frasch.

FEBS letters (1989) vol. 257, number 2, 365-368.

The expression of the major shed *Trypanosoma cruzi* antigen results from the developmentally-regulated transcription of small gene family

José L. Affranchino, Guido D. Pollevick, and Alberto C. C. Frasch.

FEBS letters (1991) vol. 280, number 2, 316-320.

The complete sequence of a shed-acute-phase-antigen (SAPA) of *Trypanosoma cruzi*

Guido D. Pollevick, José L. Affranchino, Alberto C.C. Frasch and Daniel O. Sánchez.

Mol. Biochem. Parasitol. (1991) vol. 47, 247-250.

Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*

Armando J. Parodi, Guido D. Pollevick, Martin Mautner, Alejandro Buschiazso, Daniel O. Sanchez and Alberto C. C. Frasch.

EMBO Journal (1992) vol. 11, number 5, 1705-1710.

Members of the SAPA/Trans-sialidase protein family have identical N-terminal sequences and a putative signal peptide.

Guido D. Pollevick, Daniel O. Sanchez, Oscar Campetella, Sergio Trombetta, Marcelo Sousa, Jan Henriksson, Ulf Hellman, Ulf Pettersson, Juan J. Cazzulo and Alberto C. C. Frasch.

Mol. Biochem. Parasitol. (1993) vol 59, 171-174.

An unusually small gene for a putative mucin-like glycoprotein in *Trypanosoma cruzi*.

María B. Reyes, Guido D. Pollevick and Alberto C. C. Frasch.

Gene (en prensa).

## TRABAJOS PUBLICADOS NO RELACIONADOS CON EL TEMA DE TESIS

Search for *Trypanosoma cruzi* in anal glands of naturally infected dogs

Rosario M. Petersen, Ricardo E. Gürtler, Guido Pollevick, Luis Ducrey Santopietro and Cristina Wisniveski-Colli.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. (1989) Vol. 84 (2), 269-270.

Sex determination of bovine embryos by restriction fragment polymorphisms of PCR amplified ZFX/ZFY loci

Guido D. Pollevick, Susana Giambiagi, Sabrina Mancardi, Leonardo De Luca, Oscar Burrone, Alberto C. C. Frascch and Rodolfo A. Ugalde.

Bio/Technology (1992) vol. 10, number 7, 805-807.

<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>LA ENFERMEDAD DE CHAGAS Y SU AGENTE ETIOLOGICO <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	1
1- Descripción general y epidemiología de la enfermedad	1
2- Etapas aguda y crónica de la enfermedad	1
<b>BIOLOGIA DE <i>T. cruzi</i></b>	2
1-Ubicación sistemática	2
2- Características de los tripanosomas	3
3- Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	4
<b>LA INTERACCION PARASITO-HOSPEDADOR</b>	5
1- Hidratos de carbono de superficie de <i>T. cruzi</i>	6
a- <u>El ácido siálico</u>	6
b- <u>Roles biológicos del ácido siálico</u>	7
c- <u>La neuraminidasa o sialidasa de <i>T. cruzi</i></u>	8
d- <u>Concepto de Trans-sialidación en <i>T. cruzi</i></u>	8
2- Antígenos de <i>T. cruzi</i>	10
a- <u>Clonado de genes codificantes para antígenos de <i>T. cruzi</i></u>	10
b- <u>Proteínas de <i>T. cruzi</i> relacionadas con la interacción y/o penetración de la célula hospedadora</u>	11
<b>OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION</b>	14
<b>RESULTADOS</b>	15
<b>ESTRUCTURA DE UN GEN COMPLETO QUE CODIFICA PARA UN ANTIGENO SAPA DE <i>T. cruzi</i></b>	15
1- Aislamiento de genes completos del antígeno SAPA	15
2- Mapco de diferentes clones que codifican el antígeno SAPA	15
3- Análisis de la secuencia nucleotídica completa de uno de los genes que codifican los antígenos SAPA	16
a- <u>Análisis de la estructura primaria de la secuencia</u>	16
b- <u>Análisis de hidrofobicidad de la secuencia</u>	18
<b>EL ANTIGENO SAPA Y LA NEURAMINIDASA DE <i>T. cruzi</i> PERTENECEN A LA MISMA FAMILIA DE GENES</b>	19
<b>ESTRUCTURA DE DIFERENTES GENES Y PROTEINAS DE LA FAMILIA SAPA/TCNA</b>	20

1- Los productos proteicos maduros de la familia SAPA/TCNA presentan un N-terminal idéntico y un sitio posible de clivaje para un péptido señal	20
a- <u>Secuenciación de los N-terminales de las proteínas maduras de la familia SAPA/TCNA</u>	20
b- <u>Análisis de las regiones 5' de diferentes genes de la familia SAPA/TCNA en distintas cepas de <i>T. cruzi</i></u>	21
2- Diferentes genes de la familia SAPA/TCNA presentan un número variable de unidades repetitivas	22
3- Al menos un gen de la familia SAPA/TCNA presenta un codón de terminación alternativo	23
4- Los miembros de la familia SAPA/TCNA se encuentran unidos a la membrana celular por un anclaje del tipo glicofosfatidilinositol	25
<b>ANALISIS DE LA EXPRESION DE LOS GENES DE LA FAMILIA SAPA/TCNA</b>	25
1-Los genes de la familia SAPA/TCNA no se duplican ni transponen a telómeros	25
2- Análisis de la transcripción de los genes de la familia SAPA/TCNA	26
<b>ANALISIS DE LA FUNCION DE LA FAMILIA SAPA/TCNA. DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD DE TRANS-SIALIDASA</b>	27
1- El antígeno SAPA es la neuraminidasa de <i>T. cruzi</i>	27
2- El antígeno SAPA es la trans-sialidasa de <i>T. cruzi</i>	27
3-La estructura funcional de las proteínas de la familia SAPA/Trans-sialidasa presenta dos dominios principales: uno enzimático y otro inmunodominante	29
<b>DISCUSION</b>	32
<b>SECUENCIA NUCLEOTIDICA COMPLETA DE UN ANTIGENO MARCADOR DE LA ETAPA AGUDA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS</b>	33
1- Dominio enzimático	33
2- Dominio repetitivo	34
3- Posibles roles del dominio repetitivo	35
4- Dominio de anclaje	36
<b>LOS ANTIGENOS SAPA PRESENTAN ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA Y TRANS-SIALIDASA. IDENTIFICACION DE LOS GENES QUE CODIFICAN LA TRANS-SIALIDASA DE <i>T. cruzi</i></b>	37

<b>ORGANIZACION DE UNA SUPER-FAMILIA DE GENES DE <i>T. cruzi</i></b>	
<b>CARACTERIZADA PRINCIPALMENTE POR LOS MOTIVOS DE</b>	
<b>NEURAMINIDASA: SXDXGXTW</b>	39
<b>1- Familia SAPA/Trans-sialidasa</b>	39
<b>2- Familia GP85</b>	39
<b>3- Superfamilia de genes en <i>T. cruzi</i></b>	40
<b>4- ¿Por qué una superfamilia de antígenos en <i>T. cruzi</i>?</b>	41
<b>IMPLICANCIAS DE LOS ANTIGENOS DE LA FAMILIA SAPA/TRANS-SIALIDASA</b>	
<b>EN LA RELACION PARASITO-CELULA HOSPEDADORA</b>	43
<b>CONCLUSIONES DE LA PRESENTE INVESTIGACION</b>	46
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	49
<b>MATERIALES</b>	49
<b>1- Medios de cultivo</b>	49
<b>2- Antibióticos</b>	49
<b>3- Cepas de bacterias utilizadas</b>	49
<b>4- Cepas y clones de parásitos</b>	49
<b>5- Productos radiactivos</b>	50
<b>ACIDOS NUCLEICOS</b>	50
<b>1- Purificación de ADNn (nuclear) de tripanosomas</b>	50
<b>2- Purificación de ADN plasmídico</b>	50
<b>3- Purificación de ARN de tripanosomas</b>	51
<b>4- Métodos electroforéticos de ácidos nucleicos</b>	51
<b>a-<u>Electroforesis en geles de agarosa</u></b>	51
<b>b-<u>Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes</u></b>	51
<b>c-<u>Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa</u></b>	52
<b>5- Digestiones enzimáticas de ácidos nucleicos</b>	52
<b>a-<u>Digestiones totales de ADN con endonucleasas de restricción</u></b>	52
<b>b-<u>Digestiones parciales de ADN con endonucleasas de restricción</u></b>	
<b><u>y detección por marcado de un extremo terminal</u></b>	52
<b>c-<u>Digestiones de ácidos nucleicos por las nucleasas Bal 31 y S1</u></b>	53
<b>6- Identificación de secuencias de ADN por hibridización</b>	53
<b>a-<u>Identificación de colonias recombinantes</u></b>	53



b- <u>Transferencia a filtros de nitrocelulosa</u>	54
c- <u>Marcación radiactiva de sondas específicas de ADN por el método de "nick-translation"</u>	54
d- <u>Hibridización de filtros de nitrocelulosa con sondas radiactivas. Autorradiografías</u>	54
<b>7-Secuenciación de ADN</b>	<b>55</b>
a- <u>Desnaturalización del ADN</u>	55
b- <u>Hibridización del primer</u>	55
c- <u>Reacciones</u>	55
<b>8- Técnica de PCR y sus aplicaciones</b>	<b>55</b>
a- <u>Búsqueda por PCR de diferentes 5' de genes de la familia SAPA-Trans-sialidasa</u>	55
b- <u>Clonado y secuenciación de los productos de PCR</u>	56
c- <u>Amplificación de fragmentos que contienen al extremo 5' de los diferentes genes de la familia SAPA-Trans-sialidasa en diferentes cepas de <i>T. cruzi</i></u>	56
d- <u>Corte con endonucleasas de restricción de los productos de PCR</u>	56
<b>PROTEINAS</b>	<b>57</b>
<b>1- Electroforesis de proteínas, transferencia y reacción con sueros</b>	<b>57</b>
<b>2- Purificación de los antígenos SAPA</b>	<b>57</b>
<b>3- Secuenciación de los antígenos purificados</b>	<b>57</b>
<b>4- Cinética de liberación de antígenos SAPA unidos a la membrana por un anclaje del tipo glicofosfatidilinositol</b>	<b>58</b>
<b>5- Obtención de sueros policlonales contra proteínas de fusión</b>	<b>58</b>
<b>ENSAYOS ENZIMATICOS</b>	<b>58</b>
<b>1- Ensayos de neuraminidasa</b>	<b>58</b>
<b>2- Ensayos de trans-sialidasa</b>	<b>58</b>
<b>PROGRAMAS DE ANALISIS DE SECUENCIAS</b>	<b>59</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>60</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>69</b>

## **INTRODUCCION**

## LA ENFERMEDAD DE CHAGAS Y SU AGENTE ETIOLOGICO *Trypanosoma cruzi*

### 1- Descripción general y epidemiología de la enfermedad

El protozoo flagelado *T. cruzi* es el parásito causante de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana. Dicha enfermedad fue descrita por Carlos Chagas en 1909 al descubrir en el intestino del insecto hematófago *Pastronylus megistus* un parásito flagelado al que denominó *Trypanosoma cruzi* en honor a su maestro Oswaldo Cruz, describiendo así el agente etiológico (Chagas, 1909 y 1911). La enfermedad de Chagas es una de las parasitosis más importantes de Latinoamérica, extendiéndose desde el límite sur de los Estados Unidos hasta la zona central de nuestro país, encontrándose la mayor prevalencia en Brasil, Bolivia, Venezuela y Argentina. Se calcula que en el área de alta endemicidad, sobre un total estimado de 360 millones de habitantes, hay aproximadamente 90 millones de personas en peligro de ser infectadas por *T. cruzi*, estimándose que actualmente de 16 a 18 millones de personas se encuentran infectadas por el parásito con una incidencia de 200.000 casos nuevos por año. Los vectores de transmisión de la enfermedad pertenecen a la familia Reduviidae y en Argentina, la especie más significativa es *Triatoma infestans* (Abalos, 1972), vulgarmente conocida como "vinchuca". El hombre se infecta naturalmente con *T. cruzi* a través de las deyecciones del insecto vector que contienen parásitos infectantes. La transmisión de *T. cruzi* por sus vectores naturales es aún el mecanismo más importante de infección humana en las zonas endémicas. Sin embargo en las ciudades que agrupan gran número de personas, la transmisión a través de transfusiones de sangre se torna de alto riesgo ya que la supervivencia del parásito puede llegar hasta los 20 días posteriores a la extracción (Pinto Díaz, 1984). Recientemente, a partir de estudios serológicos realizados en el área de Washington DC, en EEUU, se han encontrado inmigrantes centroamericanos infectados con *T. cruzi*, a pesar de no ser ésta una zona endémica (Kirchhoff y col., 1987). También puede existir transmisión transplacentaria de *T. cruzi*, lo cual determina infecciones congénitas. Se han descrito casos de infección por transplante de órganos (Pinto Díaz, 1984) e infecciones accidentales en laboratorios (Hofflin y col., 1987).

### 2- Etapas aguda y crónica de la enfermedad

La enfermedad se inicia con una fase aguda, donde los primeros síntomas tales como fiebre, irritabilidad, cefaleas y mialgias, aparecen 7 a 12 días luego que el parásito infecta al hospedador. Esta etapa se caracteriza por una proliferación intracelular del parásito y una parasitemia que puede ser elevada. Se estima que solamente se manifiestan síntomas clínicos en un 5% de los individuos afectados. Generalmente, las manifestaciones clínicas más severas, incluso la muerte, ocurren principalmente en niños de hasta dos años de edad. En la mayoría de los casos fatales, se observan severos daños cardíacos y/o meningoencefalitis chagásica, principalmente en el primer mes

de la enfermedad (Pinto Diaz, 1984). La evolución de la etapa aguda comprende un período estimado entre 40-60 días, desapareciendo luego la sintomatología, con una parasitemia que disminuye hasta niveles prácticamente indetectables, entrando en el período crónico. Durante esta etapa, la infección puede permanecer durante años o décadas sin manifestarse clínicamente. Algunos pacientes pueden desarrollar una forma crónica progresiva, caracterizada por la aparición de miocarditis y/o hipertrofia y dilatación del tubo digestivo en la porción proximal o distal, lo cual resulta en megaesófago y/o megacolon respectivamente (Galvao-Castro y col., 1984). En nuestro país la patología crónica más frecuente es la miocarditis chagásica, siendo los pacientes crónicos sintomáticos aproximadamente un 25% de los individuos afectados.

## **BIOLOGIA DE *T. cruzi***

### **1-Ubicación sistemática**

Según una revisión realizada por el Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoología (Levine y col., 1980), los tripanosomas son protozoos cuya ubicación taxonómica es la siguiente:

**Phylum Sarcomastigophora:** un sólo tipo de núcleo; flagelo, pseudopodios o ambos tipos de organelas.

**Subphylum Mastigophora:** uno o más flagelos; reproducción por fisión binaria; en algunos grupos reproducción sexual.

**Clase Zoomastigophora:** cloroplastos ausentes; uno o más flagelos.

**Orden Kinetoplástida:** uno a cuatro flagelos que emergen de una depresión; una única mitocondria que se extiende por toda la célula semejando un único tubo o una red de tubos; usualmente poseen una organela autorreplicante, el kinetoplasto; aparato de Golgi en la región de la depresión flagelar; hay especies parásitas y otras de vida libre.

**Suborden Trypanosomatina:** un solo flagelo libre o con membrana ondulante; kinetoplasto pequeño y compacto; parásitos.

**Familia Trypanosomatidae:** incluye varios géneros monogénéticos: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* y *Herpetomonas*, todos parásitos de invertebrados. Otros géneros son digenéticos, como *Leishmania* y *Trypanosoma*, que alternan un huésped vertebrado y otro invertebrado. Los miembros del género *Trypanosoma* han sido divididos en dos grandes grupos según el sitio de producción de tripomastigotes metacíclicos en el insecto vector y el método de infección en el hospedador vertebrado (Hoare, 1964).

**Sección Salivaria:** incluye tripanosomas cuyo ciclo de desarrollo en el vector invertebrado se completa en las glándulas salivales del insecto. Se transmite por inoculación mediante la picadura del insecto. Ej: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense*.

**Sección Estercoraria:** comprende tripanosomas que completan su desarrollo en la región posterior del tubo digestivo del vector. Se transmiten por contaminación a través de las heces del insecto (excepto *T. rangeli*) Ej: *T. cruzi*, *Trypanosoma lewisi*. La única especie de este grupo patógena para el hombre es *T. cruzi*.

## 2- Características de los tripanosomas

Los tripanosomas son protozoos parásitos de considerable importancia médica y veterinaria. Esto se debe a que son agentes causales de enfermedades crónicas en el hombre y animales, de muy amplia distribución en Sud América y Africa. De las enfermedades producidas por los tripanosomas, las más estudiadas son la enfermedad de Chagas y la tripanosomiasis africana o "enfermedad del sueño". Esta última es producida por distintas sub-especies de *T. brucei*. Con respecto a *T. cruzi*, existen numerosas evidencias que indican que esta especie no es un grupo homogéneo de parásitos, sino que estaría compuesta por un conjunto de poblaciones heterogéneas de organismos con diferentes características biológicas, bioquímicas e inmunológicas. Comparando formas sanguíneas de distintas cepas se detectaron diferencias en la morfología (Brener, 1965; Brener, 1973), las cuales podrían llegar a denotar diferencias fisiológicas (Brener, 1973). También se detectaron diferencias en la infectividad a distintos tipos de células (Doyle, Dvorak y Engel, 1984), en las curvas de parasitemia (Brener., Chiari, y Alvarenga, 1974; Avila, Avila y Muñoz, 1981), en la patogenicidad en ratones (Postan, Daniel y Dvorak, 1983), en las características de unión a anticuerpos monoclonales (Kirchhoff y col., 1984), en la cinética de crecimiento (Dvorak, Hartman y Miles, 1980) y en la sensibilidad a diferentes drogas (Brener, Costa y Chiari, 1976; Freeman, Wilson y Kazan, 1975; Avila, Avila y Muñoz, 1981). En cuanto a las características bioquímicas, se encontraron diferencias en la composición antigénica (Nussensweig, Deane y Kloetzel, 1963; Ketteridge, 1975; González y col., 1984; Kirchhoff y col., 1984), en el metabolismo oxidativo y el contenido de diferentes enzimas (Engel, Doyle y Dvorak, 1990), en los patrones de isoenzimas (Miles y col., 1977; Tibayrenc y Ayala, 1988), en los patrones de fragmentos de restricción del ADN kinetoplástico (Morel y col., 1980), en el contenido de ADN por organismo (Dvorak y col., 1982; Kooy y col., 1989) y en el cariotipo y localización cromosómica de distintos genes (Gibson y Miles, 1986; Engman y col., 1987; Henriksson y col., 1990).

Los estudios básicos realizados en tripanosomátidos en las últimas décadas, además de encarar el grave problema sanitario han posibilitado el descubrimiento de novedosos sistemas biológicos que parecen ser particulares de estos parásitos o han sido descritos en ellos por primera vez. Se han encontrado estructuras nuevas, como la presencia de una organela denominada glicosoma, donde se encuentran las enzimas glicolíticas, normalmente presentes en el citoplasma de otras células (Oppendoes y Borst, 1977) y una inusual estructura de ADN mitocondrial o ADN kinetoplástico (ADN<sub>k</sub>) formando una gran malla de moléculas de ADN concatenadas (Borst y Hoeijmakers, 1979).

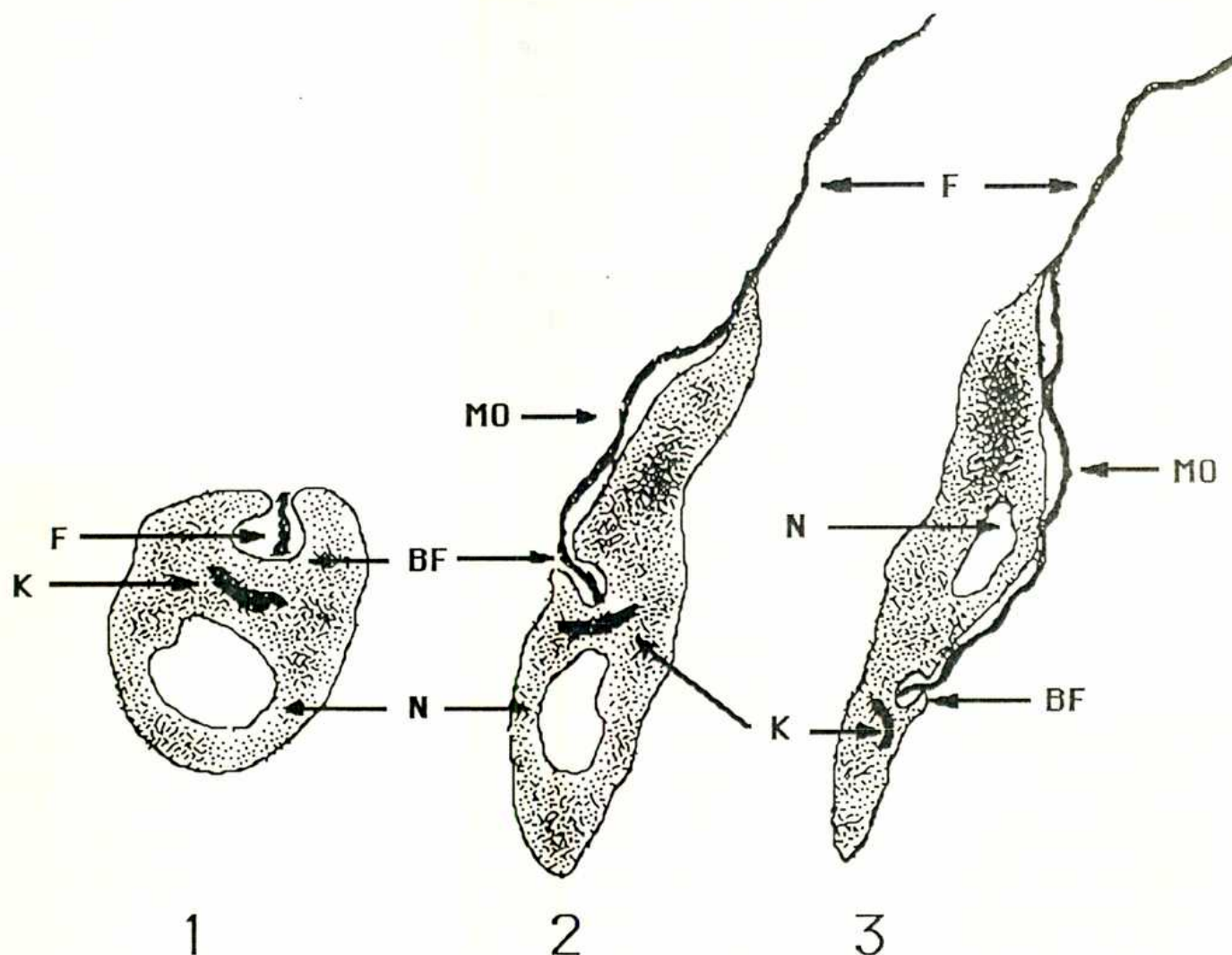
También se han descrito mecanismos moleculares nunca vistos anteriormente tales como un sistema de transcripción discontinua (De Lang y col., 1984), el mecanismo de variación antigénica en tripanosomas africanos (Cross, 1978; Vickerman, 1978) y la edición de ARN mensajero (Benne y col., 1986).

### 3- Ciclo de vida de *T. cruzi*

*T. cruzi* posee un ciclo de vida complejo, presentando diferentes estadios morfológicos y bioquímicos tanto en sus hospedadores vertebrados como en los insectos. La infección del hospedador mamífero ocurre por contaminación con la forma flagelada infectiva, denominada tripomastigote metacíclico, que penetra en el organismo a través de las mucosas y/o microescoraciones de la piel. El parásito es transmitido en las deyecciones de un insecto hematófago, representado por numerosas especies pertenecientes, en su mayoría, a los géneros *Triatoma*, *Pastrongylus* y *Rhodnius* (Chagas, 1909). Estos tripomastigotes metacíclicos son incapaces de dividirse y se ven obligados a penetrar las células del hospedador para diferenciarse y multiplicarse. *T. cruzi* es un parásito promiscuo en cuanto al diferente tipo de células que puede invadir "in vitro". En el hospedador humano tiene predilección por las células neuronales y musculares. Luego de la invasión celular, los tripomastigotes metacíclicos se diferencian a formas redondeadas, carentes de flagelo, llamadas amastigotes, que se multiplican por fisión binaria cada 12 horas aproximadamente (Figura 1) en el citoplasma de la célula hospedadora. Finalmente al cabo de un dado número de divisiones, se produce una re-diferenciación hacia la forma tripomastigote sanguíneo (Figura 1). Los mismos, que no pueden dividirse, son liberados a la circulación por ruptura de la célula y de esta manera pueden invadir nuevas células diseminándose y reiniciando el ciclo amastigote-tripomastigote, para poder multiplicarse y perpetuar la infección en el hospedador vertebrado (Brener, 1973).

En el insecto vector la infección se produce por ingestión de tripomastigotes presentes en la sangre periférica de un vertebrado infectado. Los mismos pasan a lo largo del tubo digestivo del insecto, donde sufren una serie de transformaciones morfológicas y se diferencian a epimastigotes, los cuales no son infectivos en mamíferos (Figura 1). En el intestino, estos últimos se encuentran en activa división y mantienen un estado permanente de infección en el insecto. En la ampolla rectal del insecto, los epimastigotes se diferencian nuevamente a tripomastigotes metacíclicos. El vector infectado se alimenta sobre un huésped vertebrado, elimina sus heces durante o después de la ingesta de sangre, recomenzando de esta forma el ciclo (Brener, 1973).

Se han detectado infecciones en varios mamíferos de diferentes ordenes, tanto en seres humanos como en monos, ratones, ratas, conejos, hamsters, comadrejas, zorrinos y perros. Por otro lado, tanto anfibios como aves son refractarios a la infección con este parásito.



**Figura 1.** Formas celulares de *T. cruzi*

1. Amastigote 2. Epimastigote 3. Tripomastigote. Bolsillo flagelar (BF), Flagelo (F), Kinetoplasto (K), Membrana ondulante (MO) y Núcleo (N).

### LA INTERACCION PARASITO-HOSPEDADOR

Se puede entonces comprender el amplio panorama que abarca la enfermedad de Chagas, desde lo geográfico hasta la compleja biología de *T. cruzi*. Para estudiar y combatir dicha enfermedad, necesariamente deben realizarse trabajos a través de diferentes disciplinas de la ciencia. Desde las que abarquen amplios enfoques como estudios ecológicos, poblacionales, epidemiológicos, etc., hasta los estudios de inmunología, biología y genética molecular. Un punto de suma importancia para el estudio de la enfermedad de Chagas, es comprender mejor la relación entre el parásito y sus hospedadores, invertebrados o vertebrados. Existen diferentes caminos para estudiar esta compleja relación. En este sentido nos limitaremos a introducir sólo aquellos estudios circunscriptos a la interacción de las moléculas del parásito y las de su hospedador mamífero. Cada estadio del ciclo de

vida de *T. cruzi* tiene diferente medio ambiente, morfología y forma de vida y es probable que estas diferencias se reflejen en variaciones funcionales y antigénicas de su superficie. La membrana de *T. cruzi* presenta una gran variedad de glicoproteínas y glicolípidos que pueden estar involucrados en diferentes fenómenos de suma importancia tales como la diferenciación del parásito, unión y/o penetración a la célula hospedadora. Un número importante de estas moléculas, son detectadas por el sistema inmunológico del hospedador mamífero produciendo una respuesta inmune contra las mismas, las cuales funcionan entonces como antígenos del parásito. La información acumulada hasta el momento ha permitido reconocer algunos de los componentes de la superficie de *T. cruzi* y determinar sus características estructurales y solamente en muy pocos casos, su función. Con el fin de facilitar la presentación de la información, dividiremos los estudios realizados en cuanto a moléculas de superficie de *T. cruzi* en dos grupos temáticos principales:

1-Hidratos de carbono de superficie de *T. cruzi*

2-Antígenos de *T. cruzi*

### 1- Hidratos de carbono de superficie de *T. cruzi*

En todos los estadios del parásito ha sido estudiada la presencia de carbohidratos en la superficie de *T. cruzi* (Alves y Colli, 1974; Pereira y col., 1980). Se han descrito y caracterizado numerosos ligandos para lectinas (proteínas de origen vegetal que presentan afinidad por azúcares) (Pereira y col., 1980; Katzin y Colli, 1983). La mayoría de las proteínas de superficie detectadas en *T. cruzi* serían presumiblemente glicoproteínas, debido a su probada afinidad por diferentes lectinas (Andrews, Katzin y Colli, 1984). A través de varios trabajos se ha demostrado que son varias las glicoproteínas en la membrana de *T. cruzi* (Snary y Hudson, 1979; Snary, 1980; Andrews Katzin y Colli, 1984; González y col., 1984; Kirchhoff, 1987). Una característica de interés, en cuanto a la descripción de todas estas glicoproteínas de membrana del parásito fue establecido hace ya más de una década: la existencia de sialoglicoconjugados en la superficie de *T. cruzi*. El tratamiento del parásito con sialidasa provoca diferentes efectos, que se describen a continuación: elimina la aglutinación celular inducida por lectinas (Pereira y col., 1980), hace a los tripomastigotes susceptibles al reconocimiento por la vía alternativa del complemento (Kipnis y col., 1981), estimula el ingreso de los tripomastigotes a macrófagos y reduce la carga negativa de la superficie celular del parásito (Souto-Padrón y De Souza, 1985). Por otra parte, estudios independientes han identificado ácido siálico y sialoglicolípidos en epimastigotes (Schauer y col., 1983; Lederkremer y col., 1985) y tripomastigotes (Couto y col., 1985).

