

Tesis de Posgrado

Clonado y caracterización de antígenos de *Trypanosoma cruzi* : diagnóstico serológico diferencial de distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas

Mesri, Enrique Alfredo

1990

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mesri, Enrique Alfredo. (1990). Clonado y caracterización de antígenos de *Trypanosoma cruzi* : diagnóstico serológico diferencial de distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2346_Mesri.pdf

Cita tipo Chicago:

Mesri, Enrique Alfredo. "Clonado y caracterización de antígenos de *Trypanosoma cruzi* : diagnóstico serológico diferencial de distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2346_Mesri.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

CLONADO Y CARACTERIZACION DE ANTIGENOS DE *Trypanosoma cruzi*.
DIAGNOSTICO SEROLOGICO DIFERENCIAL DE DISTINTAS FORMAS CLINICAS
DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

ENRIQUE ALFREDO MESRI

Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas

Director: Dr. Mariano Jorge Levin

1990

Instituto de Investigaciones en
Ingeniería Genética y Biología Molecular

CONICET

Levin
- 2346 -
y. 2

*A mi esposa Susana Cook, y
a mi hijo Julián.*

*A mi padre Alfonso, y
a mi hermana Verónica.*

*A la memoria de mi madre
Frida Schläien.*

"Pero acaso podemos negarnos al pueblo y al mismo tiempo seguir siendo hombres de ciencia? Los movimientos de los cuerpos celestes son ahora mas fáciles de calcular, pero los pueblos no pueden calcular los movimientos de sus señores. La lucha por medir el cielo ha sido ganada, pero las madres del mundo siguen siendo derrotadas día a día en la lucha por conseguir el pan de sus hijos. Y la ciencia debe ocuparse de ambas luchas por igual. Una humanidad que se debate entre las tinieblas de la superstición y la mentira no será capaz tampoco de dominar las fuerzas de la naturaleza que ustedes los científicos descubren y les revelan. Con que objetivo trabajan ustedes? Mi opinion es que el único fin de la ciencia consiste en aliviar la miseria de la existencia humana. Si los científicos se dejan atemorizar por los tiranos y se limitan a acumular el conocimiento por el conocimiento mismo, la ciencia se convertirá en un inválido y las nuevas máquinas sólo servirán para producir nuevas calamidades. Tal vez con el tiempo ustedes lleguen a descubrir todo lo que hay para descubrir, pero ese progreso sólo los alejará mas y mas de la Humanidad. Y el abismo entre ella y ustedes los científicos puede llegar a ser tan profundo que cuando griten de alegría por un nuevo descubrimiento, el eco les devolverá un alarido de espanto universal"

Bertolt Brecht, fragmento del monólogo final de la obra

"Galileo Galilei".

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Mariano J. Levin, por la confianza depositada en mí para la realización de esta Tesis, y participar a su lado de la etapa fundacional del laboratorio Chagás de INGEBI. Por su constante estímulo y guía en el trabajo, por su empeño y dedicación y por su compromiso constante. Por los medios que puso a mi alcance para la realización de mi trabajo de Tesis, por su rol fundamental, en el consenso y en el disenso, de esta etapa tan importante de mi formación científica.

Al Dr. Héctor N. Torres, por la oportunidad que me brindó al permitirme desarrollar mi Tesis en INGEBI, por ser constante guía y referencia en mi trabajo, por el apoyo brindado en todo momento. A la Dra. Mirta M. Flawia, por su constante e incondicional apoyo y estímulo, por el aporte de las materias de Doctorado por ella coordinadas en mi formación científica,

A Richard Benarous por su inapreciable ayuda en la construcción de la biblioteca y en la enseñanza de la técnica del rastreo inmunológico. Por el apoyo y las gentilezas recibidas durante los viajes a Francia.

Al Prof Dr. Guillermo Dighiero Director de la Unité d'Immunohe-matologie et Immunopatologie del Instituto Pasteur, París, por su gran gentileza al ofrecerme desinteresadamente su laboratorio y todos los medios necesarios para desarrollar el proyecto de mapeo antigénico. Por su constante estímulo, guía y consejo durante el trabajo realizado en su laboratorio, y por la ayuda prestada en la elaboración de los trabajos para su publicación. A Cecile Monot del mismo laboratorio por la excelente ayuda y capacitación técnica recibida con los ELISA.

Al Dr Marc H.V. Van Regenmortel del Laboratoire d'Immunochimie del Institut de Biologie Moleculaire et Cellulaire, Strasbourg, por todas las gentilezas recibidas durante mi estadía en Strasbourg, por la importante ayuda y asesoramiento brindado en el proyecto de mapeo antigénico y la síntesis de los péptidos sintéticos. Por su entusiasmo, su colaboración en la elaboración de los trabajos y su apoyo constante. Al personal de Neosystem, Strasbourg por la capacitación recibida y la ayuda prestada en la síntesis química de péptidos.

Al Dr Pablo Chiale, el Dr Mauricio Rosebaum y todos los médicos del Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía por el excelente trabajo realizado en la caracterización clínica de los pacientes y por su contribución indispensable y constante a nuestro trabajo a través de críticas, discusiones y sugerencias.

A Alberto R. Kornblihtt por sus valiosos aportes a mi formación científica y docente. Por sus consejos, su entusiasmo y su amistad. A la Dra María Teresa Tellez Iñon, por la oportunidad profesional brindada al invitarme a colaborar en sus trabajos. A Gerardo Glikin por su amistad y su paciencia. A Carmen Sanchez de Rivas, por su apoyo y su ayuda con el operón lac.

A Alejandro Paladini por su inapreciable ayuda y constante asesoramiento en el manejo de la computadora y otros equipos de INGEBI y, por que no decirlo, por la paciencia que me tuvo.

A mi amigo y compañero Alejandro Schijman por todos los buenos momentos compartidos, y por su apoyo y comprensión en los "no tan buenos". Por el trabajo con los primeros clones y la ayuda con los southernns y la caracterización genética. A mi amigo Reinaldo Rossi por su ayuda en el trabajo, su apoyo y comprensión.

A Gabriela Levitus por su colaboración en la caracterización genética de los clones, y controles de los péptidos, y sus aportes a la discusión. A Patricia Levy-Yeyati por su colaboración con la secuenciación. A Sonia Lafon por su excelente trabajo con los sueros de pacientes y los blots. A Dan Kaplan por su colaboración y su amistad.

A las varias generaciones de compañeros de INGEBI que conocí durante este trabajo. A Guillermo Taccioli por su amistad y por haberme "traído" al INGEBI, a Raúl Andino, Clara Rubinstein, Valentina Carricarte, Gabriel Aisemberg, Daniel Altschuler, Claudio Eisenschloss, Rita Ulloa y Alejandra Mandel. A Alejandro Gutman, Erich Grotewold, Leo Erijman, Jorge Muschietti, Malala Gomez, Graciela Bianchini, Javier Cáceres, Mercedes Goin, Bettina Orman, Viviana Bernath, Facundo Batista, Gustavo Pesce, Fernando Bravo, Pablo Ravinowicz, Laura Moratinos, Omar Coso y Andrés Muro. Por los buenos momentos compartidos, toda la ayuda y el apoyo recibido en todo momento, y esencialmente por ser muy buenos compañeros.

A mi amigo Norberto Serpente, por ser un ser humano ejemplar, y un modelo de vida y de lucha.

Al los Dres Elsa L. Segura, Andrés Ruiz, Ernesto de Titto y J.J. Cazzullo por el importante apoyo brindado por ellos y el Instituto Fatala Chabén en los primeros años de este trabajo. A Mónica Esteva, por los parásitos, A Jacqueline Bua y Esteban Buontempi por la ayuda recibida en el trabajo con los parásitos y el trabajo en el Fatala Chabén, y su compañerismo.

A la Dra Mireille Joskowicz por sus valiosas discusiones y aportes al trabajo realizado en Francia. Al Dr. Axel Kahn, director de la U-129 INSERM, por haberme permitido trabajar en su laboratorio, y por el apoyo recibido durante el trabajo.

A Nestor Kerner y Silvia, por toda la ayuda y las gentilezas recibidas durante el trabajo en la U-129 del INSERM y el Instituto Pasteur.

A Adriana Urman por los muchísimos favores recibidos, a saber, cartas tipeadas, FAX, ayuda con el WORD processor, el Inglés, y mil otras y en especial su apoyo y estímulo constante y su simpatía. A Javier por sus tantos favores y FAX.

A Norberto Malarini, por su locura y afecto, por los gráficos y muchos otros favores. A Nene Parodi por el apoyo espiritual.

A María Julia Alvarez, Mariano Rodriguez, Norberto Contreras y Leonor Acevedo por su apoyo técnico.

Finalmente el agradecimiento mas importante a las dos personas que siempre me quisieron y apoyaron, que soportaron largas ausencias durante los viajes, que esperaron en las noches en que los experimentos no salían, que me levantaron cuando todo parecía derrumbarse, que me reclamaron, me imploraron y perdonaron. Para esas dos personas que dieron tanto por esta Tesis, mi esposa Susana y mi hijo Julián, vaya entonces mi homenaje y mi eterno agradecimiento.

APOYO INSTITUCIONAL:

El presente trabajo de Tesis ha sido realizado gracias a los aportes de los siguientes organismos:

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Convenio de Cooperación INSERM (Institut National de la santé et la Recherche Medicale, Francia)- CONICET

Programa Regional de Biotecnología para Latinoamérica y el Caribe (UNDP-UNESCO)

UNDP-Banco Mundial-Organización Mundial de la Salud, Programa Especial de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR)

Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT)-Plan Nacional de Biotecnología (PNB).

Fundación Antorchas.

INDICE DE ABREVIATURAS.

aa.....	aminoácido.
Ac/s.....	anticuerpo/s.
AcOH.....	Acido acético.
AcOK.....	Acetato de potasio.
AcONa.....	Acetato de sodio.
AcONH ₄	Acetato de amonio.
ADCC.....	Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos.
ADN.....	ácido desoxirribonucleico.
ADNc.....	ADN copia.
ARN.....	ácido ribonucleico.
ARNm.....	ARN mensajero.
BAV.....	.Bloqueo aurículo ventricular.
BCRD.....	Bloqueo completo de la rama derecha.
BIRD.....	Bloqueo incompleto de la rama derecha.
β-gal.....	β-galactosidasa.
β-EtSH.....	β-mercaptoetanol.
BOC.....	t-butoxi-carbonilo.
BPB.....	azul de bromo-fenol.
BrET.....	Bromuro de etidio.
BSA.....	Seroalbúmina Bovina.
CIC.....	Individuos con cardiopatía idiopática congestiva
ClGu.....	Cloruro de guanidinio.
d.d.....	bidestilada.
DIEA.....	Di-isopropil-etil-amina.
DMF.....	Dimetilformamida.
D.O.....	Densidad óptica.
DAB.....	Diaminobencidina.
DC.....	Doble cadena.
ADNasa.....	Desoxirribonucleasa.

DTT.Ditiotreitol.
 ECCh.....Individuos con Enfermedad cardíaca de
 Chagas crónica.
 ECG.....Electrocardiograma.
 EDT.....Etanoditiol.
 EDTA.....Etilen-diamino, tetraacetato de sodio.
 ELISA.....Inmunoensayo enzimático en fase sólida.
 EtOH.....Etanol.
 EV.....Extrasístoles ventriculares.
 gp.....glicoproteína.
 h/s.....hora/s
 HSR.....Hiper sensibilidad retardada.
 ILb.....Individuos infectados por *Leishmania*
 brasiliensis brasiliensis
 ITsC.....Individuos infectados por *T. cruzi* sin
 evidencias clínicas de daño cardíaco.
 IPTG.....Isopropil- β -D-tiogalactósido.
 i.v.....intra venoso.
 kb.....kilo bases
 KD.....Kilo Dalton
 kpb.....kilo pares de bases
 LB.....medio de cultivo Luria-Bertani.
 LB.....Linfocitos B.
 LES.....Lupus eritematoso sistémico.
 LT.....Linfocitos T.
 LT_h.....Linfocitos T coadyuvantes (CD4, L3T4)
 LT_c.....Linfocitos T citotóxicos (CD8)
 min.....minuto
 MOPS.....ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico.
 O.N.....Durante la noche.
 PAM.....Fenilacetamidometil.
 P/V.....Peso en volumen.
 PBS.....tampón fosfato salino.
 PEG.....Poli-etilenglicol.

PMSF.....fenil-metil sulfonil fluoruro.
poliA.....ácido poli-desoxi-adenosilico.
PSA.....Persulfato de amonio.
ARNasa.....ribonucleasa.
rpm.....revoluciones por minuto.
SAM.....S-adenosil-metionina.
SS.....Simple cadena
SDS.....Dodecil-sulfato de sodio.
SH.....Solución de hibridización.
SM.....Solucion de dilución de fagos λ .
SN.....Sistema nervioso.
SNC.....Sistema nervioso central.
SNP.....Sistema nervioso periférico.
SSC.....Solución citrato salina.
t.amb.....temperatura ambiente.
TAE.....*buffer* tris acetato EDTA.
TBE.....*buffer* tris borato EDTA.
TBS.....*buffer* tris salino.
TEMED.....N,N,N',N'tetrametilendiamina.
TFA.....Acido trifluoro acético.
Tris.....2 amino-2 (hidroximetil)-1,3 propanodiol.
Tul.....cepa Tulahuén de *T. cruzi*.
u.f.p.....unidades formadoras de placa.
UV.....ultra violeta.
v.c.....voltaje constante
X-gal.....5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopira-
nosido

INDICE GENERAL.

1.	<u>INTRODUCCION</u>	1
1.1.	LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	2
1.1.1.	Epidemiología	2
1.1.2.	Agente etiológico y ciclo natural de la infección	5
1.1.3.	Heterogeneidad de la población parasitaria.	8
1.1.4.	Formas clínicas de la enfermedad.	10
1.1.4.1.	Etapa aguda.	10
1.1.4.2.	Forma indeterminada	11
1.1.4.3.	Forma crónica	12
1.1.4.3.1	Anormalidades electrocardiográficas.	15
1.1.4.3.2	Historia natural de la cardiopatía chagásica	16
1.1.4.3.3	Métodos diagnósticos alternativos	17
1.1.4.3.5	Patogenia	17
1.1.5.	Modelos experimentales de la enfermedad de Chagas.	18
1.2.	RESPUESTA INMUNE A LA INFECCION POR <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.2.1	Inmunidad humoral	21
1.2.1.1.	Mecanismos de evasión del parásito a la respuesta inmune humoral	24
1.2.2.	Inmunidad mediada por células	25
1.2.2.1.	Rol de los macrófagos en la inmunidad a <i>T. cruzi</i> .	26
1.2.3.1.	Inmunopatología de la etapa aguda.	27
1.2.3.2.	Inmunopatología de la etapa crónica	29
1.2.3.2.1	Autoinmunidad mediada por células	29
	1. Modelos animales	29
	2. Experiencias con linfocitos de pacientes.	33
1.2.3.2.2	Autoinmunidad humoral.	33
	1. Anticuerpos contra músculo cardíaco, anti-EVI y anti-laminina.	34

2.	Anticuerpos contra tejido nervioso	37
3.	Antígenos de músculo y proteína p25 de <i>T. cruzi</i>	38
4.	Mecanismos efectores patológicos mediados por autoanticuerpos.	39
1.2.3.2.3	Origen de la autoinmunidad en enfermedad de Chagas: Causa o consecuencia del daño celular ?	40
1.3.	ANTIGENOS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .	46
1.3.1.	Glicoproteínas de superficie	47
1.3.1.1.	LPPG: Lipopeptidoglicano.	47
1.3.1.2.	Glicoproteínas mayores de superficie.	47
1.3.1.3.	La glicoproteína de 25 KD.	49
1.3.2.	Antígenos involucrados en Inmunoprotección	49
1.3.3.	Antígenos involucrados en la inmunopatogenia.	51
1.3.3.1	Producción de autoanticuerpos patológicos y células autorreactivas por reactividad inmunológica cruzada.	52
1.3.2.2.	Formación de inmunocomplejos.	54
1.3.2.3.	Sensibilización de tejidos del huésped.	54
1.3.2.4.	Respuesta anti-idiotípica.	55
1.3.4.	Antígenos de importancia diagnóstica	56
1.4.	DIAGNOSTICO DE LA INFECCION CHAGASICA.	59
1.4.1.	Diagnóstico parasitológico.	58
1.4.2.	Diagnóstico serológico.	58
1.5.	APLICACIONES DE LAS TECNICAS DE LA BIOLOGIA MOLECULAR Y LA INMUNOQUIMICA A LA INMUNOPARASITOLOGIA.	60
1.5.1	Clonado de expresión.	60
1.5.2.	El vector de clonado y expresión λ gt11.	61
1.5.2.1.	λ gt11 como vector de clonado: rastreo inmunológico.	63

1.5.2.2.	λ gt11 como vector de expresión	65
1.5.3.	Identificación y síntesis química de determinantes antigénicos en proteínas.	66
1.5.4.	Clonado de antígenos y otros genes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	67
1.5.4.1.	Clonado de antígenos y genes estadio-específicos.	68
1.5.4.2.	Clonado de proteínas de T. cruzi involucradas en la respuesta autoinmune.	69
1.5.4.3.	Clonado de antígenos definidos por sueros de pacientes chagásicos.	71
1.6.	OBJETIVOS Y ALCANCES DE LA PRESENTE TESIS.	73

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1.	CONSTRUCCION DE UNA BIBLIOTECA DE ADNc DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EN EL FAGO VECTOR λ gt11	76
2.1.0.	Parásitos.	76
2.1.1.	Obtención de ARN total de <i>Trypanosoma cruzi</i>	76
2.1.2	Purificación parcial de ARN mensajero: Obtención de ARN poli A+	78
2.1.3	Dosaje del ARN	79
2.1.4.	Síntesis de ADNc por el método de la ARNasa H	80
2.1.4.1.	Síntesis de la primer cadena	80
2.1.4.1.1	Desnaturalización del RNA	80
2.1.4.1.2	Síntesis	80
2.1.4.3.	Síntesis de la segunda cadena	81
2.1.5.	Metilación de los sitios EcoRI del ADNc	82
2.1.6.	Rellenado de los extremos 3' recesivos	82
2.1.7.	Ligación de polylinkers EcoRI	83
2.1.8.	Corte con EcoRI para generar extremos cohesivos	83
2.1.9.	Separación del exceso de polylinkers y fraccionamiento	

	miento por tamaño de los ADNcs	83
2.1.9.	Clonado de los ADNc en el vector λ gt11	84
2.1.9.1.	Determinación de la relación óptima de ligación inserto/brazos del vector	84
2.1.9.2.	Empaquetamiento in vitro del ADN ligado	85
2.1.9.3.	Titulación de los recombinantes	85
2.1.9.4.	Empaquetamiento en gran escala	86
2.1.10.	Amplificación de la biblioteca en λ gt11	86
2.2.	RASTREO INMUNOLOGICO DE LA BIBLIOTECA EN λ gt11	87
2.2.0.	Buffers , soluciones , medios y cepas utilizadas	87
2.2.0.1.	Medios	87
2.2.0.2.	Soluciones y buffers.	87
2.2.0.3.	Cepas bacterianas	88
2.2.1.	Sueros de humanos	88
2.2.1.1	Individuos con Lupus eritematoso sistémico	89
2.2.3.	Rastreo inmunológico de la biblioteca en λ gt11	90
2.2.3.1.	Obtención de bacterias competentes <i>Escherichia coli</i> RY1090	90
2.2.3.2.	Plaqueo de la biblioteca de λ gt11 en <i>Escherichia coli</i> RY 1090	90
2.2.3.3.	Transferencia a nitrocelulosa de las proteínas producidas por los fagos e induccion con IPTG	91
2.2.3.4	Detección inmunologica de las proteínas recombinantes	91
2.2.3.4.1	Bloqueo e incubación con el suero	91
2.2.3.4.2	Revelado inmunoenzimático de las IgG que reaccionan con las proteínas transferidas	92
2.2.3.4.3	Extraccion de fagos con senal positiva	93
2.2.3.5.	Rastreos sucesivos: purificacion de un fago positivo	94
2.2.3.6.	Amplificación de los fagos clonados	94

2.3.	RASTREO SEROLOGICO DIFERENCIAL	95
2.3.1.	Evaluación de los sueros para el rastreo inmunológico diferencial	95
2.3.2.	Rastreo inmunológico diferencial de los clones	95
2.4.	DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS POR ELISA	97
2.4.1.	Determinación del título de anticuerpos anti- péptidos y anti proteínas de fusión.	97
2.4.2.	Determinación del título de anticuerpos anti- proteínas de fusión presentes de extractos crudos.	98
2.4.2.1.	Obtención de extractos crudos de proteínas de fusión para su utilizacion en ELISA.	98
2.4.2.2.	Determinación de títulos anti-proteíanas de fusión de extractos crudos por ELISA.	98
2.4.3.	Ensayos de inhibición	98
2.5.	ELECTROFORESIS DE PROTEINAS y WESTERN BLOT	99
2.5.0.	Obtención de homogenato total de parásitos.	99
2.5.1.	Geles de poliacrilamida	99
2.5.1.1.	Tratamiento de las muestras	99
2.5.1.2.	Condiciones de corrida	99
2.5.1.3.	Tincion de los geles	100
2.5.2.	Transferencia de proteínas a nitrocelulosa: Western blotting	100
2.5.2.1.	Electrotransferencia	100
2.5.2.2.	Transferencia por peso	100
2.5.2.3.	Tinción de proteínas transferidas	101
2.6.	CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE CLONES λ GT11	102
2.6.1.	Lisogenización de bacterias E. Coli Y1089 con los	

	fagos λ gt11 recombinantes	102
2.6.2.	Producción de proteínas de fusión	103
2.6.3	Tratamiento del lisado bacteriano para electroforesis en PAGE-SDS y western blot	104
2.6.4.	Purificación de anticuerpos por afinidad utilizando proteínas de fusión	105
2.6.4.1.	Obtención de extractos de proteínas de fusión parcialmente purificados	105
2.6.4.2.	Purificación por afinidad de los anticuerpos	106
2.6.5.	Obtención de un lisado de E. coli RY 1089 lisogénica para λ gt11.	107
2.6.6.	Purificación de proteínas de fusión por inmunoafinidad	107
2.7.	SINTESIS QUIMICA DE PEPTIDOS	109
2.7.1.	Protocolo de desprotección	109
2.7.2.	Reacción de acoplamiento	110
2.8.2.	Ensayo de ninhidrina	110
2.8.3.	Corte con ácido fluorhídrico anhidro	111
2.8.4.	Purificación de los péptidos	112
2.8.5.	Análisis de la composición del péptido sintetizado	113
2.8.6.	Acoplamiento del péptido a las proteínas portadoras.	113
2.9.	METODOS DE PREDICION DE LA LOCALIZACION DE DETERMINANTES ANTIGENICOS EN PROTEINAS.	115
2.10.	METODOS ESTADISTICOS.	115
2.11.	CARACTERIZACION GENETICA DE LOS ADN CLONADOS	116
2.11.1.	Buffers, soluciones y medios de cultivo utilizados comúnmente	116
2.11.2.	Preparacion en gran escala de ADN de λ gt11	117

2.11.2.1.	Obtención de fagos purificados por ClCs	117
2.11.2.2.	Extracción del ADN	118
2.11.3.	Determinación del tamaño del inserto de ADNc	118
2.11.3.1	Extracción del inserto por digestión con EcoRI	118
2.11.3.2	Determinación del tamaño del inserto de ADNc	119
2.11.4.	Subclonado en el fago M13mp18	120
2.11.4.1.	Ligación de los insertos de ADNc al vector M13mp18/mp10	120
2.11.4.2.	Obtención de bacterias E. coli JM101 competentes	121
2.11.4.3.	Transformación de E. coli JM101	121
2.11.4.4.	Obtención de ADN simple cadena de fagos recombinantes M13	122
2.11.4.5.	Controles de subclonado	124
2.11.4.5.	1.Verificación de la presencia del inserto en SS M13 por electroforesis	124
	2.Test de complementaridad de insertos de fagos M13	124
	3.Determinación del tamaño de los insertos M13	125
2.11.5.	Obtención de sondas radiactivas monocatenarias a partir de los ADN SS de M13	125
2.11.5.1	Hibridización del M13 SS con el primer universal (annealing).	126
2.11.5.2	Primer extension, corte con EcoRI y separacion del inserto marcado por electroforesis	126
2.11.6.	Northern blot de ARN total de Trypanosoma cruzi	127
2.11.6.1.	Gel de agarosa - formaldehido	127
2.11.6.2.	Preparación de la muestra y corrida del gel	128
2.11.6.3.	Tratamiento del gel para transferencia	128
2.11.6.4.	Transferencia a GENE SCREEN PLUS	129
2.11.6.5.	Tratamiento posterior de la transferencia	129
2.11.7.	Southern blot de Trypanosoma cruzi	129
2.11.7.1.	Obtención de ADN de Trypanosoma cruzi	129
2.11.7.2.	Digestión del ADN con las enzimas de restricción	130
2.11.7.3.	Geles analíticos de agarosa 1% para Southern blot	131
2.11.7.4.	Tratamiento del gel	131

2.11.8.	Hibridización con sondas radioactivas	132
2.11.8.1.	Prehibridización	132
2.11.8.2.	Hibridización	132
2.11.9.	Secuenciación de los clones en M13 por el método de Sanger	133
2.11.9.1.	Geles de secuencia	133
2.11.9.2.	Reacciones de secuencia	133
2.11.9.3.	Condiciones para lecturas extensas	135
2.11.9.4.	Corrida de geles de secuencia	136
2.	<u>RESULTADOS</u>	137
3.1	CLONADO DE ANTIGENOS DE Trypanosoma cruzi DEFINIDOS POR ANTICUERPOS PRESENTES EN EL SUERO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD CARDIACA DE CHAGAS.	138
3.1.0.	Construcción de la biblioteca en xgt11	138
3.1.1.	Caracterización del suero.	138
3.1.2.	Resultados del rastreo inmunológico-Optimización del método	141
3.1.3.	Criterios de identidad entre clones	145
3.2.	CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LOS CLONES λ gt11	148
3.2.1.	Producción de proteínas de fusión	148
3.2.2.	Identificación de las proteínas de <i>T. cruzi</i> que contienen los epitopes clonados	151
3.3.	ESTUDIO DE DIFERENCIAS SEROLOGICAS ENTRE PACIENTES CON DISTINTAS FORMAS CLINICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS UTILIZANDO LOS ANTIGENOS CLONADOS.	153
3.3.1.	Optimización del ensayo.	154

3.3.2.	Validez del ensayo como método para el dosaje de IgGs específicas de cada antígeno recombinante.	157
3.3.3.	Resultados del rastreo serológico diferencial.	159
3.3.4.	Determinación cuantitativa de los títulos de anticuerpos hacia las proteínas de fusión por ELISA	163
3.3.5.	Comparación de la reactividad de los sueros con los antígenos clonados y los hallazgos clínicos en pacientes chagásicos.	168
3.3.6.	Capacidad diagnóstica del ensayo.	170
3.3.8.	Comparación del método de ELISA y el inmunoensayo de fagos.	171
3.4.	CARACTERIZACION GENETICA DE LOS CLONES	172
3.4.1.	Determinación del tamaño de los insertos	172
3.4.2.	Caracterización de los ARN mensajeros que codifican para los antígenos clonados	174
3.4.3.	Southern blots	174
3.4.4.	Secuenciación de los ADNc clonados y comparación de secuencias	176
3.4.5.	Homología entre la secuencia aminoacídica de JL9 y una proteína de <i>T. brucei</i> asociada a microtúbulos	186
3.4.6.	Homología entre la secuencia aminoacídica de JL8 y el antígeno S de <i>Plasmodium falciparum</i> .	186
3.4.7.	Predicción de la localización de determinantes antigénicos secuenciales en los antígenos repetitivos clonados	189
3.4.7.	Comparación de la secuencia de JL5 con la familia de las proteínas ribosomales P	193
3.4.8.	La secuencia carboxiterminal de JL5 es altamente homóloga al epítipo definido por los autoanticuerpos anti-P de Lupus eritematoso sistémico.	194
3.5.	MAPEO ANTIGENICO DE LA PROTEÍNA P RIBOSOMAL JL5 de	

<i>T. cruzi</i> CON ANTICUERPOS DE ENFERMOS DE CHAGAS y DE LUPUS	196
3.5.1. Localización de determinantes antigenicos secuenciales en JL5.	196
3.5.2. Mapeo antigénico fino del determinante antigénico de JL5 definido por el péptido R-13.	199
3.5.3. Mapeo antigenico de JL5 con sueros de Chagas y LES.	205
<u>4. DISCUSION</u>	209
4.1. DIAGNOSTICO SEROLOGICO DIFERENCIAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	210
4.2. CLONADO DE ANTIGENOS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> DEFINIDOS POR SUERO DE PACIENTES CON CARDIOPATIA CHAGASICA	212
4.3. ANTICUERPOS CONTRA LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	216
4.3.1. Determinantes antigénicos del extremo C-terminal de la proteína ribosomal P de <i>T. cruzi</i> JL5, definidos por anticuerpos de Chagas y LES	216
4.3.2. Origen de los anticuerpos anti-P en enfermedad de Chagas	220
4.3.3. Autoanticuerpos anti-P e inmunopatología.	222
<u>5. CONCLUSIONES</u>	226
<u>6. BIBLIOGRAFIA</u>	230

1. INTRODUCCION

1.1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

1.1.1. Epidemiología

La Enfermedad de Chagas-Mazza o Tripanosomiasis americana fue descrita por primera vez por Carlos Chagas (1909) quien identificó como agente etiológico de la enfermedad al protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, transmitido por insectos hematófagos de la familia de los Redúvidos . Hoy esta enfermedad es uno de los mayores problemas sanitarios de América Latina. Un informe de la Organización Mundial de la salud del año 1988, estima que 90 millones de personas habitan en la zona considerada endémica, zona de distribución de los insectos vectores de la enfermedad. De esta población expuesta a contraer la enfermedad, 20 millones están infectados (TDR, 1988).

La infección aguda dura de uno a dos meses y es generalmente asintomática; más del 90% de los infectados entra en la llamada etapa crónica de la enfermedad sin advertirlo. Un porcentaje variable de individuos infectados crónicos, del 10 al 30% dependiendo de la región, desarrollará a lo largo de su vida síntomas de daño visceral principalmente en intestino y corazón; la manifestación más frecuente de la Enfermedad de Chagas crónica es la Cardiopatía Chagásica (Rosembaum, 1964).

El área de dispersión de los insectos vectores abarca desde el sur de los Estados Unidos hasta el paralelo 42 en Sudamérica. En Argentina y gran parte del Sudamérica el insecto vector es el *Triatoma infestans* y su distribución geográfica se representa en la Figura 1 (Schofield, 1985). En Argentina estudios realizados en varones convocados para el servicio militar, permiten estimar la existencia de 2.000.000 de infectados en un área que abarca dos tercios de la superficie del país.

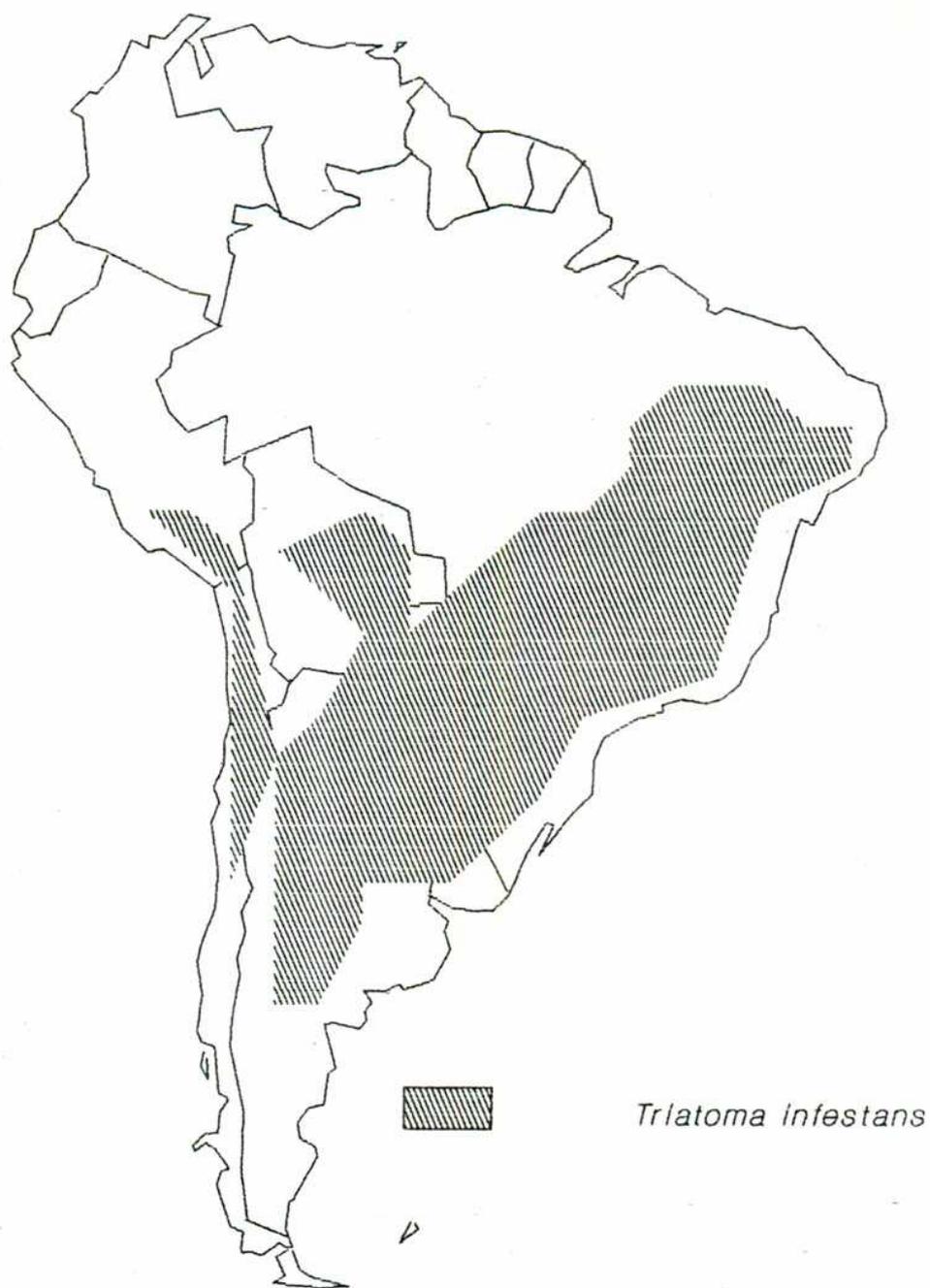


Figura 1:

Distribución geográfica del insecto vector de la Enfermedad de Chagas *Triatoma infestans*, según Schofield (1985).

La prevalencia de la infección depende tanto de factores geográficos como de factores sociales y/o culturales. Por su distribución geográfica la enfermedad de Chagas es considerada una Enfermedad Tropical. Se considera que estas, afectan regiones situadas entre ambos trópicos, donde factores climáticos y geográficos permiten el desarrollo de los vectores de diversas enfermedades infecciosas. Coincidentemente, en estas zonas viven grandes poblaciones humanas en condiciones de extrema pobreza, falta de higiene y medios sanitarios que son las principales víctimas de estas enfermedades (parasitosis, lepra, cólera, tuberculosis).

La enfermedad de Chagas es sobre todo una enfermedad rural. Los insectos vectores infectados anidan en los techos y hendiduras de las viviendas rurales precarias y se alimentan de la sangre de sus moradores, a los que transmiten el parásito. Sin embargo, debido a los procesos migratorios desde las zonas rurales hacia los centros urbanos, los habitantes de las ciudades también están expuestos a la enfermedad, siendo las transfusiones de sangre la principal vía de infección (Cerisola *et. al*, 1972).