#### a-El ácido siálico

Los ácidos siálicos forman una familia de azúcares con un carboxilo en el carbono 9 y se los encuentra usualmente como monosacáridos terminales (excepcionalmente se lo encuentra formando



una rama) de oligosacáridos animales. Al menos se han descrito 39 especies diferentes de ácidos siálicos, debido a las diferentes posibilidades de sustitución a nivel de los carbonos: 4, 5, 7, 8 y 9 (Varki, 1992). El más común es el ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac), que se encuentra en la mayoría de los animales, desde los equinodermos hasta el hombre y en ciertas bacterias (Schauer, 1985 y Varki, 1992). El ácido siálico forma uniones del tipo  $\alpha$  glicosídicas con Gal, GalNAc, GlcNAc y ácidos siálicos, tanto en oligosacáridos, polisacáridos como en glicoconjugados. Usualmente la unión entre dos ácidos siálicos es del tipo  $\alpha$  2-8, pero en los hidratos de carbono de tipo complejo que se encuentran en la naturaleza, el ácido siálico se une principalmente a galactosa por uniones del tipo  $\alpha$ (2-3) o  $\alpha$ (2-6) (Schauer, 1985). El ácido siálico es removido de los glicoconjugados por la acción de las sialidasas o neuraminidasas.

#### b-Roles biológicos del ácido siálico

La distribución de los hidratos de carbono en las membranas biológicas es asimétrica, ya que las cadenas de oligosacáridos de los glicolípidos y las glicoproteínas de la membrana plasmática se localizan exclusivamente en la superficie no citoplasmática (Alberts y col., 1989). Los residuos de ácido siálico se suelen encontrar en los extremos de las cadenas laterales de los carbohidratos presentando una localización celular apropiada como para estar involucrados en interacciones con otras células y con sustratos solubles (Corfield y Schauer, 1982). Se han descrito ácidos siálicos involucrados en interacciones intercelulares (Stamenkovic y col., 1991), adhesión a sustratos (Varki, 1992), desarrollo neuronal (Zhang, Miller y Rutishauser, 1992), cáncer (Passaniti y Hart, 1988), resistencia al complemento (Nairn y col., 1988), evasión del complemento (Fearon, 1978), enmascaramiento biológico (Schauer, 1985), mantenimiento de glóbulos rojos y glicoproteínas en circulación (Jancik y col., 1978) y patologías microbianas (Corfield y Schauer, 1982). Son numerosos los patógenos virales, procarióticos y eucariotas que utilizan ácido siálico y receptores de ácido siálico en su interacción con la célula hospedadora. Diferentes virus se unen a la célula huésped a través de hemoaglutininas que funcionan como lectinas. El mejor estudiado de ellos es el virus influenza HA. El análisis mediante cristalografía de rayos X de la unión de este virus al ácido siálico permitió identificar el sitio de la interacción (Weis y col., 1988) y trabajos posteriores demostraron que virus mutantes con un solo aminoácido cambiado en este sitio, difieren en su especificidad de unión a ácido siálico unidos  $\alpha$  (2-3) o  $\alpha$  (2-6) (Pritchett y col., 1987).

Algunas bacterias contienen ácido siálico y muchas de ellas presentan actividad de sialidasa (Corfield y Schauer, 1982). En muchas patologías es importante el rol del ácido siálico del hospedador en las interacciones huésped-bacteria (Rfaiee y col. 1991). Sialidasas bacterianas pueden actuar desenmascarando glicoproteínas del hospedador que entonces pueden ser atacadas por proteasas bacterianas.

En la infección denominada malaria, se demostró que el merozoito de *Plasmodium falciparum* invade los glóbulos rojos a través de un mecanismo mediado por receptores que involucra ácido

siálico. El receptor ha sido denominado "erythrocyte binding antigen 175 " (EBA175) (Orlandi, Klotz y Haynes, 1992).

#### c-La neuraminidasa o sialidasa de *T. cruzi*

La actividad de sialidasa o neuraminidasa de *T. cruzi*, fue reconocida por primera vez por un ensayo de sensibilidad en el cual, luego de incubar eritrocitos con tripanosomas vivos o lisados, residuos de galactosa eran detectados en una reacción con aglutinina de maní (Pereira, 1983). Estudios posteriores asignaron esta actividad a un grupo polimórfico de proteínas de un peso molecular aparente entre 160 y 220 kDa, que son liberadas al medio extracelular (Prioli, Mejía y Pereira, 1990). Esta actividad estaba ausente en los amastigotes y era entre 7 y 15 veces más baja en los epimastigotes con respecto a la forma tripomastigote de cultivo celular (Pereira, 1983). Estas diferencias sugieren que la enzima podría estar involucrada en procesos específicos del estadio tripomastigote, tales como la penetración celular o la patogénesis de los tejidos. En este sentido, aunque no se haya demostrado una relación causal, ciertas cepas miotrópicas de *T. cruzi* presentan una actividad de neuraminidasa incrementada (Pereira y Hoff, 1986). Por otra parte la neuraminidasa soluble del parásito es capaz de remover ácido siálico a partir de miocardio de ratas y células epiteliales humanas, hechos que sugieren un posible rol en la interacción parásito-hospedador (Pereira y Hoff, 1986). También fue sugerida la participación de neuraminidasas del parásito en la adhesión y penetración en células del huésped. Se ha propuesto que esta enzima estaría involucrada en un control negativo sobre el crecimiento de *T. cruzi*, a través de la remoción de ácido siálico de moléculas (de los parásitos o de las células huéspedes) que serían necesarias para la internalización (Pereira, 1988; Prioli, Mejía y Pereira, 1990).

Harth y colaboradores (Harth, Haidaris y So, 1987) partiendo de tripomastigotes metacíclicos, obtenidos a partir de cultivos envejecidos de epimastigotes, purificaron a aparente homogeneidad una proteína de 60 kDa de peso molecular con actividad de sialidasa. Este tamaño difiere con las proteínas identificadas por Pereira y colaboradores (Prioli, Mejía y Pereira, 1990). Una posible causa de esta discordancia en los pesos moleculares, podría radicar en el diferente estadio de parásitos utilizado por ambos grupos. En relación a este dato, recientemente se ha descrito una proteína de 90 kDa de peso molecular aparente con actividad de sialidasa en epimastigotes (Botelho-Chaves, Briones y Schenkman, 1993). Otra posible explicación es que la proteína de 60 kDa fuese un producto de degradación generado durante los pasos de purificación.

#### d-Concepto de Trans-sialidación en *T. cruzi*

Como se describió anteriormente, el ácido siálico es un componente importante de la membrana de *T. cruzi*. Sin embargo el parásito es incapaz de sintetizarlo a partir de precursores como N-acetil-[<sup>3</sup>H]-D-manosamina o [<sup>3</sup>H]-acetato (Schauer y col., 1983). En 1985 los trabajos de Previato y colaboradores, permitieron describir un camino alternativo de incorporación del ácido siálico

(Previato y col., 1985). Este grupo demostró que los epimastigotes que crecían en suero fetal, que contiene sialoglicoconjugados, se pegaban a aglutinina de germen de trigo (lectina que reconoce residuos de ácido siálico). Esto no sucedía si los epimastigotes eran crecidos en ausencia de sialoglicoconjugados. Además, luego de tratar los parásitos con sialidasa bacteriana, los mismos recuperaban el ácido siálico a partir de fetuina o sialil-lactosa, pero no a partir de ácido siálico libre. Esta reacción ocurría también en presencia de inhibidores de la producción de energía, por lo tanto los autores propusieron que los residuos de ácido siálico eran transferidos a componentes de *T. cruzi*, a través de una reacción de trans-glicosilación (Previato y col., 1985). Este mecanismo difiere de las sialil-transferasas de eucariotes que utilizan CMP-siálico como dador y se encuentran normalmente en el aparato de Golgi de la célula. La misma actividad trans-glicosilasa fue descripta luego en tripomastigotes (Zingales y col., 1987). Se demostró también que la fetuina (pero no la asialofetuina o los residuos de ácido siálico libre) aumenta la invasión de los tripomastigotes a células entre 4 y 8 veces si se preincuba con los parásitos o se incluye en el medio durante el ensayo de infección (Piras, Henríquez, Piras, 1987). Se propuso entonces como hipótesis que la sialidación de los componentes de superficie de *T. cruzi* (vía la reacción de trans-glicosilasa) estaba involucrada en la relación parásito-célula-hospedador. A partir de estos hallazgos se utilizó el término de trans-sialidasa para la enzima sialil-trans-glicosilasa de *T. cruzi*. Es importante aclarar que todas las sialidasas son sialil-trans-glicosilasas que transfieren los residuos de ácido siálico al agua. En la práctica, sin embargo, se aplica el término de sialil-trans-glicosilasas a las enzimas capaces de transferir los residuos de ácido siálico a aceptores que están presentes en concentraciones mucho menores que el agua.

Recientemente Schenkman y colaboradores (Schenkman y col., 1991) retomaron el tema demostrando que la trans-sialidasa transfiere ácido siálico de macromoléculas del huésped a numerosas proteínas, de un peso molecular aparente entre 60 y 200 kDa, presentes en la forma tripomastigote (derivados de cultivo de células) de *T. cruzi*. Todas ellas caracterizadas por compartir el epitope sialidado denominado Ssp-3, que fue originalmente definido por el anticuerpo monoclonal MAb 3C9 (Andrews y col., 1987). Se ha observado que los anticuerpos que reconocen a los residuos de ácido siálico del Ssp-3, inhiben la penetración de tripomastigotes a células huésped (Schenkman, Pontes de Carvalho y Nussenzweig, 1992). Este resultado se correlaciona con los descriptos previamente por Piras (Piras, Henríquez, Piras, 1987) y conjuntamente indican que el ácido siálico modularía, por intermedio de los diferentes epitopes Ssp-3, la internalización del parásito en la célula hospedadora. Es interesante destacar que en la forma tripomastigote metacíclico se han caracterizado como principales aceptores de ácido siálico, un grupo de antígenos de peso molecular aparente entre 35 y 50 kDa. Este conjunto de antígenos presenta una estructura que asemeja a las mucinas de mamíferos, como se detallará en el próximo punto (Schenkman y col., 1993).

## **2- Antígenos de *T. cruzi***

Han sido reportadas numerosas proteínas antigénicas de membrana en *T. cruzi*. Algunas de ellas son comunes entre las distintas formas del parásito y otras específicas de estadio (Araujo y Remington, 1981; Lanar y Manning, 1983; Dragon y col., 1985; Nogueira y col., 1981; Contreras y col., 1985; Kirchhoff y col., 1987). La mayoría de los estudios realizados son de tipo estructural, sin embargo han sido descritos diversos antígenos involucrados en la protección contra la infección de *T. cruzi* y en la evasión de la respuesta inmune por el parásito. La utilización de técnicas de clonado molecular ha posibilitado una mejor caracterización de antígenos de *T. cruzi*, ya que permiten aislar y manipular genes parciales o completos, abriendo la posibilidad de estudiar la regulación de su expresión y de producir en cantidad moléculas individuales, que de otro modo sería imposible obtener.

### **a-Clonado de genes codificantes para antígenos de *T. cruzi***

En organismos con un ciclo de vida complejo como *T. cruzi*, las técnicas de clonado molecular posibilitan acceder a los diferentes componentes que intervienen en la interacción con el hospedador vertebrado y el vector.

Peterson y colaboradores reportaron por primera vez, el clonado de un gen que codifica para un antígeno de superficie de 85 kDa específico de tripomastigotes (Peterson, Wrightsman y Manning, 1986). Durante los últimos años se han clonado otros genes del parásito, a través de búsquedas inmunológicas en genotecas de expresión de ADN, utilizando sueros obtenidos de animales o personas infectadas (Dragon y col., 1987; Ibañez y col., 1987; Frasch y col., 1991). Analizando las secuencias obtenidas hasta el momento, se observó que gran parte de ellos posee una estructura común conformada por unidades repetidas de aminoácidos, las cuales serían inmunodominantes en infecciones naturales (Frasch y col., 1991). Uno de estos clones aislados caracterizado por unidades repetitivas de 12 aminoácidos cada una, constituye un caso de sumo interés ya que es un antígeno reconocido fuertemente y con frecuencia, por sueros de pacientes en la etapa aguda de la enfermedad de Chagas y recién nacidos infectados congénitamente con *T. cruzi* (Affranchino y col., 1989; Reyes y col., 1990). Consecuentemente este antígeno es poco reconocido por sueros de pacientes crónicos analizados, hecho que sugiere su utilización como marcador de infecciones recientes con *T. cruzi* (Affranchino y col., 1989; Reyes y col., 1990). La importancia de estos resultados radica en que solamente durante el período temprano de la infección el tratamiento quimioterápico de la enfermedad es efectivo. El clon aislado corresponde a la región 3' terminal del gen cuyo producto es liberado al medio extracelular por la forma tripomastigote del parásito durante el período temprano de la infección y que se denominó SAPA, por las siglas del inglés: "Shed Acute Phase Antigen" (Affranchino y col., 1989). Se obtuvo la secuencia parcial del clon aislado y se demostró la presencia de varias copias del gen. También se comprobó la liberación al medio extracelular por los

tripomastigotes de cultivo de seis polipéptidos en el rango de 165 a 205 kDa de peso molecular aparente (Ibañez y col., 1988; Affranchino y col., 1989).

Este tipo de estructuras repetitivas también ha sido observada en proteínas antigénicas en *T. brucei* (Schneider y col., 1988; Roditi, Carrington y Turner, 1987). Comparando los mismos genes entre diferentes cepas de *T. cruzi*, se ha visto que las unidades repetidas son casi idénticas, aún cuando fueran identificadas a partir de diferentes aislamientos de parásitos (Ibañez y col., 1988, Lafaille y col., 1989; Levin y col., 1989; Hoft y col., 1989). No se han observado homologías entre las unidades repetidas de *T. cruzi* y las de otros parásitos. Sin embargo, la región repetitiva del antígeno 36 (Ibañez y col., 1988)/JL9 (Levin y col., 1989), es idéntica en tamaño y similar en secuencia a una proteína asociada a microtúbulos, descrita en *T. brucei* (Schneider y col., 1988). Esta similitud ha sido descrita para el antígeno 1 de *T. cruzi* y el antígeno GM6 de *T. brucei* (Muller y col., 1992). La presencia de unidades repetidas parecería ser un fenómeno general entre los parásitos protozoos, los cuales tienen que estar evadiendo continuamente la respuesta inmune del huésped. La presencia de epitopes repetidos de aminoácidos podría tener posibles implicaciones en la evasión de la respuesta inmune (Kemp y col., 1987).

Algunos de los antígenos de *T. cruzi* identificados son internos (Lafaille y col., 1989; Schijman y col., 1990; Bontempi, Martínez y Cazzulo, 1989). En el caso de la cisteín proteínasa de *T. cruzi* (Cazzulo y col., 1990) además de localizarse en lisosomas (Bontempi, Martínez y Cazzulo, 1989), se han encontrado evidencias que sugieren que podría localizarse también en la superficie celular (Souto-Padrón y col., 1990). Otros antígenos han sido localizados en el flagelo (Lafaille y col., 1989; Levin y col., 1989) Estos últimos podrían ser utilizados para estudios de serología y de inmunoprotección ya que se ha observado protección en ratones inyectados con dosis fatales de parásitos, cuando se utiliza la fracción flagelar (Ruiz y col., 1985).

La función que cumplen estos antígenos de *T. cruzi*, sólo se conoce para muy pocos de ellos. Se sabe que las proteínas de "heat-shock" son antigénicas en las infecciones naturales (Dragon y col., 1987, Requena y col., 1988, Engman y col., 1989). La proteína P, la cual se sugiere que podría estar involucrada en el proceso de autoinmunidad, es un componente ribosomal (Levin y col., 1989). Se ha reportado (Murta y col., 1990) que una glicoproteína antigénica denominada gp57/51 (Scharfstein y col., 1985), es una cisteín proteínasa de *T. cruzi* denominada "cruzipaína" (Cazzulo y col., 1990). Recientemente se ha descrito una familia de genes que expresan antígenos de 85 kDa que presentan regiones conservadas correspondientes a neuraminidasas bacterianas (Kahn y col., 1991; Takle y Cross, 1991).

#### b-Proteínas de *T. cruzi* relacionadas con la interacción y/o penetración de la célula hospedadora

Un capítulo aparte en cuanto a antígenos de *T. cruzi* lo constituyen aquellos relacionados con la interacción e invasión del parásito a la célula hospedadora. La infección con *T. cruzi* es iniciada por los tripomastigotes metacíclicos que provienen del insecto vector. Esta forma del parásito es capaz

de invadir células del hospedador provocando el reclutamiento y la fusión de los lisosomas de la misma, en un mecanismo diferente de la fagocitosis clásica (Tardieux y col., 1992). No están claros aún los factores involucrados en la interacción célula(hospedador)-parásito que llevan a la infección. Se presume que en este proceso se produzca una interacción específica de tipo ligando-receptor entre componentes del parásito y la célula del mamífero. Una forma muy difundida de identificar componentes de la superficie de *T. cruzi*, implicados en la invasión de la célula huésped, la constituye la utilización de anticuerpos monoclonales contra el parásito que inhiban parcialmente la entrada del mismo a cultivo de células de mamífero. A partir de estos anticuerpos monoclonales es posible identificar los antígenos correspondientes del parásito. Utilizando esta técnica, se ha sugerido que una glicoproteína de 85 kDa podría servir como un ligando que mediaría el reconocimiento célula(hospedador)-parásito "in vitro" (Zingales y Colli, 1985; Alves y col., 1986). Se ha observado que tripomastigotes obtenidos de células en cultivo contienen una proteína de 83 kDa que se uniría a la superficie de fibroblastos "in vitro" (Boschetti y col., 1987). Otra molécula que podría estar asociada a la capacidad infectiva de *T. cruzi* es un polipéptido de 90 kDa, específico del estado metacíclico, identificado por el anticuerpo monoclonal 1G7 (Texeira y Yoshida, 1986). Este anticuerpo es capaz de reducir la infectividad en ratones (Araguth, Rodriguez y Yoshida, 1988) y de inhibir la adhesión y penetración de tripomastigotes metacíclicos en células Vero (Yoshida y col., 1990).

Se han reportado un conjunto de glicoproteínas de superficie de la forma metacíclica, con un peso molecular aparente entre 35 y 50 kDa, identificadas por el anticuerpo monoclonal 10D8 que neutraliza parcialmente la infectividad del parásito en células Vero (Yoshida y col., 1989). Estos antígenos de superficie presentan un importante grado de polimorfismo molecular, como lo indican anticuerpos monoclonales diferentes que reconocen epitopes distintos en estos antígenos (Mortara y col., 1992). Se sugiere una estructura similar a la de las mucinas para los mismos y un anclaje a la membrana del tipo glicofosfatidilinositol (Schenkman y col., 1993). Además, como se dijo anteriormente, los antígenos de 35/50 kDa constituyen las moléculas aceptoras principales de ácido siálico de los tripomastigotes metacíclicos (Schenkman y col., 1993).

Existen otras proteínas también relacionadas con la interacción y/o penetración de la célula hospedadora aún no caracterizadas antigénicamente. Se estudió la interacción de la fibronectina plasmática con *T. cruzi* (Ouaissi y col., 1984). La fibronectina es una glicoproteína multifuncional, de alto peso molecular, presente en sangre, tejido conectivo y en la superficie celular. Estos autores demostraron que la fibronectina se une específicamente a tripomastigotes y que estaría involucrada en la adhesión del parásito a la superficie de la célula hospedadora. Los mismos autores localizaron una proteína de superficie específica de tripomastigotes de 85 kDa, con características de receptor de fibronectina (Ouaissi, Cornette y Capron, 1986). Además, la proteína purificada inhibió la infección de fibroblastos por tripomastigotes, hecho que sugiere que ésta se uniría a la fibronectina de la superficie celular compitiendo e impidiendo la adhesión del parásito (Ouaissi y col., 1986) Los

autores concluyen que los dímeros de fibronectina actuarían como puente entre las superficies de las células del huésped y del parásito, a través de una secuencia hidrofílica de cuatro aminoácidos (Ouaissi, 1988).

En el año 1991, el grupo de Pereira describió una molécula denominada penetrina, de 60 kDa de peso molecular, localizada en la superficie de la forma tripomastigote del parásito (Ortega-Barria y Pereira, 1991). La misma se une a heparina y sería capaz de promover la adhesión selectiva y migración de los tripomastigotes a través de la matriz extracelular, para luego penetrar las células de mamíferos. La proteína recombinante expresada en la superficie de *E. coli* posibilita la penetración de las bacterias a células de mamífero no fagocíticas (Ortega-Barria y Pereira, 1991).

**OBJETIVOS**



**OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION**

Como indican los estudios previos en el laboratorio, existe una importante respuesta inmunológica contra el antígeno SAPA durante las infecciones tempranas con *T. cruzi*. Este antígeno es fuertemente reconocido por sueros de pacientes en la etapa aguda de la enfermedad de Chagas y recién nacidos infectados congénitamente con *T. cruzi* (Affranchino y col., 1989; Reyes y col., 1990). Se propuso entonces, investigar la importancia y el rol del antígeno SAPA en la biología del parásito, de acuerdo a los siguientes objetivos:

- 1- Obtener la secuencia completa de un gen de la familia de genes del antígeno SAPA.
- 2- Analizar la misma y realizar una búsqueda de identidad con otros genes. Este tipo de comparaciones, constituye un primer acercamiento con una posible función biológica además de la ya reconocida capacidad antigénica.
- 3- Caracterizar la estructura y organización de la familia de genes del antígeno SAPA.
- 4- Realizar un estudio preliminar de la regulación y expresión de los genes de esta familia.
- 5- Relacionar la importancia antigénica de las proteínas SAPA con los resultados desarrollados a partir de los objetivos precedentes, en relación a la biología de *T. cruzi*.

**RESULTADOS**

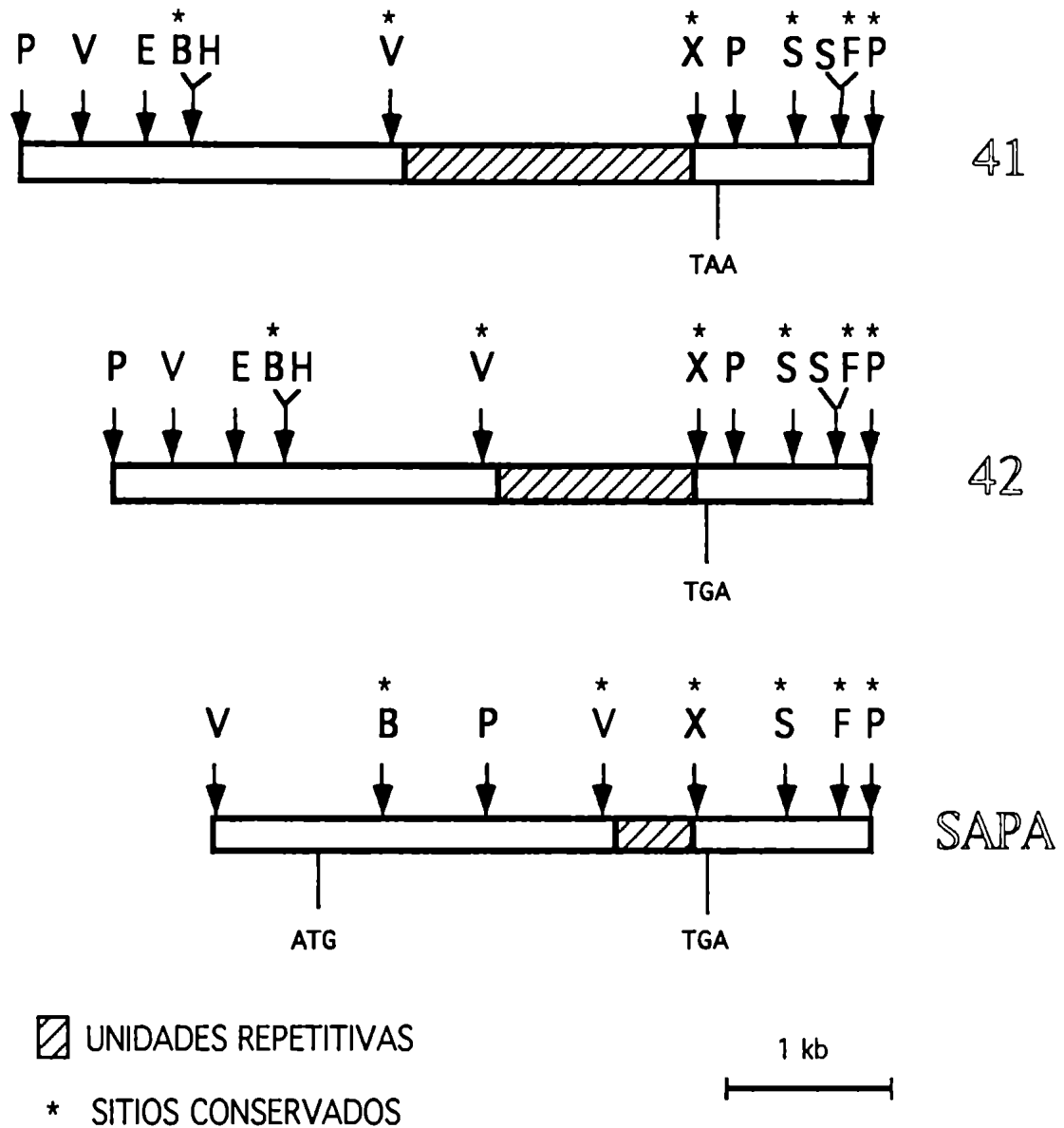
## **ESTRUCTURA DE UN GEN COMPLETO QUE CODIFICA PARA UN ANTIGENO SAPA DE *T. cruzi***

### **1- Aislamiento de genes completos del antígeno SAPA**

La familia antigénica denominada SAPA (Shed acute phase antigen) está formada por una serie de proteínas caracterizadas por poseer unidades repetitivas organizadas cabeza-cola, de 12 aminoácidos cada una y por ser inmunodominantes en infecciones experimentales en animales y naturales en humanos. En estas últimas, tanto agudas como congénitas, una fuerte respuesta inmunológica temprana es generada contra este antígeno (Affranchino y col., 1989 y Reyes y col. 1990). Todos los estudios realizados hasta este momento habían utilizado solamente el extremo carboxilo terminal del antígeno SAPA. Es decir, un clon que codifica una proteína recombinante que contiene las 14 unidades repetitivas de 12 aminoácidos cada una y que solamente posee 43 aminoácidos hacia el N-terminal de las mismas y 39 aminoácidos hasta el codón de terminación de la proteína. Dada la importancia de este antígeno en la respuesta humoral contra *T. cruzi* y como marcador de la etapa aguda de la enfermedad de Chagas se propuso aislar, estudiar y caracterizar un gen completo SAPA. Para ello se llevó a cabo una búsqueda en una genoteca de ADN de la cepa CA-I/65 de *T. cruzi* en el vector  $\lambda$ gt wes. Se utilizó como sonda, ADN del clon original SAPA (Affranchino y col., 1989). De los clones obtenidos, tres fueron analizados y caracterizados por mapeos de restricción (Figura 2). Se estableció que uno de ellos estaba completo secuenciándolo totalmente. El gen fue denominado SAPA por ser el primer gen completo secuenciado que representa a la familia de antígenos SAPA.

### **2- Mapeo de diferentes clones que codifican el antígeno SAPA**

Utilizando las técnicas de digestión por endonucleasas de restricción y secuenciación de ADN se estableció que los tres clones aislados (41, 42 y SAPA) correspondían a genes diferentes del antígeno SAPA. Se observó un patrón conservado con algunos polimorfismos en cuanto a los sitios de restricción para los distintos genes aislados del antígeno SAPA (ver figura 2). El sitio para la endonucleasa de restricción PvuII cercano al inicio de las repeticiones y el sitio BamHI, se encuentran altamente conservados en los tres genes estudiados. Lo mismo ocurre con ciertos sitios HaeII, PstI, SspI y FspI en el extremo 3' de los tres clones. Además, se pueden observar en la figura 2, sitios diferentes comparando los clones 41 y 42 con el clon SAPA. Los clones 41 y 42 difieren entre sí por poseer un número distinto de unidades repetitivas y diferencias en sus secuencias de ADN, como se desarrollará en los próximos puntos (ver figura 2).



**Figura 2.** Comparación estructural de diferentes clones que codifican el antígeno SAPA. El esquema indica el número diferente de unidades repetitivas que cada clon contiene y sitios conservados y polimórficos para diferentes endonucleasas de restricción. B: BamHI, E: EcoRI, F: FspI, H: HindIII, P: PstI, S: SspI, V: PvuII, X: HaeII.

### 3- Análisis de la secuencia nucleotídica completa de uno de los genes que codifican los antígenos SAPA

#### a-Análisis de la estructura primaria de la secuencia

El clon identificado fue subclonado en el vector pUC19 con el objeto de obtener su secuencia nucleotídica completa. Luego de dos codones de terminación (subrayados en la figura 3), se obtuvo un marco de lectura abierto de 2637 pb. Tomando como referencia que luego de este segundo codón de terminación comienza la primer base del marco de lectura abierto, a 12 pb del mismo se encuentra en fase con este marco de lectura, el codón que codifica una posible metionina de

1 TCCTCTGCGA CTTCGTGTTT CTCTTCTCTT TCTCATCGCC CCGCGCGCAA TCCCCCTGCA AAGAGACGGT CTTCGCCCTA TTGATTTAGG CACAATATAA ATTCTACAAG CAACCTCGA  
121 AGGACACACA GGTAGGCACC GAGTACGATG GGGAGGACAG TGGTCGGGC CAGCAGGATG TTCTGGCTAA CGCATTTCTG GCCGCTTCTT CTGGCGCTCT GCCCCAGCGA GCCCGGCAC  
M G R T V V G A S R M F W L T H F V P L L L A L C P S E P A H  
241 GCCCTGOCAC CCGGATGAG CCGAGTTGAG CTGTTTAAGC GCGAAAATTC GACGGTCCCA TTGGAAGAGA ACGGCGAGGT CCGACAGCGA GTTGTCCTCT CGTTCCGCTT CCCCGCCCTT  
A L A P O S S R V E L P K R Q N S T V P F B E N G E V R Q R V V H S F R L P A L  
361 OTTAATGTGG ACCGGGTGAT GGTTCOCATC GCGGACCTC GCTAGCAGAC ATCCAATGAC AACTCCCTCA TTGATACGGT GGTGAAGTAC AGCGTGGACG ATGGGGAGAC GTGGGAGACC  
V N V D O V M V A I A D A R Y D T S N D N S L I D T V V K Y S V D D G E T W E T  
481 CAATGTCGA TCAAGAACAG TCGTGCATCG TCTGTCTCTC GTGTGGTGGG TCCACAGTGT ATTGTGAAGG GCAACAAGAT TTACGTCTCT GTTGAAGCT ACAATAGCTC AACTAGCTAC  
Q I A I K N S R A S S V S R V V D P T V I V K G N K I Y V L V G S Y N S S T S Y  
601 TGGAGTCCG ATGGTATGTC GAGAGCTGG GATATCTGTC TTCCCGTTGG TGGTCTCAGC AAGTCCATTT TGGATGGCAA GACAACCTCG AATATCATAT GGGGGAGCC TGTGTACTG  
M T S H G D A R D W D I L L A V G E V T K S I V D G K T T A N I T W G S P V S L  
721 AAGGATTTT TTCCGGCATA TATGGAAGGA ATGCACACAA ATCAATTTCT CCGCGGTGCA GGTGTGCGCA TTGTGGCGTC CAACGGGAAT CTGTGTACC CTGTGCAGT TACGAACAAA  
K E F P P A Y M E G M H T M Q F L G G A G V A I V A S N G N L V Y P V Q V T N K  
841 AGGAAGCAAG TTTTTCCTAA GATCTCTTAC TGGGAAGATG ATGGCAAGAC GTGGAAGTTT GCGAAGGTA GGAGCGATTT TGGCTGCTCT GAACCTGTGG CCGTTGAGT GGAGGGAGG  
R K Q V P S K I F Y S E D D G K T W K P G K G R S D P G C S E P V A L E W E G K  
961 CTCATCATAA ACACTGAGT TGACTATGTC GCGCGCTGG TGTAGAGTTC CAGTGACAG GAGAAACCGT GGTGGAGGC TGTGGCAGC CTCTCGGTTT CTTGGGCCCT CTCACAAAA  
L I I N T R V D Y R R R L V Y E S S D T E K P M V E A V G T L S R C W G P S P K  
1081 TGGACCAGC CCGCAGTCA GAGCAGCTTC ACTGCGGTGA CCAATGGAAG AATGGGTGTG ATGCTCTTCA CACACCCGCT GAATTTTAA GGATGTGGC TGGCGAGCC ACTGAACCTC  
S D Q P G S Q S S F T A V T I E G H R V M L P T H P L N F K G W W L R D R L N L  
1201 TGGCTGAGG ATAACAGCG CATTTATAAC GTTGGCAAT TTCCATTTGG TGATGAAAT TCCCGCTACA CCGCTGCTCT ATACAAGGAT GATAAGCTGT ACTGTTTGA TGAGATCAAC  
W L T D N Q R I Y N V G Q L S I G D E N S A Y S S V L Y K D D K L Y C L H E I N  
1321 AGTAACGAGG TGTACAGCCT TGTTTTGTGG CCGCTGGTGG GCGAGCTACG GATCAITAAA TCCGTGCTGC AGTCTCGAA GAAGTGGAC AGCCACCTGT CCAGCAITTT CACCCCTGCT  
S N E V Y S L V F A R L V G E L R I I K S V L Q S W K K W D S H L S S I C T P A  
1441 GATCTGCGC CCGTGTGTC CGAGCGTGTG TGTGGTCCCG CCGTACCAC GGTGGTCTT GCTGGCTTTT TGTCCACAG TCGCAACAAG ACCAAGTGA AGGATGGTA CCGCTGCGT  
D P A A S S S E R V C G P A V T T V G L A G F L S H S A N K T K W K D A Y R C V  
1561 GAGCAAGCA CCGCAATGC GGAGAGATTT TCAACGGTIT TGAAGTTTGC GGGAGTGGC GGAGGGGCGC TTGGCGCGT GAGCCAGCAG GGGCAGAAT AACGTTATG TTTTGAACA  
D A S T A N A E R V S N G L K P A G V G G G A L W P V S Q Q G Q N Q R Y R F A N  
1681 CAGCGTCA CCGTGTGGC GTCCGTGAGC ATTCAGGAG CTOGAGGCT CGCAAGTCTT TTGCTGGGTG CGAGCGTGA CTCCTCTGTT GCGAAAAAC TCTGGGGCT CCGTACGAC  
H A P T L V A S V T I H E A P S V A S P L L G A S L D S S G G K K L L G L S Y D  
1801 GAGAAGCACC AGTGGCAGCC AATATACGGA TCAACCCGG TACGCCGAC AGGATCATGG GAGACGGTA AGAGTACCA CCGTGTCTTT AGCATGGCA ATAGAAAAG CTTCCGTGAC  
E X H Q W Q P I Y G S T P V T P T G S W B T G K R Y H V V L T M A N R N G S V Y  
1921 GTTGAAGGAG AACTTCTGAA GGGTTCAGGG CAGACCGTGG TCGCAGACAG GAGCGCTGAC ATCTCCACT TCTAGCTGG CCGGTATGGA AGGAGTATA TCGCAACCAT AAGCCAGTG  
V D G E L L K G S G Q T V V P D R T P D I S H F Y V G G Y G R S D M P T I S H V  
2041 ACGTGAATA ATGTTCTTCT TTACAACCGT CAGCTGAATG CCGAGGAGAT CAAGACTTGG TTCTTGAGCC AGGACTGAT TGGCAGCGAA GCACACATGG ACAGCAGCAG GAGCAGCAGT  
T V N N V L L Y N R Q L N A E E I K T L F L S Q D L I Q T E A H M D S S S D S S  
2161 GCGCAGGTA CCGCTCAAC TCCCGTGGC AGCACTGCC AGGTAAGCC CTGACTCCC GCTGACAGCA GTGCCACAG TACGCCCTCG ACTCCCGTGG ACAGCAGTGC CCACAGTACG  
A H G T P S T P V D S T A H G T P S T P A D S S A H S T P S T P A D S S A H S T  
2281 CCGTACTC CCGTGGCAG CAGTGGCCAT AGTACGCCCT CCACTCCCGC TGACAGCAGT GCCACAGTA CCGCCCTGAC TCCCGTGGC AGCATGGCC ACAGTACGCC CTCAACTCCC  
P S T P V D S S A H S T P S T P A D S S A H S T P S T P A D S S A H S T P S T P  
2401 GTGACAGCA CCGCCACCG TACGCCCTCG ACTCCCGCTG ACAGCAGTGC CCACAGTACG CCGTCAACTC CCGTGGCAGC CAGTGGCCAC AGTACGCCCT CCACTCCCGC TGACAGCAGT  
V D S T A H Q T P S T P A D S S A H S T P S T P V D S S A H S T P S T P A D S S  
2521 GCGCAGGTA CCGCTCAAC TCCCGTGGC AGCACTGCC ACAGTACGCC CTGACTCCC GCTGACAGCA GTGCCACAG TACGCCCTCG ACTCCCGTGG ACAGCAGTGC CCACAGTACG  
A H S T P S T P V D S S A H S T P S T P A D S S A H Q T P S T P V D S S A H S T  
2641 CCGTCAACTC CCGTGGCAG CAGTGGCCAT GGTACGGTIT TGTTTTTGGC CGATGGCGCT GCATTTTCCA CCTTTTGGG CCGAGGGCTT CTCTGTGTG CCGTGTCTTT GCTGCTGAC  
P S T P A D S S A N Q T V L I L P D G A A L S T P S G G G L L L C A C A L L L H  
2761 GTTTTTTTA CCGCAGTTTT TTTCTgatgt agtgagagag tctcctaaca aatgtagata aa\*cataat tgtggtgtgc aa\*cgtttgg gtaaatgtgt gtgtgctet cataca  
V P P T A V P F

**Figura 3.** Secuencia nucleotídica completa de uno de los genes que codifica para los antígenos SAPA  
Se muestra la secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos deducida a partir de ésta, comenzando por la primer metionina del marco de lectura abierto, a continuación de dos codones de terminación (subrayados). La línea de puntos indica los motivos de neuraminidasas S-X-D-X-G-X-T-W. Los asteriscos sobre el AG marcan el sitio de "transplicing". Las unidades repetitivas de 12 aminoácidos se encuentran recuadradas. La región carboxilo terminal característica de los anclajes del tipo glicofosfatidilinositol está subrayada.

iniciación de la proteína (figura 3). Asumiendo la misma iniciación de la proteína para *T. cruzi* y los eucariotas superiores, esta metionina se encuentra en un contexto adecuado para la unión de la subunidad ribosomal. Es decir de las 13 bases de la secuencia consenso de eucariotas (CCGCCAGCCAUGG) las 8 subrayadas están conservadas en el mismo orden y posición para el AUG del gen SAPA. Del análisis general de este marco de lectura se puede deducir una secuencia proteica de peso molecular teórico de 93.881 Dalton correspondiente a un total de 880 aminoácidos, de los cuales la serina es el de porcentaje más alto en cuanto a composición (14,2%). El aumento del peso molecular aparente en geles desnaturizantes con SDS (160 a 200 kDa) puede ser atribuido a una migración anómala de las proteínas debido a las unidades repetitivas de aminoácidos que se describen más adelante. Se pueden inferir tres dominios proteicos bien definidos, deducidos a partir de la secuencia de ADN: comenzando por el 5' del gen el mismo posee una región no repetitiva de 1994 pb que por motivos que se explicarán a continuación, podemos denominar dominio enzimático. Seguidamente, 504 pb constituidas por 14 repeticiones de 36 pb cada una, organizadas cabeza-cola, ya descritas para el clon incompleto de SAPA (Affranchino y col., 1989), recuadradas en la figura 3, que llamaremos dominio repetitivo. Finalmente el dominio de anclaje consta de una región no repetitiva hidrofóbica de 128 pb en el 3' terminal del gen, hasta el codón de terminación de la proteína (ver figura 4).

#### DOMINIO ENZIMATICO

El N-terminal de la proteína SAPA posee 6 residuos de cisteínas y un 27% de identidad con la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* (figura 16). Este dominio además incluye cuatro secuencias consenso (S-X-D-X-G-X-T-W), altamente conservadas en neuraminidasas virales y bacterianas (Roggentin y col., 1989) (indicadas en las figuras 3 y 4). Estos motivos de neuraminidasas están localizados en diferentes regiones de la secuencia con una distribución similar a la de las neuraminidasas bacterianas (Figura 16). Dos de estos motivos presentes en la secuencia del gen SAPA conservan el total de los 5 aminoácidos consenso y los dos restantes 3 de los 5 (Figuras 3 y 4). Además en esta región se encontraron 5 sitios potenciales (Asn-X-Ser/Thr) para N-glicosilación. Comparando la región comprendida entre los aminoácidos 537 y 667 del antígeno SAPA con la secuencia consenso de los Módulos de Tipo III de la Fibronectina, definidos como segmentos de 71-109 aminoácidos repetidos 15 veces en esta proteína (Skorstengaard y col., 1986), se encuentran residuos de aminoácidos aromáticos (triptofano y tirosina) y aminoácidos hidrofóbicos cercanos, conservados en distancia entre ambas secuencias (Pereira y col., 1991).

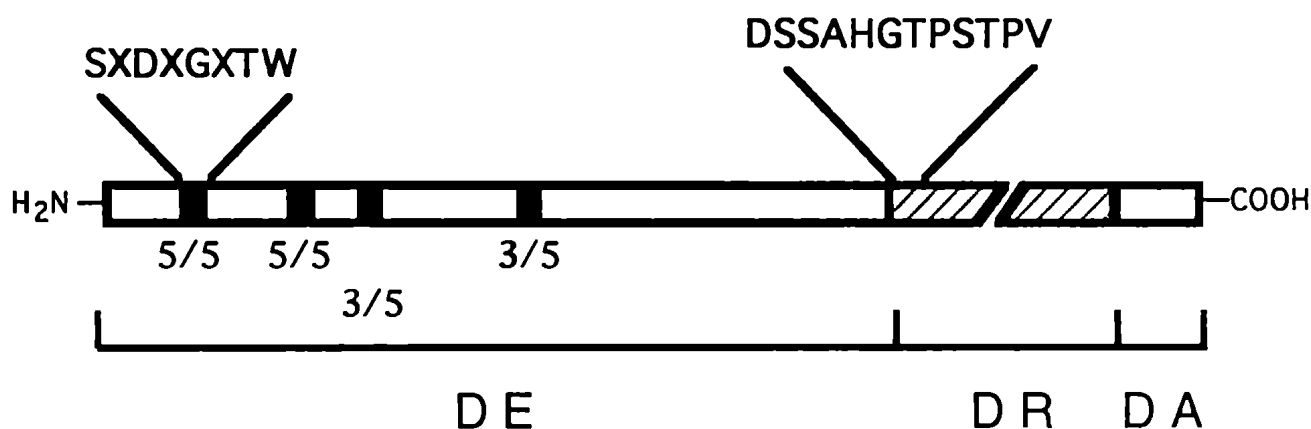
#### DOMINIO REPETITIVO

Este dominio presenta las 14 unidades repetitivas organizadas cabeza-cola, de 12 aminoácidos cada una (figura 3). Estas repeticiones constituyen el 20% de la proteína, siendo cada unidad rica (75%) en residuos de serina, treonina y prolina, con la siguiente secuencia consenso: D-S-(S/T)-A-H-(S/G)-T-P-S-T-P-(A/V). Como se describe en el próximo punto y en la figura 5, este dominio es hidrofílico debido a su alto contenido de aminoácidos polares (serina, treonina, ácido

aspártico e histidina). Cada unidad contiene dos prolina conservadas las cuales evitan la formación de estructuras  $\beta$  plegadas y  $\alpha$  hélice. Este dominio se puede considerar en cuanto a estructura, similar al dominio C-terminal de la subunidad mayor de la ARN polimerasa II de ratón que consta de 52 repeticiones ricas en serina, treonina y prolina (Corden y col., 1985).

#### DOMINIO DE ANCLAJE

Este dominio comienza a continuación del dominio repetitivo, a partir de una unidad repetitiva incompleta de 5 aminoácidos donde existe un sitio potencial para N-glicosilación. La secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal es altamente hidrofóbica. Además en este dominio se encuentran los aminoácidos: alanina, asparagina, aspártico, glicina o serina combinados de a dos y seguidos de corridas hidrofóbicas de aminoácidos (ver figuras, 3 y 5). Este hecho caracteriza un grupo de proteínas funcionalmente no relacionadas, que se encuentran unidas a la membrana plasmática a través de un anclaje del tipo glicofosfatidilinositol (Cross, 1990a). Estas proteínas son procesadas proteolíticamente en el retículo endoplasmático y el carboxilo terminal es reemplazado por el anclaje glicofosfatidilinositol (Ferguson y Williams, 1988).

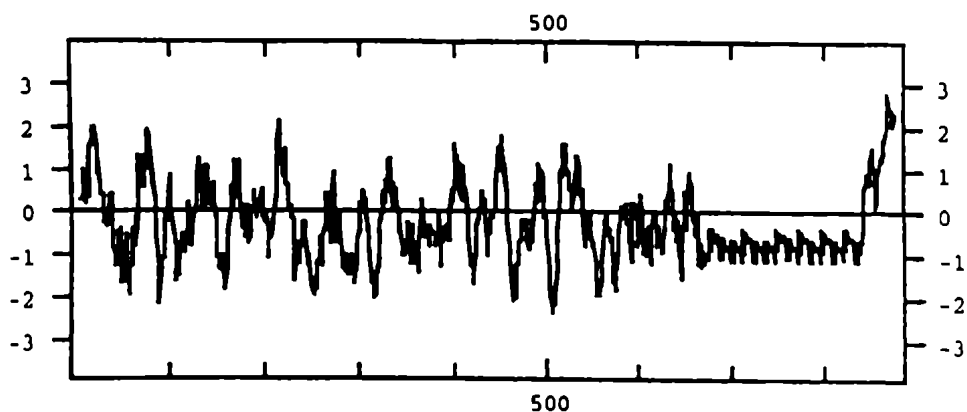


**Figura 4.** Modelo esquemático de la estructura monomérica de un antígeno SAPA. Los motivos de neuraminidasas se representan como bloques negros. Los números debajo de los mismos indican cuantos de los 5 aminoácidos consenso se encuentran conservados. D E: dominio enzimático, D R: dominio repetitivo, D A: dominio de anclaje. El dominio repetitivo se representa como discontinuo debido a que diferentes antígenos SAPA presentan distinto número de unidades repetitivas de 12 aminoácidos.

#### b-Análisis de hidrofobicidad de la secuencia

El análisis de hidrofobicidad reveló un típico N-terminal con una secuencia altamente hidrofóbica, característica de un péptido señal (figura 5). Este péptido señal podría ser necesario para la exportación de la proteína a la superficie celular y/o liberación al medio extracelular. El análisis de hidrofobicidad también puso en evidencia una región altamente hidrofílica, en el C-terminal, que es la representación del dominio repetitivo (figuras 4 y 5). Esta zona es continuada por una región no polar de 35 aminoácidos en el extremo C-terminal (figura 5). Esta región es característica de las

proteínas ancladas a la superficie celular por una unión de tipo glicofosfatidilinositol como se discutió en el punto anterior.



**Figura 5.** Análisis de hidrofobicidad de la secuencia de SAPA. El gráfico es colineal con la secuencia de ADN del gen SAPA y se generó utilizando el programa DNA strider de acuerdo a Kyte y Doolittle, 1982.

#### EL ANTIGENO SAPA Y LA NEURAMINIDASA DE *T. cruzi* PERTENECEN A LA MISMA FAMILIA DE GENES

Simultáneamente a la finalización de la secuencia completa de uno de los genes que codifican para los antígenos SAPA, el grupo de Pereira y colaboradores obtuvo la secuencia completa del gen de la neuraminidasa de *T. cruzi* o TCNA (Pereira y col., 1991). Ambos genes presentan una homología muy alta: un 93% de identidad en sus secuencias nucleotídicas y 84% de identidad en sus secuencias proteicas deducidas de la primera. Las dos proteínas contienen las unidades repetitivas de 12 aminoácidos en su C-terminal, con la misma secuencia consenso D-S-(S/T)-A-H-(S/G)-T-P-S-T-P-(A/V), pero diferente número de unidades (figura 4). La TCNA tiene 30 unidades repetitivas más que el SAPA, es decir 44 en lugar de 14. Comparten la última repetición incompleta y el sitio potencial para N-glicosilación allí presente, pero el SAPA posee 5 más de estos posibles sitios y la TCNA sólo dos en total. Ambas secuencias presentan el dominio hidrofóbico C-terminal, con características del tipo glicofosfatidilinositol y el mismo codón de terminación.

Analizando el N-terminal, en la región caracterizada como Dominio enzimático, SAPA y TCNA comparten los motivos de neuraminidasas S-X-D-X-G-X-T-W (Roggentin y col., 1989) en la misma posición y con idéntica relación de aminoácidos conservados (5/5-5/5-3/5-3/5) (figura 4). Sin embargo las secuencias difieren en cuanto a la posible metionina de iniciación de la proteína. La secuencia proteica deducida de la nucleotídica de SAPA posee una extensión de 77 aminoácidos, ausente en la secuencia de la TCNA. Esta extensión N-terminal que contendría una señal de secreción o péptido señal, rico en aminoácidos hidrofóbicos (figuras 5 y 6), podría estar presente en algunas proteínas y



ausente en otras. Este hecho se reflejaría en diferentes localizaciones de las proteínas en distintos compartimientos celulares o en su liberación o no, al medio extracelular.

La idea que los antígenos SAPA forman una familia de genes y proteínas fue sustentada por estudios previos en nuestro laboratorio que demuestran la existencia de varios genes con las unidades repetitivas SAPA y diferentes polipéptidos, con un peso molecular aparente entre 160 y 200 kDa, correspondientes a este antígeno (Frasch y col., 1987, Affranchino y col., 1989). Este hecho, sumado a la caracterización de otros genes con unidades repetitivas SAPA (como se detalla en los puntos subsiguientes) y la alta identidad entre los genes SAPA y TCNA permiten definir una familia de genes altamente relacionados, cuyos productos proteicos se caracterizan por estas repeticiones de 12 aminoácidos responsables de la fuerte respuesta inmunológica contra los antígenos SAPA. Debido a que las mismas fueron descritas originalmente caracterizando a esta familia antigénica como SAPA (Affranchino y col., 1989) y dada la actividad enzimática de neuraminidasa de estas proteínas, podemos denominar a esta familia: SAPA/TCNA.

Recientemente fueron obtenidas dos secuencias de ADN parciales (Uemura y col., 1992) con una secuencia proteica deducida de 100 aminoácidos cada una, con más de un 80% de identidad para esta región con las proteínas SAPA y TCNA. Ambas se pueden incluir en este grupo, a pesar de no contar con las secuencias completas, debido a esta alta identidad, su caracterización con mapeo con endonucleasas de restricción y por contener las unidades repetitivas de aminoácidos SAPA (Uemura y col., 1992).

## **ESTRUCTURA DE DIFERENTES GENES Y PROTEINAS DE LA FAMILIA SAPA/TCNA**

### **1- Los productos proteicos maduros de la familia SAPA/TCNA presentan un N-terminal idéntico y un sitio posible de clivaje para un péptido señal**

#### **a-Secuenciación de los N-terminales de las proteínas maduras de la familia SAPA/TCNA**

Las secuencias proteicas deducidas a partir de las secuencias de ADN para SAPA y TCNA difieren en cuanto a la metionina putativa de iniciación de la proteína. La secuencia de SAPA posee una extensión de 77 aminoácidos, ausente en la secuencia de la TCNA (figura 6). Con el objeto de comprobar ésta, o alguna otra diferencia, en el N-terminal las proteínas de la familia SAPA/TCNA se procedió a secuenciar directamente los N-terminales de los productos proteicos maduros. Para ese fin se purificaron las proteínas a partir de sobrenadantes de cultivo de células infectadas con tripomatigotes, utilizando una columna de afinidad con anticuerpos dirigidos contra el dominio repetitivo. Los productos purificados de diferentes tamaños se resolvieron en una corrida electroforética para aislar los diferentes componentes de la familia, luego de transferirlos a membranas PVDF para su secuenciación. Cada una de las bandas correspondientes a las proteínas de la familia SAPA fue extraída de la membrana PVDF y secuenciada desde el N-terminal. Una de



las 6 bandas no pudo secuenciarse (ver figura 7 A, banda nº 2). Las otras 5 bandas presentaron una secuencia idéntica para los 12 aminoácidos secuenciados, no pudiéndose determinar la séptima posición en ningún caso (ver figura 6). Todos los aminoácidos se corresponden perfectamente con la secuencia proteica deducida de la secuencia del gen SAPA, donde la posición séptima corresponde a un residuo de Arg (figura 6). La secuencia N-terminal de las proteínas maduras de la familia SAPA/TCNA se alinea con la región comprendida entre la metionina que podría ser la iniciación del SAPA y la propuesta para la TCNA, es decir involucra 45 de los 77 aminoácidos de extensión del SAPA que no existen en la secuencia proteica deducida de la TCNA (figura 6). Si tomamos entonces la primer metionina de la secuencia proteica deducida del gen SAPA como inicio de la proteína, los primeros 32 aminoácidos no aparecen en las proteínas maduras (figura 6). Esta región ausente es coincidente con la zona hidrofóbica N-terminal revelada por el análisis de hidrofobicidad de la secuencia del gen SAPA (figura 5). Luego las proteínas maduras comienzan en el aminoácido leucina, como se indica en la figura 6. Este hecho favorece la idea de la existencia de un péptido señal que luego es procesado, al menos en la mayoría de los miembros de esta familia proteica. Más aún, utilizando el método propuesto por von Heijne (von Heijne, 1986) para predecir secuencias señales de sitios de clivaje podemos tomar la secuencia EPAXALA como una probable señal para el clivaje por una proteasa, involucrada en la maduración post-traducciona (Figura 6).

Como dato adicional se secuenció el extremo 5' terminal del ADN copia sintetizado utilizando la enzima transcriptasa reversa y un oligonucleótido interno, complementario a la secuencia de ADN del gen SAPA (oligonucleótido interno 391, ver Materiales y Métodos) a partir de ARN purificado del estadio tripomastigote y luego amplificado por el método de PCR utilizando este oligo interno y el oligo del miniexón de *T. cruzi*. El producto de PCR fue clonado en el vector pUC19 para su secuenciación. A partir de las secuencias de tres clones diferentes se determinó el sitio de "trans-splicing" (figura 3), también relacionado en distancia con las posibles metioninas de iniciación de la traducción descriptas para el gen SAPA. Este resultado es totalmente acorde con el inicio de la proteína madura luego de un clivaje.