Como toda enfermedad tropical la solución del problema del mal de Chagas involucra la búsqueda de medios terapéuticos y la posibilidad de una inmunoprofilaxis; pero requiere ante todo esfuerzos destinados a la lucha contra el vector, y por la mejora de la educación, la calidad de vida, y condiciones sanitarias de la población de las zonas endémicas (TDR, 1988). Un ejemplo de este enfoque es el del litoral del Estado de San Pablo (Brasil) donde planes adecuados de lucha contra el vector y la educación de la población han logrado interrumpir completamente el ciclo de transmisión de la enfermedad.

Los medios quimioterapéuticos disponibles son aptos para controlar la enfermedad sólo si son administrados en las primeras etapas de la infección, antes de su pasaje a la etapa crónica (Can-

cado, 1985). Siendo muy lejanas las posibilidades de una vacuna y la implementación de políticas eficientes, la enfermedad de Chagas es y puede seguir siendo un grave problema sanitario de América Latina.

1.1.2. Agente etiológico y ciclo natural de la infección

El agente etiológico de la enfermedad es el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*:

Reino: *Protista*

Phylum: *Sarcomastigophora*

Subphylum: *Mastigophora*

Clase: *Zoomastigophora*

Orden: *Kinetoplastida*

Suborden: *Trypanosomatina*

Familia: *Tripanosomatidae*

Este protozoo es durante su ciclo de vida un hiesped alternado de insectos (vectores) y de mamíferos (hiespedes). Tanto en uno como en otro tipo de hiesped su especificidad de parasitismo es baja.

Los insectos vectores pertenecen todos a la familia *Reduvidae* y a la subfamilia *Triatominae*, por el contrario *T. cruzi* puede infectar por lo menos ocho órdenes distintos de mamíferos.

En su ciclo de vida *T. cruzi* presenta distintos estadios fisiológica y morfológicamente distinguibles que se caracterizan según el flagelo (su nacimiento junto al kinetoplasto, curso intracelular y punto de donde emerge libre del citoplasma), y la posición relativa del kinetoplasto respecto del núcleo celular (Brenner 1973). En la figura 2 se esquematiza el ciclo de vida del parásito.

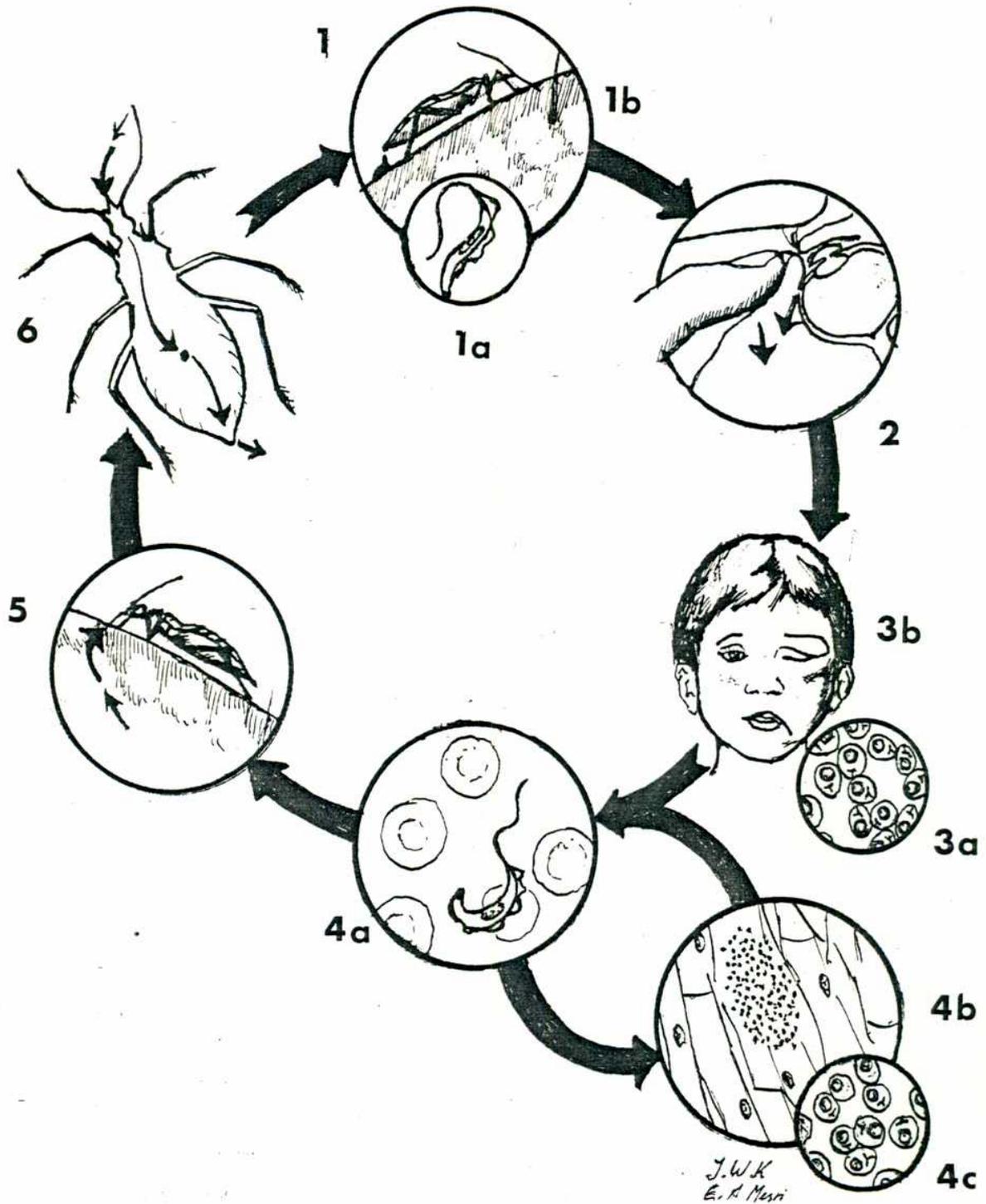


Figura 2:

Ciclo de vida del protozoo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. Ver explicaciones en el texto.

Introducción

El estadio infectivo de *T. cruzi* es el tripomastigote metacíclico (15 μm de largo, flagelo emergente desde el extremo apical posterior) (Fig 2.1a), que se acumulan en la ampolla rectal de los insectos triatominos. Estos insectos se alimentan de la sangre de animales homeotermos e inmediatamente después de alimentarse defecan, depositando en el entorno de la picadura las heces que contienen los tripomastigotes metacíclicos infectivos (Fig. 2.1b). Cuando el insecto abandona el sitio, el huésped al rascarse favorece la entrada de los tripomastigotes. Si la picadura es en las cercanías del ojo o la boca los tripomastigotes pueden infectar directamente a través de las membranas mucosas (Fig. 2.2). Otras vías de transmisión que no involucran la presencia de los insectos vectores son la infección trasplacental y las transfusiones con sangre infectada.

Los tripomastigotes que infectaron el huésped pueden parasitar todo tipo de célula, en especial macrófagos; una vez en el citoplasma de las células se diferencian a amastigote (3-5 μm y sin flagelo visible al microscopio) (Fig 2.3a). Los amastigotes intracelulares se dividen por fisión binaria.

Los amastigotes se pueden re-diferenciar en tripomastigotes sanguíneos y escapar al líquido intersticial o a la sangre destruyendo la célula huésped. Como consecuencia del daño celular en el sitio de infección pueden aparecer síntomas de inflamación; en infecciones a través de la mucosa ocular aparece el característico síndrome de Romaña (Fig. 2.3b). Los tripomastigotes circulan en el torrente sanguíneo y a través del mismo pueden alcanzar cualquier parte del organismo e invadir nuevas células, sobre todo fibras musculares lisas, estriadas o cardíacas y las células del sistema retículo endotelial (Fig 2. 4b). Aunque no parasitan neuronas, sí pueden infectar células gliales. La predilección de

ciertas cepas por la infección de determinados tipos de tejidos determina que se las clasifique en miotrópicas como la cepa CL, o reticulotrópicas (Cepa Y).

En los tejidos parasitados pueden encontrarse "nidos" de amastigotes que luego se re-diferenciarán a tripomastigotes, los que a su vez pueden infectar nuevos tejidos (Fig 2. 4a, b, c).

El ciclo de transmisión se cierra cuando los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por un reduvívulo no infectado (Fig 2.5). Dentro del tracto digestivo del insecto los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes; en el intestino medio los epimastigotes se dividen por fisión binaria y una vez que pasan a la parte final del intestino se diferencian a tripomastigotes metacíclicos infectivos (Fig 2. 6, 1a) (Brener, 1973).

1.1.3. Heterogeneidad de la población parasitaria.

La intensidad de la afección chagásica depende como en todas las parasitosis tanto de factores del huésped como del parásito. Así, se podría pensar que el curso de la infección chagásica estaría influenciado por el tipo del parásito infectante. Esto se comprobó trabajando con animales genéticamente definidos. Diferentes cepas del parásito provocaron infecciones clínicamente distintas.

Existen varias cepas de laboratorio descritas hasta el presente como son por ejemplo la Y, la CL, la Colombia y la Tulahuen; estas cepas difieren en su tropismo tisular, en la intensidad de la parasitemia, en la letalidad de la infección y en su capacidad de escape de la respuesta inmune (Brener, 1985).

La heterogeneidad de las poblaciones de *T. cruzi* ha sido explorada utilizando métodos bioquímicos y moleculares. Así pudo clasificarse a los parásitos en:

- 1- zimodemas: aquellos parásitos con un mismo perfil de isoenzimas.
- 2- Esquizodemas: aquellos parásitos que presentan el mismo perfil de digestión del DNA de su kinetoplasto con distintas endonucleasas de restricción.

A través del análisis comparativo de clones y cepas del parásito se comprobó la heterogeneidad de las cepas. Miles *et al.*, (1977) demostró que las cepas involucradas en el ciclo doméstico de la enfermedad de Chagas y el ciclo selvático pertenecen a zimodemas distintos. Determinando los esquizodemas Morel *et al.* (1986) demostraron la heterogeneidad de las cepas de laboratorio y comprobaron la diferente composición clonal de una misma cepa proveniente de laboratorios distintos.

Respecto a la asociación entre forma clínica de la enfermedad de Chagas y el zimodema del parásito infectante se verificó que parásitos pertenecientes al zimodema Z3 raramente eran encontrados en casos agudos de la enfermedad, en el caso de la enfermedad crónica la correlación con algún zimodema es bastante dudosa (Miles y Cibulskis, 1986); en un estudio epidemiológico realizado en Chile entre 107 infectados chagásicos crónicos no se pudo comprobar la asociación entre el zimodema de la cepa infectante y la prevalencia de la cardiopatía chagásica. Un estudio más reciente realizado en Bolivia mostró que no existen diferencias entre la patogenicidad de los zimodemas más frecuentemente aislados de humanos infectados indicando la inexistencia de correlación entre el zimodema infectante y la prevalencia de alguna forma clínica de la enfermedad (Bréniere *et al.*, 1989).

1.1.4. Formas clínicas de la enfermedad.

1.1.4.1. Etapa aguda.

Para la mayoría de los casos esta fase de la enfermedad es leve o inaparente, no obstante la alta parasitemia. Los individuos infectados ingresan en una etapa asintomática una vez que la parasitemia fue controlada por la respuesta inmune (Brener, 1987).

En los casos agudos, es frecuente una reacción inflamatoria en el sitio por donde se produjo la infección (Chagoma de inoculación), cutáneo u ocular (Signo de Romaña), estos signos tienen un importante valor diagnóstico considerando que los tratamientos quimioterápicos son efectivos sólo en esta etapa. También puede observarse la sintomatología la de una infección generalizada que puede incluir fiebre, irritabilidad y linfadenopatía.

Si bien durante esta etapa las formas replicativas del parásito se encuentran sobre todo en macrófagos y células gliales, tanto en casos sintomáticos como en los inaparentes, las alteraciones mas importantes ocurren en corazón (miocarditis aguda) y en sistema nervioso (meningoencefalitis). Estas lesiones estarían provocadas por la destrucción celular debida al parásito (Andrade, 1983), que darían lugar a reacciones inflamatorias (ver 1.2.3.1.). Sin embargo en varios casos de cardiopatías agudas la destrucción de tejido no resulta proporcional al número de fibras parasitadas (Rosebaum, 1964).

La inflamación focal en el miocardio tiende a ser difusa, ocurriendo necrosis lítica y hialina de fibras parasitadas y no parasitadas. Algunas estructuras como neuronas del SN parasimpático y fibras del sistema conductor del corazón no se regeneran: como consecuencia de este daño puede haber un bajo porcentaje de mor-

talidad (5% de los casos sintomáticos) (Andrade, 1983, 1985; Brener, 1987). La gravedad de estas lesiones es mayor en los pacientes de menor edad (Andrade, 1985).

A partir del momento en que el huésped monta una respuesta inmune efectiva hacia el parásito; la parasitemia disminuye y la sintomatología de la etapa aguda desaparece. La enfermedad entra en un período asintomático que puede durar varios años o toda la vida del individuo (Brener, 1987); a esta etapa de la enfermedad se la denomina forma indeterminada de la enfermedad de Chagas.

1.1.4.2. Forma indeterminada

La etapa más común de la enfermedad de Chagas es la denominada forma indeterminada. Aproximadamente de un 50 a un 70% de infectados se clasifican clínicamente en este subgrupo. La forma indeterminada cursa con serología y/o xenodiagnóstico positivo para *T. cruzi*, con examen radiológico del corazón e intestino, y electrocardiogramas normales. La presencia de desórdenes revelados por éstas técnicas es comunmente tomada como una indicación del pasaje a la fase crónica sintomática (Brener, 1987).

Para detectar precozmente las lesiones cardíacas se ha empleado la ajmalina, fármaco depresor del sistema de conducción cardíaco, que sirve para evidenciar lesiones incipientes en el sistema de conducción produciendo alteraciones en el ECG que no se manifestarían en ausencia del fármaco (Chiale *et al.*, 1982a). Con la incorporación de este tipo de técnicas y con seguimientos más prolongados de los pacientes, la tendencia ha sido de un aumento en la detección de pacientes con formas crónicas cardíacas o digestivas, y la consecuente disminución del número de individuos con una forma indeterminada "pura" (Brener, 1987).

Los hallazgos anatomopatológicos en miocardios de individuos con esta forma de la enfermedad, fallecidos por accidente, muestran focos dispersos y escasos de inflamación mononuclear, y en algunos casos aneurisma apical (Brener 1987, Andrade 1983). Por estas razones es correcto denominar a esta etapa "forma preclínica o subclínica" de la enfermedad crónica. La forma indeterminada representaría entonces un estadio evolutivo de una enfermedad de lesiones progresivas. Según esta suposición lo que determinaría que un individuo ingrese en la fase crónica con una sintomatología característica (cardiopatía chagásica, megacolon) sería la velocidad con que la enfermedad evoluciona, pudiendo ésta ser sumamente baja en algunos infectados que jamás alcanzan la fase crónica.

No obstante todo el esfuerzo realizado, no existe aún forma de predecir la evolución de la enfermedad a partir de los síntomas observados en ésta etapa.

1.1.4.3. Forma crónica

El conocimiento de esta etapa de la enfermedad presenta el mayor interés práctico con respecto al manejo de los pacientes y sobre todo al establecimiento de un pronóstico.

La evolución clínica de la etapa indeterminada o asintomática en sintomática dependería de varios factores aún no aclarados. Según estudios realizados en Bambuí (Brasil) la prevalencia de esta forma es mayor en pacientes que presentaron manifestaciones clínicas durante la etapa aguda (Pinto Díaz, 1985). Este hecho tiende a fortalecer la hipótesis según la cual la intensidad de la etapa aguda predeterminaría la posterior evolución de la enfermedad (Rosebaum, 1964; Koberle, 1968; Pinto Díaz, 1985).

La dependencia de la incidencia de esta forma de la enfermedad del área geográfica sugeriría una asociación entre la forma clínica prevalente y la variedad del parásito (Miles 1984, Morel, 1984) ,y/o con factores que determinan el estado clínico del huesped antes y durante la infección como ser clima y condiciones de vida y alimentación. Como se detalló en 1.1.3., la primera hipótesis estaría descartada dada la falta de asociación entre zimodema infectante y forma clínica de la enfermedad.

La más frecuente e importante manifestación clínica de esta etapa de la enfermedad es una severa miocarditis crónica. En 1964 Rosebaum acuñó el nombre de *panmiocarditis* para describir el hecho de que los focos inflamatorios microscópicos asociados al daño del miocardio estaban diseminados por todo el corazón (Rosebaum, 1964). La coexistencia de áreas de degeneración miocítica, infiltrados inflamatorios de células mononucleares y fibrosis sugiere la existencia de un proceso en permanente e irreversible evolución.

Dependiendo de la magnitud, localización y quizás del desarrollo a través del tiempo de los focos inflamatorios dispersos, pueden observarse una gran variedad de manifestaciones clínicas, electrocardiográficas y ecocardiográficas. Generalmente la Enfermedad cardíaca de Chagas (ECCh) se comporta como una cardiopatía congestiva, con tamaños de corazón que pueden ir desde normales a la cardiomegalia (índice cardiotorácico de 0.5 a 0.15), con modificaciones características del ECG, y que puede evolucionar hacia una insuficiencia cardíaca congestiva; sin embargo, no son infrecuentes otras formas clínicas como alteraciones severas del ECG con un tamaño normal de corazón (Chiale y Rosebaum, 1987). En la Tabla I se comparan las características fundamentales de la cardiopatía chagásica y las cardiopatías congestivas idiopáticas. Se

Tabla I: CARACTERISTICAS DE LA CARDIOPATIA CHAGASICA Y LA CARDIOPATIA CONGESTIVA IDIOPATICA.

	CHAGASICA	CONGESTIVA IDIOPATICA
<i>T. cruzi</i> SEROPOSITIVO	+	
FUNCION SISTOLICA	DISMINUIDA	SEVERAM. COMPROMET.
INSUFICIENCIA CARDIACA		
ANEURISMA VENTRICULAR		
COMPROMISO SN AUTONOMO		
DISFUNCION NODULO SINUSAL		
TRASTORNOS DE CONDUCCION	BCRD + HBA	BCRI
ONDAS Q ANORMALES	+	+/-
ARRITMIAS VENTRI- CULARES SEVERAS	+	+/-
INFILTRADOS CELULARES INFLAMATORIOS		+

BCRD: Bloqueo completo de la rama derecha, HBA: hemibloqueo de la división anterior de la rama izquierda, BCRI: Bloqueo completo de la rama izquierda.

observa que existen varias características que distinguen a la cardiopatía chagásica de otras cardiopatías congestivas (Dr. P. Chiale, comunicación personal).