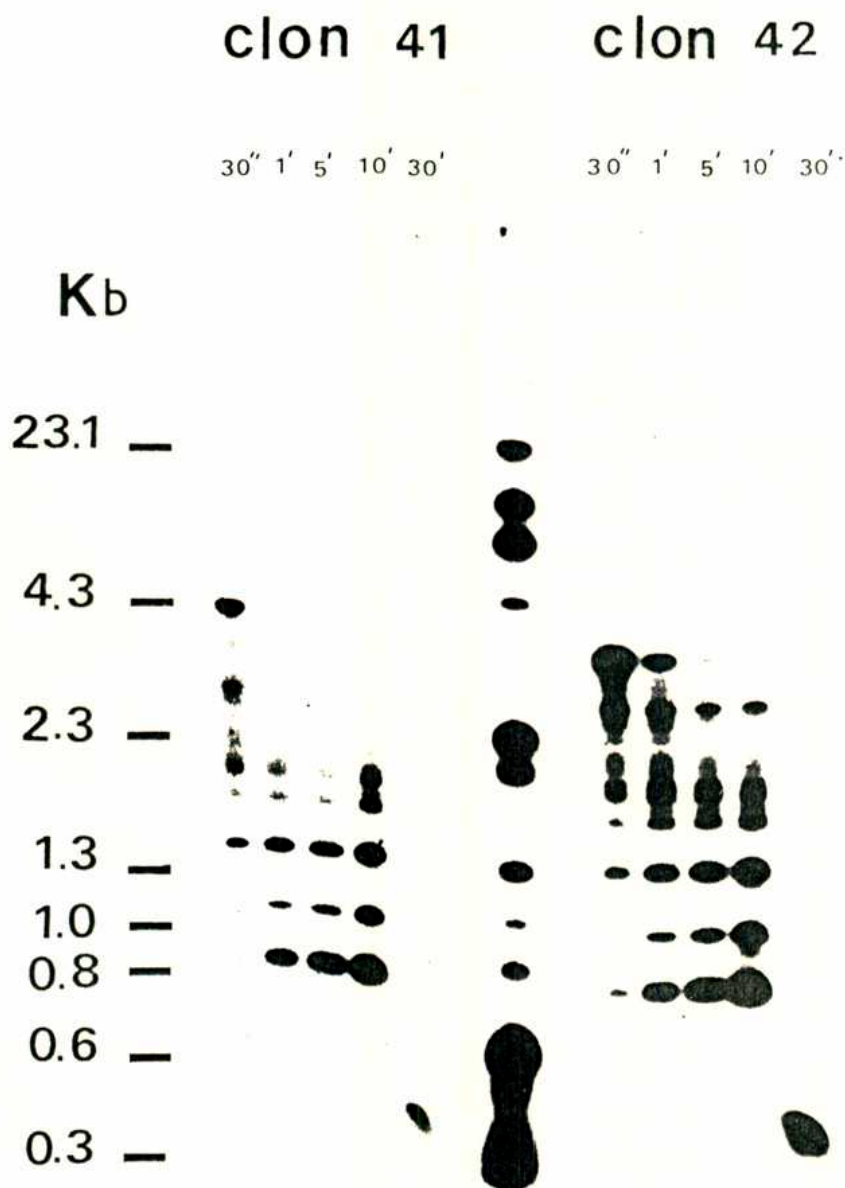
#### b-Análisis de las regiones 5' de diferentes genes de la familia SAPA/TCNA en distintas cepas de *T. cruzi*

Con el objeto de analizar las regiones N-terminales en otra cepa de *T. cruzi* se secuenciaron los 5' terminales de genes obtenidos por amplificación utilizando la técnica de PCR a partir de ADN de una genoteca del clon Miranda/76 del parásito (ver Materiales y Métodos). La comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de estos clones con la del SAPA presentó entre un 88 y un 96% de identidad en la región que se incluye en la figura 6. Sin embargo fueron idénticos en la zona donde comienza el N-terminal de la proteína madura (en los 12 aminoácidos secuenciados) y en la secuencia EPAXALA, sugiriendo un sitio para un proceso proteolítico altamente conservado (figura 6).

La razón por la cual SAPA y el resto de los clones analizados presentan una extensión N-terminal que parece estar ausente en la secuencia de la TCNA es la presencia de una timidina en el gen SAPA que está ausente en el gen de la TCNA y por lo tanto se generan diferentes marcos de lectura. Si se inserta la timidina en la secuencia de ADN de la TCNA, se restaura en la proteína deducida la secuencia N-terminal coincidente con las proteínas maduras secuenciadas. Los tres clones de ADN secuenciados que se muestran en la figura 6 poseen la timidina al igual que el gen SAPA y los clones de ADN sintetizados a partir de ARN que se mencionan en el punto anterior. Además esta timidina compone un codón (CTG) para leucina que es uno de los aminoácidos presente en la secuencia de las proteínas maduras (ver figura 6) y genera un sitio específico de reconocimiento de la endonucleasa de restricción AluI, AGCT subrayado en la figura 6, en el gen SAPA y ausente en la secuencia de la TCNA. Teniendo en cuenta este último dato y con el fin de extender estos resultados a otras cepas de *T. cruzi* se realizó el siguiente experimento. A partir de ADN de las cepas: Y, Tulahuen y RA y de los clones del parásito Dm28c y CA-I/72, se amplificó mediante la técnica de PCR, un fragmento de ADN de 391 pb, utilizando el oligonucleótido interno 391 (5' ACTGTGGGATCCACCACACG 3') y un oligonucleótido que comienza en el codón ATG propuesto para la metionina del gen SAPA (5' ATGGGGAGGACAGTCGTCGGGGCC 3'), cuya secuencia también está conservada en el clon de la TCNA (ver Materiales y Métodos). En todos los casos el producto amplificado fue de 391 pb como se esperaba por la distancia entre los oligonucleótidos. En esa región según la secuencia del gen SAPA el sitio para la endonucleasa de restricción AluI, descrito anteriormente, es único y corta el fragmento de 391 pb en dos de 270 y 121 pb. El hecho de amplificar directamente sobre el ADN genómico utilizando dos oligonucleótidos conservados posibilita la amplificación de todos los genes de la familia SAPA/TCNA donde deberían estar representadas ambas secuencias SAPA y TCNA o, lo que es lo mismo, el fragmento sensible (270 +121 pb) y el fragmento resistente a la endonucleasa (391 pb), respectivamente. Como luego de la digestión, no se observó un fragmento resistente de 391 pb (figura 7 B) podemos afirmar que la mayoría o todos los genes de la familia SAPA/TCNA presentes en las cepas analizadas contienen el residuo de timidina y por lo tanto un péptido señal al obtenerse el marco de lectura correspondientes a las metioninas del SAPA.

## **2- Diferentes genes de la familia SAPA/TCNA presentan un número variable de unidades repetitivas**

Trabajos previos en el laboratorio demostraron la presencia de genes y proteínas SAPA de distintos tamaños (Frasch y col., 1987; Ibañez y col., 1987; Affranchino y col., 1989). Resultados obtenidos posteriormente, también indicaban la posibilidad que esta diferencia de tamaño entre los genes residiera concretamente en el número de unidades repetitivas que cada uno contenía (Macina y col., 1989). Se propuso entonces caracterizar el número de unidades repetitivas presentes en los clones



**Figura 8.** Los clones 41 y 42 contienen diferente número de unidades repetitivas. Se realizaron digestiones parciales de los insertos de los clones 41 y 42 marcados en un extremo terminal de la molécula, por diferentes períodos, con la endonucleasa de restricción RsaI. Se utilizaron como marcadores de peso molecular: ADN del fago  $\phi$ X 174 digerido por HaeIII y del fago  $\lambda$  digerido por HindIII.

41 y 42. Con ese fin se marcó radiactivamente el extremo 5' del inserto de cada clon y se realizaron digestiones parciales con la endonucleasa de restricción RsaI a diferentes tiempos. Se eligió esta endonucleasa debido a que corta una vez dentro de cada una de las repeticiones de 36 pb, pudiendo estimar así el número de repeticiones ya que por cada corte se perdería teóricamente una repetición. En la autorradiografía de la electroforesis de las digestiones, se pudo ver claramente la zona correspondiente a las repeticiones ya que la diferencia de tamaño en cada fragmento marcado en un extremo correspondía a una de ellas, observándose una superposición de bandas continuas características, perfectamente distinguible de los sitios para RsaI que estaban fuera de las repeticiones. En ambos clones estos sitios mostraron un patrón de restricción conservado y en la digestión total por la endonucleasa se llega al mismo fragmento único (figura 8).

Comparando los resultados obtenidos para los clones 41 y 42 (ver figura 8 y esquema figura 2) se observó que la diferencia antes encontrada en el tamaño entre estos clones tiene como causa el número diferente de bloques de unidades repetitivas que cada uno contiene. Entonces, tres de los genes del antígeno SAPA difieren en el número de unidades repetidas, teniendo 14 copias de las mismas el clon SAPA secuenciado y aproximadamente 33 y 46 unidades de 36 pb los clones 42 y 41, respectivamente (ver figura 2).

Si sumamos el dato de la secuencia de la TCNA con 44 unidades repetitivas, obtenida posteriormente a estos resultados, podemos postular entonces que distintos genes pertenecientes a la familia SAPA/TCNA, poseen un número diferente de unidades repetitivas.

Al demostrar que las proteínas maduras comienzan en el mismo sitio, podemos descartar la hipótesis que la causa de los diferentes tamaños de los polipéptidos es consecuencia de inicios diferentes de la traducción de los mismos. Otra hipótesis posible es que se produzcan diferentes subproductos por el procesamiento de un ARN mensajero que se transcriba a partir de un único gen activo. Este hipótesis queda descartada en el próximo punto de resultados. Estudios realizados en el laboratorio demostraron que la diferencia en los pesos moleculares no se debe a un patrón distinto de N-glicosilación de las proteínas. Entonces podemos afirmar que la causa más importante de los diferentes pesos moleculares observados en las proteínas de la familia SAPA/TCNA, es el diferente número de unidades repetitivas que los diferentes polipéptidos contienen.

### **3- Al menos un gen de la familia SAPA/TCNA presenta un codón de terminación alternativo**

Con el objeto de comparar los extremos 3' de los clones 41 y 42 se procedió a secuenciar los mismos a partir del sitio de clonado PstI, correspondiente a la región 3' terminal del gen hasta el comienzo del dominio repetitivo. De esta manera se confirmó el sitio RsaI fuera de las repeticiones y luego a 281 pb del sitio PstI de clonado, el comienzo de las mismas. Comparando las secuencias de los genes SAPA, TCNA y el clon 42, se observó en la región 3' de los tres la presencia de 4 bases



ausentes en el clon 41. Esta ausencia de 4 bases (TTCT) en este gen determina un cambio del marco de lectura que evita el codón de terminación TGA respecto de SAPA, TCNA y el clon 42 y produce un polipéptido hidrofóbico con 10 aminoácidos adicionales (figura 9). El resto de la secuencia codificante hacia el 5', continua igual para las secuencias parciales de los clones 41 y 42 y se describen 6 bases cambiadas con respecto al gen SAPA (indicadas en la figura 9), de las cuales solo dos provocan un cambio de un aminoácido (Met por Thr y Ser por Phe). El agregado de estos 10 aminoácidos produce un cambio despreciable en el peso molecular de las proteínas como para ser la causa de los diferentes pesos moleculares aparentes de los productos de la familia SAPA/TCNA (160 a 200 kDa). Este hecho también confirma la conclusión del punto anterior, donde la causa de los diferentes pesos moleculares es el número variable de unidades repetitivas que cada polipéptido contiene.

```

    Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro Ser Thr  Pro Ala Asp Ser Ser
5'  GAC AGC AGT GCC CAC AGT ACG CCC TCG ACT CCC GCT GAC AGC AGT
                                     A

```

```

    Ala Asn Gly Thr Val Leu Ile Leu Pro Asp Gly Ala Ala Leu Ser
    GCC AAT GGT ACG GTT TTG ATT TTG CCC GAT GGC GCT GCA CTT TCG
                                                C

```

```

    Thr Phe Ser Gly Gly Gly Leu Leu Leu Cys Ala Cys Ala Leu Leu
    ACC TTT TCG GGC GGA GGG CTT CTT CTG TGT GCG TGT GCT TTG CTG

```

```

    Leu His Val Phe Phe Met Ala Val Ser      Asp Val Val Arg Glu
    CTG CAC GTG TTT TTT ATG GCA GTG TCT ----GAT GTA GTG AGA GAG
                C          T  T TTCTGA
                Thr          Phe Phe *

```

```

    Ser Pro Asp Lys Cys Arg  *
    TCT CCT AAC AAA TGT AGA TAA  3'
                G

```

**Figura 9.** El clon 41 presenta un codón de terminación alternativo. Se muestra en la parte superior la secuencia nucleotídica y la traducción en aminoácidos de la región 3' del clon 41. Debajo se indican los cambios de nucleótidos y de aminoácidos que exhibe la secuencia del gen SAPA respecto de la del 41. El asterisco marca los codones de terminación en ambas secuencias. Los guiones indicados en la secuencia del clon 41 señalan las 4 bases ausentes respecto de la correspondiente al gen SAPA.

#### **4- Los miembros de la familia SAPA/TCNA se encuentran unidos a la membrana celular por un anclaje del tipo glicofosfatidilinositol**

Estudios realizados en el laboratorio demostraron que los productos proteicos de la familia SAPA/TCNA son liberados al medio extracelular por la forma tripomastigote de *T. cruzi* (Affranchino y col., 1989). Por otra parte las secuencias C-terminal deducidas a partir de las secuencias de ADN para los miembros de la familia SAPA/TCNA, presentan una región hidrofóbica con un sitio probable de adición para un anclaje del tipo glicofosfatidilinositol, 9 a 12 aminoácidos cadena arriba de este segmento (Cross, 1990a). Para confirmar estas observaciones se realizó el siguiente experimento, en colaboración con el Dr. Daniel Sánchez: la forma tripomastigote del parásito fue crecida en cultivo de células Vero. Los parásitos fueron lavados y tratados, o no, por períodos de 0, 2 y 4 horas con fosfolipasa C fosfatidil inositol-específica de *Bacillus thuringiensis*. El producto fue analizado en gel de poliacrilamida 7,5%, transferido a un filtro de nitrocelulosa y detectado inmunológicamente utilizando anticuerpos preparados en conejo contra el dominio repetitivo de la proteína SAPA recombinante y luego reaccionado con proteína A marcada con <sup>125</sup>I (figura 10). Este estudio cinético demostró que el antígeno SAPA es liberado por la fosfolipasa C de la superficie del parásito (ver tratados versus no tratados en figura 10). El dato de liberación basal, es debido a una actividad endógena de fosfolipasa C fosfatidil inositol-específica de los tripanosomas (Schenkman, Yoshida y Cardoso de Almeida, 1988).

### **ANALISIS DE LA EXPRESION DE LOS GENES DE LA FAMILIA SAPA/TCNA**

#### **1-Los genes de la familia SAPA/TCNA no se duplican ni transponen a telómeros**

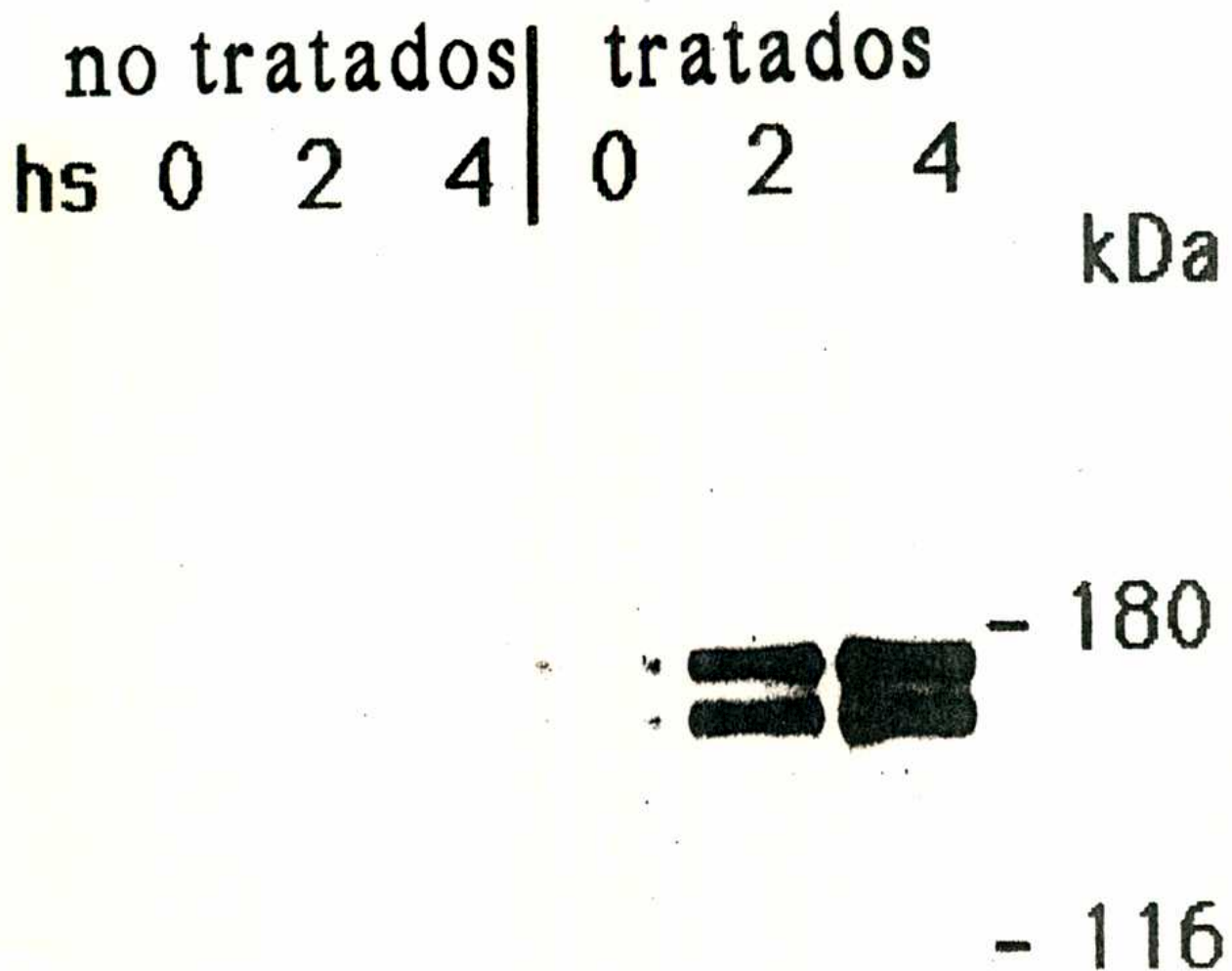
En un primer intento de estudiar el mecanismo de la expresión específica, en el estadio tripomastigote, del antígeno SAPA se analizó si ésta ocurre como consecuencia de reordenamientos genómicos similares a los utilizados por *T. brucei*. Este parásito evade la respuesta inmune del hospedador mamífero utilizando el sistema denominado mecanismo de variación antigénica (VSG). Es decir, de los cientos de genes que codifican para glicoproteínas de la cubierta de superficie que posee, expresa únicamente uno por vez. De esta forma cuando el hospedador comienza una respuesta inmunológica contra un determinado antígeno de cubierta, el parásito expresa un nuevo gen variando así el antígeno presentado (Pays y Steinert, 1988). Para que se exprese uno de los genes VSG el mismo debe localizarse en el telómero del cromosoma por medio de un rearrreglo genómico (Cross, 1990b). Si bien evidencias serológicas descartaron la posibilidad de variación antigénica en *T. cruzi* (Snary, 1980), uno de los genes con motivos de neuraminidasas perteneciente a la familia de proteínas del parásito GP85, fue reportado por tener una ubicación telomérica para su expresión (Peterson, Fouts y Manning, 1989). Una de las evidencias de la localización telomérica de los genes VSG es su sensibilidad preferencial a la digestión por la



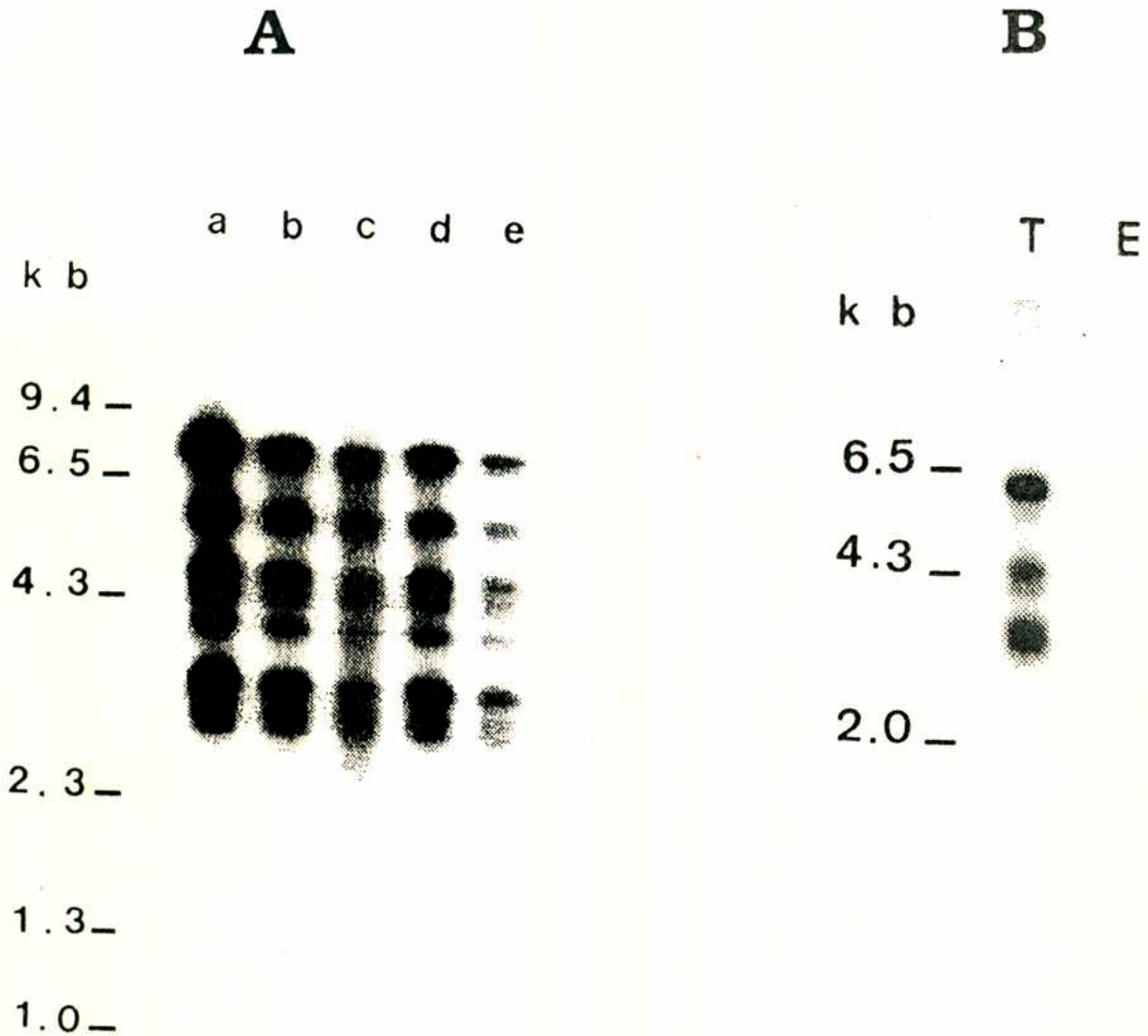
exonucleasa Bal 31. Se analizó entonces, si los genes de la familia SAPA/TCNA que se expresan se hallan localizados en los telómeros de cromosomas como ocurre en el proceso de variación antigénica. De esta forma se estudió la sensibilidad de los genes SAPA/TCNA a la nucleasa Bal 31. Luego de la acción de la misma por períodos de: 0, 1, 5, 20 y 30 minutos, las muestras de ADN genómico de *T. cruzi* así tratadas se digirieron con la endonucleasa de restricción PstI, cuyo patrón, luego de transferir e hibridizar el gel, permite identificar distintas bandas correspondientes a diferentes genes. Como se observa en la figura 11 A, se comprobó entonces que ninguna de las bandas correspondientes a los genes de la familia SAPA/TCNA disminuía su tamaño con respecto al tiempo 0 por acción de la nucleasa. Todas las bandas se mostraron insensibles a la digestión por Bal 31 bajo condiciones que aseguraban la digestión de por lo menos 7 a 10 kb de ADN telomérico (ver Materiales y Métodos). Este resultado indica que los genes de la familia SAPA/TCNA no están localizados en una posición cercana al telómero del cromosoma y no necesitan de este tipo de rearrreglos genómicos, como en *T. brucei*, para su expresión.

## **2- Análisis de la transcripción de los genes de la familia SAPA/TCNA**

Con el objeto de comprobar si genes diferentes de la familia SAPA/TCNA se expresan se realizó el siguiente experimento: con el fin de obtener un patrón de expresión de los genes de la familia SAPA/TCNA durante las diferentes etapas del ciclo de vida de *T. cruzi* se realizó un "Northern blot" de ARN total de tripomastigotes y epimastigote, que fueron hibridizados con la sonda del dominio repetitivo del gen SAPA. Como se observa en la figura 11 B no es detectable la expresión en epimastigotes, mientras varios transcritos de tamaños aproximados de 6.3, 4.3 y 2.8 kb, se observan en la forma infectiva del parásito. Estos transcritos podrían originarse como consecuencia de la expresión de los diferentes genes de la familia o representar la transcripción de un único miembro que luego es procesado en diferentes subproductos. Por este motivo se realizó un experimento donde ARN total de tripomastigotes fue protegido de la acción de la nucleasa S1, al hibridarlo con una sonda del dominio repetitivo. Este resultado de protección con la nucleasa S1 demostró que diferentes genes que contienen un número variable de unidades repetitivas se transcriben (Affranchino, Pollevick y Frasch, 1991). A partir de estos datos, sumados al estudio previo que demuestra la diferencia en el número de unidades repetitivas entre los diferentes genes de la familia SAPA/TCNA, se puede concluir que en la forma infectiva del parásito más de un gen de esta familia se expresa por vez en contraste con los genes VSG de los tripanosomas africanos. Además se confirma que la causa de los diferentes tamaños de los polipéptidos que las formas tripomastigote liberan al medio extracelular es el número de unidades repetitivas variable que cada uno de los genes que los codifica contiene.



**Figura 10.** Liberación de los antígenos SAPA de la superficie de tripomastigotes. Los parásitos se incubaron con fosfolipasa C fosfatidil inositol-específica a diferentes periodos y el producto fue analizado en geles de poliacrilamida 7,5%, transferido a filtros de nitrocelulosa y detectado inmunológicamente con anticuerpos que reconocen específicamente el dominio repetitivo y proteína A <sup>125</sup>I.



**Figura 11.**

**A** Sensibilidad de los genes SAPA a la nucleasa Bal 31

ADN genómico de tripomastigotes del clon CA-1/72 fue tratado con Bal 31 durante: a: 0, b: 1, c: 5, d: 20, e: 30 minutos. Luego se digirieron las muestras con PstI, se transfirieron a filtros de nitrocelulosa que se hibridaron con el dominio repetitivo SAPA.

**B** Análisis de la transcripción de los genes SAPA por la técnica de "northern blot"

ARN total de tripomastigotes (T) y epimastigotes (E) de la cepa CA-1/72, fue fraccionado en geles de agarosa 1%, transferido a filtros de nitrocelulosa los cuales fueron hibridizados con el dominio repetitivo SAPA.

En A y B, se utilizaron como marcadores de peso molecular: ADN del fago  $\phi$ X 174 digerido por HaeIII y del fago  $\lambda$  digerido por HindIII.

## ANALISIS DE LA FUNCION DE LA FAMILIA SAPA/TCNA. DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD DE TRANS-SIALIDASA

### 1- El antígeno SAPA es la neuraminidasa de *T. cruzi*

Debido al alto porcentaje de identidad entre el antígeno SAPA y la TCNA, se analizó la posible actividad de neuraminidasa en inmunoprecipitados de SAPA. Un suero preparado en conejo contra la proteína recombinante compuesta prácticamente en su totalidad por el dominio repetitivo (Affranchino y col., 1989), que reconoce específicamente péptidos sintéticos de las unidades repetitivas (Vergara y col., 1991) inmunoprecipitó, con proteína A-sepharosa, entre el 54 y el 66% de la actividad neuraminidasa (medida en presencia de anticuerpos) de extractos totales de tripomastigotes (figura 12 A). Este dato indica que la unión de los anticuerpos a la región repetitiva no afecta la actividad enzimática del dominio N-terminal. Más aún, un anticuerpo monoclonal dirigido a las unidades repetitivas del SAPA inmunoprecipitó el 87% de la actividad total de tripomastigotes. Controles realizados con suero preinmune demuestran que la inmunoprecipitación fue específica (figura 12 A). Como control adicional, se utilizaron 5 sueros contra otras proteínas recombinantes de *T. cruzi* no relacionadas (Ibañez y col., 1988) que, siguiendo el mismo esquema de inmunoprecipitaciones, fallaron en precipitar actividad de neuraminidasa. Por otra parte, las proteínas de los inmunocomplejos activos fueron corridas en geles de acrilamida 7,5%, transferidos a nitrocelulosa y detectados inmunológicamente con un suero de un ratón infectado con *T. cruzi* cuyos anticuerpos detectan principalmente a SAPA. Se observaron solo las bandas esperadas del peso molecular de los polipéptidos SAPA (Figura 12 B).

### 2- El antígeno SAPA es la trans-sialidasa de *T. cruzi*

Estudios independientes identificaron ácido siálico en epimastigotes de *T. cruzi*, a pesar de la imposibilidad metabólica del parásito de sintetizarlo, sugiriéndose su incorporación a partir de ácido siálico externo mediante una actividad de trans-sialidasa (Previato y col., 1985; Zingales y col., 1987).

En estudios realizados en colaboración con el Dr. Armando Parodi, se analizó la actividad de trans-sialidasa en los antígenos SAPA, usando como fuente de enzima los inmunoprecipitados con anticuerpos poli y monoclonales directos contra las unidades repetitivas como se indicó en el punto anterior. Se utilizó como aceptor de ácido siálico [galactosa-<sup>14</sup>C]-N-acetil-lactosamina que fue incubado con SAPA más diferentes dadores de residuos de ácido siálico. Si al aceptor le son transferidos residuos de ácido siálico el mismo es retenido por una resina de intercambio aniónico, siendo luego eluido con sales y cuantificado. Sin ácido siálico la [galactosa-<sup>14</sup>C]-N-acetil-lactosamina no es retenida en la columna. Como se muestra en la tabla 1, SAPA puede utilizar sialil-lactosa, fetuina y MU-NANA (4 metilumberiferil-ácido siálico) como sustratos dadores. En cambio el ácido

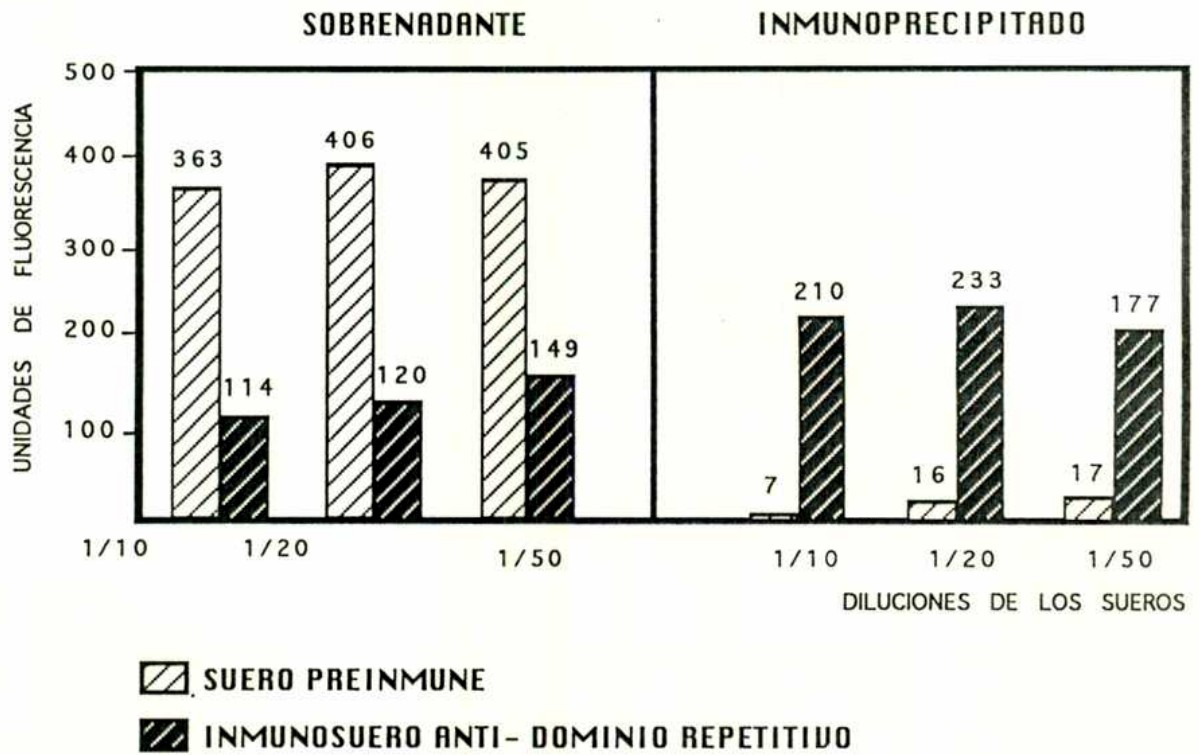
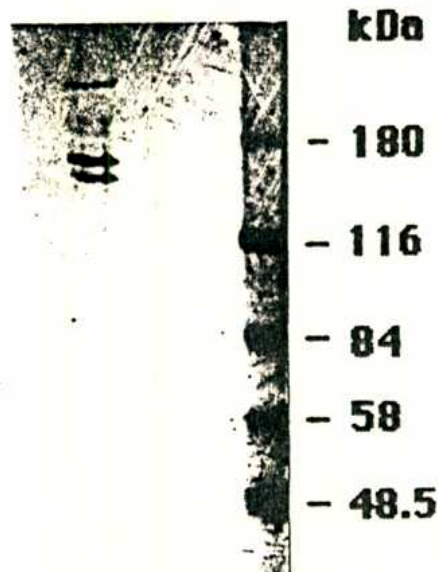
colomínico (polímero con ácido siálico unido con enlaces  $\alpha$  2-8) no fue un dador efectivo. Si el producto de reacción es tratado con la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, altamente purificada, el mismo ya no es retenido en la resina de intercambio aniónico. En el caso de utilizar en la mezcla de incubación lactosa o ácido siálico libre, como posibles dadores en lugar de sialil-lactosa, no se forma ningún producto de reacción (ver tabla 1). De manera análoga a la actividad de neuraminidasa, más del 80% de toda la actividad de trans-sialidasa de *T. cruzi* (tomando como 100% extractos totales de parásitos como fuente de enzima) es inmunoprecipitada específicamente por anticuerpos dirigidos contra el dominio repetitivo del antígeno SAPA. Experimentos realizados por el Dr. Parodi demostraron también que en presencia de una molécula aceptora (lactosa) los residuos de ácido siálico son transferidos al disacárido, mientras que en ausencia de aceptores los residuos son transferidos al agua y si se utilizan aceptores relativamente ineficientes (por ejemplo maltosa) los residuos son transferidos al disacárido y al agua.

Podemos concluir entonces, que el antígeno SAPA de *T. cruzi* es la neuraminidasa y trans-sialidasa del parásito.

Ensayo	Sustrato dador	Fuente enzimática	Tratamiento	c. p. m.
I	Sialil-lactosa	—	—	180
	Sialil-lactosa	SAPA	—	20541
	Sialil-lactosa	extracto	—	24874
	Sialil-lactosa	sobrenadante	—	3072
	Fetuina	SAPA	—	24530
	Fetuina	extracto	—	25235
II	Sialil-lactosa	SAPA	—	21928
	Lactosa	SAPA	—	155
	Acido siálico	SAPA	—	252
	Acido colomínico	SAPA	—	197
III	Sialil-lactosa	SAPA	—	24172
	Sialil-lactosa	SAPA	sialidasa	145
IV	Sialil-lactosa	SAPA	—	9818
	MU-NANA	SAPA	—	9745

**Tabla 1.** Actividad de trans-sialidasa de los antígenos SAPA

El término extracto se refiere a un lisado de tripomastigotes con Tritón X-100. SAPA es el inmunocomplejo formado por los antígenos SAPA precipitados con los anticuerpos que reconocen el dominio repetitivo con proteína A-sepharosa y como sobrenadante se indica la fracción no inmunoprecipitada.

**A****B**

**Figura 12.** Detección de actividad neuraminidasa en sobrenadantes e inmunoprecipitados de anticuerpos que reaccionan con el dominio repetitivo del antígeno SAPA

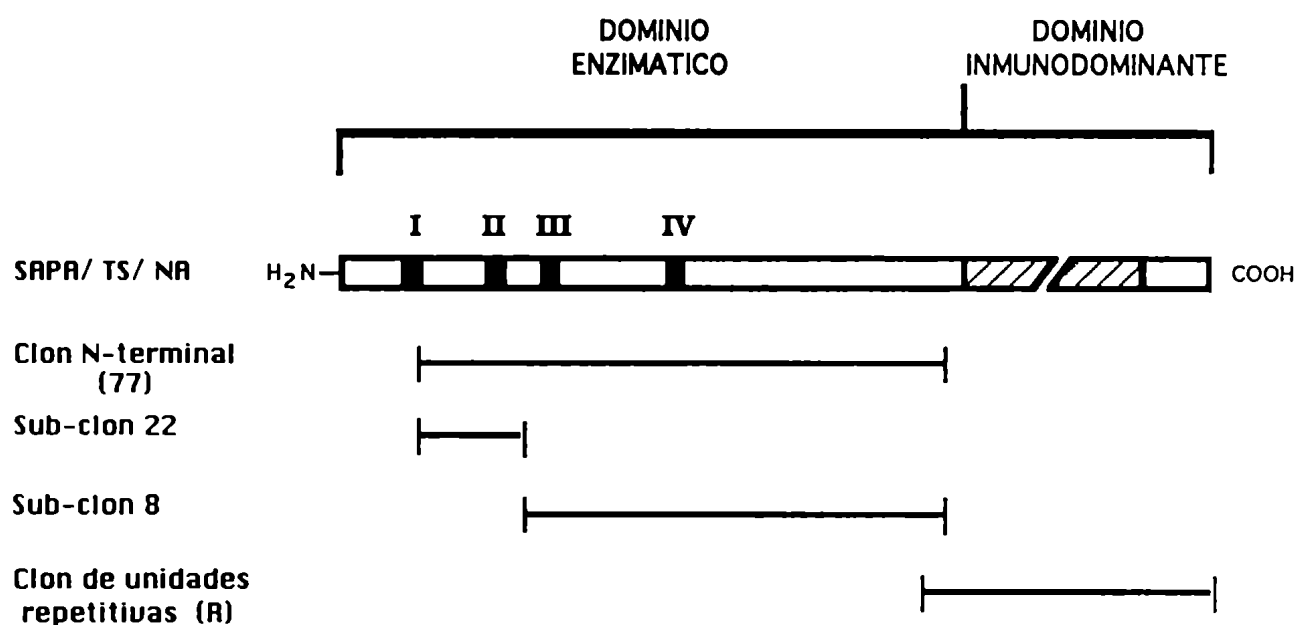
**A** Medición de la actividad de neuraminidasa en sobrenadantes e inmunoprecipitados de extracto total de tripomastigotes, utilizando un suero específico contra las unidades repetitivas SAPA y un suero preinmune como control.

**B** "Western blot" del material inmunoprecipitado procesado con un suero de ratón que reconoce específicamente a los antígenos SAPA.



**3-La estructura funcional de las proteínas de la familia SAPA/Trans-sialidasa presenta dos dominios principales: uno enzimático y otro inmunodominante**

La región esencial para la actividad enzimática de la proteína aún es desconocida, de hecho la secuencia de SAPA/TCNA de *T. cruzi* es la primer secuencia obtenida de una neuraminidasa de eucariotas. Por lo descripto en el punto de análisis de la secuencia primaria del gen SAPA podemos inferir que en el llamado dominio enzimático, que presenta los motivos característicos de neuraminidasas, reside el dominio catalítico de la enzima. También apoya esta asunción, el hecho que anticuerpos policlonales y monoclonales contra la región que involucra únicamente las unidades repetitivas no anulan ni disminuyen la actividad enzimática, con lo cual este dominio repetitivo no parece estar involucrado en las funciones de neuraminidasa y trans-sialidasa. Trabajos previos en nuestro laboratorio indicaron que este dominio repetitivo C-terminal de la proteína SAPA es antigénico en humanos y en animales durante infecciones naturales y experimentales (Affranchino y col., 1989, Frasch y Reyes, 1990). Más aún, péptidos sintéticos de las repeticiones diseñados a partir de la secuencia del gen SAPA, fueron capaces de detectar anticuerpos en sueros provenientes de infecciones, pudiendo concluir entonces que estas unidades repetitivas componen un importante epítotope para las células B (Vergara y col., 1991). A pesar de ello no podemos excluir la posibilidad de la presencia de epítotope B en la región N-terminal de la molécula.



**Figura 13.** Esquema de los dominios enzimático e inmunodominante de los antígenos SAPA

Se indican con líneas debajo del esquema la extensión de los diferentes insertos de ADN. Cada uno de ellos fue clonado independientemente en el vector pGEX con el objeto de expresar las respectivas proteínas recombinantes. Los números romanos indican los motivos de neuraminidasas. Las unidades repetitivas (///) se representan discontinuas.

Para analizar esta posibilidad se realizó el siguiente experimento: utilizando el vector de expresión de *E. coli* pGEX (Smith, D.B. y Johnson, 1988) que permite la expresión de una proteína de fusión entre lo expresado por el inserto clonado y el extremo carboxilo de una glutatión transferasa (Sj 26), se clonaron los fragmentos de ADN correspondientes a los diferentes dominios de la proteína deducidos a partir de la secuencia de ADN. Se diseñaron y construyeron cuatro clones recombinantes expresando independientemente cada uno: el dominio repetitivo (dominio inmunodominante), la región N-terminal (dominio enzimático) y dos sub-clones derivados de este último (ver esquema figura 13). A partir de los productos proteicos recombinantes de cada uno de los clones se realizaron "Western blots". Los mismos fueron incubados con 5 sueros de infecciones humanas crónicas y 7 sueros de infecciones humanas agudas, además de 7 sueros de infecciones experimentales de ratón y 3 de conejo (tabla 2). En la mayoría de los casos los antisueros reaccionaron con la proteína de fusión que expresa las unidades repetitivas de SAPA y solo un suero de ratón, de los 22 sueros totales analizados, reaccionó con las proteínas recombinantes correspondientes al dominio enzimático como se observa en la figura 14 y se analiza en la tabla 2.

Origen de los sueros	Nº de sueros	Nº de sueros positivos con cada proteína recombinante					
		pGEX	# 1	R	#77	# 8	#22
Humano (Fase aguda)	7	0	0	7	0	0	0
Humano (Fase crónica)	5	0	5	2	0	0	0
Ratón infectado	7	0	0	7	1	1	0
Conejo infectado	3	0	0	3	0	0	0

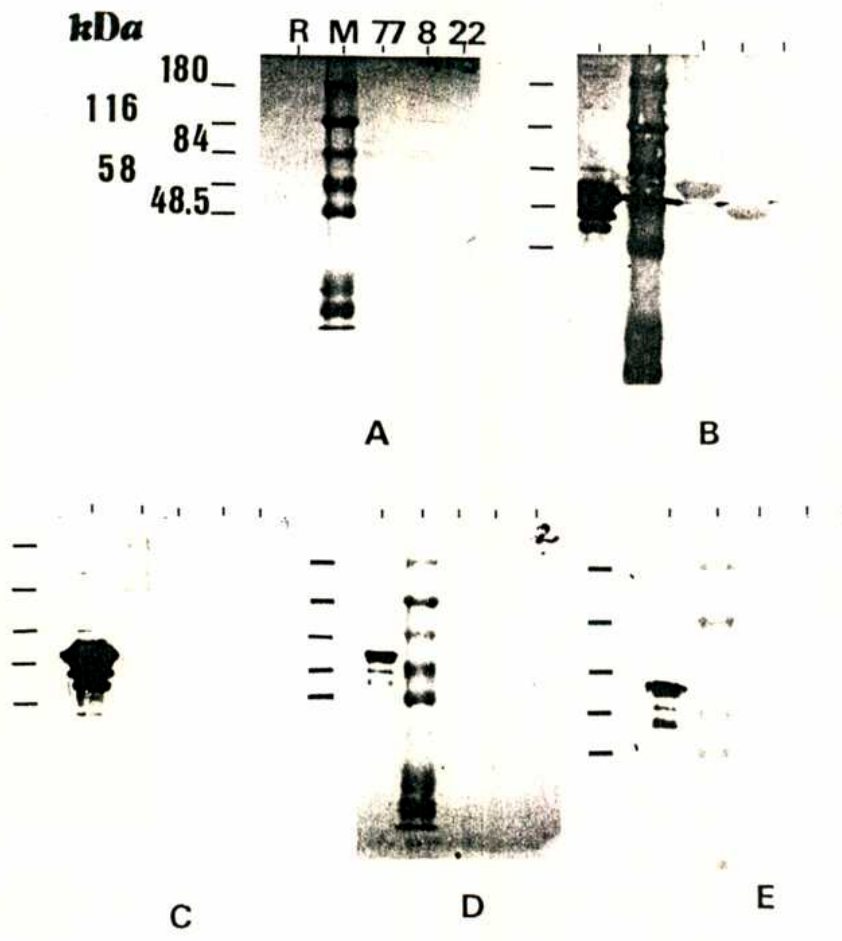
**Tabla 2.** Detección de los dominios enzimático e inmunodominante de los antígenos SAPA

La tabla indica que número de sueros reacciona con cada proteína recombinante por la técnica de "western blot" como se muestra en la figura 14. pGEX: expresa solamente la glutatión transferasa del vector. #1: proteína recombinante en el vector pGEX de un antígeno de *T. cruzi* no relacionado con la familia SAPA/Trans-sialidasa. R, #77, #8, #22, se encuentran representados en la figura 13.

Estos resultados sugieren que:

- si están presentes, los anticuerpos contra el dominio enzimático pueden ser detectados bajo las condiciones experimentales utilizadas.
- la mayoría de los sueros de infecciones humanas o de animales, no presentan niveles detectables de anticuerpos contra los epitopes lineales del dominio enzimático, a la vez que poseen un alto título





**Figura 14.** Detección de los dominios enzimático e inmunodominante de los antígenos SAPA

Las proteínas recombinantes: R, 77, 8 y 22 (ver figura 13) fueron fraccionadas en geles de poliacrilamida 10% y transferidos a filtros de nitrocelulosa, los cuales se hicieron reaccionar con diferentes sueros (tabla 2). En esta figura se muestran solo algunos casos representativos: A) suero preinmune B y C) suero de ratón infectado D) Suero humano agudo E) suero de conejo infectado. Los marcadores de peso molecular son los descritos en materiales y métodos.

que reacciona con el dominio repetitivo. Se prueba de esta forma que la región repetitiva no solamente es antigénica sino que además es inmunodominante en "cis" en la molécula, siendo por ende el dominio antigénico principal de la proteína.

- no se puede descartar la presencia de epitopes conformacionales o debidos a regiones que contengan hidratos de carbono, en el dominio enzimático.

- el hecho que se generen anticuerpos contra epitopes secuenciales de las repeticiones es de esperar ya que esta región presenta una baja tendencia para formar estructuras secundarias debido a la presencia de dos residuos de prolina por cada 12 aminoácidos correspondientes a una unidad repetitiva. Es entonces muy probable que los epitopes de esta región correspondan a aminoácidos contiguos.

- se postula una estructura bifuncional con un dominio enzimático y un dominio inmunodominante para las proteínas de la familia SAPA/TCNA. Este dominio inmunodominante o repetitivo actuaría en cis en la molécula siendo el blanco de la respuesta inmune del hospedador, sin que la unión de los anticuerpos al mismo afecte la actividad de la enzima (figura 13).

**DISCUSSION**

## SECUENCIA NUCLEOTIDICA COMPLETA DE UN ANTIGENO MARCADOR DE LA ETAPA AGUDA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

En los últimos años, han sido identificadas diferentes proteínas antigénicas en infecciones naturales y experimentales con *T. cruzi* y sus genes han sido clonados y secuenciados ya sea total o parcialmente (Frasch y col., 1991). Uno de los antígenos relevantes que ha sido descrito es el denominado SAPA, ya que es un antígeno fuertemente reconocido por sueros de pacientes en la etapa aguda de la enfermedad de Chagas y de recién nacidos infectados congénitamente con *T. cruzi* (Affranchino y col., 1989; Reyes y col., 1990). Por otra parte, varias cepas de ratones infectadas con diferentes cepas de parásitos también presentan una respuesta inmune temprana y persistente contra el antígeno SAPA (Leguizamón y col., 1991).

En este trabajo se obtuvo la secuencia completa de uno de los genes codificantes de la familia de antígenos SAPA (figura 3). La secuencia de aminoácidos deducida de este gen reveló la presencia de tres dominios proteicos bien diferenciados (figura 4). En este punto de la discusión, utilizaremos la organización dada por estos tres dominios para analizar y relacionar los resultados del análisis de la secuencia con los resultados estructurales obtenidos en la presente investigación.

### 1- Dominio enzimático

El dominio enzimático comprende el N-terminal de la proteína que contiene los cuatro bloques de la secuencia consenso S-X-D-X-G-X-T-W (figura 4), altamente conservada en neuraminidasas virales y bacterianas (Roggentin y col., 1989). Como se observa en las figuras 3 y 16, estos motivos no solo están conservados en cuanto a secuencia, además presentan una distribución similar en la molécula a la encontrada en las neuraminidasas bacterianas. Por otra parte, el análisis de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos reveló un extremo N-terminal hidrofóbico, con características típicas de una secuencia para un péptido señal (figura 5). Luego al secuenciar directamente los N-terminales de cinco polipéptidos maduros de los antígenos SAPA se pudo comprobar que esta secuencia hidrofóbica no estaba presente. Además todos los péptidos comenzaban en el mismo sitio (leucina) y presentaban una secuencia idéntica en los 12 aminoácidos secuenciados, que a su vez se correspondían perfectamente con la secuencia de aminoácidos deducida del gen SAPA (ver figura 6). Este hecho confirma que existe un procesamiento de los N-terminales de las proteínas SAPA, sugiriendo fuertemente la presencia de un péptido señal. Utilizando el método de von Heijne (von Heijne, 1986) se puede predecir la secuencia E-P-A-X-A, como una posible señal de clivaje para una proteasa involucrada en la maduración post-traduccional. Es interesante destacar que los aminoácidos secuenciados de las proteínas maduras, se corresponden con la secuencia deducida de SAPA en una extensión N-terminal de 77 aminoácidos con respecto a la supuesta metionina de iniciación de la TCNA. Por consiguiente el N-terminal de las proteínas maduras no se encuentra

presente en la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de ADN de la TCNA (Pereira y col., 1991) (figura 6). Este hecho podría reflejar una posible metionina de iniciación diferente para varios miembros de esta familia antigénica. Sin embargo al comparar las secuencias de ADN de los genes SAPA y TCNA, se observa la ausencia de una timidina en esta última. La falta de esta base provoca un corrimiento del marco de lectura de la TCNA, de acuerdo al cual la iniciación hipotética de la proteína deducida corresponde a una metionina interna con respecto a la posible iniciación de SAPA (figura 6). Como dato adicional, si se inserta la correspondiente timidina en la secuencia de la TCNA y se deduce la secuencia proteica, el marco de lectura se modifica coincidiendo con el descrito para el SAPA y por ende correspondiéndose también con las secuencias de las proteínas maduras. Resultados posteriores indican que diferentes genes de la familia SAPA/Trans-sialidasa en diferentes cepas de *T. cruzi* presentan una secuencia de ADN con el mismo ATG del gen SAPA y además que el sitio de "trans-splicing" conserva la distancia apropiada con un inicio de la traducción en las metioninas descritas para el SAPA. Estos resultados, sumados a que el total de las 5 proteínas secuenciadas presentan esta extensión hacia el N-terminal con respecto al comienzo teórico de la TCNA, permiten concluir que las proteínas de la familia SAPA/Trans-sialidasa presentes en las cepas analizadas poseen un péptido señal y comienzan en la metionina descrita para la proteína deducida del gen SAPA.

## 2- Dominio repetitivo

Este dominio está compuesto por las 14 unidades repetitivas de 12 aminoácidos cada una, organizadas cabeza-cola, que definen a los antígenos SAPA. Las mismas se encuentran representadas por la secuencia consenso D-S-(S/T)-A-H-(S/G)-T-P-S-T-P-(A/V) (figura 3). Como indica el análisis de hidrofobicidad (figura 5), este dominio es marcadamente hidrofílico como consecuencia de su alto contenido de aminoácidos polares. Es interesante destacar que diferentes genes contienen distinto número de estas unidades repetitivas. Dos clones obtenidos en este trabajo contienen aproximadamente 33 unidades en un caso y 46 en el otro a diferencia de las 14 del gen SAPA secuenciado (figuras 2 y 3). Por otra parte la secuencia del gen de la TCNA (Pereira y col., 1991) presenta 44 unidades repetitivas. Se podría especular entonces, debido a la estructura repetitiva de estas secuencias, que el mecanismo de "crossing-over" desigual (Smith, 1976) es el responsable de las diferencias en el número de repeticiones. Esta diferencia en la estructura de los genes de la familia SAPA/Trans-sialidasa, se ve reflejada en el diferente peso molecular de los antígenos SAPA analizados por "western blot". Otras hipótesis podrían explicar las causas de esta diferencia de peso molecular. Por ejemplo podrían existir diferentes inicios de la traducción, que resultaran en polipéptidos de diferentes tamaños. Dado que a partir de la secuencia de las proteínas maduras se demostró la existencia de un único comienzo, esta hipótesis queda descartada. También se puede descartar por experimentos realizados por el Dr. A. Parodi que la diferencia se deba a un patrón

diferente de N-glicosilación en las proteínas. Además, se demostró que se transcriben diferentes genes conteniendo distinto número de unidades repetitivas (Affranchino, Pollevick y Frasch, 1991). Entonces podemos afirmar que la causa de los diferentes pesos moleculares de las proteínas de la familia SAPA/TCNA, es el número de unidades repetitivas variable que contiene cada uno de los genes que las codifican.

### 3- Posibles roles del dominio repetitivo

Trabajos previos en nuestro laboratorio demostraron que este dominio repetitivo C-terminal de la proteína SAPA es antigénico en humanos y en animales durante infecciones naturales y experimentales (Affranchino y col., 1989, Frasch y Reyes, 1990). Más aún, péptidos sintéticos diseñados a partir de la secuencia de las unidades repetitivas del gen SAPA, fueron capaces de detectar anticuerpos en sueros provenientes de infecciones, pudiendo concluir entonces que estas unidades repetitivas definen uno o más epitopes para las células B (Vergara y col., 1991). En la presente investigación se observó que sueros de infecciones humanas o animales, no presentan niveles detectables de anticuerpos contra epitopes lineales del dominio enzimático, pero si poseen un alto título contra el dominio repetitivo. Es de esperar que epitopes en este dominio repetitivo correspondan a aminoácidos contiguos, ya que en esta región las estructuras secundarias no se encuentran favorecidas debido a la presencia de dos residuos de prolina por cada 12 aminoácidos correspondientes a una unidad repetitiva. Este tipo de repeticiones de aminoácidos han sido muy estudiadas en *Plasmodium spp* (Kemp y col., 1987). A partir de estos estudios se han postulado tres hipótesis para explicar sus posibles funciones: i) Actuar como ligandos para los receptores de las células hospedadoras (Nussenzweig y Nussenzweig, 1989). ii) Formar una red de epitopes que reaccionen de forma cruzada, evitando de esta forma la maduración de la afinidad de la respuesta inmunológica contra posibles epitopes protectores (Kemp y col., 1987). iii) Inducir la activación de los linfocitos B, en una respuesta T-independiente (Schofield, 1991). Este tercer modelo propone también una inmunosupresión que actuaría en "cis" sobre epitopes claves en la supervivencia del parásito, para lo cual sería necesario la presentación de un dominio repetitivo en la misma molécula. Concretamente si extrapolamos esta hipótesis para los antígenos SAPA, podríamos postular que éstas son moléculas bifuncionales con un dominio enzimático protegido de la respuesta inmune del hospedador ya que los anticuerpos se dirigen contra el dominio repetitivo o inmunodominante, no afectando la actividad enzimática de la molécula. Recientemente en el laboratorio fue demostrada la presencia de anticuerpos neutralizantes de la actividad de trans-sialidasa en sueros de humanos y animales infectados. Se postula como hipótesis que el dominio repetitivo actuaría como un señuelo para el sistema inmune desviando la respuesta humoral hacia un dominio irrelevante hasta el establecimiento de la infección

(Leguizamón, comunicación personal). Además el dominio repetitivo podría actuar desbalanceando la respuesta inmunológica del hospedador.