1.1.4.3.1 Anormalidades electrocardiográficas.

El concepto de *panmiocarditis* explicaría las diversas anormalidades electrocardiográficas que generalmente se encuentran en las formas avanzadas de la enfermedad:

El compromiso del atrio y del nódulo sinusal puede inducir diferentes manifestaciones, como ser una severa depresión de la actividad sinusal, bloqueo sino-atrial, síndrome de taquicardia-bradicardia y fibrilación atrial (Chiale y Rosebaum, 1987). El daño del atrio puede también explicar los disturbios en la conducción intraatrial y las ondas P altamente anormales (Chiale y Rosebaum, 1987).

Los trastornos en el sistema de conducción ventricular del impulso nervioso son frecuentes; el bloqueo completo (BCRD) o incompleto de la rama derecha (BIRD) (juntos o por separado) y el hemibloqueo anterior (HBA) son las alteraciones más frecuentes del sistema de conducción (Chiale y Rosebaum, 1987).. Una mayor alteración del sistema de conducción puede llevar a distintos grados de bloqueo atrio ventricular (BAV) que invariablemente muestran anchos complejos QRS (Chiale y Rosebaum, 1987).

El daño al miocardio ventricular puede resultar en ondas Q anormales y en alteraciones primarias de la repolarización ventricular). Finalmente los extrasístoles ventriculares son también una expresión de los focos inflamatorios diseminados por el miocardio (Chiale y Rosebaum 1987).

1.1.4.3.2 Historia natural de la cardiopatía chagásica

La cardiopatía Chagásica crónica es una enfermedad en permanente evolución. En los estadios mas avanzados la ECCh lleva a la incapacidad e incluso a la muerte; generalmente como consecuencia de una insuficiencia cardíaca o por muerte súbita (Chiale y Rosembaum, 1987). En un seguimiento de diez años realizado en la localidad de Bambui (Brasil) se estudió la sobrevida en una población de 855 adultos jóvenes chagásicos crónicos con ECG normal y de 911 con ECG inicial alterado. Entre los primeros (ECG inicial normal) hubo una sobrevida del 94,5% frente al 61,3% de sobrevida en el grupo con ECG inicial alterado (Pinto Díaz, 1985).

Un estudio realizado en San Felipe (Brasil) (Chiale y Rosembaum, 1987) la causa del 58% de las muertes en al población Chagásica fue la insuficiencia cardíaca y el 37% muerte súbita; 17,6% de chagásicos autopsiados experimentó muerte súbita sin síntomas previos de compromiso cardíaco.

Generalmente se admite que la fibrilación ventricular es la causa mas común de muerte súbita; se demostró que aquellos pacientes que presentan arritmias, como los extrasístoles ventriculares tendrían mayor tendencia a desarrollar taquicardia ventricular y/o fibrilación ventricular y muerte súbita (Chiale et al., 1982b, Chiale y Rosembaum, 1987). Estudios de ECG dinámico (Holter) en chagásicos permitieron detectar un considerable número de arritmias ventriculares complejas en pacientes aparentemente sanos y tambien detectar procesos de mayor severidad en pacientes con ECG correspondientes a arritmias leves. El empleo de pruebas de esfuerzo graduado como la ergometrías permite evaluar la reserva cardíaca del individuo y pone en evidencia o agrava trastornos cardíacos silentes o mínimos en condiciones de reposo.

1.1.4.3.3 Métodos diagnósticos alternativos

Además de el ECG y el ecocardiograma actualmente se dispone de otros métodos para evaluar el daño cardiaco, estos son:

- a- El estudio con anticuerpos antimiosina marcados con In^{111} que permite apreciar por escintilografía la magnitud del daño tisular por mayor exposición de la miosina del sarcolema y por lo tanto mayor accesibilidad al anticuerpo.
- b- Las biopsias endomiocárdicas que permiten la observación directa del estado tisular y el avance de la lesión inflamatoria.

1.1.4.3.5. Patogenia

La forma crónica se caracteriza por ser una miocarditis activa y difusa que tiene características histológicas típicas. El infiltrado inflamatorio está compuesto por macrófagos y células linfoides que tienden a acumularse en áreas donde las fibras miocárdicas muestran grados variables de degeneración. Este infiltrado se acompaña de una fibrosis intersticial fina y difusa. Son evidentes las señales histológicas del proceso con áreas de degeneración y necrosis de fibras cardíacas aisladas, con focos de miocitolisis, áreas de adensamiento del infiltrado y con focos de fibrosis con varios grados de colagenización y maduración (Andrade, 1983).

La característica más notable de estas lesiones es la casi ausencia del parásito, sugiriendo que otras causas, además de la presencia del parásito, deben intervenir en la patogenia de las lesiones (Rosebaum 1964; Andrade, 1983, 1985; Santos Buch y Acosta, 1985).

Para poder explicar la patogenesis de la enfermedad en ausencia del parásito han surgido distintas hipótesis. La primera postula la destrucción de la inervación autónoma del corazón tal como se observa en los ganglios del plexo mientérico en los casos digestivos de la enfermedad (megaesófago), sin embargo, en el modelo canino, ni la destrucción de los ganglios parasimpáticos por vagotomía, ni la interrupción con farmacos del impulso nervioso reprodujo las lesiones cardiacas observadas en la enfermedad de Chagas (Santos Buch y Acosta, 1985). La presencia de macrófagos y linfocitos en estos focos inflamatorios sugiere la existencia de una reacción inmunitaria mediada por células. Magarinos Torres (1930, 1941) postuló que las lesiones estarían provocadas por una reacción autoinmune secundaria a la infección por *T. cruzi* (Rosebaum 1964, Koberle 1968, Andrade 1983).

1.1.5. Modelos experimentales de la enfermedad de Chagas.

Para el estudio detallado del rol de cada compartimiento del sistema inmune en la resistencia a la infección y en la inmunopatología, o para estudiar la influencia del tipo de cepa del parásito, quimioterapia o inmunoprotección, es necesario utilizar un modelo animal apropiado. Según el Comité de la OMS de Enfermedad de Chagas un buen modelo de la enfermedad crónica de Chagas debe (Brener y Ramirez, 1985):

1. Permitir el aislamiento del parásito a lo largo de la infección.
2. Presentar reacciones serológicas indicativas de la presencia del parásito.
3. Presentar las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas crónica.

Introducción

4. Desarrollar miocarditis, miositis y otras lesiones anatomopatológicas típicas de la enfermedad.
5. Inducir una respuesta inmune hacia tejidos del huésped.

En la Tabla II se resumen los principales modelos animales de la enfermedad de Chagas investigados hasta la fecha.

TABLA II. Modelos animales de la enfermedad de Chagas.

MODELO ANIMAL	INFECCION	PATOLOGIA	MANIFESTACIONES CLINICAS	RESPUESTA AUTOINMUNE	VENTAJAS	DESVENTAJAS
RATON	Dependiendo de cepa y dosis: Aguda y Crónica (1)	Miocarditis Miositis (2)	Modif. ECG*: EV, alt QRS (2)	anti-miocardio anti-nerv. anti-musc. (6)	Cepas genéticamente definidas. Sistema inmune Caracterizado.	Enfermedad no evolutiva Interpretac. del ECG. (1)
CONEJO	Aguda y Crónica	Miocarditis. (3)	Insuficiencia Cardíaca. (1,3)	anti-miocardio. (3)		Sist. Inmune poco caracteriz. (1)
PÉRRRO	Aguda, indeterminada y crónica (1,4)	Miocarditis (4)	Insuficiencia Cardíaca, Modif. ECG: BCRD, EV. (1,4)		Analogía con enfermedad humana (4)	
PRIMATES	Aguda indeterminada y crónica (1,5)	Miocarditis Megacéfalo (1,5)	Modif. ECG: EV, HBA. (1,5)	anti-EVI. anti-nerv P (6)		

Referencias: 1) Brener y Ramirez, 1985; 2) Laquens et al. 1981; 3) Andrade y Andrade, 1979; 4) Teixeira et al. (1975). 5) Bolomo et al., 1980; 6) Szarfman et al., 1978 #: ECG. electrocardiograma; EV, extrasístoles ventriculares; alt QRS, alteraciones del QRS.; BCRD, bloqueo completo de la rama derecha; HBA, hemibloqueo anterior.

1.2. RESPUESTA INMUNE A LA INFECCION POR *Trypanosoma cruzi*.

El huésped reacciona contra el parásito y monta una respuesta inmune efectiva que virtualmente elimina al parásito de la sangre (Brener, 1987). No obstante, como la parasitemia de la etapa aguda es muy alta, el parásito logra alojarse en los tejidos blanco y establece la infección crónica.

Como se describe en 1.1.4.1. y 1.1.4.3.5. la respuesta inmune del huésped estaría involucrada en el origen de las lesiones de la etapa aguda y la enfermedad crónica. De acuerdo con esto, podría pensarse que aquellos individuos con una respuesta más intensa hacia la infección chagásica serían más propensos a desarrollar la cardiopatía crónica; sin embargo, la asociación entre título de anticuerpos anti-*T. cruzi* y cardiopatía no pudo ser comprobada (D'á Gusmão *et al*, 1982). Si bien no se tienen pruebas acerca de si son los mismos mecanismos efectores los que protegen al huésped y los que median las reacciones inmunopatológicas, se puede dividir la respuesta inmune a la infección por *T. cruzi* en dos partes para su estudio:

- 1) Respuesta inmune protectora: es aquella dirigida contra el parásito vivo, contra esta respuesta el parásito ha desarrollado mecanismos de escape.
- 2) Respuesta inmune autoagresiva: es aquella dirigida contra el huésped y sería el fundamento inmunológico de las lesiones observadas en la etapa aguda y al cardiopatía chagásica crónica.

1.2.1 Inmunidad humoral

La respuesta inmune humoral contra *T. cruzi* reviste importancia porque constituye el principal mecanismo utilizado por el huésped

para controlar la parasitemia. Prueba de la eficiencia de esta respuesta es la baja parasitemia de la infección crónica, cuando el huésped ha montado la respuesta humoral anti-parasitaria.

Estudios de la cinética de aparición de clases de anticuerpos anti-*T. cruzi* durante la infección experimental, demostraron que las IgM y las IgG aparecen y alcanzan altos títulos casi simultáneamente (Araujo *et al.*, 1984), un resultado similar se observó durante una infección accidental humana (Israelski *et al.*, 1988) indicando que para la infección por *T. cruzi* la cinética de aparición de las clases difiere del resto de las infecciones parasitarias (Israelski *et al.*, 1988). A medida que transcurre el tiempo el título de IgM disminuye hasta valores mínimos respecto al título de las IgG específicas, que alcanza su máximo una vez que la infección se hace crónica (Araujo *et al.*, 1984. Israelski *et al.*, 1988).

La aparición temprana de las IgG puede deberse a la activación policlonal que se produce durante la etapa aguda de la infección experimental murina, con la activación inespecífica de las células B a la forma blástica con un isotipo dominante de IgG2a (D'Imperio Lima *et al.*, 1985). Se ha sugerido que este efecto además estaría involucrado en la inmunosupresión de la respuesta específica a antígenos característica de la etapa aguda (Minoprio *et al.*, 1989 c). Estudios recientes han revelado que sólo un bajo porcentaje de células plasmáticas producidas durante la estimulación policlonal producen anticuerpos anti-*T. cruzi*, indicando que en esta etapa de la infección, si bien existe una respuesta inmune específica anti-*T. cruzi* esta constituye una pequeña parte (Minoprio *et al.*, 1989 b).

El modelo animal murino ha servido para determinar el rol de la inmunidad humoral en la resistencia a la infección con *T. cruzi*. Se comprobó a través de experiencias de transferencia pasiva que

el suero de ratones infectados crónicos es capaz de conferir resistencia a la infección. Además, se demostró que los anticuerpos anti-*T. cruzi* del isotipo IgG2a e IgG2b son esenciales en la respuesta inmune protectora (Takehara *et al.*, 1981). La importancia de la respuesta humoral también fue demostrada por las experiencias en ratones con deficiencias genéticas para la producción de anticuerpos (*Biozzi low responders*) (Kierszbaum y Howard, 1976), y en ratones depletados de células B por anticuerpos anti-cadena μ . Ambas cepas de ratones fueron altamente susceptibles a la infección por *T. cruzi* (Rodríguez *et al.*, 1981). Todas estas experiencias confirman el rol prevalente del compartimiento B del sistema inmune en la respuesta inmune protectora.

Los anticuerpos involucrados en el control de la parasitemia, o anticuerpos líticos, actuarían por los mecanismos efectores de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) y lisis mediada por complemento. Su presencia no se correlaciona con el título de anticuerpos anti-*T. cruzi* detectados por métodos de serología clásica (Krettli y Brener, 1982, Brener 1986). La presencia de anticuerpos líticos en sueros se evidencia porque pueden producir *in vitro* la lisis mediada por complemento, o por inmunofluorescencia sobre tripomastigotes vivos (Krettli y Brenner 1982). Estos anticuerpos no pueden ser producidos por inoculación con parásitos muertos, o fracciones o antígenos de los mismos (Brenner 1986). Tampoco se detectaron en pacientes o en animales que a través de un tratamiento quimioterápico fueron parasitológicamente "curados". De estas evidencias se deduce que los anticuerpos líticos son producidos sólo durante la infección activa por *T. cruzi* (Brener, 1986).

Estudios de la cinética de aparición de los anticuerpos líticos mostraron que no son detectable en sueros de infecciones experimentales agudas y sí en sueros de infecciones crónicas (Takehara *et al.*, 1990). Esta diferencia es atribuible al título de IgG

anti-*T. cruzi*, el que alcanza su valor máximo en la etapa crónica de la infección concomitantemente con el control de la parasitemia (Takehara *et al.*, 1990).

1.2.1.1. Mecanismos de evasión del parásito a la respuesta inmune humoral

Existen varios mecanismos de escape de *T. cruzi* a las respuesta inmune mediada por anticuerpos específicos. En los primeros momentos de la infección la inmunosupresión disminuye la respuesta hacia el parásito (Eisen y Petry, 1989). Además, los tripanosomas han desarrollado mecanismos capaces ya sea de neutralizar la porción fc de las IgG o de eliminar de la superficie los anticuerpos que los reconocen específicamente lo que impide que estos puedan mediar funciones efectoras como la fijación de complemento o el reconocimiento por los receptores fc de los macrófagos (Nogueira, 1986).

El mecanismo de fagocitosis que consiste en clivar el fragmento fc de las IgG unidas dejando sólo el fragmento Fab ha sido probado en tetrahimena, y se verificó por IF indirecta para la cepa C1 de *T. cruzi* (Krettli y Eisen 1980); sin embargo fragmentos fab obtenidos de sueros inmunes, fueron capaces de lisar *in vitro* en presencia de complemento tripomastigotes sanguíneos. En un estudio reciente se identificó una proteína de *T. cruzi* de 52 KD capaz de unir inespecíficamente IgG y degradarla en pequeños fragmentos evitando la fijación de complemento (Cicarelli 1989). Los tripomastigotes también serían capaces de internalizar y degradar las IgG unidas específicamente por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor, este mecanismo sería mas activo en los tripomastigotes sanguíneos que en los amastigotes (Teixeira *et. al* 1989).

Los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* son lisados por los sueros no inmunes de mamíferos, esta lisis es mediada por la vía alterna del complemento. Los tripomastigotes y amastigotes se hallan "protegidos" de este mecanismo efector y no son lisados por sueros normales. La lisis sí se produce (1.2.1.) en presencia de sueros específicos y es mediada tanto por la vía clásica como por la vía alterna del complemento. Existiría en la superficie de los tripomastigotes un componente capaz de bloquear la vía alterna del complemento que es sensible al tratamiento con tripsina (Kipnis *et al.* 1981); este componente sería bloqueado por los anticuerpos específicos, que permitirían de esta forma que el parásito sea lisado por la vía alternativa del complemento (Kipnis *et al.*, 1985).

1.2.2. Inmunidad mediada por células

La participación de los linfocitos T (LT) en la inmunidad a *T. cruzi* ha quedado demostrada tanto por la mayor susceptibilidad a la infección de los ratones *nude* y ratones depletados de células T (Hoff y Boyer, 1985; Schmuñis *et al.*, 1971; Kierszbaum y Pienkovsky, 1979), como por la transferencia de la resistencia a través de timocitos y células de bazo (Hoff y Boyer, 1985). Scott *et al.* (1981) encontraron que preparaciones de células de bazo depletadas de Linfocitos T conservan la capacidad de proteger pasivamente ratones inoculados; mientras que aquellas preparaciones carentes de Linfocitos B son incapaces de transferir la protección. Asimismo Los ratones que fueron depletados de macrófagos por tratamiento con sílica fueron altamente susceptibles a la infección. A partir de ratones hiperinmunizados con *T. cruzi*, Nickell y Boyer (1987) aislaron y caracterizaron líneas y clones de linfocitos T específicos del parásito. Uno de estos clones, perteneciente al tipo de LT coadyuvante LTh, L3T4+ fue capaz de

transferir protección contra una dosis letal de tripomastigotes, indicando el rol activo de la inmunidad celular en la inmunoprotección.

El conjunto de estos resultados indican que la función primaria de los linfocitos T en la inmunidad a *T. cruzi* es la de *helper* (LTh) o coadyuvante de la respuesta humoral y de macrófagos (Hoff y Boyer 1985). La actividad citotóxica y de linfocitos *natural killer* o natural killer hacia tejidos parasitados también ha sido descripta (Hoff y Boyer, 1985)

1.2.2.1. Rol de los macrófagos en la inmunidad a *T. cruzi*.

Los macrófagos (Mø) no inmunes se cuentan entre las primeras células que los tripomastigotes metacíclicos invaden y donde *T. cruzi* se diferencia a amastigote y se replica (ver 1.1.2.); sin embargo, a medida que el huesped monta una respuesta inmune efectiva hacia el parásito los macrófagos se activan y pueden destruir a los parásitos intracitoplasmáticos (Nogueira, 1986) Los macrófagos activados de ratones inoculados con BCG, también muestran actividad tripanocida por lo que el mecanismo de activación sería inespecífico; los macrófagos se activan por la acción de linfoquinas producidas por LT helper que son los que sí reconocen específicamente al parásito (Nogueira *et al.*, 1981). Todos los clones de linfocitos T específicos del parásito obtenidos por Nickell y Boyer (1987), pertenecían al subset L3T4+ (LTh) y fueron capaces de inducir el estado microbicida en macrófagos infectados por *T. cruzi*.