La sialidasa descrita en epimastigotes (Botelho-Chaves, Briones y Schenkman, 1993), también posee actividad de trans-sialidasa y no presenta el dominio repetitivo, pero sí existe similitud en el dominio enzimático (Botelho-Chaves, Briones y Schenkman, 1993). Experimentos realizados en el laboratorio por el Dr. Campetella, utilizando un clon correspondiente solamente al dominio enzimático de un gen de esta familia SAPA/Trans-sialidasa, demostraron que el producto de este clon presentaba actividad de neuraminidasa y trans-sialidasa. Por lo tanto, la presencia del dominio repetitivo no es necesaria para expresar dichas actividades (Campetella, comunicación personal).

Un enfoque diferente que no tiene en cuenta la antigenicidad del dominio repetitivo, postula que la función del mismo sería simplemente la de alejar el dominio enzimático de la superficie del parásito. De esta forma el dominio repetitivo aportaría una solución estructural permitiendo sobresalir al dominio enzimático del resto de las glicoproteínas y glicolípidos de cubierta para actuar como trans-sialidasa (Cross y Takle, 1993). Sin embargo, esta última hipótesis no tiene en cuenta que las proteínas de la familia de antígenos SAPA/Trans-sialidasa se encuentran ancladas a la membrana por una unión del tipo glicofosfatidilinositol, siendo entonces liberados al medio extracelular.

El enfoque que recalca la relación entre el dominio repetitivo y la respuesta inmune del hospedador, parece acercarse más hacia una respuesta a su posible función. Sobre todo si se tiene en cuenta que la trans-sialidasa del estadio epimastigote no contiene un dominio repetitivo (Botelho-Chaves, Briones y Schenkman, 1993). Considerando que este estadio de *T. cruzi* no tiene relación alguna con un hospedador vertebrado capaz de desarrollar una respuesta inmune, es probable que el dominio repetitivo o inmunodominante no se haya seleccionado o se haya perdido evolutivamente en los epimastigotes al no ser funcional por no tener una presión de selección.

#### **4- Dominio de anclaje**

Como lo demuestra el análisis de hidrofobicidad, la secuencia de aminoácidos deducidas de la secuencia de ADN del gen SAPA para este dominio hacia el extremo C-terminal, es marcadamente hidrofóbica (figura 5). Además en este dominio se encuentran los aminoácidos: alanina, asparagina, aspártico, glicina o serina combinados de a dos y seguidos de corridas hidrofóbicas de aminoácidos, hecho que es característico de las proteínas ancladas a la membrana por uniones glicofosfatidilinositol, si bien no existe una secuencia consenso para éstas (Cross, 1990a). Para corroborar estos datos teóricos, un estudio cinético de liberación de antígenos de la familia SAPA/Trans-sialidasa fue realizado. Se demostró entonces que estos antígenos son liberados de la superficie del parásito por la enzima fosfolipasa C fosfatidil inositol-específica, aumentando marcadamente la liberación (figura 10). El dato de liberación basal es debido a una actividad

endógena de fosfolipasa C fosfatidil inositol-específica de los tripanosomas (Schenkman, Yoshida y Cardoso de Almeida, 1988). Por otra parte, el grupo de Nussenzweig demostró que la trans-sialidasa liberada "espontáneamente" cuando tripomastigotes se incuban en medio de cultivo, reacciona con anticuerpos específicos para estructuras de inositol-glicanos, sugiriendo que la liberación es mediada por una actividad endógena de fosfolipasa C fosfatidil inositol-específica (Schenkman, Pontes de Carvalho y Nussenzweig, 1992).

### **LOS ANTIGENOS SAPA PRESENTAN ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA Y TRANS-SIALIDASA. IDENTIFICACION DE LOS GENES QUE CODIFICAN LA TRANS-SIALIDASA DE *T. cruzi***

Desde el año 1985, cuando por primera vez se describió la actividad de trans-sialidasa (Prelato y col., 1985), hasta los estudios desarrollados en la presente investigación, no se habían identificado los genes responsables de codificar las proteínas con actividad de trans-sialidasa en *T. cruzi* (único organismo donde se había descrito esta actividad hasta ese momento). En cambio se habían realizado numerosos estudios funcionales que fueron sumando importancia cuando Schenkman y colaboradores retomaron el tema demostrando la transferencia de ácido siálico de las células hospedadoras a numerosas proteínas del parásito, caracterizadas todas ellas por presentar el epítopo sialidado Ssp3 (Schenkman y col., 1991). También se demostró que la trans-sialidación de estas moléculas juega un importante rol en la invasión de *T. cruzi* a células hospedadoras (Piras, Henríquez y Piras, 1987; Schenkman, Pontes de Carvalho y Nussenzweig, 1992).

A partir del alto porcentaje de identidad entre las secuencias del gen SAPA y el gen de la TCNA, obtenidas en forma simultánea e independiente, se propuso comprobar la actividad de neuraminidasa de los antígenos SAPA. Utilizando anticuerpos que reconocen únicamente el dominio repetitivo se inmunoprecipitó entre el 54 y el 87% de la actividad total de neuraminidasa del parásito (figura 12). Surgió entonces la posibilidad de estudiar la relación entre esta actividad donde los residuos de ácido siálico son transferidos al agua y la actividad de trans-sialidasa, donde las moléculas de ácido siálico son transferidas a aceptores que están presentes en concentraciones mucho menores que el agua. Siguiendo el mismo esquema de inmunoprecipitaciones, más del 80% de la actividad de trans-sialidasa, del total de la actividad de *T. cruzi*, es inmunoprecipitada por anticuerpos específicos que reconocen al dominio repetitivo del antígeno SAPA (tabla 1). Además se demostró que sialil-lactosa, fetuina y MU-NANA son dadores efectivos de ácido siálico. En cambio el ácido siálico libre y el ácido colomínico, que es un polímero de ácido siálico con uniones  $\alpha$  (2-8), no funcionaron como dadores para la trans-sialidasa (tabla 1). Estudios posteriores demostraron que la enzima únicamente reconoce ácido siálico unido  $\alpha$  (2-3) como dador y que oligosacáridos unidos N-, O- a proteínas y a lípidos funcionan como dadores y aceptores (Parodi, 1993).



Podemos entonces concluir que la familia antigénica de *T. cruzi* denominada SAPA contiene ambas actividades enzimáticas: neuraminidasa y trans-sialidasa. A partir de este punto se abrió el camino para estudiar estas actividades a través del clonado de sus genes. Si bien en el trabajo de Pereira y colaboradores reportando la secuencia del gen de la TCNA, se describe que este clon expresado en *E. coli* produce una proteína recombinante con actividad de neuraminidasa (Pereira y col., 1991), hasta el momento este grupo no publicó ningún otro resultado al respecto. Otros laboratorios comenzaron a intentar expresar las actividades de neuraminidasa y trans-sialidasa en sistemas procariotas, pero el trabajo no resultaba sencillo. Un gran paso fue el aporte de Uemura y colaboradores al describir genes de la familia SAPA/Trans-sialidasa codificantes para productos que presentan actividad de neuraminidasa y trans-sialidasa y genes codificantes para productos totalmente inactivos. También confirmaron que ambas actividades enzimáticas están presentes en la misma molécula (Uemura y col., 1992). En este trabajo los autores expresan diferentes fusiones de genes activos e inactivos y definen de esta manera una región de 101 aminoácidos determinante en la actividad de la proteína de fusión. Luego comparan las secuencias de aminoácidos deducidas de esa región y concluyen que un aminoácido, tirosina, es el responsable de la actividad ya que en el clon inactivo se encuentra cambiado por una histidina (Uemura y col., 1992). De todas formas esta comparación no es total debido a que no se han publicado las secuencias completas de los clones (Uemura y col., 1992). Entonces podrían existir otros cambios en las secuencias, que también estarían involucrados en la actividad enzimática, que Uemura y colaboradores no detectaron ya que eran indistinguibles en los dos clones estudiados por ellos. Por lo tanto serían más de una las variables que actuarían simultáneamente. Por otra parte, la simple comparación de secuencias de proteínas de la familia SAPA/Trans-sialidasa, deducidas a partir de las secuencias de ADN de genes que codifican para proteínas activas o inactivas, no parece alcanzar para descifrar las diferencias responsables de las actividades enzimáticas. Experimentos de mutagénesis dirigida son también necesarios para esclarecer este problema. Finalmente estudios de las estructuras tridimensionales de las proteínas activas e inactivas llevarán a un completo entendimiento de este tema.

A partir de lo expuesto se deduce que es de sumo interés el estudio de la función de los productos inactivos de la familia SAPA/Trans-sialidasa. Se puede plantear como hipótesis que estos productos al no producir hidrólisis o transferencia pero sí unión a ácido siálico u otros azúcares, actúen como un tipo de lectina. Una lectina de mamíferos que es específica para  $\beta$  galactosidasa contiene los motivos de neuraminidasa S-X-D-X-G-X-T-W, que también se encuentran presentes en versiones más degeneradas en diferentes lectinas (Abbott y Feizi, 1991).

## ORGANIZACION DE UNA SUPER-FAMILIA DE GENES DE *T. cruzi* CARACTERIZADA PRINCIPALMENTE POR LOS MOTIVOS DE NEURAMINIDASA: SXDXGXTW

### 1- Familia SAPA/Trans-sialidasa

Las unidades repetitivas características de los genes correspondientes a los antígenos SAPA fueron descritas por primera vez en 1989 (Affranchino y col., 1989). Por lo tanto quedaba definida una familia de proteínas que compartían el dominio de unidades repetitivas responsable de la alta respuesta serológica en la fase aguda de la enfermedad de Chagas (antígenos SAPA). En el año 1990, como parte de esta tesis, se obtuvo la secuencia completa de un gen de la familia de antígenos SAPA simultáneamente a la obtención de la secuencia de la TCNA (Pereira y col., 1991). La comparación entre ambas secuencias de ADN, presentó un 93% de identidad y las secuencias de aminoácidos deducidas resultaron 84% idénticas. La TCNA, también es un antígeno SAPA por el hecho de contener el dominio repetitivo-antigénico. Ambas proteínas comparten los motivos de neuraminidasa S-X-D-X-G-X-T-W (Roggentin y col., 1989) (figura 4). Como se demostró en el presente trabajo, el conjunto de proteínas inmunoprecipitadas por anticuerpos monoclonales y policlonales contra las unidades repetitivas que definen a los antígenos SAPA, expresan las actividades de neuraminidasa y trans-sialidasa de *T. cruzi*. Este hecho nos permite definir una familia de antígenos altamente relacionados (una identidad mayor del 80%), caracterizados por las unidades repetitivas de 12 aminoácidos [D-(S/T)-S-A-H-(S/G)-T-P-S-T-P-(A/V)] y por presentar, algunos de ellos, actividad de neuraminidasa y trans-sialidasa. Dado que esta última parece ser la actividad "in vivo" de la enzima podemos llamar a esta familia de genes y proteínas SAPA/Trans-sialidasa.

Los genes codificantes para productos activos e inactivos cuyas secuencias parciales fueron reportadas por Uemura y colaboradores (Uemura y col., 1992), están incluidos en esta familia ya que poseen más de un 80% de identidad con las proteínas SAPA y TCNA en los 101 aminoácidos presentados. Además fueron aislados y caracterizados por contener las unidades repetitivas SAPA.

### 2- Familia GP85

Existe una segunda familia de genes bien caracterizada en *T. cruzi*, cuyos productos proteicos contienen los motivos de neuraminidasas S-X-D-X-G-X-T-W (Roggentin y col., 1989). En el año 1986 se describió el primer gen clonado que codifica para un antígeno de *T. cruzi* y se lo denominó TSA-I (Peterson y col., 1986). La secuencia de aminoácidos deducida de su secuenciación parcial mostró un dominio de unidades repetidas de un nonapéptido organizadas cabeza-cola. Luego se secuenció totalmente y la secuencia de aminoácidos deducida hacia el N-terminal y el C-terminal de las repeticiones, mostró una alta identidad con dos secuencias obtenidas independientemente por dos grupos: una denominada SA85-1.1 (y sus dos genes homólogos SA85-1.2 y 1.3) (Kahn y col., 1991) y

la otra Tt34cI (Takle y Cross, 1991). Los productos de estos genes, a diferencia del antígeno TSA-I, carecen de las secuencias repetitivas de 9 aminoácidos pero todos comparten copias de los motivos bacterianos de neuraminidasas S-X-D-X-G-X-T-W (Roggentin y col., 1989). No se reportó actividad de neuraminidasa para ninguno de los productos de estos genes, excepto la proteína SA85-1.1 que fue considerada erróneamente la neuraminidasa de *T. cruzi* por una reactividad cruzada del antisuero utilizado (Kahn y col., 1991; Kahn y col., 1993). Todas estas proteínas presentan secuencias altamente homólogas (con una identidad mayor del 60%) y un peso molecular estimado alrededor de 85 kD, por lo tanto se pueden agrupar en una familia, al igual que los genes que las codifican, que se denominó familia de glicoproteínas de superficie GP85. Las proteínas de esta familia se expresan solamente en el estadio tripomastigote del parásito y se encuentran unidas a la membrana celular por un anclaje de tipo glicofosfatidilinositol (Takle y Cross, 1991).

### 3- Superfamilia de genes en *T. cruzi*

TSA-I, SA851.1(1.2,1.3), Tt34cI, SAPA y TCNA son proteínas que contienen los motivos bacterianos de neuraminidasas. Los miembros de la familia GP85 fueron comparados previamente presentando una identidad mayor del 60% (Takle y Cross, 1991). Por esta razón se tomó como representante de esta familia la secuencia de SA851.1, para compararla con la secuencia deducida del gen SAPA como representante de la familia SAPA/Trans-sialidasa. Como se observa en la figura 15 A, se comparó la región de 430 aminoácidos donde la homología entre las familias es mayor. El resultado permite definir una superfamilia de antígenos de superficie de *T. cruzi*, con un 30 a 40% de identidad en esta región conservada (Figura 15 A y B). También se incluyeron los antígenos Tc 13.1 y Tc 13.N5, caracterizados en nuestro laboratorio (Campetella y col., 1992), debido a que presentan una identidad mayor del 30% en esa región, con sólo un motivo de neuraminidasa poco conservado (figura 16). Se considera una superfamilia ya que las proteínas comparadas se pueden agrupar a su vez en familias, cuando su identidad es mayor del 60%. Por lo tanto podemos describir una superfamilia de genes en *T. cruzi*, cuyos productos se caracterizan por contener los motivos de neuraminidasas y una identidad mayor del 30% en la región N-terminal. Otra característica común de estas proteínas es un anclaje a la membrana del tipo glicofosfatidilinositol, que luego de clivado produciría la liberación al medio de las mismas. Esta superfamilia de genes estaría constituida fundamentalmente por la familia de genes de las glicoproteínas denominada GP85 y las familias de genes de los antígenos Tc 13 y SAPA/Trans-sialidasa. Entre todas estas proteínas codificadas por la superfamilia de genes de *T. cruzi*, Cross y Takle describieron un motivo subterminal V-T-V-X-N-V-F-L-Y-N-R común a todas ellas (Cross y Takle, 1993). La presencia de este motivo es utilizada como criterio para agrupar familias y subfamilias de genes y proteínas en *T. cruzi*. Por esta razón se incluyó en la figura 16, el grupo de genes denominado FL/CEA160 (aunque no contienen los motivos de neuraminidasas) que codifican proteínas de aproximadamente 160 kDa de



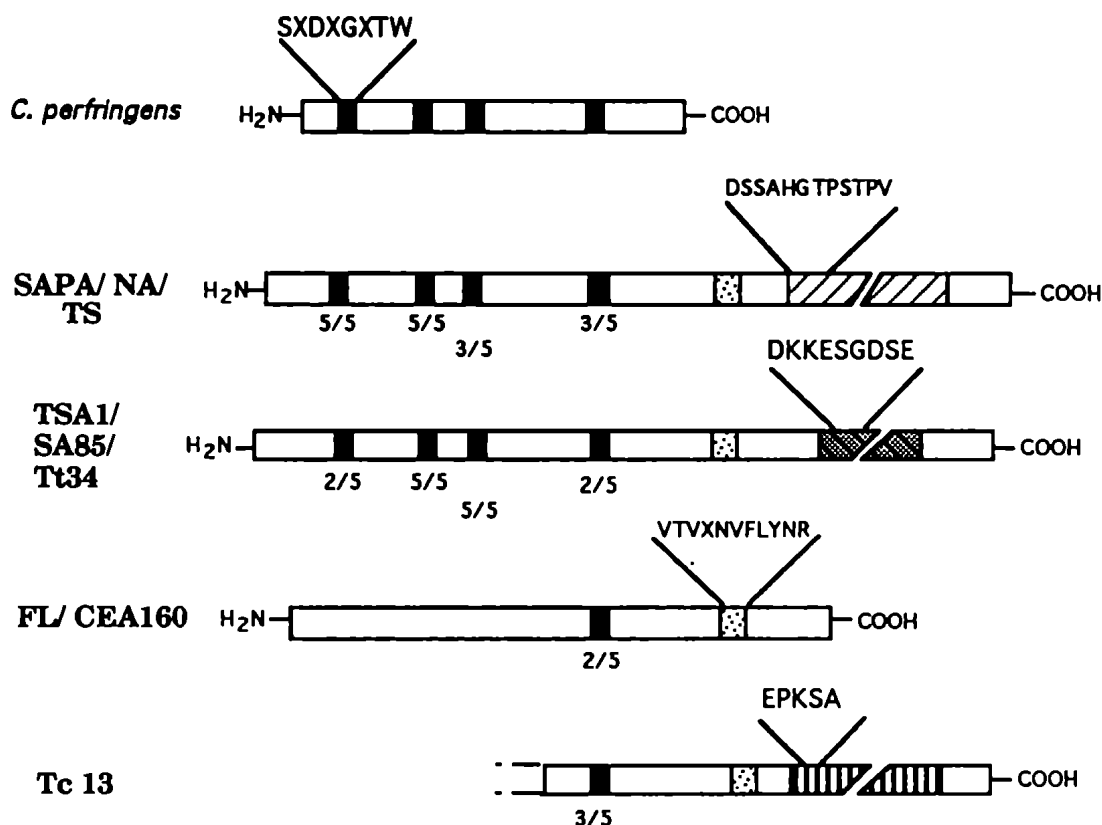
peso molecular (Van Voorhis, Schlekewy y Le Trong, 1991). No se ha descrito ninguna función asociada al motivo V-T-V-X-N-V-F-L-Y-N-R, pero por el hecho de estar tan conservado se especula que podría interactuar con otras proteínas del parásito o del hospedador, ser una señal de secreción o simplemente ser el reflejo en la secuencia proteica de una conservación de la secuencia de ADN, la cual podría ser necesaria para regular la expresión, o el rearrreglo de esta superfamilia de genes (Cross y Takle, 1993).

Las secuencias de los miembros de la superfamilia SAPA/Trans-sialidasa no presentan ninguna homología con las secuencias de sialiltransferasas asociadas al Golgi descritas hasta el presente. Sí existe una importante conservación con la secuencia de la sialidasa de *Clostridium* (figura 16), que no presenta actividad de trans-sialidasa (tabla 1). Este dato sugiere la existencia de un posible gen ancestral bacteriano de la trans-sialidasa. En este sentido es interesante estudiar la presencia de actividad de sialidasa y trans-sialidasa en diferentes especies de tripanosomátidos. Hasta el momento ha sido descrita la actividad de sialidasa en *T. rangeli*, correspondiente a una proteína de peso molecular aparente de 70 kDa (Reuter y col., 1987). Esta sialidasa no presentó actividad de trans-sialidasa (Engstler, Reuter y Schauer, 1992). Sí en cambio fue descrita esta actividad en *T. brucei*, luego de su descubrimiento en *T. cruzi* (Engstler, Reuter y Schauer, 1992). Se purificó una glicoproteína asociada a la membrana de 67 kDa de peso molecular aparente a partir del estadio procíclico de cultivo de *T. brucei* (Engstler, Reuter y Schauer, 1992). Hasta el momento no existe reporte de actividad trans-sialidasa en ningún otro organismo. Tampoco ha sido aislado alguno de los genes codificantes de estas enzimas de *T. brucei* y *T. rangeli*. Sin embargo, en este último, Buschiazzo y colaboradores identificaron un gen con una secuencia que comparte una identidad mayor del 80% con la del gen SAPA, pero no se ha demostrado si se expresa o presenta actividad de trans-sialidasa (Buschiazzo y col., 1993).

#### **4- ¿Por qué una superfamilia de antígenos en *T. cruzi*?**

La supervivencia de *T. cruzi* en el hospedador vertebrado depende de su estadio intracelular, ya que la respuesta inmunológica es capaz de matar a las formas tripomastigotes sanguíneas del parásito. La actividad de trans-sialidasa ha sido reportada como esencial para la penetración del parásito a la célula hospedadora (Piras, Henríquez y Piras, 1987; Schenkman, Pontes de Carvalho y Nussenzweig, 1992). Los epitopes de *T. cruzi* denominados Ssp3 deben ser sialidados por la enzima para que el parásito invada las células (Schenkman y col., 1991). En este proceso la trans-sialidasa debe ser expuesta en la superficie o liberada al medio y por lo tanto se convierte en blanco del sistema inmune, como lo indican los anticuerpos que reconocen las unidades repetitivas SAPA/Trans-sialidasa, frecuentemente detectados en sueros de humanos y animales infectados (Frasch y Reyes, 1990). La existencia de esta superfamilia de genes, cuyos productos se encuentran altamente relacionados en la estructura de su N-terminal o dominio enzimático, implica la

producción de un gran número de moléculas inactivas presentadas al sistema inmunológico del huésped. Si estas proteínas, a pesar de su similitud en secuencia, fuesen lo suficientemente



**Figura 16.** Superfamilia de genes en *T. cruzi*

Se representan esquemáticamente los miembros de las familias de antígenos de *T. cruzi* y la neuraminidasa de *C. perfringens*. Las representaciones de las secuencias se encuentran en escala. Las regiones repetitivas se indican con diferentes dibujos rayados para cada familia y se representan discontinuas para marcar la diferencia en número que cada miembro de una familia contiene. La secuencia consenso de cada unidad repetitiva está indicada. Los motivos conservados de neuraminidasas se representan como bloques negros. Los números debajo de los mismos indican cuantos de los 5 aminoácidos consenso se encuentran conservados. El motivo subterminal VTVXNVFLYNR se representa con un relleno punteado.

diferentes como para generar anticuerpos que no neutralizaran la actividad de trans-sialidasa, la maduración de la respuesta inmune contra los epitopes críticos del dominio enzimático podría evitarse o retardarse (Campetella y col., 1992). Los tripanosomas Africanos, a diferencia de *T. cruzi*, sobreviven en la sangre del hospedador utilizando el sistema de variación antigénica (Cross, 1990 b). De esta forma los parásitos expresan únicamente uno por vez, los cientos de genes relacionados que codifican para glicoproteínas de la cubierta de superficie. En el caso de *T. cruzi*, en base a lo descrito, se puede especular que los cientos de genes relacionados de esta superfamilia, se

expresarían como un conjunto de glicoproteínas antigénicas. El alto número de estas proteínas carentes de actividad enzimática formaría entonces una cubierta de antígenos similares, pero con pequeñas variaciones y a diferencia de *T. brucei*, expresados simultáneamente en la superficie. Este mecanismo estaría involucrado en la protección de uno de los sistemas principales de supervivencia del parásito: la penetración a la célula hospedadora y el posterior desarrollo del estadio intracelular (Cross y Takle, 1993).

### **IMPLICANCIAS DE LOS ANTIGENOS DE LA FAMILIA SAPA/TRANS-SIALIDASA EN LA RELACION PARASITO-CELULA HOSPEDADORA**

Ha sido demostrado que la actividad de trans-sialidasa es regulada durante el ciclo de vida de *T. cruzi* (Pereira, 1983). La expresión de la enzima es 10 a 20 veces mayor en tripomastigotes que en epimastigotes y no se detectó actividad en amastigotes (Pereira, 1983).

Las evidencias que relacionan la actividad de trans-sialidasa con la internalización del parásito en las células hospedadoras aún son indirectas. Inicialmente, Piras y colaboradores demostraron que la fetuina aumenta la penetración de los parásitos a las células entre 4 y 8 veces (Piras, Henríquez y Piras, 1987). Luego se comprobó que fragmentos Fab de anticuerpos monoclonales contra el epítipo Ssp-3 bloquean la invasión del parásito a células no fagocíticas (Schenkman y col., 1991). Sumado a estos datos, la opsonización de tripomastigotes con cantidades no aglutinantes de anticuerpos dirigidos contra diversos epítopes de membrana, incluyendo un anticuerpo contra Ssp-3, aumenta el pegado de los parásitos a células CHO y L, establemente transfectadas con genes para receptores de Fc (Schenkman y col., 1992). La opsonización en general estimuló la penetración de los parásitos a las células excepto para el caso de los anticuerpos anti Ssp-3 (Schenkman y col., 1992). A partir de estos resultados se puede inferir que el epítipo Ssp-3, que es generado luego de la acción de la trans-sialidasa, participa en algún paso de la interacción parásito-célula que tiene lugar entre la unión y la penetración, ya que no afecta el pegado de los parásitos, pero altera la infección. Las formas tripomastigotes metacíclicos derivados de cultivos de epimastigotes, invaden células, pero no presentan el epítipo Ssp-3. Si en cambio poseen proteínas altamente glicosiladas de peso molecular aparente entre 35 y 50 kDa, que son reconocidas por el anticuerpo monoclonal 10D8, el cual inhibe parcialmente la internalización en células Vero (Yoshida y col., 1989). Estas proteínas se caracterizan por contener un 33% de treoninas en su composición aminoacídica y cadenas de O-oligosacáridos que son los principales aceptores de ácido siálico de los tripomastigotes metacíclicos (Schenkman y col., 1993). De manera opuesta a estos resultados el grupo de Pereira postulaba, en estudios anteriores, que anticuerpos que inhibían la actividad de sialidasa aumentaban dos veces la penetración de *T. cruzi* en células de cultivo (Prioli, Mejía y Pereira, 1990). Se propuso que esta enzima estaría involucrada en un control negativo sobre la infección de *T. cruzi*, a través de la remoción de ácido siálico de moléculas (de los parásitos o de las células

huéspedes) que serían necesarias para la internalización (Pereira, 1988; Prioli, Mejía y Pereira, 1990). Este dato es opuesto y de difícil conciliación con los últimos resultados que involucran directamente la actividad de trans-sialidasa con la penetración del parásito a la célula. Por otra parte quedó demostrado en el presente trabajo que anticuerpos dirigidos contra las unidades repetitivas, como los utilizados por Pereira (Prioli, Mejía y Pereira, 1990), no afectan la actividad de la enzima aunque se utilicen sustratos proteicos como la fetuina. Por lo tanto se puede descartar la hipótesis de una modulación de la actividad de la enzima por el pegado de los anticuerpos a un epitope secundario para la actividad. Teniendo en cuenta que durante el desarrollo de estos experimentos solamente se conocía la actividad de sialidasa de la enzima, se podría suponer que el anticuerpo utilizado para bloquear la actividad en realidad estuviese actuando como un dador de ácido siálico, que aumentaría la infección por aumento de la trans-sialidación. Es difícil sin embargo, sostener esta hipótesis ya que el medio utilizado, que contiene suero fetal bovino, es rico en este tipo de dadores. Como una hipótesis alternativa se podría suponer que los anticuerpos uniesen la trans-sialidasa a través del dominio repetitivo y al unirse luego el complejo anticuerpo-Trans-sialidasa a los receptores para Fc de los fibroblastos, acercara la enzima a su zona de acción favoreciendo entonces la infección.

Recientemente se encontró que tripomastigotes de cultivo invaden con una eficiencia del 50% células mutantes, que contienen en su superficie solamente un 10% del ácido siálico presente en células normales (Schenkman, Vandekerckhove y Schenkman, 1993). Estas células son deficientes en el transporte de CMP-siálico a través del aparato de Golgi. En este trabajo concluyen que tanto la sialidación total del parásito, como la expresión de muchos epitopes Ssp-3, no es un requerimiento primario para la invasión de *T. cruzi*. Se sugiere entonces que son mínimas las cantidades de ácido siálico intercambiadas entre el parásito y la célula hospedadora y que este intercambio es necesario para evitar un pegado irreversible que impida el próximo paso en la invasión. Entonces la inhibición de la invasión provocada por el anticuerpo dirigido contra los epitopes Ssp-3, podría deberse a una inhibición de este intercambio de ácido siálico cuando ambas superficies celulares se encuentran en estrecho contacto (Schenkman, Vandekerckhove y Schenkman, 1993).