En los macrófagos activados los parásitos son eliminados por la producción de radicales superóxido, mientras que en los macrófagos no inmunes, los tripanosomas sobreviven gracias a un mecanismo de escape de la vacuola fagocítica. Cuando el amastigote se diferencia a tripomastigote sanguíneo, estos ya no pueden ser

fagocitados debido a la presencia de un componente antifagocítico que poseen en la superficie (Nogueira, 1986). Al ser reconocidos específicamente por los anticuerpos, esta actividad resultaría bloqueada; además la opsonización del parásito por anticuerpos específicos facilitaría la fagocitosis (Nogueira 1986).

1.2.3. Inmunopatología

Como se expuso en 1.1.4.3.5. y 1.1.4.1 los hallazgos anatomopatológicos de la etapa aguda y crónica de la enfermedad sugieren que la respuesta inmune del huésped estaría involucrada en la patología de la enfermedad. La casi ausencia del parásito, y el tipo de células encontradas en los infiltrados de las lesiones crónicas ha llevado a postular que éstas serían en parte producidas por una respuesta autoagresiva mediada por células o anticuerpos.

En modelos animales, especialmente en la infección crónica experimental murina, se pudo demostrar la presencia de células T auto-reactivas; y tanto en modelos animales como en pacientes chagásicos se demostró la presencia autoanticuerpos. Sin embargo, en pacientes chagásicos, la ocurrencia de fenómenos autoinmunes no se ha podido aún correlacionar con la enfermedad cardíaca. Por esta razón, la hipótesis autoinmune ha encontrado detractores y es objeto de controversias (Kierszbaum, 1985; Hudson, 1985). A continuación se presentan las evidencias más relevantes acerca del rol de la respuesta autoinmune en la patología de la enfermedad de Chagas.

1.2.3.1. Inmunopatología de la etapa aguda.

En los casos de miocarditis aguda los infiltrados inflamatorios compuestos de neutrófilos y eosinófilos pueden estar o no asociados a la presencia del parásito; Según Rosebaum (1964), sólo en

un 50% del total de los casos de miocarditis aguda informados las fibras cardíacas se encuentran parasitadas, en los demás casos las fibras parasitadas son escasas, e inclusive, en algunos casos no se detectan parásitos. En todos los casos el número de fibras dañadas no es proporcional a la parasitación y llama también la atención que el infiltrado intenso y difuso parece más lesivo para las fibras cardíacas que para los parásitos (Ribeiro dos Santos y Rossi, 1985) (Andrade, 1983, 1985). Observaciones antiguas, describen en las adyacencias de amastigotes rotos la presencia de fibras en degeneración y necrosis. Estos hallazgos sugieren que el daño producido en las fibras cardíacas no depende solamente del parásito, sino que también dependería de reacciones inflamatorias y probablemente autoagresivas que no están necesariamente ligadas a la presencia del parásito vivo.

En ratones, la infección por *T. cruzi* provoca una desregulación en la homeostasis del sistema inmune caracterizada por la proliferación policlonal de linfocitos B y T que son activados a la forma blástica (D'Imperio Lima *et al.*, 1985), y una disminución de los niveles de IL-2 y de la respuesta inmune hacia antígenos específicos del parásito (Harell-Bellan *et al.*, 1984). La proliferación policlonal es dependiente de células Th como lo demuestran experimentos en que ratones depletados de LTh por inyección de anticuerpos anti-L3T4+ no experimentan la proliferación policlonal (Minoprio *et al.* 1987). Estos fenómenos en humanos aún no fueron probados, si bien la reactividad anti-*T. cruzi* en las primeras momentos de la enfermedad es baja comparada con la reactividad de la etapa crónica (Israelski *et al.*, 1989). En la infección experimental murina se ha demostrado que la mayoría de las células plasmáticas surgidas de la activación policlonal son autorreactivas y producen sobre todo autoanticuerpos naturales; lo que sugiere una posible relación entre la activación policlonal y la inmunopatología tanto de la etapa aguda como en la etapa crónica de la enfermedad (Minoprio *et al.*, 1989 b y c). En el mo-

delo murino y en pacientes en la etapa aguda de la infección se demostró la presencia de células citotóxicas y de anticuerpos capaces de mediar reacciones de citotoxicidad celular (ADCC) que lisan sólo células infectadas o sensibilizadas por adsorción de antígenos del parásito (Ribeiro Dos Santos y Hudson, 1980; López *et al.*, 1983, Ribeiro dos Santos y Rossi, 1985). Russo *et al.* (1988) mostraron que en ratones depletados de células Th por tratamiento con anticuerpos anti-CD4, la inflamación disminuye y la parasitosis aumenta sugiriendo un doble rol de los linfocitos Th en la inflamación y el control de la parasitemia. En miocarditis agudas en humanos, la inflamación cardíaca se puede atenuar por el suministro de inmunosupresores sugiriendo un rol importante de la respuesta inmune en la patogenia (Andrade, 1985). Por otra parte surge de la observación de la evolución de los casos agudos que los síntomas disminuyen y tienden a desaparecer con la disminución numérica de los parásitos lo que estaría demostrando la relación entre la presencia del parásito y las lesiones de la etapa aguda (Andrade, 1985).

Todos estos resultados indican que el probable mecanismo patogénico para las lesiones inflamatorias de la etapa aguda debe depender tanto del parásito como de la respuesta inmune del huésped; una hipótesis patogénica coherente con estas evidencias sería la destrucción tisular y del parásito que inducirían reacciones inflamatorias y reacciones autoagresivas hacia células sensibilizadas o no por antígenos parasitarios (Ribeiro dos Santos y Rossi, 1985; Andrade 1985).

1.2.3.2. Inmunopatología de la etapa crónica

1.2.3.2.1 Autoinmunidad mediada por células

1. Modelos animales

Para probar la relación entre la autoinmunidad celular y la patogénesis de la cardiopatía chagásica se han realizado diversos

estudios, tanto *in vivo* como *in vitro* en los que se ha tratado de determinar:

- a- La presencia de células T autorreactivas inducidas por la infección.
- b- La capacidad de las células T autorreactivas para transferir las lesiones inflamatorias.
- c- El origen de las células T autorreactivas: i-reacción cruzada con *T. cruzi*; ii-estimulación por antígenos expuestos del huésped), iii-activación policlonal.

Santos Buch y Teixeira (1974) comprobaron que los linfocitos de conejos crónicamente infectados con *T. cruzi* son capaces de destruir específicamente células cardíacas alogénicas esten o no parasitadas. El origen de las células autorreactivas fue determinado por el test de la inhibición de la migración de macrófagos que demostró reactividad cruzada entre antígenos de corazón y de *T. cruzi*. Los resultados de estos modelos alogénicos fueron corroborados en un modelo murino singénico (Acosta y Santos Buch 1985). La validez de estos mecanismos *in vivo* fue probada por Laguens *et. al* (1981) quienes reprodujeron, por transferencia de linfocitos de ratones crónicamente infectados, las lesiones inflamatorias en el miocardio de ratones sanos. Acosta y Santos Buch (1985) produjeron una miocarditis mediada por linfocitos autorreactivos en recipientes singeneicos neutralizable por glucocorticoides.

Distintos niveles de daño inflamatorio cardíaco y alteraciones en el ECG se obtienen por inmunización con de homogenatos de *T. cruzi*, fracciones subcelulares del parásito y extractos de tejidos del huésped. Conejos y ratones inmunizados con una fracción ribosomal mostraron en el examen histopatológico focos de miocarditis con infiltrado linfocitario (Santos Buch y Teixeira,

1974; Ruiz *et. al.*, 1985). A su vez, la inyección de homogenato completo de corazón provoca en ratones una miocarditis autoinmune con una sintomatología análoga a la observada en la cardiopatía Chagásica (Cossio *et. al.*, 1984). Estos resultados estarían ilustrando la capacidad de los antígenos de *T. cruzi* y los autoantígenos en la activación de células autorreactivas tejido-específicas (ver 1.3.3.). Coincidentemente, Sadigursky *et al.* (1982) describieron un antígeno común a *T. cruzi* y a preparaciones purificadas de retículo sarcoplásmico de músculo estriado ricas en ATPasa Mg⁺² dependiente (Acosta *et. al.*, 1983). En ratones de 150 días de infección con *T. cruzi*, y ratones inmunizados con el antígeno SRA se encontraron los mismos síntomas y lesiones. Los linfocitos esplénicos de ambos ratones resultaron citotóxicos contra fibras musculares singeneicas normales (Acosta y Santos Buch, 1985); sugiriendo que la reactividad inmunológica cruzada entre antígeno de *T. cruzi* y el retículo sarcoplasmático estaría involucrada en la activación de células autorreactivas.

En contradicción con estos resultados Gattas *et al.* (1988) midieron la aparición de células capaces de proliferar en presencia de extractos de corazón en ratones inmunizados, a) con parásitos muertos b) con homogenatos de *T. cruzi* y c) con fracciones subcelulares, y en ratones infectados con *T. cruzi*. Las células autorreactivas sólo se detectaron en la infección activa. Los autores sugieren que la autorreactividad es consecuencia exclusiva de la ruptura de tejidos por el parásito. Estos resultados no están de acuerdo con los de las inmunizaciones mencionadas mas arriba, ni considera las modificaciones en el sistema inmune del huésped durante la infección chagásica (Joskowicz 1985, Eisen y Petry 1989).

Respecto de los probables mecanismos efectores de la autoagresión celular existen evidencias que estaría mediada por macrófagos (Ribeiro dos Santos y Rossi, 1985). Cuando las células esplénicas

se depletan de macrófagos, desaparece toda acción citotóxica hacia fibras musculares normales isólogas. La citotoxicidad se recupera por el agregado de macrófagos mostrando que los linfocitos T (LT) actuarían sólo en su presencia (Ribeiro dos Santos y Rossi, 1985). Estos hallazgos están de acuerdo con un mecanismo de hipersensibilidad retardada (HSR) de tipo IV donde los LT helper reconocen específicamente al antígeno, liberan factores que activan a los macrófagos. Este tipo de mecanismo es coherente con el tipo de células encontradas en los infiltrados inflamatorios de la cardiopatía crónica (ver 1.1.4.3.5.). Hontebeyrie-Joskowicz *et al.* (1987) demostraron que los linfocitos T helper (LTh) L3T4+ son capaces de transferir a recipientes sanos la neuropatía observada en ratones infectados con *T. cruzi* (Said *et al.*, 1986; Hontebeyrie-Joskowicz *et al.*, 1987). Asimismo, una línea de LTh L3T4+ que prolifera ante antígenos de *T. cruzi* produjo reacciones locales HSR cuando fue inyectada en huéspedes sanos en presencia de extractos de *T. cruzi* o de células nerviosas periféricas. Cuando esta línea de LT L3T4+ fue inyectada en huéspedes sanos i.v. o intraneuralmente, se desarrollaron infiltrados granulomatosos. En el nervio ciático, los infiltrados se acompañaron de demielinización (Hontebeyrie-Joskowicz *et al.* 1987).

Toda ésta evidencia experimental demostraría:

- La existencia de células T autorreactivas en la infección crónica.
- b- La capacidad de las células T autorreactivas para transferir lesiones inflamatorias.
- c- Sugiere que el origen de las células T autorreactivas podría deberse a la reacción cruzada de antígenos de *T. cruzi* con los del huésped.

2. Experiencias con linfocitos de pacientes.

Las experiencias con linfocitos de pacientes chagásicos son poco concluyentes. Teixeira *et al.* (1978) observaron que células fetales humanas infectadas o no, eran lisadas *in vitro* por los linfocitos de pacientes chagásicos; sin embargo los linfocitos de enfermos agudos fueron más efectivos que los de enfermos crónicos. Utilizando la técnica de inhibición de la migración de macrófagos demostraron que los LT se activan con tejido humano y con *T. cruzi*. Bracco *et al.* (1984) mostraron que los linfocitos de pacientes chagásicos reconocen preparaciones de miocardio, induciendo una mayor contractilidad. Un efecto similar fue encontrado utilizando linfocitos de ratones con miocarditis experimental inducida por inmunización con antígenos de miocardio. Los autores postulan la existencia en enfermos chagásicos de linfocitos anti-miocardio cuyo origen sería la estimulación autoantigénica (Bracco *et al.*, 1984).

Di Titto *et al.* (1985) midieron la respuesta proliferativa de células mononucleares periféricas hacia fracciones de *T. cruzi* y extractos de corazón, en pacientes infectados con distinto grados de avance de la cardiopatía. Solo algunos infectados crónicos mostraron respuesta linfoproliferativa hacia antígenos de miocardio. Diferencias entre infectados con y sin cardiopatía sólo se detectaron en la respuesta linfoproliferativa hacia fracciones subcelulares de *T. cruzi* (ver 1.3.3.).

El balance de estos resultados indica que si bien existen células autorreactivas en pacientes chagásicos, su presencia en sangre periférica no estaría en principio, asociada a las manifestaciones clínicas.

1.2.3.2.2 Autoinmunidad humoral.

Desde las primeras evidencias acerca de la existencia de fenómenos autoinmunes en la enfermedad de Chagas se ha tratado de

determinar:

- a- La existencia de autoanticuerpos específicos.
- b- La existencia de mecanismos efectores inmunopatológicos mediados por autoanticuerpos y su asociación con la patología.
- c- El origen de los autoanticuerpos. i-Estimulación policlonal, ii- Reacción cruzada entre antígenos del parásito y del huésped (mimetismo molecular). iii- Reacción contra epitopes expuestos por ruptura celular.

1. Anticuerpos contra músculo cardíaco, anti-EVI y anti-laminina.

Tejada-Valenzuela y Castro (1958) demostraron que el suero de tres pacientes con cardiopatía chagásica crónica formaba líneas de precipitinas con extractos de corazón humano. Continuando con

dichos experimentos Jaffé *et al.* (1959, 1961) y Kosma (1962) demostraron un alto grado de correlación entre la aparición de estas precipitinas y la cardiopatía chagásica crónica. Evidencias de autoanticuerpos que reaccionaban con tejidos del huésped fueron aportadas por Cossio *et al.* (1974). En suero de pacientes chagásicos se detectó la presencia de IgGs circulantes que reaccionan con endocardio, estructuras vasculares e intersticios de rata o cobayo no infectados. Estos autoanticuerpos eran detectados por inmunofluorescencia indirecta y mostraban un perfil de tinción particular. Fueron denominados autoanticuerpos EVI (endocardio-estructuras vasculares-intersticios). Los autoanticuerpos EVI eran capaces de fijar complemento, reconocer la superficie de fibras musculares esqueléticas y cardíacas. Como eran adsorbidos por extractos de epi- y tripomastigotes se supuso que los Acs EVI se originaban por reactividad cruzada entre antígenos de *T. cruzi* y del huésped (Cossio *et al.*, 1974).

Biopsias de individuos con cardiopatía chagásica mostraron IgGs unidas *in vivo* a la superficie de fibras cardíacas en las adyacencias de los focos inflamatorios. La intensidad del daño tisular en las lesiones inflamatorias era proporcional a la deposición de las IgGs, sugiriendo una relación de causa efecto (Laguens *et al.*, 1975; Cossio *et al.*, 1977). La determinación de los anticuerpos EVI en pacientes chagásicos mostró en forma preliminar que habría prevalencia de estos en pacientes con cardiopatía sugiriendo que los autoanticuerpos EVI tendrían un rol en la patología y por lo tanto cierto valor diagnóstico y/o pronóstico de la cardiopatía (Cossio *et al.*, 1974 ; Diez *et al.*, 1976).

Estudios llevados a cabo por Borda *et al.* (1984) encontraron asociada a los Acs EVI, una actividad que modificaba *in vitro* la contractilidad del miocardio de rata a través de la estimulación específica de receptores β -adrenérgicos (Borda *et al.*, 1984). Dicha actividad se encontraba asociada a una fracción proteica que coincidía con la fracción IgG. La estimulación se realiza a través del sistema adenilato ciclasa (Sterin-Borda *et al.* 1986), el AMPc producido aumenta la contractilidad del músculo cardíaco estimulando la Ca^{+2} ATPasa e inhibiendo la K^{+}/Na^{+} ATPasa. Como la actividad era adsorbida por epimastigotes, se postuló que el origen de estos autoanticuerpos sería la reacción cruzada con putativos receptores β_1 -adrenérgicos presentes en *T. cruzi* (Borda *et al.*, 1984).

El entusiasmo inicial despertado por los Acs EVI no duró demasiado. Algunos investigadores encontraron un perfil de tinción EVI por inmunofluorescencia indirecta sobre corazón y músculo de cobayo en individuos de zonas no-endémicas para *T. cruzi*; indicando que podría tratarse de una actividad heterófila (Nicholson *et al.*, 1977). Al repetir las experiencias utilizando tejidos de origen humano, se comprobó la naturaleza heterófila de la actividad EVI (Khoury *et al.*, 1983). Nuevos resultados con mayor número

de pacientes no pudieron reproducir la prevalencia de los EVI en pacientes con cardiopatía chagásica (Peralta *et al.*, 1981; Szarfman *et al.*, 1981).