Podemos entonces especular que la invasión por *T. cruzi* es un proceso activo, en el cual muchos eventos deben ocurrir simultáneamente. Primero el parásito debe unirse a moléculas que contengan ácido siálico, a proteoglicanos o moléculas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina). Luego los tripomastigotes penetran en la célula formando una invaginación en la membrana y por deslizamiento y movimientos flagelares, finalmente son totalmente cubiertos por la membrana generando un fagolisosoma (Tardieux y col., 1992). En el proceso de entrada del parásito a la célula, probablemente ocurran reacciones de unión y despegado de moléculas con mucha frecuencia. Como la trans-sialidasa puede transferir ácido siálico reversiblemente, la sialidación y desialidación del parásito o ligandos del hospedador puede otorgar un buen método para lograr esta unión y despegado de moléculas. La enzima podría entonces soltar al parásito de una determinada



molécula, al remover sitios de unión de ligandos tales como la penetrina (Ortega Barria y Pereira, 1991), u otras moléculas aún no descriptas. Este modelo en el que se postula un pegado y despegado secuencial del parásito para invadir la célula, se basa en el impedimento de intercambio de ácido siálico logrado por el anticuerpo monoclonal dirigido contra los epitopes Ssp-3, que inhibe la invasión celular, descrito anteriormente (Schenkman, Vandekerckhove y Schenkman, 1993). También ha sido reportada la acción de la neuraminidasa facilitando la ruptura de la membrana del fagolisosoma, luego de la invasión celular (Hall y col., 1992).

Además de las conclusiones obtenidas a partir de estos datos, que involucran a la actividad de trans-sialidasa en la penetración a la célula hospedadora, podrían existir otras funciones para las cuales sería necesaria la acción de la enzima. Un hecho interesante al respecto es el descubrimiento de esta actividad en las formas procíclicas de los tripanosomas africanos, pero no en las formas sanguíneas (Engstler, Reuter y Schauer, 1992). *T. cruzi* y *T. brucei* interaccionan de forma diferente con sus respectivos hospedadores, sin embargo ambos presentan la actividad de trans-sialidasa en la etapa de su ciclo de vida en el insecto vector. Es posible entonces que la adquisición de ácido siálico juegue un importante rol en esta etapa del ciclo de los tripanosomas. Este hecho parece indicar una función biológica más general de la enzima, conservada en ambos parásitos, además de actuar en la invasión celular.

Por otra parte se demostró que tripomastigotes tratados con neuraminidasas bacterianas, pasan a ser sensibles a la lisis por acción de la vía alternativa del complemento (Kipnis y col., 1981). Entonces tal vez el ácido siálico incorporado en el parásito por la trans-sialidasa evitaría esta lisis. Sin embargo los epimastigotes que son normalmente sensibles a la vía alternativa del complemento, también presentan actividad de trans-sialidasa y poseen ácido siálico en superficie (Botelho-Chaves, Briones y Schenkman, 1993), indicando que debe existir otro mecanismo de resistencia a la lisis por sueros.

Por otra vez, una respuesta a los roles cumple la trans-sialidasa, podría obtenerse a partir de experimentos de disrupción génica. El inconveniente para poder realizar este trabajo es determinar cuáles de todos los genes presentes, son realmente relevantes en la familia SAPA/Trans-sialidasa. Este problema podría resolverse más fácilmente si los genes estuvieran organizados en "tandem" como sugieren Uemura y colaboradores (Uemura y col., 1992). Por otra parte la búsqueda de inhibidores de la trans-sialidasa puede aportar importantes datos a esta pregunta, además de representar un camino clave para combatir la enfermedad de Chagas, al bloquear la entrada de *T. cruzi* a las células del hospedador, evitando de este modo la infección.

**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES DE LA PRESENTE INVESTIGACION

- 1- Se obtuvo la secuencia completa de uno de los genes codificantes de los antígenos SAPA de *T. cruzi*. Dicha secuencia comparte un 93% de identidad con el gen de la enzima neuraminidasa del parásito, cuya secuencia fue obtenida simultáneamente (Pereira y col., 1991). Ambos genes son los primeros reportados para una neuraminidasa de eucariotes.
- 2- La secuencia de aminoácidos deducida del gen SAPA, presentó una estructura con tres dominios proteicos:
  - a) Dominio enzimático: comprende el N-terminal de la proteína y está caracterizado por presentar los motivos conservados de neuraminidasas bacterianas.
  - b) Dominio repetitivo: compuesto por 14 unidades de 12 aminoácidos cada una, organizadas cabeza-cola, que definen a los antígenos SAPA. Este dominio es el responsable de la fuerte antigenicidad de estas moléculas.
  - c) Dominio de anclaje: se localiza en el C-terminal de la proteína, es altamente hidrofóbico y presenta características de las secuencias de anclaje a la membrana por una unión del tipo glicofosfatidilinositol.
- 3- Se secuenciaron los N-terminales de cinco proteínas maduras de la familia SAPA/Trans-sialidasa. Las proteínas comparten el mismo aminoácido inicial (leucina). Desde el inicio de la traducción en la metionina propuesta para SAPA, hasta esta leucina, existen 32 aminoácidos hidrofóbicos que son procesados. Este hecho demuestra la presencia de un péptido señal hidrofóbico en esta familia de proteínas.
- 4- Se comprobó que la causa de la diferencia de peso molecular entre los diferentes antígenos SAPA, es el número variable de unidades repetitivas que cada uno de ellos contiene.
- 5- Se demostró que el dominio de anclaje forma una unión a la membrana celular del tipo glicofosfatidilinositol.
- 6- Se comprobó que los antígenos SAPA son las moléculas responsables de la actividad de neuraminidasa del parásito. Se demostró la actividad de trans-sialidasa de los antígenos SAPA, hecho que permitió entonces identificar las proteínas y en consecuencia los genes, responsables de esta actividad esencial para la invasión del parásito a las células hospedadoras. Por lo tanto la función biológica de los antígenos SAPA es clave, ya que son la única vía de incorporación de ácido siálico en *T. cruzi*.

7- Existe una superfamilia de genes relacionados en *T. cruzi*, caracterizados fundamentalmente por contener los motivos de neuraminidasa bacterianos y sitios de anclaje a la membrana del tipo glicofosfatidilinositol. Esta superfamilia está compuesta a su vez por familias de genes que comparten una identidad mayor del 60%, representadas por la familia de glicoproteínas GP85 y las familias de los antígenos Tc13 y SAPA/Trans-sialidasa. Esta última es la única familia cuyos productos presentan actividad de neuraminidasa y trans-sialidasa.

8- Se demostró que diferentes miembros de la familia SAPA/Trans-sialidasa se expresan y no necesitan un rearrreglo hacia la posición telomérica para ello. Ambos hechos marcan una importante diferencia con el sistema de variación antigénica de los tripanosomas africanos.

## **MATERIALES Y METODOS**

## MATERIALES

### 1- Medios de cultivo

Los medios de cultivo para las bacterias se prepararon de la siguiente manera (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989):

-LB (Luria broth): 10 g de Bacto triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio en 1 l de agua destilada; se ajustó el pH a 7.5 con hidróxido de sodio.

-LB agar: Al medio descrito anteriormente se le agregó 15 g de agar por cada litro de medio de cultivo.

-LB top agarosa: Al medio descrito anteriormente se le agregó 7 g de agarosa por cada litro de medio de cultivo.

Todos los medios se esterilizaron en autoclave 15 minutos a 1,5 atmósferas.

### 2- Antibióticos

Para la selección de bacterias se utilizó ampicilina trihidrato (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989). Se preparó una solución madre de ampicilina de 100 mg/ml en agua destilada, luego se esterilizó por filtración a través de membranas Millipore de 0.44 mm de poro y se conservó a -20°C. Esta solución se agregó a los medios de cultivo, previamente esterilizados por autoclave. La concentración final de ampicilina utilizada en los medios de cultivo fue de 100 µg/ml.

### 3- Cepas de bacterias utilizadas

Las cepas fueron de la familia *E. coli* K-12:

Y-1089 (Young y col., 1983): araD139  $\Delta$ lacU169 proA<sup>+</sup>  $\Delta$ lon rpsL hflA 150 [chr: Tn 10 (tet<sup>r</sup>) pMC9

Y-1090 (Young y col., 1983): supF hsdR  $\Delta$ lon  $\Delta$ lacU169 rpsL trpC22::Tn 10 (tet<sup>r</sup>) pMC9

HB-101 (Boyer y Roulland-Dussoix, 1969): F<sup>-</sup>, hsd S20 (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) rec A13,  $\Delta$ ara-14, pro A<sub>2</sub> lacY 1, gal K2, rpsL20(Sm<sup>R</sup>), Xyls, mtl-1, supE44,  $\lambda$ <sup>-</sup>

### 4- Cepas y clones de parásitos

Las cepas y aislamientos de parásitos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

**RA:** aislada en la provincia de La Pampa, Argentina, en 1978, de un paciente con infección aguda (González Cappa y col., 1981).

**Tulahuén (Tu):** aislada de un triatomineo de Chile (Pizzi, 1956).

**CA-I:** aislada en diciembre de 1974 de un paciente con miocarditis chagásica crónica de la provincia de San Luis, República Argentina. Esta cepa no produce infecciones letales en ratón; produce la máxima parasitemia entre los 25-30 días post-infección, siendo detectable la presencia de parásitos aún 12-18 meses post-infección (González Cappa y col., 1980). Por xenodiagnóstico de un perro

infectado con la cepa CA-I se obtuvieron parásitos que se utilizaron para obtener los clones CA-I/65 y 72 utilizados en este trabajo.

Todas estas cepas fueron cedidas por el Dr. Cazzulo.

## **5- Productos radiactivos**

Todos los materiales radiactivos se adquirieron en New England Nuclear (NEN). Los dNTPs  $\alpha^{32}\text{P}$  radiactivos se hallaban en solución acuosa, en una concentración de 10 mCi/ml con una actividad específica de 3000 Ci/mM.

## **ACIDOS NUCLEICOS**

### **1- Purificación de ADNn (nuclear) de tripanosomas**

Los cultivos de epimastigotes se cosecharon por centrifugación diferencial a 3000 g, 10 minutos a 4°C y se lavaron tres veces con NaCl 0,154 M. El precipitado de parásitos se resuspendió en una solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM y EDTA 100 mM. Los parásitos en suspensión se lisaron por el agregado de SDS a una concentración final de 1%. Luego el lisado se incubó con 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Proteinasa K durante 2 horas a 37°C. El lisado proteico se extrajo varias veces con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, hasta la desaparición de proteínas en la interfase. El ADN kinetoplástico se sedimentó por centrifugación diferencial a 20000 g, 2 horas a 4°C. Se utilizó el sobrenadante y se lo desproteinizó incubándolo 2 horas a 37°C con SDS (0,5% final) y Proteinasa K (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  final). Luego se realizaron varias extracciones con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, hasta desaparición de proteínas en la interfase. El ADNn se precipitó por el agregado de 0,1 volúmenes de acetato sodio 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se dejó precipitar toda noche a -20°C y posteriormente se centrifugó a 12.000 g, 30 minutos a 4°C. El precipitado de ADNn se lavó con etanol 70% y se volvió a centrifugar a 12.000 g, 30 minutos a 4°C. Se volcó el sobrenadante y el precipitado se secó para luego ser resuspendido en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 0,1 mM.

### **2- Purificación de ADN plasmídico**

Se utilizó el método desarrollado por Viesturus Simanis descripto en Hanahan, 1983 para preparar bacterias HB 101 competentes. Las mismas se transformaron según el método de Hanahan (Hanahan, 1983). Con el objeto de purificar el ADN plasmídico por el método del LiCl (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989), a partir de colonias aisladas, se realizó un cultivo en medio LB líquido con ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Se incubó toda la noche a 37°C con agitación vigorosa. Posteriormente se centrifugó 1,5 ml de cultivo en un tubo eppendorf, a 10000 g por dos minutos. El precipitado fue resuspendido en TELT "buffer" (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 62,5 mM EDTA; 0,4% v/v Tritón X-100;

2,5 M LiCl). Se agregó a la mezcla lisozima (1 mg/ml final) dejándola 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó a 100°C durante 2 minutos, se enfrió 5 minutos en hielo y se centrifugó a 12000 g tomándose el sobrenadante que se precipitó con 0,6 volúmenes de isopropanol. Una vez resuspendido el ADN se agregó RNAsa A (50 µg/ml final) efectuándose luego una extracción con 1 volumen de fenol, seguidas de varias extracciones con 1 volumen de cloroformo. Se precipitó el ADN plasmídico llevando la fase acuosa resultante a 0,3 M final de AcNa con 2 volúmenes de etanol 95%, 30 minutos a -70°C. El ADN se resuspendió en 40 µl de agua bidestilada.

Cuando se requirió una gran cantidad de ADN plasmídico y con alto grado de pureza, se utilizó el método de lisis alcalina en gran escala, seguido de una centrifugación en gradiente de CsCl (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989).

### **3- Purificación de ARN de tripanosomas**

ARN celular total de epimastigotes y tripomastigotes (cepa CA-I/72) se purificó por el método de urea-ClLi (Auffray y Rougeon, 1980). ARN poli (A)<sup>+</sup> fue purificado del ARN total por cromatografía en oligo(dT) celulosa (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989). El ARN fue tratado con glioxal, fraccionado por electroforesis en geles de agarosa 1.2% (5 µg por calle aproximadamente) y transferido a filtros de nitrocelulosa en las condiciones descriptas luego.

### **4- Métodos electroforéticos de ácidos nucleicos**

#### **a-Electroforesis en geles de agarosa**

Los fragmentos de ADN fueron fraccionados en geles de agarosa horizontales de distintos porcentajes, de acuerdo a su tamaño: geles 0,8% para fragmentos de 10 a 0,8 kpb, geles 1,2% para fragmentos de 6 a 0,4 kpb y geles 2% para fragmentos de 3 a 0,1 kpb (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989). Las condiciones de corrida fueron 4-5 Volts/cm durante 2-3 horas. A cada muestra se le agregó 0,1 volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 5% (p/v) y naranja G 2% (p/v). Se utilizó como "buffer" de electroforesis Tris-borato 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2,5 mM pH 8,3 con bromuro de etidio (0,5 µg/ml final) tanto en el gel como en el "buffer". El ADN fue visualizado por la fluorescencia inducida por la luz U.V. en el bromuro de etidio intercalado. Los geles se fotografiaron por transiluminación con luz ultravioleta.

Se utilizaron como marcadores de peso molecular, ADN del fago φX 174 digerido por la endonucleasa de restricción HaeIII y ADN del fago λ digerido por HindIII.

#### **b-Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes**

Los geles que se utilizaron fueron 6% (acrilamida:bisacrilamida, 19:1), 7 M urea. Se precorrió el gel durante 30 minutos a 55 W constantes, en una solución TBE 1X pH 8,6. A las muestras se les agregó "buffer" de siembra (formamida deionizada 100% (v/v), EDTA 10 mM,



azul de bromo fenol 0,3% (p/v) y xylen cianol). Se las calentó 3 minutos a 95°C, se sembraron y se corrieron en las condiciones antedichas. Cuando la electroforesis finalizó, la placa de vidrio con el gel se sumergió durante 10 minutos en ácido acético al 10 % para su fijación. Luego se transfirió a un papel de Whatman 3 MM y se secó al vacío durante una hora a 80°C. Finalmente, el gel se expuso con películas sensibles Kodak X-OMAT a temperatura ambiente toda la noche.

### c-Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Con el objeto de purificar solamente el, o los fragmentos de ADN de interés, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa. Luego de cortar la banda correspondiente del gel (visualizándola con luz ultravioleta), se procedió a eluirla del mismo por el método de GEN CLEAN<sup>®</sup> siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello se colocó el bloque del gel conteniendo la banda correspondiente al inserto de ADN de interés en una solución 4 M de NaI y se incubó a 50°C durante 5 minutos, para fundir la agarosa. Se agregó entonces la suspensión de "GLASSMILK"<sup>®</sup> en una relación de 1 µl de solución por µg de ADN incubándose por 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó la suspensión conteniendo el ADN unido al "GLASSMILK"<sup>®</sup> y luego se lavó tres veces. Finalmente se eluyó el ADN en 10 µl de agua. El fragmento obtenido, posee el grado de pureza necesario para su ligación.

## **5- Digestiones enzimáticas de ácidos nucleicos**

### a-Digestiones totales de ADN con endonucleasas de restricción

Se hicieron digestiones totales con endonucleasas de restricción, siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Se utilizaron 5 unidades de enzima por µg de ADN. En términos generales, las incubaciones se realizaron durante 2 horas a 37°C en el siguiente "buffer": 25 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µg/ml BSA, 2 mM β-ME y diferentes concentraciones (de 0 a 150 mM) de NaCl, de acuerdo a los requerimientos de la enzima utilizada.

### b-Digestiones parciales de ADN con endonucleasas de restricción y detección por marcado de un extremo terminal

Se digirieron 500 ng de los plásmidos recombinantes 41 y 42, con la endonucleasa de restricción BamHI, que corta en un único sitio en el inserto, cercano a un extremo del mismo. De esta forma, quedaron moléculas de ADN con sus extremos 5' protruyentes, que se rellenaron por la técnica de "filling" (Drouin, 1980). En el "buffer" de la digestión, se agregaron 20 µCi de α<sup>32</sup>P dATP (3000 Ci/mmol), 2 nmoles de dGTP (en este caso el único nucleótido necesario para completar la marcación) y 5 unidades del fragmento "Klenow" de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se inactivó a la enzima, 10 minutos a 70°C. Finalmente se digirió con la endonucleasa de restricción PstI en el "polylinker" del plásmido. Así se

obtuvo el inserto marcado en un extremo y el plásmido en el otro, procediéndose a purificar de gel de agarosa, el fragmento de interés. El inserto purificado y marcado en un extremo fue preincubado durante 10 minutos a 37 °C. Luego se agregaron 4 unidades de la endonucleasa de restricción RsaI, tomando alícuotas a los siguientes tiempos: 30 segundos, 1, 5, 10 y 30 minutos. Cada alícuota se mezcló con EDTA (50 mM final) para detener la reacción. Paralelamente se efectuó una digestión total del ADN por la misma endonucleasa de restricción. Todas las muestras correspondientes a los diferentes tiempos, se corrieron en una electroforesis en gel horizontal de agarosa. Una vez finalizada la misma, se sumergió el gel en una solución de ácido acético 10% v/v durante 20 minutos con el fin de fijar las bandas. Finalmente el gel fue secado al vacío y los fragmentos resultantes de la digestión parcial se visualizaron por autorradiografía.

### c-Digestiones de ácidos nucleicos por las nucleasas Bal 31 y S1

Con el objeto de digerir de ADN utilizando la nucleasa Bal 31, se incubaron 30 µg de ADN genómico del clon CA-I/72 de *T. cruzi*, con 2 unidades de Bal 31, a 30°C en un volumen final de reacción de 30 µl. A los tiempos 0, 1, 5, 20 y 30 minutos se tomaron alícuotas, donde la reacción se detuvo inmediatamente con el agregado de EGTA (20 mM final). Luego se digirieron las muestras de ADN así tratadas por la endonucleasa de restricción PstI y se analizaron en geles de agarosa transferidos a nitrocelulosa e hibridizados con sondas radiactivas como describiremos en los próximos puntos (Southern, 1975). La efectividad de la digestión por la nucleasa Bal 31 fue estimada por la disminución en los tamaños de los fragmentos de ADN del fago λ, digerido previamente por la enzima de restricción HindIII, incluidos en la muestra de ADN de *T. cruzi*.

Para los experimentos realizados utilizando la nucleasa S1, se mezclaron 20 ng de la sonda doble cadena fría, con 10 µg de ARN total de tripomastigote en 25 µl finales de reacción en el "buffer" S1 descrito por Berk y Sharp (Berk y Sharp, 1977). La mezcla se calentó a 85°C por 10 minutos y luego se renaturalizó por tres horas a 63°C. Las muestras se diluyeron con 250 µl de "buffer" S1 y se digirió a temperatura ambiente por una hora con nucleasa S1 (200U/ml).

## **6- Identificación de secuencias de ADN por hibridización**

### **a-Identificación de colonias recombinantes**

En algunos casos de clonado en plásmidos, se utilizó el método de hibridación "in situ" para la búsqueda del clon que contenía el inserto con la secuencia deseada (Grunstein y Hogness, 1975). Se hicieron réplicas en filtros de nitrocelulosa y éstos se hibridaron con las sondas para localizar los clones de interés. Las placas con colonias de 1-2 mm de diámetro, se incubaron 30 minutos a 4°C y luego se procesaron. Se colocaron filtros de nitrocelulosa marcados asimétricamente sobre el agar y en contacto con las colonias, hasta que estuvieron completamente húmedos. Se transfirieron las marcas a la base de la cápsula de Petri. Los filtros, con las colonias hacia arriba, se apoyaron

3 minutos sobre un papel de filtro embebido en 10 % de SDS para lisar las bacterias. Luego se apoyaron 5 minutos sobre un segundo papel de filtro embebido en NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M para desnaturalizar el ADN. A continuación, se apoyaron 5 minutos sobre un papel de filtro embebido en Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0), NaCl 1,5 M para su neutralización. Se lavaron los filtros de nitrocelulosa 15 minutos en 2 X SSC. Se secaron a temperatura ambiente y se calentaron 2 horas a 80°C. La hibridización de los filtros se describe en los próximos puntos. Luego se expusieron con películas autorradiográficas. Se transfirieron las marcas asimétricas a las películas y estas marcas se alinearon con las marcas de la cápsula de Petri original para localizar los recombinantes positivos. Se tomaron colonias positivas, para preparar ADN plasmídico.

#### **b-Transferencia a filtros de nitrocelulosa**

Luego de la corrida electroforética, los geles de agarosa fueron fotografiados y sometidos a tratamiento alcalino durante 30 minutos en 0,5 M NaOH y 1,5 M NaCl que desnaturaliza "in situ" el ADN. Luego se neutralizaron en 0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los geles se colocaron sobre un papel de filtro Whatman 3MM en contacto con el "buffer" de transferencia (20X SSC: 3M NaCl, 0,3 M citrato de Na pH 7,0). Sobre los mismos se colocó el filtro de nitrocelulosa, previamente embebido en 2X SSC y sobre éste dos hojas de Whatman 3MM también embebidos previamente en 2X SSC. A continuación, se colocaron varias capas de papel absorbente y un peso de 0,5 Kg. El conjunto se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente se lavó el filtro en 2X SSC y se calentó a 80°C durante 2-3 horas. Los pasos desarrollados, corresponden a la técnica de Southern (Southern, 1975).

#### **c-Marcación radiactiva de sondas específicas de ADN por el método de "nick-translation"**

Las sondas empleadas fueron marcadas radiactivamente con dNTPs  $\alpha$   $^{32}\text{P}$ , "in vitro" según el método de Rigby y colaboradores (Rigby y col., 1977) obteniéndose actividades específicas de  $10^7$  cpm/ $\mu\text{g}$  de ADN. Se utilizaron 50 ng de ADN, que luego fue separado del nucleótido libre pasando la mezcla de reacción a través de una columna (9 X 90 mm) de Sephadex G-50, equilibrada con TE y saturada con ADN de esperma de salmón. Se desnaturalizó la sonda por calentamiento 5 minutos a 98°C y se utilizó para la hibridización.

#### **d-Hibridización de filtros de nitrocelulosa con sondas radiactivas. Autorradiografías**

Se utilizó esta técnica para la identificación de secuencias homólogas a una sonda determinada (Southern, 1975). Los filtros de nitrocelulosa provenientes ya sea de la transferencia de un gel o el levantamiento de colonias recombinantes, fueron prehibridados durante 2 horas a 62°C en una mezcla conteniendo 3X SSC, 5X Denhart [100X Denhart= Ficoll 2% (p/v), polivinilpirrolidona 2% (p/v), albúmina sérica bovina 2% (p/v)], ADN de esperma de salmón 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , SDS 0,1% (p/v). La hibridización se llevó a cabo agregando a la mezcla anterior la sonda radiactiva, previamente

desnaturalizada durante 10 minutos a 100 °C. Se incubó toda la noche a 62°C con agitación suave. Las condiciones de lavado fueron: 0,1X SSC, 0,1% (p/v) SDS, a 62°C con agitación suave (3 lavados de 45 minutos cada uno). Las autorradiografías se realizaron exponiendo los filtros con películas Kodak X-Omat S y pantallas intensificadoras por diferentes períodos.

## **7-Secuenciación de ADN**

Los clones de pUC19, se secuenciaron siguiendo básicamente el método de terminación de cadena descrito por Sanger y colaboradores. (Sanger y Coulson, 1975; Sanger, Nicklen y Coulson, 1977; Sanger y Coulson, 1978).

### **a-Desnaturalización del ADN**

Se tomaron entre 2 y 5 µg de ADN plasmídico, el cual fue desnaturalizado por el agregado de una solución 0,2 M NaOH, 0,2 mM EDTA, final, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, fue precipitado con 0,3 M final de Acetato de Na pH 5 y 2,5 volúmenes de etanol 95% durante 5 minutos a -70 °C y centrifugado 10 minutos a 12.000 g. Se lavó el precipitado con etanol 70% y se resuspendió en 8 µl de "buffer" TE 0,25 X (TE 1X pH 7,6:10 mM Tris-Cl pH 7,6; 1 mM EDTA pH 8,0).

### **b-Hibridización del primer**

A la solución anterior se le agregaron 12 ng del primer y se incubó 10 minutos a 37°C.

### **c-Reacciones**

Después de la hibridización del "primer", se agregó una mezcla conteniendo 20 µCi de  $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP (500 Ci/mmol), Klenow "buffer" (para concentración final 1 X) y 5 unidades del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (en un volumen de 6 µl), incubándolo 5 minutos a 37°C. La solución luego se dividió en 4 porciones en los tubos marcados como A, C, T, G, (3 µl en cada uno). A cada tubo se le agregó 2 µl de la mezcla de secuencia de cada nucleótido respectivamente, incubándolos durante 20 minutos a 37°C. Finalizada la misma se agregaron a cada tubo 2 µl de la solución "chase" y se incubó nuevamente 20 minutos a 37°C. Antes de sembrar en el gel, se agregó "buffer" de siembra y se incubó la muestra a 95°C durante 3 minutos.

Alternativamente se utilizó como fuente de reactivos y enzima, la versión 2 del "DNA Sequencing Kit: SEQUENASE®".

## **8- Técnica de PCR y sus aplicaciones**

### **a-Búsqueda por PCR de diferentes 5' de genes de la familia SAPA-Trans-sialidasa**

Las reacciones de PCR ("Polymerase chain reaction") se realizaron a partir de ADN de una

genoteca de *T. cruzi* (cepa: clon Miranda/76) realizada en el fago  $\lambda$ gt11 (Ibañez, Affranchino y Frasch, 1987). Se utilizó el siguiente "buffer": 10mM KCl, 10mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20mM Tris-HCl, pH 8,8, 2mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1% Tritón X-100, al cual se agregaron 0.20 mM de c/u de los dNTPs, 300 ng de cada "primer" y 2 unidades de Taq DNA polimerasa. Se utilizaron como "primers" un oligonucleótido específico complementario a la región conservada entre las secuencias de ADN de SAPA y TCNA correspondiente a la posición 391 del primero (5' ACTGTGGGATCCACCACACG 3'), al que llamaremos oligonucleótido interno 391 y los "primers" comerciales del fago  $\lambda$ gt11 ("Forward" y "Reverse") combinados independientemente con el oligo específico. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización del ADN 5 minutos a 93°C y luego 35 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 93°C, 30 segundos de renaturalización 65°C y 3 minutos de extensión a 72°C. Luego se completó la extensión 10 minutos a 72°C. A partir de ARN purificado del estadio tripomastigote, ADN copia fue sintetizado mediante la enzima transcriptasa reversa (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989) utilizando el oligonucleótido interno 391 y luego amplificado por PCR con este mismo "primer" y otro con la secuencia del miniexón de *T. cruzi*, siguiendo el mismo esquema de amplificaciones descrito anteriormente.

#### **b-Clonado y secuenciación de los productos de PCR**

Las diferentes bandas fueron purificadas a partir de una electroforesis horizontal en gel de agarosa. Luego se clonaron en el plásmido pUC19 y se secuenciaron según el método de Sanger (Sanger y Coulson, 1975) como se detalló anteriormente.

#### **c-Amplificación de fragmentos que contienen al extremo 5' de los diferentes genes de la familia SAPA-Trans-sialidasa en diferentes cepas de *T. cruzi***

Utilizando el oligonucleótido interno 391 (5' ACTGTGGGATCCACCACACG 3') y un "primer" que comienza en el codón ATG propuesto para la metionina del gen SAPA (5' ATGGGGAGGACAGTCGTCGGGGCC 3') se amplificó por la técnica de PCR el fragmento de 391 pb comprendido entre esos oligonucleótidos a partir de ADN extraído de las cepas Y, Tulahuen y RA y de los clones de parásitos Dm28c y CA-I/72. Las condiciones de la reacción y los ciclos de amplificación son los mismos que se indican en el punto anterior.

#### **d-Corte con endonucleasas de restricción de los productos de PCR**

Las muestras fueron diluidas al tercio, en el "buffer" para la endonucleasa de restricción AluI, digeridas durante 3 horas y visualizadas en geles horizontales de agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio, a través de luz ultravioleta.

## PROTEINAS

### 1- Electroforesis de proteínas, transferencia y reacción con sueros

Se prepararon las muestras proteicas de diferentes orígenes, resuspendiendo las mismas en una solución de DTT 1,5%, SDS 1%, Tris-ClH (pH 6.8) 80 mM, glicerol 10% y azul de bromofenol 2%. Este extracto fue calentado a 100°C durante 4 minutos y centrifugado 2 minutos 13000 g. El sobrenadante fue fraccionado por electroforesis en geles de poliacrilamida 7,5 o 10%, dependiendo de la resolución buscada, con SDS 0,1%. Se sembraron de 1 a 10 µg de proteínas por calle de acuerdo al origen de las muestras (Laemli, 1970).

Los geles fueron electrotransferidos a filtros de nitrocelulosa (Burnette, 1981), los cuales se hicieron reaccionar con sueros y anticuerpos siguiendo el procedimiento descrito en Ibañez, Affranchino y Frasch, 1987.

### 2- Purificación de los antígenos SAPA

Se obtuvieron sobrenadantes de cultivo de células Vero infectadas con la cepa RA de *T. cruzi*, con actividad de trans-sialidasa (ya que la enzima es liberada al medio). Utilizando una columna de afinidad con anticuerpos contra las repeticiones del antígeno SAPA unidos a Sepharosa 4B se purificaron parcialmente el conjunto de proteínas nativas, de la familia SAPA/Trans-sialidasa. La elución se realizó a pH 11 y se colectaron fracciones de 1 ml.

Como medida alternativa al pasaje por una columna de afinidad de anticuerpos contra las repeticiones del antígeno SAPA, para purificar el mismo, se optó por inmunoprecipitarlo. De esta forma se evitó la acción de pH extremos, sales u otras alternativas para el despegado de la columna que pudiesen dañar la actividad de la enzima nativa. Se utilizó un suero policlonal específico contra el dominio repetitivo (Affranchino y col., 1989) y un anticuerpo monoclonal que reconoce las unidades repetitivas exclusivamente (Leguizamón y col., 1991).

### 3- Secuenciación de los antígenos purificados

Las fracciones con actividad de trans-sialidasa (medida como se indica posteriormente), eluidas de la columna de afinidad a pH alcalino, se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (7.5%) y luego se transfirieron a filtros de nitrocelulosa para confirmar la presencia de las unidades repetitivas que caracterizan los antígenos SAPA por detección inmunológica. Paralelamente también se realizó una transferencia a membranas PVDF ("polyvinylidene difluoride") para secuenciar los N-terminales de las proteínas. Se detectaron 6 bandas entre 140 y 220 kDa en el "western blot" utilizando anticuerpos contra las repeticiones (ver figura 7). Cada una de estas bandas se cortó de la membrana de PVDF (transferida en paralelo), luego de ser teñida por la técnica de "Coomasie Blue" (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989), con el objeto de secuenciarlas en

un secuenciador de "Applied Biosystems" modelo 470 A. Unicamente la banda número dos (ver figura 7) no pudo secuenciarse.

#### **4- Cinética de liberación de antígenos SAPA unidos a la membrana por un anclaje del tipo glicofosfatidilinositol**

La forma tripomastigote fue crecida en cultivo de células Vero, siendo los parásitos ( $25 \times 10^6$ ), lavados e incubados a 37°C con 0,1 U de fosfolipasa C fosfatidil inositol-específica de *B. thuringiensis* (Schenkman, Yoshida, y Cardoso de Almeida, 1988). El tratamiento se realizó por períodos de 0, 2 y 4 horas. Paralelamente se sometieron parásitos a estas incubaciones pero sin el tratamiento enzimático. El producto (25 µl) se analizó en geles 7,5% transferidos a un filtro de nitrocelulosa y detectado inmunológicamente con anticuerpos dirigidos contra el dominio repetitivo de la proteína SAPA recombinante y luego reaccionado con proteína A  $^{125}\text{I}$ .

#### **5- Obtención de sueros policlonales contra proteínas de fusión**

El esquema de inmunización utilizado para inyectar a los conejos se llevó a cabo en dos etapas: una primera dosis de 100 µg de proteína recombinante purificada, emulsionada con adyuvante completo de Freund, a los 15 días una segunda dosis con la misma cantidad de proteínas pero esta vez emulsionada con adyuvante incompleto de Freund. A los quince días de aplicada la segunda dosis, se sacó sangre de la oreja para determinar la presencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína recombinante inoculada.

### **ENSAYOS ENZIMATICOS**

#### **1- Ensayos de neuraminidasa**

Se determinó la actividad de neuraminidasa utilizando como fuente de enzima lisado de tripomastigotes y los precipitados o sobrenadantes, de las inmunoprecipitaciones con los anticuerpos que reconocen las unidades repetitivas. Los mismos fueron incubados con 0,52 mM MU-NANA (2'-(4-methylumbellifery)-N-acetil ácido neuramínico) como sustrato de la enzima. Las reacciones se llevaron a cabo en PBS (pH: 7,4), 0,1% Tritón X-100, 1 mM PMSF y 0,5 mM TLCK, durante dos horas a 37°C (Cavallesco y Pereira, 1988). Se detuvo la reacción por el agregado de glicina 100 mM (pH: 10,5). La fluorescencia se midió en un espectrofotómetro de fluorescencia Jasco (Excitación: 366 nm; emisión: 448 nm).

#### **2- Ensayos de trans-sialidasa**

Se realizó una incubación en 50 µl de "buffer" 50 mM PIPES pH: 7,0 y como molécula marcada, aceptora de ácido siálico, se utilizó [galactosa  $^{14}\text{C}$ ]-N-acetil-lactosamina (285 Ci/mol). Se utilizaron

diferentes sustratos como dadores de ácido siálico: 2 mM sialil-lactosa, 2 mM lactosa, 2 mM N-acetil-ácido neuramínico, 0,5 mg de fetuina, 0,5 mg de ácido colomínico, 0,8 mM MU-NANA. Se utilizaron las mismas preparaciones enzimáticas que en el punto anterior (10 µl). Luego se incubaron las respectivas muestras 45 minutos a 37°C, se diluyeron en 1 ml de agua y se sembraron en una columna de 0,5 X 3 cm de QAE-Sephadex A-25. Las mismas fueron lavadas con 3 ml de agua y se cuantificó la marca eluída con 1,5 ml de formiato de amonio.

### **PROGRAMAS DE ANALISIS DE SECUENCIAS**

Las secuencias comparadas se obtuvieron directamente del sistema GenBank<sup>®</sup> Copyright 1993 DNASTAR.

Las secuencias se compararon utilizando el sistema LASERGENE<sup>®</sup> para computadoras Macintosh.

Los análisis de secuencia fueron realizados con el programa DNA STRIDER.



## **BIBLIOGRAFIA**

- Abalos, J. W. (1972) Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas p. 347.
- Abbott, W. M. y Feizi, T. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 5552.
- Affranchino, J. L., Ibañez, C. F., Luquetti, A. O., Rassi, A., Reyes, M. B., Macina, R. A., Åslund, L., Petersson, U. y Frasch, A. C. C. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* 34: 221.
- Affranchino, J. L., Pollevick, G. D. y Frasch, A. C. C. (1991) *FEBS letters* 280: 316.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1989) In *Molecular Biology of the Cell*, Segunda edición (New York: Garland Publishing) pp. 802.
- Alves, M. J. M. y Colli, W. (1974) *J. Protozool.* 21: 575.
- Alves, M. J. M., Abuin, G., Kuwayima, V. Y. y Colli, W. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 21: 75.
- Andrews, N. N., Hong, K. S., Robbins, E. S. y Nussenweig, V. (1987) *Exp. Parasitol.* 64: 474.
- Andrews, N. W., Katzin, A. M. y Colli, W. (1984) *Eur. J. Biochem.* 140: 599.
- Araguth, M. F., Rodríguez, M. M. y Yoshida, N. (1988) *Parasite Immunol.* 10: 707.
- Araujo, F. J. y Remington, J. S. (1981) *J. Immunol.* 127: 855.
- Auffray, C. y Rougeon, F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 107: 303.
- Avila, J. L., Avila, A. y Muñoz, E. (1981) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 769.
- Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J. P. J., Sloof, P., Van Boom, J. H. y Tromp, M. C. (1986) *Cell* 46: 819.
- Berk, A. J. y Sharp, P. A. (1977) *Cell* 12: 721.
- Bontempi, E., Martínez, J. y Cazzulo, J. J. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* 33: 43.
- Borst, P. y Hoeijmakers, J. H. J. (1979) *Plasmid* 2: 20.
- Boschetti, M. A., Piras, M. N., Henriquez, D. y Piras, R. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 24: 175.
- Botelho-Chaves, L., Briones, M. R. S. y Schenkman, S. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* (en prensa).
- Boyer, H., W. y Roulland-Dussoix (1969) *J. Mol. Biol.* 41: 459.
- Brenner, Z. (1965) *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 59: 19.
- Brenner, Z. (1973) *Ann. Rev. Microbiol.* 27: 347.
- Brenner, Z., Chiari, E. y Alvarenga, N. J. (1974) *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 16: 32.
- Brenner, Z., Costa, C. A. G. y Chiari, C. (1976) *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 18: 450.
- Burnette, W., N. (1981) *Anal. Biochem.* 112: 195.
- Buschiazzo, A., Cremona, M. L., Campetella, O., Frasch, A. C. C. y Sánchez D. O. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* (en prensa).

- Campetella, O., Sánchez, D.O., Cazzulo, J.J. y Frasch, A.C.C. (1992) *Parasitol. Today* 8: 378.
- Cavallesco, R. y Pereira, M. E. A. (1988) *J. Immunol.* 140: 617.
- Cazzulo, J. J., Cazzulo Franke, M. C., Martínez, J. y Franke de Cazzulo, B. M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1037: 186.
- Chagas, C. (1909) *An. Acad. Med. Rio de Janeiro* 72: 188.
- Chagas, C. (1911) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 3: 219.
- Contreras, V. T., Morel, C. M. y Goldenberg, S. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 14: 83.
- Corden, J. L., Cadena, D. L., Ahearn, J. M. y Dohmus, M. E. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 7934.
- Corfield, A. P. y Schauer, R. (1982) En: *Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and function*, ed. Schauer, 10: 5-50. New York: Springer-Verlag.
- Couto, A. S., Zingales, B., Lederkremer, R. M. y Colli, W. (1985) *Experientia* 41: 736.
- Cross, G. A. M. (1978) *Proc. Roy. Soc. London Ser. B.* 202: 55.
- Cross, G. A. M. (1990 a) *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 1.
- Cross, G. A. M. (1990 b) *Annu. Rev. Immunol.* 8: 83.
- Cross, G. A. M. y Takle, G. B. (1993) *Ann. Rev. Microbiol.* 46 (en prensa).
- De Lang, T., Michels, P.A.M., Veerman, H.J.G., Cornelissen, A.W.C.A. y Borst, P. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 3777.
- Doyle, P. S., Dvorak, J. A., y Engel, J. C. (1984) *J. Protozool.* 31: 280.
- Dragon, E. A., Brothers, V. M., Wrightsman, R. A. y Manning, J. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 213.
- Dragon, E. A., Sias, S. R., Kato, E. A. y Gabe, J. D. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7: 1271.
- Drouin, J. (1980) *J. Mol. Biol.* 140: 15.
- Dvorak, J. A., Hall, T. E., Crane, M. S. J., Engel, J. C., Mc Daniel, J. P. y Uriegas, R. (1982) *J. Protozool.* 29: 430.
- Dvorak, J. A., Hartman, D. L. y Miles, M. A. (1980) *J. Protozool.* 27: 472.
- Engel, J. C., Doyle, P. S. y Dvorak, J. A. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 39: 69.
- Engman, D. M., Sias, S. R., Gabe, J. D., Donelson, J. E. y Dragon, E. A. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* 37: 285.
- Engman, D. M., Reddy, L. V., Donelson, J. E. y Kirchhoff, L. V. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 22: 115.
- Engstler, M., Reuter, G. y Schauer, R. (1992) *Mol. Biochem. Parasitol.* 54: 21.
- Fearon, D. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1971.

- Ferguson, M. A. J. y Williams, A. F. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57: 285.
- Frasch, A. C. C., Affranchino, J. L., Ibañez, C. F., Macina, R. A., Reyes, M. B., Camargo, M. E., Åslund, L. y Petterson. V. (1987) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 82: 238.
- Frasch, A. C. C., Cazzulo, J. J., Åslund, L. y Pettersson, U. (1991) *Parasitol. Today* 7: 148.
- Frasch, A. C. C., Reyes, M. B. (1990) *Parasitol. Today* 6: 137.
- Freeman, F., Wilson, P. L. y Kazan, B. H. (1975) *Exp. Parasitol.* 38: 181.
- Galvao-Castro, B., Sá-Ferreira, J. A. y Puinez, C. (1984) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79: 69.
- Gibson, W. C. y Miles, M. A. (1986) *EMBO J.* 5: 1299.
- González Cappa, S. M., Chiale, P., Del Prado, G. E., Katzin, A. M., Martini, G. W. de, Isola, E. D. de, Abramo Orrego, L. y Segura, E. L. (1980) *Medicina (Bs. As)* 40: 63.
- González Cappa, S. M., Katzin, A. M., Añasco, N. y Lajmanovich, S. (1981) *Medicina (Bs. As)* 41: 549.
- González, N. S., Sánchez, D. O., Frasc, A. C. C. y Algranati, I. D. (1984) *Mol. Cell. Biochem.* 63: 157.
- Grunstein, M. y Hogness, D. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 3961.
- Hall, B. F., Webster, P., Ma, A. K., Joiner, K. A. y Andrews, N. W. (1992) *J. Exp. Med.* 176: 313.
- Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166: 557.
- Harth, G. Haidaris, C. G. y So, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8320.
- Henriksson, J., Åslund, L., Macina, R. A., Franke de Cazzulo, B., Cazzulo, J. J., Frasc, A. C. C. y Pettersson, U. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 42: 213.
- Hoare, C. A. (1964) *J. Protozool.* 11: 206.
- Hofflin, J. M., Sadler, R. H., Araujo, F. G., Page, W. E. y Remington, J. S. (1987) *Trans. R. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 81: 437.
- Hoft, D. F., Kim, K. S., Otsu, K., Moser, D. R., Yost, W. J., Blumin, J. H., Donelson, J. E. y Kirchhoff, L. V., (1989) *Infect. Immun.* 57: 1959.
- Ibañez, C. F., Affranchino, J. L. y Frasc, A. C. C. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 25: 175.
- Ibañez, C. F., Affranchino, J. L., Macina, R. A., Reyes, M. B., Leguizamón, M. S., Camargo, M. E., Åslund, L., Pettersson, U. y Frasc, A. C. C. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* 30: 27.
- Jancik, J. M., Schauer, R., Andres, K. H. y von During, M. (1978) *Cell. Tiss. Res.* 186: 209.
- Kahn, S., Colbert, T.G., Wallace, J.C., Hoagland, N.A. y Eisen, H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4481.
- Kahn, S., Kahn, M., Van Voorhis, W. C., Goshorn, A., Strand, A., Hoagland, N., Eisen, H. y Pennathur S. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* 60: 149.
- Katzin, A. M. y Colli, W. (1983) *Biochim. et Biophys. Acta* 727: 403.

- Kemp, D. J., Coppel, R. L. y Anders, R. F. (1987) *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 181.
- Ketteridge, D. (1975) *Acta Trop.* 32: 173.
- Kipnis, T. L., David, J. R., Alper, C. A., Sher, A., Dias Da Silva, W. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 602.
- Kirchhoff, L. U., Engel, J. C., Dvorak, J. A. y Sher, A. (1984) *Mol. Biochem. Parasitol.* 11: 81.
- Kirchhoff, L. V., Gam, A. A., Gusmao, R. D. A., Goldsmith, R. S., Rezende, J. M. y Rassi, A. (1987) *J. Infect. Dis.* 155: 561.
- Kooy, R. F., Ashall, F., Van der Ploeg, M. y Overdulve, J. P. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* 36: 73.
- Kyte, J. y Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157: 105.
- Laemli, U. K. (1970) *Nature* 227: 680.
- Lafaille, J. J., Linss, J., Krieger, M. A., Souto-Padrón, T., de Souza, W. y Goldenberg, S. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* 35: 127.
- Lanar, D. y Manning, J. (1983) *J. Cell. Biochem. Suppl.* 7A 12<sup>th</sup> Annual UCLA Symposia, abstr. 0057.
- Lederkremer, R. M., Zingales, B., Confalonieri, A. N., Couto, A. S., Martin, N. F. y Colli, W. (1985) *Biochem. Int.* 7: 215.
- Leguizamón, M. S., Campetella, O. E., Reyes, M. B., Ibañez, C. F., Basombrío, M. A., Rincón, J., Orn, A., y Frasch, A. C. C. (1991) *Parasitology* 102: 379.
- Levin, M. J., Mesri, E., Benarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Chiale, P. A., Ruiz, A. M., Kahn, A., Rosenbaum, M. B., Torres, H. N. y Segura, E. L. (1989) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41: 530.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Devoux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Polzansky, G., Spragne, V., Vassa, J. y Wallace, F. G. (1980) *J. Protozool.* 27: 37.
- Macina, R. A., Affranchino, J. L., Pollevick, G. D., Jazin, E. y Frasch, A. C. C. (1989) *FEBS letters* 257: 365.
- Miles, M. A., Toye, R. J., Oswald, S. C. y Godfrey, D. G. (1977) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71: 217.
- Morel, C., Chiari, E., Plessman Camargo, E., Mattei, D. M., Romanha, A. J. y Simpson, L. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6810.
- Mortara, R. A., daSilva, S., Araguth, M. F., Blanco, S. A. y Yoshida N. (1992) *Infect Immun* 60: 4673.
- Muller, N., Hemphill, A., Imboden, M., Duvallet, G., Dwinger, R. H. y Seebeck, T. (1992) *Parasitology* 104: 111.
- Murta, A. C. M., Persechini, P. M., Souto-Padrón, T., de Souza, W., Guimarães, J. A. y Scharfstein, J. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 43: 27.
- Nairn, C. A., Cole, J. A., Patel, P. V., Parsons, N.J., Fox, J.E. (1988) *J. Gen. Micro.* 134: 3295.

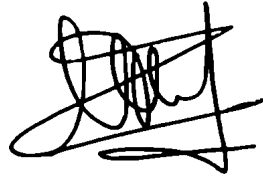
- Nogueira, N., Chaplan, S., Tydings, J. D., Unkeless, J. y Cohn, Z. (1981) *J. Exp. Med.* 153: 629.
- Nussenzweig, V. y Nussenzweig, R. (1989) *Adv. Immunol.* 45: 283.
- Nussenzweig, V., Deane, L. M. y Kloetzel, J. (1963) *Exp. Parasitol.* 14: 221.
- Opperdoes, F. R. y Borst, P. (1977) *FEBS Lett.* 80: 360.
- Orlandi, P. A., Klotz, F. W. y Haynes, J. D. (1992) *J. Cell Biol* 116: 901.
- Ortega-Barria, E. y Pereira, M. E. A. (1991) *Cell* 67: 411.
- Ouaissi, M. A. (1988) *Parasitol. Today* 4: 169.
- Ouaissi, M. A., Afchain, D., Capron, A. y Grimaud, J. A. (1984) *Nature* 308: 380.
- Ouaissi, M. A., Cornette, J. y Capron, A. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 19: 201.
- Ouaissi, M. A., Cornette, J., Afchain, D., Capron, A. Gras-Masse, H. y Tartar, A. (1986) *Science* 234: 603.
- Parodi, A. J. (1993) *Glycobiology* 3: 193.
- Passaniti, A. y Hart, G. W. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 7591.
- Pays, E. y Steinert, M. (1984) *Annu. Rev. Genet.* 22: 107.
- Pereira, M. E. A. (1983) *Science* 219: 1444.
- Pereira, M. E. A. y Hoff, R. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 20: 183.
- Pereira, M. E. A., Loureas, M. A., Villalta, F. y Andrade, A. F. B. (1980) *J. Exp. Med.* 152: 1375.
- Pereira, M. E. A., Santiago Mejía, J., Ortega Barria, E., Matzilevich, D. y Prioli, R.P. (1991) *J. Exp. Med.* 174: 179.
- Pereira, M.E.A. (1988) En: *The Biology of Parasitism*, ed. P.T. Englund, A. Sher. New York: Alan R. Liss, 105.
- Peterson, D. S., Fouts, D. L. y Manning, J. E. (1989) *EMBO J.* 8: 3911.
- Peterson, D. S., Wrightsman, R. A. y Manning, J. E. (1986) *Nature* 322: 566.
- Pinto Diaz, J. C. (1984) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79: 85.
- Piras, M. M., Henríquez, D. y Piras, R. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 22: 135.
- Pizzi, T. (1956) *Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Monografía de la Universidad de Chile.* p. 183.
- Postam, M., Mc Daniel, J. P. y Dvorak, J. A. (1983) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 497.
- Previato, J. O., Andrade, A. F. B., Pessolani, M. C. V. y Previato, L. M. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 85.
- Prioli, R. P., Mejía, J. S., y Pereira, M. E. A. (1990) *J. Immunol.* 144: 4384.

- Pritchett, T. J., Brossmer, R., Rose, U. y Paulson, J. C. (1987) *Virology* 160: 502.
- Requena, J. M., López, M. C., Jimenez-Ruiz, A., de La Torre, J. C. y Alonso, C. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 1393.
- Reuter, G., Schauer, R., Prioli, R. y Pereira M. E. A. (1987) *Glycoconjugate J.* 4: 339.
- Reyes, M. B., Lorca, M., Muñoz, P. y Frascch, A. C. C. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2846.
- Rfaiee, P., Leffler, H., Byrd, J. C., Cassels, F. J. y Boedeker, E. C. (1991) *J. Cell Biol.* 115: 1021.
- Rigby, P. W. J., Dieckman, M., Rhodes, C. y Berg, P. (1977) *J. Mol. Biol.* 113: 237.
- Roditi, I., Carrington, M. y Turner, M. (1987) *Nature* 325: 272.
- Roggentin, P., Rothe, B., Kaper, J., B., Galen, J., Lawrisuk, L., Vimr, E. R. y Schauer, R. (1989) *Glycoconjugate J.* 6: 349.
- Ruiz, A. M., Esteva, M., Cabeza Meckert, P., Laguens, R. P. y Segura, E. L. (1985) *Acta Tropica* 42: 299.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger, F. y Coulson, A. R. (1975) *J. Mol. Biol.* 94: 441.
- Sanger, F. y Coulson, A. R. (1978) *FEBS lett* 87: 107.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 74: 5463.
- Scharfstein, J., Luquetti, A., Murta, A. C. M. Senna, M., Rezende, J. M., Rassi, A. y Mendonca-Previato, L. (1985) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34: 1153.
- Schauer, R. (1985) *Trends Biochem. Sci.* 10: 357.
- Schauer, R., Reuter, G., Muhlfordt, H., Andrade, A.F.B. y Pereira, M.E.A. (1983) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364: 1053.
- Schenkman, R. P. F., Vandekerckhove, F. y Schenkman, S. (1993) *Infect. Immun.* (en prensa).
- Schenkman, S., Ferguson, M. A. J., Heise, N., Cardoso de Almeida, M. L., Mortara, R. A. y Yoshida N. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* 59: 293.
- Schenkman, S., Jiang, M. S., Hart, G. W. y Nussenweig, V. (1991) *Cell* 65: 1117.
- Schenkman, S., Kurosaki, T., Ravetch, J. V. y Nussenzweig, V. (1992) *J. Exp. Med.* 175: 1635.
- Schenkman, S., Pontes de Carvalho, L., Nussenzweig, V. (1992) *J. Exp. Med.* 175: 567.
- Schenkman, S., Yoshida, N. y Cardoso de Almeida, M. L. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* 29: 141.
- Schijman, A. G., Dusetti, M. J., Vázquez, M. P., Lafon, P., Levy-Yeyati, P. y Levin, M. J. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18: 3399.
- Schneider, A., Hemphill, A., Wyler, T. y Seebeck, T. (1988) *Science* 241: 459.
- Schofield, L. (1991) *Parasitol. Today* 7: 99.

- Skorstengaard, K., Jensen, M.S., Sahl, P., Petersen, T.E. y Magnusson, S. (1986) *Eur. J. Biochem.* 161: 441.
- Smith, D.B. y Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67: 31.
- Smith, G. P. (1976) *Science* 191: 528.
- Snary, D. (1980) *Exp. Parasitol.* 49: 68.
- Snary, D. y Hudson, L. (1979) *FEBS Lett* 100: 166.
- Southern, E. M. (1975) *J. Mol. Biol.* 98: 503.
- Souto-Padrón, T. y De Souza, W. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 814: 163.
- Souto-Padrón, T., Campetella, O., Cazzulo, J. J. y de Souza, W. (1990) *J. Cell. Sci.* 96: 485.
- Stamenkovic, I., Sgroi, D., Aruffo, A., Sun Sy, M. y Anderson, T. (1991) *Cell* 66: 1133.
- Takle, G. B. y Cross, G. A. M. (1991) *Mol. Biochem. Parasitol.* 48: 185.
- Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, A. J., Heuser, J. E. y Andrews, N. W. (1992) *Cell* 71: 1117.
- Texeira, M. M. G. y Yoshida, N. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 18: 271.
- Tibayrenc, M. y Ayala, F. J. (1988) *Evolution* 42: 277.
- Uemura, H., Schenkman, S., Nussenzweig, V. y Eichinger, D. (1992) *EMBO J.* 11: 3837.
- Van Voorhis, W. C., Schlekewy, L. y Le Trong, H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5993.
- Varki, A. (1992) *Glycobiology* 2: 25.
- Vergara, U., Lorca, M., Veloso, C., Gonzales, A., Engstrom, A., Åslund, L., Pettersson, U. y Frasch, A. C. C. (1991) *J. Clin. Microbiol.* 29: 2034.
- Vickerman, K. (1978) *Nature* 273: 613.
- von Heijne, G. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14: 4683.
- Weis, W., Brown, J. H., Cusack, S., Paulson, J. C., Skehel, J. J. (1988) *Nature* 333: 326.
- Yoshida, N., Blanco, S. A., Araguth, M. F., Russo, M. y González, J. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 39: 39.
- Yoshida, N., Mortara, R. A., Araguth, M. F., González, J. C. y Russo, M. (1989) *Infect. Immun.* 57: 1663.
- Young, R. A. y Davis, R. W. (1983) *Science* 222: 778.
- Zhang, H., Miller, R. y Rutishauser, U. (1992) *J. Neurosci.* 12: 3107.
- Zingales, B. y Colli, W. (1985) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 117: 129.
- Zingales, B., Carniol, C., de Lederkremer, R. M. y Colli, W. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 26: 135.



-Zingales, B., Katzin, A. M., Arruda, M. V. y Colli, W. (1985) Mol. Biochem. Parasitol. 16: 21.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. M. Katzin'. The letters are cursive and somewhat stylized.A handwritten signature in black ink, appearing to read 'W. Colli'. The signature is more compact and stylized than the one to its left.

**AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Carlos Frasch.

A Oscar Campetella, Roberto A. Macina y Daniel O. Sánchez.

A Alejandro Buschiazzo, Laura Cremona, Berta F. de Cazzulo, Hilda Gasparoli, Marcelo Guerin, Sergio Iglesias, Susana Leguizamón, Javier Martínez, Martín Mautner, Beatriz Reyes, Susana Salceda y Liliana Sferco.

Al Dr. Roberto O. Couso.

A los Dres. Juan J. Cazzulo, Armando Parodi, Juana Tandecarz y Rodolfo Ugalde.

A mis compañeros del I. I. B. "Fundación Campomar"

A mis padres y mi hermana.

A Alejandra.