Al estudiar la reactividad de anticuerpos chagásicos contra componentes de la lámina basal, Szarfman *et al.* (1982) encontraron que anticuerpos de monos infectados con *T. cruzi* reaccionaban exclusivamente con laminina, una proteína de 200-400 KD. Los anticuerpos inmunopurificados sobre laminina reaccionaron con tripó- y amastigotes. Además, mostraron, al reaccionar con músculo y corazón de ratón, un perfil similar al producido por los Acs EVI. La prevalencia de la actividad anti-laminina fue mayor en pacientes con infección aguda. Estos anticuerpos inhibieron la pegada de células endoteliales a una matriz de colágeno; este efecto, que fue contrarrestado por el agregado de laminina, sugería una relación de la actividad anti-laminina con algún mecanismo patológico (Szarfman *et al.*, 1982). Estudios posteriores demostraron la presencia de estos autoanticuerpos en Leishmaniasis (Avila *et al.*, 1984, 1988). Recientemente el epítipo reconocido por los anticuerpos anti-laminina fue identificado como un resto galactosil- α 1:3-galactosa, disacárido antigénico presente en todo tipo de laminina del huésped (Towbin *et al.*, 1987), y también presente en *T. cruzi* y *Leishmania* (Avila *et al.*, 1989). La reactividad cruzada entre el epítipo de los parásitos y el de la laminina del huésped sería el origen más probable de los Acs anti-laminina en las infecciones con tripanosomátidos (Avila *et al.*, 1989). Towbin *et al.* (1988) sugieren que la patogenicidad de los anticuerpos anti-laminina estaría determinada por la mayor concentración de este epítipo en los tejidos blanco, sin embargo la presencia de estos anticuerpos en leishmaniasis (Avila *et al.*, 1984), enfermedad donde no se produce compromiso cardíaco, y en pacientes chagásicos parasitológicamente curados (Gazzinelli *et*

al., 1988 a) tiende a señalar un dudoso rol de los anticuerpos anti-laminina en la patogenia de la cardiopatía chagásica (Schmuñis 1988).

Mc Cormick y Rowland (1989) realizaron un detallado estudio sobre autoanticuerpos anti-corazón inducidos durante la infección murina experimental crónica y aguda. Comprobaron la existencia de anticuerpos específicos hacia extractos de corazón con reactividad casi nula hacia músculo esquelético y laminina. La reactividad cruzada de los autoanticuerpos purificados por inmunoafinidad sobre tejidos de corazón o sobre *Trypanosoma cruzi* pudo ser demostrada.

2. Anticuerpos contra tejido nervioso

Para encontrar un sustento inmunológico que explique la denervación y la demielinización observadas en las lesiones del sistema nervioso periférico durante la infección (Hudson, 1983) se intentó probar la existencia autoanticuerpos hacia tejido neuronal y la existencia de antígenos comunes a *T. cruzi* y neuronas (Hudson y Britten, 1985).

En la mayoría de los pacientes crónicos EVI-seropositivos se detectaron por inmunofluorescencia indirecta anticuerpos circulantes anti-células de Schwann mielinizadas y no-mielinizadas del sistema nervioso periféricos humano y murino. Estos autoanticuerpos fijaban complemento y eran adsorbidos por incubación con epimastigotes (Khoury *et al.*, 1979).

Para tratar de identificar determinantes antigénicos comunes se obtuvieron anticuerpos monoclonales anti-*T. cruzi* y neuronas. El monoclonal CE5 producido por inoculación de tejido nervioso de rata, reaccionó con epimastigotes fijados pero no con epimastigotes vivos, este anticuerpo mostraba citotóxicidad hacia neuronas *in vitro* en presencia de complemento y reaccionaba también con

músculo cardíaco (Wood *et al.*, 1982). A partir de ratones inmunizados con epimastigotes los mismos autores obtuvieron anticuerpos monoclonales capaces de reconocer en *Western blot* proteínas de *T. cruzi* de 58 y 35 KD, y antígenos de 58 y 37 KD de cerebro y espina dorsal (Snary *et al.*, 1983). Todos estos resultados fueron severamente cuestionados por Kierszbaum (1985) quien sugirió que la reactividad de CE5 con *T. cruzi* se debía al hecho que los epimastigotes fueron cultivados en un medio conteniendo extracto de cerebro.

Otro anticuerpo monoclonal obtenido de ratones infectados reaccionó con la superficie del parásito (Alcina *et al.*, 1986). El monoclonal reconoció un polipéptido de *T. cruzi* y también α -tubulina de cerebro, indicando la existencia de un antígeno de superficie del parásito que reacciona en forma cruzada con la α -tubulina de cerebro. Este antígeno podría ser una α -tubulina del parásito asociada a membranas (Alcina *et al.*, 1986).

Utilizando una metodología distinta Van Vooris y Eisen (1989) (ver 1.5.4.2.) clonaron una proteína parasitaria de 160 KD reconocida por el suero de ratones chagásicos. Anticuerpos contra esta proteína reaccionaron con el flagelo de tripomastigotes sanguíneos, con nervio ciático, cerebro y neuronas del plexo mientérico y en *W. blot* reconocen una proteína de cerebro de 48 KD. Estos resultados demuestran que el o los determinante antigénico clonado de la p160 de *T. cruzi* son compartidos con la p48 de cerebro. Experiencias preliminares de inmunizaciones con el péptido clonado tenderían a demostrar el probable rol de la reacción anti-F1 160 en la neuropatía.

3. Antígenos de músculo y proteína p25 de *T. cruzi*

Tal como se describió en 1.2.3.2.1.1 Sadigurski *et al.* (1983) identificaron un antígeno común a preparaciones purificadas de retículo sarcoplasmático de músculo o sarcolema de corazón y

T. cruzi. Estudios realizados en pacientes chagásicos mostraron la prevalencia de anticuerpos anti-sarcolema en pacientes con cardiopatía chagásica y en cardiopatías idiopáticas, en polimiositis y en distrofia muscular de Duchenne (Santos Buch *et al.*, 1985).

Por otra parte en el 94% de los sueros de pacientes con cardiopatía chagásica se detectaron, por inmunoprecipitación, anticuerpos contra una proteína de *T. cruzi* de 25 KD que no fueron detectados en suero de pacientes infectados sin compromiso cardíaco. Los anticuerpos anti-p25 de *T. cruzi* también se detectaron en sueros de pacientes con otras enfermedades primarias del corazón que eran anti-sarcolema seropositivos, y también en ratones inmunizados con preparaciones de sarcolema. Este resultado indicaría que los anticuerpos contra la p25 de *T. cruzi* presenta reactividad inmunológica cruzada con algún antígeno de músculo (Santos Buch *et al.*, 1985; Schmuñis, 1987).

Los anticuerpos anti-p25 son los únicos marcadores serológicos asociados al daño cardíaco en Chagas y otras enfermedades musculares no infecciosas. Estos tendrían valor diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad cardíaca de Chagas (Schmuñis, 1987).

4. Mecanismos efectores patológicos mediados por autoanticuerpos.
En 1969 Cabral comprobó al transferencia pasiva de la cardiopatía a recipientes sanos por sueros de ratones infectados crónicos (Cabral, 1969). Silva *et al.* (1985) estudiaron el posible rol patogénico de los inmunocomplejos y comprobaron que en la infección murina aguda la aparición de los infiltrados inflamatorios se correlaciona con la deposición de inmunoglobulinas y complemento en músculo estriado (Silva *et al.*, 1985). En biopsias cardíacas de pacientes con cardiopatía chagásica Molina *et al.* (1984) pudieron detectar Igs y complemento unido *in vivo* a la superficie de fibras cardíacas lo que sugería no sólo una depósito

pasivo de IgG sino un probable proceso activo contra las células cardíaca similar al informado para las lesiones inflamatorias de miocarditis autoinmunes post-infecciosas (Rose *et al.*, 1989). En este mismo sentido, IgGs aisladas de sueros chagásicos demostraron poseer actividad anti-receptor β adrenérgico y modular su actividad (Borda *et al.*, 1984). En suero de ratones infectados crónicos, Laguens *et al.* (1988), comprobaron la presencia de autoanticuerpos que se unen a cardiocitos de ratones sanos y producen reacciones de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). La reacción de CCDA disminuye si los sueros son pre-adsorbidos con miocardio, pero no con tripomastigotes o músculo esquelético, indicando que los anticuerpos capaces de producir la CCDA están dirigidos exclusivamente hacia miocardio y no reaccionan con la superficie de tripomastigotes (Laguens *et al.*, 1988).

1.2.3.2.3 Origen de la autoinmunidad en enfermedad de Chagas: Causa o consecuencia del daño celular ?

Con los datos descriptos en los capítulos precedentes puede concluirse que existen numerosas evidencias sobre la existencia de autoinmunidad en la enfermedad de Chagas; sin embargo es difícil determinar la relevancia de la autoinmunidad en la producción de las lesiones o si esta es simplemente consecuencia de la ruptura de tejidos.

Los datos experimentales son coherentes con un modelo según el cual, las modificaciones producidas en los órganos blanco de la enfermedad y el sistema inmune del huésped durante las primeras etapas de la infección desencadenarían un proceso autoinmunitario. Este se daría independientemente de la presencia del parásito en los tejidos y provocaría un daño focalizado durante la etapa crónica. La evolución de las lesiones dependería de la intensidad de la etapa aguda y de factores propios del huésped. Un modelo simi-

lar se postula para las miocarditis autoinmunes secundarias a infecciones virales y bacterianas (Rose, 1989; Rose *et al.*, 1989). En Chagas, la cronicidad de la infección y el ciclo de vida del parásito contribuirían a la estimulación del proceso inmunológico. En la figura 3 se esquematizan 1) los posibles desencadenantes de la autoinmunidad en Chagas y 2) sus mecanismos efectores

1) a-En la etapa aguda de la enfermedad, para el modelo murino, se comprobó la proliferación policlonal B y T, esta proliferación es dependiente de células Th (Minoprio *et al.*, 1987). La proliferación policlonal es una de las características de los síndromes linfoproliferativos observados en las cepas de ratones propensas a la autoinmunidad como la MRL *lpr/lpr* y la NZB y en enfermos con lupus eritematoso sistémico (Dziarski, 1988), estas cepas además muestran mayor susceptibilidad a la infección con *Trypanosoma cruzi* (Nickell *et al.*, 1985) y se demostró que dicha susceptibilidad no se debe a deficiencias en la respuesta hacia el parásito (Nickell y Boyer, 1986). Recientemente se comprobó que la mayoría de las células plasmáticas surgidas durante la estimulación policlonal de la etapa aguda son autorreactivas y producen autoanticuerpos naturales (Minoprio *et al.*, 1989).

b-Falta de supresión de las células autorreactivas: Se informó que la infección de células T por *Trypanosoma cruzi* que provocaría la destrucción de células reguladoras (Velge *et al.*, 1989). Teixeira *et al.* (1989) detectaron en ratones infectados LTh anti-miosina que no son suprimidos por componentes séricos que sí suprimen respuestas LTh anti-parásito.

c-El hecho que la inmunización con fracciones antigénicas de *Trypanosoma cruzi* pueda inducir una miocarditis sugiere un rol importante de la estimulación antigénica específica a través del mecanismo de mimetismo molecular. En los capítulos precedentes se

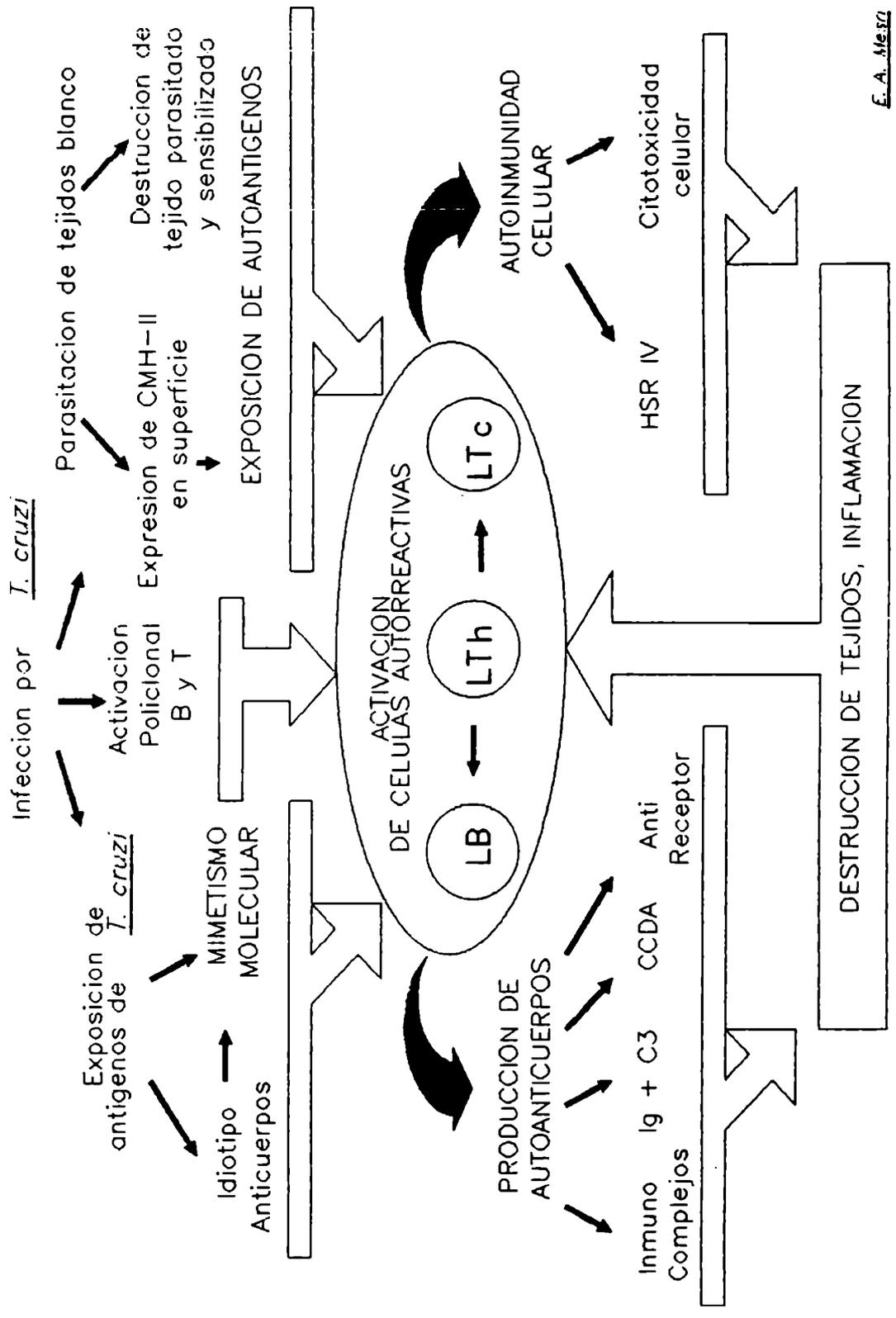


Figura 2: Inmunopatología de la enfermedad de Chagas.

enumeraron los distintos casos comprobados de mimetismo molecular entre *T. cruzi* y el huésped y en el capítulo correspondiente a antígenos se profundizará más este concepto (ver 1.3.3.)

d-Ruptura celular y exposición de antígenos secuestrados.

e-Presentación de autoantígenos debido a la expresión aberrante de antígenos de histocompatibilidad de clase II (CMH-II) en la superficie de cardiocitos (Cabeza Meckert *et al.* (1990)). Estas moléculas podrían también mediar mecanismos de citotoxicidad celular restringida por el CMH-II.

Estos eventos actuando en conjunto o separadamente iniciarían el reconocimiento de lo propio por linfocitos Th autorreactivos (ruptura de la tolerancia) que sustentan la reacción autoinmune y cuyos mecanismos efectores ya han sido descritos en los capítulos precedentes: la producción de autoanticuerpos, la activación de macrófagos (HSR, tipo IV) y de linfocitos citotóxicos (ver 1.2.3.2.1. y 1.2.3.2.2.). Estos mecanismos podrían cumplir un rol patológico en la etapa crónica de la enfermedad (Parte inferior de la figura 3). A su vez la producción de lesiones tisulares e inflamación, más la cronicidad de la infección estimularían los mecanismos iniciadores del reconocimiento autoinmune. Por eso los procesos esquematizados en la Fig. 3 son más probables en las inmediaciones de los órganos blanco como lo sugieren las experiencias de Ben Younnes-Chennoufi *et al.* (1988) que encuentran estimulación antigénica de linfocitos en las inmediaciones de los infiltrados inflamatorios. Las experiencias de Chambo *et al.* (1989), que muestran una mayor cantidad de linfocitos B productores de anticuerpos anti-miocardio en las lesiones inflamatorias del corazón de ratones infectados tienden a sustentar esta hipótesis.

Si se analizan los mecanismos desencadenantes de la autoinmunidad, se ve que la mayoría son parásito-dependientes. Dado que la parasitemia y la parasitosis de los tejidos es mayor en la etapa aguda de la enfermedad, es coherente postular que la evolución de la enfermedad de Chagas hacia una etapa indeterminada o hacia una miocarditis autoinmune dependa de la intensidad de la etapa aguda de la infección (Rosebaum, 1964; Koberle 1968). Esta hipótesis esta apoyada por los datos epidemiológicos descritos en Pinto Díaz (1985), donde el seguimiento de la evolución de 82 pacientes durante 27 años demostró una significativa asociación entre las anomalías electrocardiográficas en la etapa aguda y el desarrollo de la cardiopatía chagásica crónica.

Rosebaum (1964), demuestra que los hallazgos anatomopatológicos y clínicos de la mayoría de los casos de cardiopatías agudas fatales son análogos a los de la miocarditis crónica y sugiere que la cardiopatía aguda severa representa una conexión entre la enfermedad aguda y la crónica; donde simultáneamente se producen altas parasitemias y panmiocarditis de origen inflamatorio y donde la parasitosis no es proporcional a la intensidad de las lesiones inflamatorias (Rosebaum, 1964. En la mayoría de los casos agudos asintomáticos o leves aún con miocarditis este proceso está dividido en el tiempo y sigue una evolución mas "benigna": desde el momento en que disminuye la parasitemia y la parasitosis de los tejidos y se establece la enfermedad crónica hasta el momento en que un determinado porcentaje desarrolla una miocarditis pueden pasar varios años (Andrade, 1985; Brener 1987). Siguiendo nuestro razonamiento corroborado con los datos epidemiológicos, puede postularse que cuanto más benigna sea la etapa aguda más alejados en el tiempo estarán la parasitosis del miocardio característica de la etapa aguda y la panmiocarditis inflamatoria característica de la etapa crónica; contrariamente cuanto mas agresiva e intensa sea la etapa aguda, mas probable

Introducción

será la rápida evolución hacia la panmiocarditis llegando el caso límite de las cardiopatías agudas severas descritas por Rosembaum (1964).

Concluyendo, de acuerdo con las evidencias epidemiológicas, anatomopatológicas e inmunológicas resulta coherente caracterizar la patología chagásica crónica como un proceso autoinmune post-infeccioso, dado que se produce prácticamente en ausencia del parásito, pero que es desencadenado por la presencia del parásito en los tejidos blanco y por la interacción del parásito con el sistema inmune del huesped durante la infección aguda y estimulado durante la etapa crónica de la infección.

1.3. ANTIGENOS DE *Trypanosoma cruzi*.

Como se ha visto en los capítulos anteriores la respuesta inmune del huésped juega un papel fundamental tanto en el control de la parasitemia como en la patogenia de las lesiones de la etapa crónica; por otra parte, la detección de anticuerpos específicos es la forma más simple de diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Por estas razones la identificación y caracterización de los antígenos de *T. cruzi* ha sido y sigue siendo una de los principales objetivos de la investigación en Chagas. El tipo de resultado obtenido ha dependido de las técnicas utilizadas. En un primer momento surgieron controversias entre distintos grupos de investigadores por resultados aparentemente contradictorios. La existencia de anticuerpos monoclonales y la posibilidad de clonar genes de antígenos permitieron identificar y caracterizar claramente varios antígenos. El *Trypanosoma cruzi*, a diferencia de los tripomastigotes africanos no experimenta "variación antigénica" (Borst, 1986). Sólo existirían diferencias entre cepas para algunos antígenos, mientras los otros se encontrarían altamente conservados (Snary, 1985).

La respuesta inmune hacia el parásito podría dividirse para su estudio en una respuesta efectora lítica, una respuesta "irrelevante", y una respuesta patológica; si bien esta es una definición operacional es lógico pensar que estas respuestas son rovocadas por distintos tipos de antígenos. Así, los blancos moleculares de la respuesta humoral lítica son principalmente antígenos de superficie de tripomastigotes sanguíneos o metacíclicos, mientras que los anticuerpos detectados por serología clásica cuya presencia no depende de una infección activa están producidos por componentes mayormente citoplasmáticos muchos de los cuales son proteínas altamente conservadas (Brenner, 1986).

También la respuesta inmune humoral en la etapa aguda y crónica estaría dirigida hacia distintas clases de antígenos (Stolf *et al.*, 1988). las IgM de la etapa aguda reaccionan sobre todo con proteínas de superficie mientras que la respuesta de los pacientes crónicos (mayormente IgG) está dirigida principalmente contra proteínas citoplasmáticas si bien ciertas proteínas de superficie siguen siendo reconocidas (Stolf *et al.*, 1988)

1.3.1. Glicoproteínas de superficie

1.3.1.1. LPPG: Lipopeptidoglicano.

Se trata de un complejo entre un glicolípido y tres glicoproteínas de 37, 31 y 24 KD que se obtiene a partir de epimastigotes (Lederkremer *et al.*, 1976, 1977). Anticuerpos contra este complejo reaccionan con un antígeno circulante presente en suero de infectados agudos, y con amastigotes; lo que sugiere que este complejo sería secretado por el parásito durante el estadio amastigote (Snary *et al.*, 1985).

1.3.1.2. Glicoproteínas mayores de superficie.

Existen dos grupos mayoritarios de glicoproteínas de superficie, uno en el rango de los 70-75 KD y el otro en el rango de los 80-90 KD. Varios grupos han estudiado sus propiedades y funciones y existen aún discrepancias en los datos debidas sobre todo a diferencias en las técnicas y cepas empleadas.

Snary y Hudson (1980) describieron una glicoproteína de 90 KD presente en todos los estadios del parásito. Esta proteína también fue identificada por Zingales *et al.* (1982) quienes describieron una gp95 y una gp85 específica de tripomastigote. A su

Introducción

vez, Nogueira *et al.* (1981b, 1982) informaron el hallazgo de una glicoproteína de 90 KD expresada por estadios específicos del huésped mamífero que correspondería a la gp 85.

Utilizando anticuerpos monoclonales contra epimastigotes Snary *et al.* (1981) identificaron una gp72 específica de epimastigote. Por su parte Nogueira *et al.* (1981b, 1982) describió la existencia de una gp75 presente en los estadios del insecto de *Trypanosoma cruzi*.

Algunas de estas glicoproteínas cumplirían importantes funciones en los mecanismos de escape y la interiorización celular:

La gp90 estaría involucrada en el mecanismo antifagocítico de los tripomastigotes y probablemente relacionada con una actividad neuraminidasa asociada al mecanismo de entrada a la célula (Nogueira *et al.*, 1986).

La gp85 (Zingales *et al.*, 1982) se encuentra involucrada en la internalización del parásito en la célula huésped: la ausencia de esta glicoproteína en tripomastigotes tratados con tunicamicina, inhibidor de la glicosilación, se correlaciona con la pérdida de la infectividad *in vitro* (Zingales *et al.*, 1985). Además anticuerpos contra esta proteína inhiben *in vitro* la infección a fibroblastos. Estudios inmunoquímicos demostraron que el epítopo reconocido es un β -D-galactofuranósido terminal. Esto fue confirmado por una experiencia en la cual el disacárido sintético gal(13)manp produjo una inhibición significativa de la infectividad *in vitro* (De Arruda *et al.*, 1989).

Una gp85 sería también el receptor de fibronectina del parásito. Ouaiissi y col. comprobaron que la fibronectina celular es capaz de modular la adhesión del parásito a las células del huésped (Ouaiissi, 1988). Las proteínas de superficie de *T. cruzi* que ac-

tuarían como receptoras de fibronectina fueron aisladas por cromatografía de afinidad y los anticuerpos contra estas proteínas reconocieron un polipéptido de 85 KD (Ouaissi, 1988). Péptidos con la secuencia de la fibronectina RGD (Arg-Gly-Asp), reconocida específicamente por el receptor de fibronectina, fueron capaces de inhibir *in vitro* la entrada del parásito. Ratones inmunizados con estos péptidos fueron protegidos de una dosis letal de tripomastigotes demostrando que la inhibición de la adhesión del parásito a la célula tendría utilidad en inmunoprolifaxis (Ouaissi *et al.*, 1986).

La gp 72 mayoritaria en epimastigotes es el receptor para el componente C3b del complemento involucrado en la lisis por la vía alterna (Joiner *et al.*, 1985), en tripomastigotes esta interacción es dificultada por distintos mecanismos estadio-específicos y por el bajo nivel de expresión de la gp72 (Nogueira, 1986).

1.3.1.3. La glicoproteína de 25 KD.

Esta glicoproteína fue caracterizada inicialmente por Mendonca Previato *et al.* (1983) a partir de extractos de epimastigotes y se encuentra asociada a la membrana del parásito. La gp25 presenta interés diagnóstico, y se ha determinado que reacciona con el 95% de los sueros de humanos infectados por *T. cruzi* (Scharfstein *et al.*, 1983) (ver 1.3.4.).

1.3.2. Antígenos involucrados en Inmunoprotección

Teniendo en cuenta la existencia de una respuesta inmune humoral protectora de la infección chagásica y que *T. cruzi* no experimenta variación antigénica como otros tripanosomatidos se han encarrado diversas formas de vacunación, utilizando tanto parásitos muertos o atenuados, homogenatos, glicoproteínas de superficie y fracciones subcelulares (Snary, 1985). En consecuencia, se han

tratado de identificar antígenos involucrados en la protección, tanto aquellos que median la lisis del parásito como aquellos capaces de generar anticuerpos neutralizantes. Así por ejemplo, la inmunización con la glicoproteína de superficie gp90 de epimastigotes (Snary y Hudson, 1979) protegió a ratones de la infección letal aguda (Scott y Snary, 1979).

Según Krettli y Brenner (1982) (ver 1.2.1), los anticuerpos líticos sólo se producen durante infecciones activas. Se demostró que los sueros de pacientes crónicos con actividad lítica reaccionaron con una proteína de 160 KD específica de tripomastigotes contra la que no se detectaron Acs en suero de pacientes chagásicos curados por quimioterapia (parásito eliminado de la sangre). Esta proteína de 160 sería un probable blanco molecular de los anticuerpos líticos (Martins *et al.* 1985). Norris *et al.* (1989) lograron purificar esta glicoproteína por inmunoafinidad a partir de tripomastigotes metacíclicos utilizando un anticuerpo monoclonal y verificaron que su inoculación producía en conejos anticuerpos capaces de lisar al parásito en presencia de complemento.

Yoshida (1986) inmunizó ratones con metacíclicos muertos por tratamiento con merthiolate y logró protegerlos contra la infección letal aguda. Los sueros de los ratones inmunizados produjeron "in vitro" la lisis mediada por complemento de tripomastigotes. Estos sueros y los de ratones infectados crónicos, capaces de transferir resistencia y con alta actividad lítica, inmunoprecipitaron proteínas de superficie de tripomastigotes metacíclicos de 77, 80 y 88 KD. Un anticuerpo monoclonal, IG7, que disminuyó la infectividad de metacíclicos en ratones, identificó una proteína de superficie específica tripomastigotes metacíclicos de 90 KD (Teixeira y Yoshida, 1988 ; Araguth *et al.*, 1988). Otro anticuerpo monoclonal que también produjo un efecto

neutralizante en la infectividad de tripomastigotes metacíclicos esta dirigido hacia glicolípidos de superficie de 35 y 50 KD (Yoshida *et al.*, 1989).

1.3.3. Antígenos involucrados en la inmunopatogenia.

Teniendo en cuenta las evidencias discutidas en 1.2.3. varios han sido los trabajos en los que se trató de identificar a los antígenos de *T. cruzi* que provocan una respuesta inmune autoagresiva.

Los conejos inmunizados con fracciones subcelulares de *T. cruzi* mostraron, en el examen histopatológico, focos de miocarditis con infiltrado linfocitario (Teixeira *et al.*, 1975). El proceso inflamatorio fue mas intenso en los animales inoculados con una fracción (Fs) compuesta por ribosomas, polirribosomas, microfilamentos y lisosomas pequeños (Teixeira *et al.*, 1975, Teixeira y Santos Buch, 1974). Los linfocitos de conejos inmunizados con la fracción F2, compuesta de núcleos y membranas plasmáticas, y Fs compuesta de lisosomas y fragmentos de mitocondrias y retículo (teixeira y santos Buch, 1974), lisaron fibras musculares infectadas y no infectadas (Santos Buch y Teixeira 1975).

Experiencias realizadas en ratones por Ruiz *et al.* (1985) mostraron que la mayoría de los ratones inmunizados con la fracción microsomal (Mc, análoga a la fracción ribosomal Fs) desarrollaron miocarditis inflamatoria mientras que los inmunizados con la fracción citosólica Cs mostraron predominantemente alteraciones en el ECG. Este indicaría que los mecanismos involucrados en la generación de la miocarditis y la destrucción del sistema de conducción del impulso eléctrico son diferentes dado que son provocados por inmunización con fracciones antigenicas distintas (Ruiz *et al.*, 1985)

De Titto (1982, 1985) midió la respuesta inmune humoral y celular de pacientes chagásicos contra estas fracciones del parásito. Comprobó que el título de anticuerpos anti-fracción Mc y la respuesta linfoproliferativa hacia la fracción Cs son mayores en pacientes con enfermedad cardíaca de Chagas sugiriendo una asociación entre la respuesta inmune contra estas fracciones y la patología cardíaca (De Titto, 1982, 1985).

Existen varios mecanismos a través de los cuales los antígenos de *T. cruzi* podrían inducir reacciones inmunológicas autoagresivas. Estos son: la producción de autoanticuerpos patológicos y células autorreactivas, la formación de inmunocomplejos y la sensibilización de tejidos.

1.3.3.1 Producción de autoanticuerpos patológicos y células autorreactivas por reactividad inmunológica cruzada.

En la infección con *T. cruzi* se han descrito distintos mecanismos que podrían desencadenar la activación de células auto-

rreactivas (ver Fig 3 y 1.2.3.2.3.). Este capítulo se referirá al rol de los antígenos de *T. cruzi* en la ruptura de la tolerancia a través del mecanismo denominado "mimetismo molecular" (Dyrberg y Oldstone, 1986).

Pueden existir en un patógeno antígenos homólogos a los del huésped; pero ser suficientemente distintos, o presentarse en el contexto de un "carrier" o epítipo T suficientemente inmunogénico como para que el sistema inmune del huésped los reconozca como extraños y genere una respuesta inmune que reaccionará en contra el antígeno parasitario y el correspondiente del huésped (Dyrberg y Oldstone, 1986). Este mecanismo ha sido verificado para el virus de la encefalomiелitis que contiene una secuencia antigénica

TABLA III: Antígenos de *Trypanosoma cruzi* que presentan reactividad inmuno lógica cruzada con tejidos del huésped.

Antígeno <i>T. cruzi</i> /estadio	Reactividad cruzada con:	Autores
25 KD/ epi	Sarcolema muscular	Sadigurski <i>et al.</i> , 1982 Santos Buch <i>et al.</i> , 1985
p 160 KD/try flagelar	Proteína de 45 KD de cerebro, nervio ciático, plexo mientérico.	Van Vooris y Eisen, 1989
gal α -1:3 gal superficie	gal α -1:3 gal laminina	Szarfman <i>et al.</i> , 1982; Towbin <i>et al.</i> , 1988; Avila <i>et al.</i> , 1989
NI/epi	miocardio	Mc Cormick y Rowland, (1989)
p50/epi/superf. α -tubulina ?	α -tubulina de cerebro.	Alcina <i>et al.</i> , 1986
p 38 KD/p 57 KD	p 37 KD y p 58 KD cerebro, espina dorsal.	Snary <i>et al.</i> , 1983.
NI	p 20 KD miocardio, p 68 KD cerebro, espina dorsal y riñón	Wood <i>et al.</i> , 1982.

NI: No identificados, epi: epimastigote, try: tripomastigotes.

homóloga a la proteína básica de mielina (Fujinami y Oldstone 1986). En el capítulo 1.2.3 se describió la identificación de varios antígenos de *T. cruzi* que presentan reactividad inmunológica cruzada con el huésped (ver 1.2.3.2.2) y en la Tabla III se resumen los más importantes. La demostración formal de un mecanismo de mimetismo molecular para estos antígenos todavía falta.

1.3.2.2. Formación de inmunocomplejos.

Araujo (1982) demostró la presencia de antígenos circulantes de *T. cruzi*. Estos podrían formar con anticuerpos específicos inmunocomplejos circulantes. Silva *et al.* (1985) (ver 1.2.3.2.2.) aportaron datos sugiriendo la asociación entre la aparición de inmunocomplejos y el daño muscular en la infección aguda.

1.3.2.3. Sensibilización de tejidos del huésped.

Los antígenos circulantes de *T. cruzi*, y los antígenos liberados de las células infectadas y rotas por el parásito, se adsorben rápidamente sobre las células no infectadas del huésped (Ribeiro dos Santos y Hudson, 1980; Araujo, 1982; Williams *et al.*, 1985). Estas células sensibilizadas por antígenos de *T. cruzi* son susceptibles de ser lisadas por mecanismos de citotoxicidad celular. Ribeiro dos Santos y Hudson (1980a) mostraron que células tratadas con antígenos de *T. cruzi* eran lisadas por linfocitos provenientes de pacientes chagásicos y de ratones infectados o por anticuerpos capaces de mediar reacciones de CCDA; Araujo (1985) comprobó que cuando cultivos de células infectadas son tratados con linfocitos provenientes de ratones crónicos tanto las células parasitadas como las adyacentes no parasitadas son lisadas, sugiriendo que estas últimas son sensibilizadas por antígenos liberados de las células parasitadas adyacentes (Araujo, 1985).

1.3.2.4. Respuesta anti-idiotípica.

La respuesta primaria hacia ciertos epitopes de *T. cruzi* muy antigénicos podría generar una respuesta anti-idiotípica patológica. Sadigursky *et al.*, (1988) y Gazzinelli *et al.* (1988 b) comprobaron una asociación entre la respuesta anti-idiotípica humoral y celular contra la respuesta anti-*T. cruzi* primaria y la cardiopatía en pacientes infectados con *T. cruzi*.

Trabajos posteriores mostraron que vesículas derivadas de *T. cruzi* con la misma orientación que su membrana plasmática se adhieren a mioblastos L6 con mayor afinidad que a células de músculo liso o epiteliales (Von Kreuter *et al.*, 1988). Demostraron así, el reconocimiento específico de receptores saturables de mioblastos por epitopes complementarios presentes en la superficie de *T. cruzi* (Von Kreuter *et al.*, 1988). Luego se comprobó que la adhesión de *T. cruzi* a mioblastos es inhibida por ligandos de los receptores β -adrenérgicos y muscarínico colinérgicos indicando que estos receptores musculares están involucrados en la adhesión y tropismo celular de *T. cruzi* (Von Kreuter y Santos Buch, 1989). Esto indica la presencia, en la superficie del parásito, de moléculas que reconocen específicamente dichos receptores (Von Kreuter y Santos Buch, 1989). En 1.2.3.2.2. se mencionó la existencia de anticuerpos contra el receptor β -adrenérgico capaces de modular su actividad (Borda *et al.*, 1984). La existencia de receptor β -adrenérgico en *T. cruzi* en los estadios infectivos no ha sido aún demostrada. Podría pensarse que anticuerpos anti-receptor β adrenérgico surjan como respuesta anti-idiotípica hacia la respuesta primaria contra el epítipo de *T. cruzi* que es complementario al receptor β -adrenérgico (Von Kreuter y Santos Buch, 1989).

1.3.4. Antígenos de importancia diagnóstica

Existen varios trabajos donde se han tratado de identificar los antígenos definidos por los sueros de humanos infectados.

Las glicoproteínas principales de 90 y 72 KD de *T. cruzi* están presentes en todas las cepas de parásitos ensayadas (Nogueira 1986), los tests de inmunoprecipitación demostraron que se trata de componentes inmunodominantes. Dragon *et al.* (1985), inmunoprecipitaron las proteínas con sueros de pacientes e identificaron un antígeno de 90KD específico de tripomastigote. Kirchoff *et al.* (1987) encontraron que 90 de 140 sueros detectan componentes de 90 Kd y 72 Kd de epimastigotes que no son reconocidos por sueros de otras enfermedades. Para tratar de establecer si la reactividad hacia los antígenos del parásito está dirigida sólo hacia el componente glucídico o si también los polipéptidos son reconocidos, se inmunoprecipitaron los productos de la traducción *in vitro* de ARNm de *Trypanosoma cruzi*, se detectaron varios polipéptidos demostrando la presencia de secuencias polipeptídicas antigénicas (Rangel Aldao *et al.*, 1987). Otros autores, identificaron por inmunoblot los antígenos reconocidos por infectados y por cardiopatas chagásicos crónicos (Grogl y Kuhn, 1984).

Son pocos los antígenos que reaccionan con sueros de gran número de infectados; la gp 25 (Scharfstein *et al.*, 1983), se obtiene fácilmente de epimastigotes y es reconocida por el 96% de los infectados con *T. cruzi* (N=173) pertenecientes a áreas endémicas muy distintas por lo que ha sido considerado el mejor antígeno diagnóstico de la infección crónica. La glicoproteína gp25 no es inmunogénica "per se", sino que es el producto de la proteólisis de precursor, la gp51/57 identificada por inmunoprecipitación con anticuerpos anti-gp25 (Scharfstein *et al.*, 1985). Ensayos posteriores de T-cell *western blot* demostraron que el 30% de la

Introducción

estimulación total de células mononucleares periféricas humanas es producido por antígenos de *T. cruzi* entre 51-57 KD (Gazzinelli *et al*, 1988 c)

Ciertos estudios mostraron que el reconocimiento antigénico es diferente en las distintas etapas de la enfermedad por lo que no se podría utilizar un único antígeno para el diagnóstico de la infección (Israelski *et al.*, 1988). Los trabajos de clonado de antígenos de *T. cruzi* han permitido identificar nuevos determinantes antigénicos polipeptídicos con potencial diagnóstico (ver 1.5.4.).

1.4. DIAGNOSTICO DE LA INFECCION CHAGASICA.

1.4.1. Diagnóstico parasitológico.

Se realiza demostrando la presencia del parásito en la sangre. La examinación directa es útil sólo en la detección de casos agudos con alta parasitemia. El examen de "gota gruesa" se prefiere al extendido dada la fragilidad de los tripomastigotes. Para cepas de baja virulencia se deben utilizar técnicas de concentración. (Van Meirvenne y Le Ray, 1985).

En la etapa crónica sólo el xenodiagnóstico puede demostrar la presencia del parásito. Recientemente el empleo de sondas específicas de ADN de kinetoplasto o de ADN total del parásito (Ashall *et. al*, 1988) y de las técnicas de amplificación de genes combinada con la posibilidad de clonar genes específicos de *T. cruzi* permiten vislumbrar grandes avances en este terreno.

1.4.2. Diagnóstico serológico.

Las técnicas serológicas resultan imprescindibles para los monitoreos masivos de la infección por *T. cruzi*. La superposición de áreas endémicas de *T. cruzi* con áreas endémicas para *Leishmania sp.* o *Trypanosoma rangeli* requiere que los tests sean altamente específicos (Van Meirvenne y Le Ray, 1985). Los tres tests mayormente empleados en los ensayos serológicos de rutina son:

a) Test de fijación de complemento (Cerisola y Rosebaum, 1964): las dificultades en la estandarización de los resultados y la presencia de anticuerpos que reconocen al parásito en enfermedades autoinmunes constituyen impedimentos serios de este test (Van Meirvenne y Le Ray, 1985).

b) Inmunofluorescencia indirecta sobre epimastigotes fijados con formaldehído: se caracteriza por su alta sensibilidad y especificidad a diluciones bajas de suero y buena reproducibilidad (Camargo et al., 1966; Alvarez et al., 1968).

c) Aglutinación. Hemoaglutinación con eritrocitos estabilizados cubiertos de antígenos de *T. cruzi* (Cerisola et al., 1967), aglutinación indirecta con látex y aglutinación directa con epimastigotes tripsinizados y fijados: Son tests específicos a diluciones bajas. Tiene limitaciones similares a test de fijación de complemento (Van meirvenne y Le Ray, 1985).

d) ELISA (Inmunoensayo en fase sólida) con extractos totales del parásito, con fracciones antigénicas y con antígenos purificados: La sensibilidad es muy alta por lo que no son raros los falsos positivos (Van Meirvenne y Le Ray, 1985). El uso de antígenos purificados y los tests de inhibición de anticuerpos monoclonales monitoreados por ELISA constituyen importantes aportes al diagnóstico diferencial Chagas-Leishmaniasis (gp25, Scharfstein et al, 1983; Lemesre et al., 1986). Los antígenos recombinantes y los péptidos sintéticos incorporan nuevas posibilidades en este campo.

1.5. APLICACIONES DE LAS TECNICAS DE LA BIOLOGIA MOLECULAR Y LA INMUNOQUIMICA A LA INMUNOPARASITOLOGIA .

Los métodos de la biología molecular y las técnicas de ADN recombinante produjeron un profundo avance en inmunoparasitología. Estos han permitido el clonado de antígenos de parásitos y su secuenciación, la deducción de su estructura primaria, la consecuente predicción de funciones y propiedades, y el análisis de sus relaciones filogenéticas con proteínas conocidas. Con el uso de vectores de expresión, se han podido producir antígenos recombinantes en bacterias *E. coli* que serían de potencial utilidad en la prevención y el diagnóstico de las enfermedades parasitarias.

1.5.1 Clonado de expresión.

El clonado de expresión de ADNc y ADN genómico ha probado ser una herramienta muy eficaz para la caracterización e identificación de antígenos de distintos patógenos microbianos. Utilizando esta metodología se evita el procedimiento de rastreo clásico por hibridación con sondas radiactivas y la necesidad de verificación de la identidad del producto del gen clonado (selección de híbridos ADN-RNA, traducción "in vitro" del mRNA seleccionado, inmunoprecipitación). En las bibliotecas de expresión el producto del ADN clonado es sintetizado por la maquinaria molecular de la bacteria y puede ser directamente identificado por anticuerpos específicos y detectado inmunoenzimáticamente o con proteína A [131].

El vector λ gt11 es el vector de expresión de elección (Huynh *et. al*, 1985). El clonado molecular en λ gt11 de ADN y ADNc de parásitos permite no solo la detección inmunológica de los recombinantes de interés (el péptido que codifica el ADNc se expresa como proteína de fusión y puede ser detectado por anticuerpos), sino también la posibilidad de preparar el péptido clonado a es-

cala de laboratorio. De esta forma el trabajo con λ gt11 permite trabajar simultáneamente con el ADNc clonado (secuenciación, identificación de transcriptos, etc), y con la proteína de fusión para caracterizar la respuesta inmune humoral y celular hacia el antígeno clonado.

1.5.2. El vector de clonado y expresión λ gt11.

El fago λ gt11 fue construido por Young *et al.* (1983) y su estructura se muestra en la Figura 4. Como la eficiencia de clonado no depende de la transformación sino del ligado-empaquetado *in vitro*, muy alta para los vectores derivados del fago lambda, permite la construcción de bibliotecas muy representativas (Huynh *et al.*, 1985). En el λ gt11 el ADNc se inserta en el único sitio EcoRI del genoma del fago, dentro del gen LacZ (*E. coli*): de manera que la expresión de los ADNcs cuyos marcos de lectura continúan al de la β -galactosidasa se encuentran bajo el control del promotor-operador lactosa: cuando la transcripción del gen lacZ es desreprimida por el agregado de IPTG se induce la expresión del ADNc insertado en forma de una proteína de fusión β -galactosidasa-péptido clonado. Esto permite la identificación del ADNc de interés utilizando un anticuerpo que reaccione con el péptido codificado por el mismo por rastreo inmunológico de la biblioteca.

En la construcción de λ gt11 se incluyeron varias mutaciones para se pueda utilizar como vector de clonado o de expresión según el hésped *E. coli* que se elija. Estas mutaciones son la cI857 que produce un represor termosensible a 37-42°C y la mutación ambar S100 que hace al fago defectivo para la lisis (Huynh *et al.*, 1985).

λ -gt 11

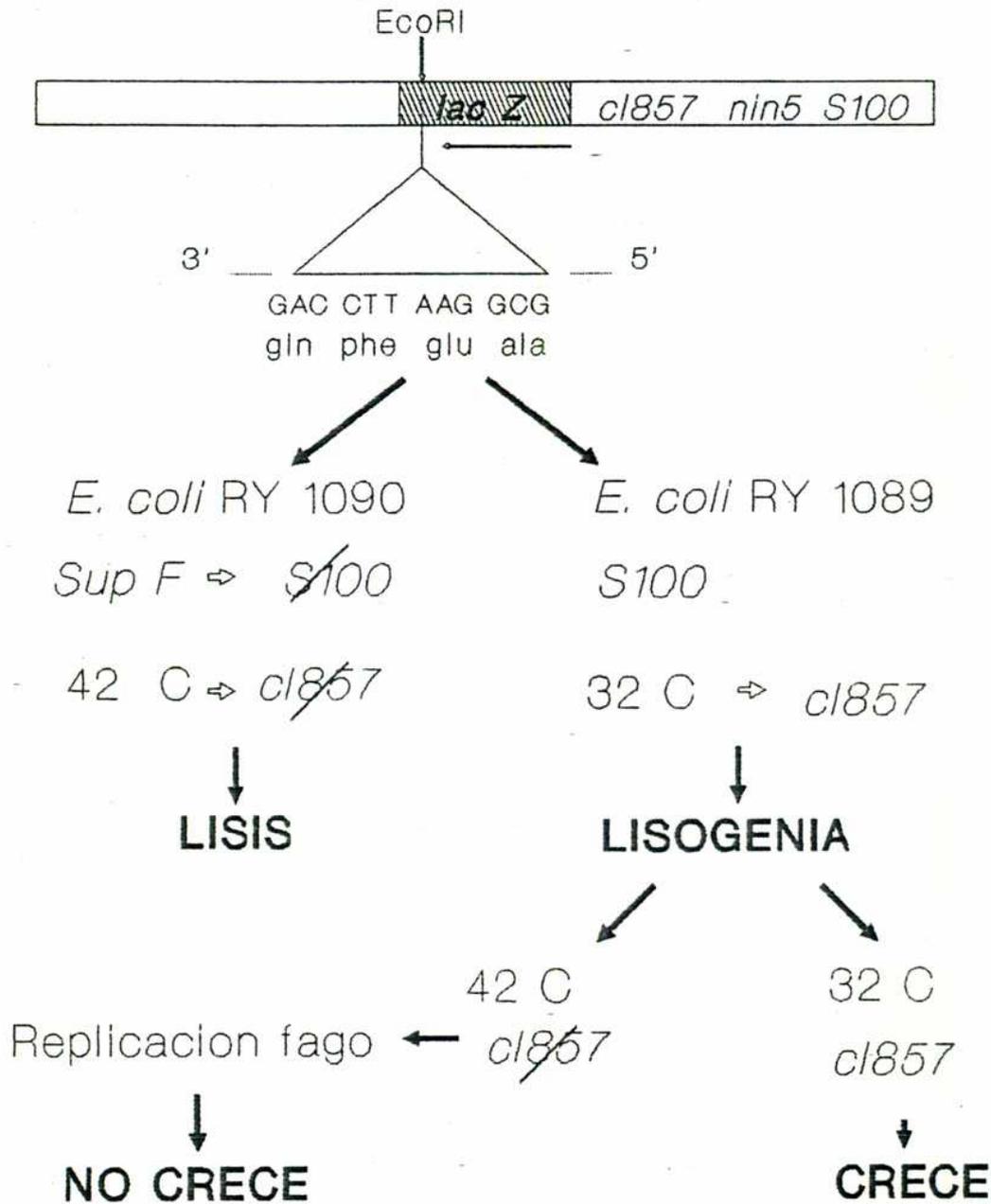


Figura 4: Genética del fago vector λ gt11 y sus huéspedes *E. coli* RY 1090 y *E. coli* RY 1089 (Huynh et al., 1985).

1.5.2.1. λ gt11 como vector de clonado: El rastreo inmunológico.

Todo rastreo inmunológico de una biblioteca de expresión de ADNc en λ gt11 tiene como objetivo individualizar uno o varios fagos

recombinantes cuyo ADNc insertado codifique la síntesis de un polipéptido que reaccione con anticuerpos o sueros específicos que se usan como "sonda inmunológica". La cepa que se usa para plaquear la biblioteca en un rastreo inmunológico es la *E. coli* RY 1090 cuyas principales características son:

a-Contiene al plásmido pMC9 (pBR322-lacI^q) que contiene el represor lactosa I^q.

b-Es deficiente en la proteasa *lon*, cuya función es degradar proteínas anómalas (Huynh *et al.*, 1985).

c-Contiene al *Sup F* que suprime la mutación lisis defectiva S100 de λ gt11.

Cuando se infecta *E. coli* RY 1090 con λ gt11 y se incuba a 37-42°C el represor cI857 se inactiva y como la bacteria suprime S100 se forman placas de lisis (Figura 4 y 5), en ausencia de IPTG no se podrá expresar el gen lacZ; de esta manera se evita que proteínas de fusión potencialmente tóxicas inhiban la formación de las placas de lisis.

Una vez que las placas de lisis son visibles la expresión del gen lacZ se induce cubriendo el césped de bacterias con un filtro de nitrocelulosa impregnado en IPTG e incubando a 37°C (Fig. 5). De esta manera la proteína de fusión que sintetizan las bacterias que rodean cada placa de lisis será liberadas cuando el fago lise la bacteria (cI857 es inactivo a 37°C) e inmovilizadas en la nitrocelulosa. Al retirar la hoja luego de 2 horas de incubación quedará la impronta de las proteínas de fusión sintetizadas por todas las placas (Fig. 5). A continuación los sitios inespecíficos de la nitrocelulosa se bloquean con proteínas poco antigéni

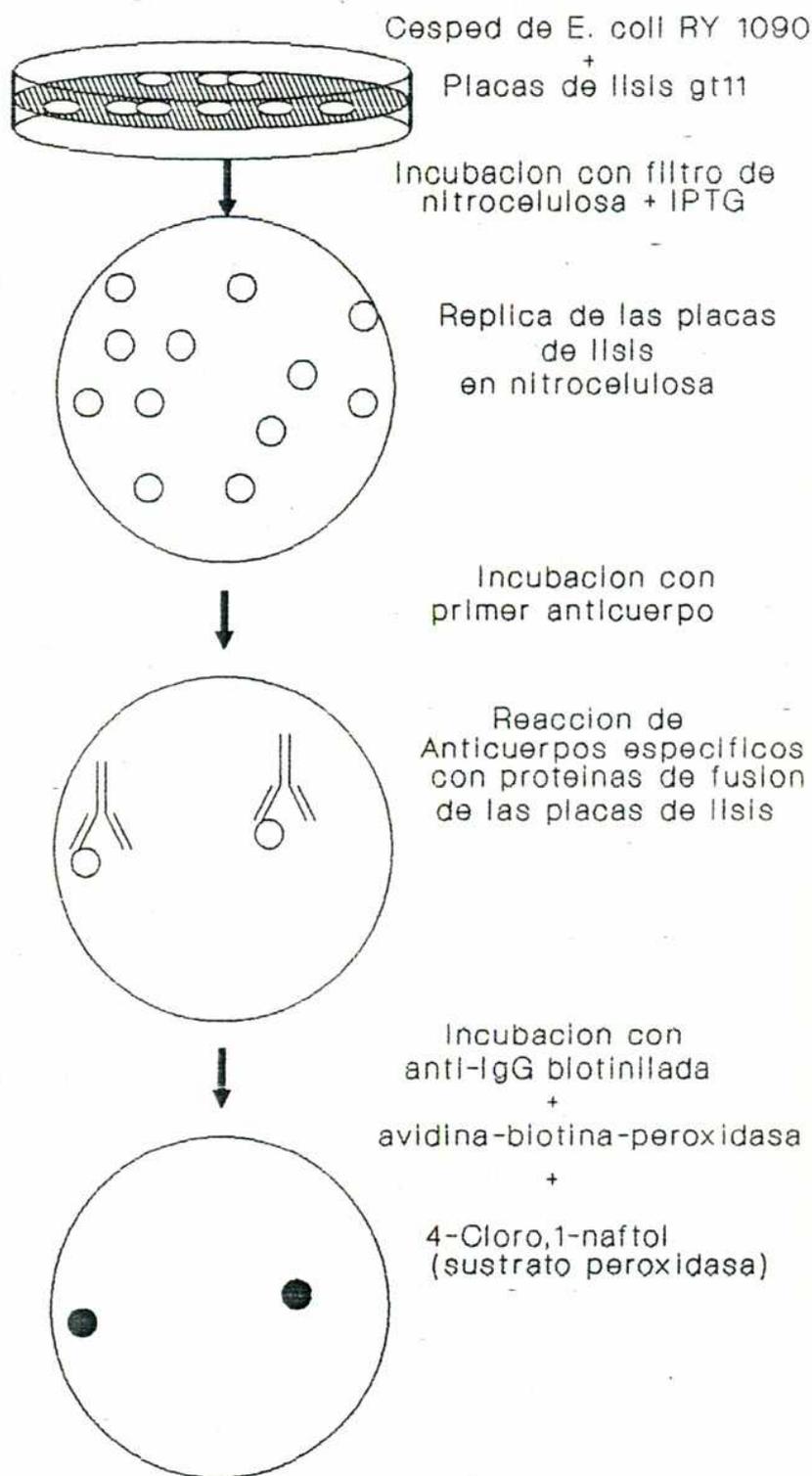


Figura 5:

Rastreo inmunológico de una biblioteca de expresión de ADNc en el fago λ gt11 (Hunynh *et al.*, 1985).

cas (caseína, albúmina) y se incubaba con la dilución apropiada de anticuerpo. Los anticuerpos que reconocen la proteína de fusión expresada por algún recombinante se detectan con un segundo anticuerpo y un sistema inmunoenzimático. El fago recombinante responsable de la señal positiva se puede aislar y purificar en sucesivos rastreos (ver 2.2.3).

1.5.2.2. λ gt11 como vector de expresión

Para utilizar el fago λ gt11 como vector de expresión y producir proteínas de fusión en cantidad, se debe lisogenizar una bacteria *E. coli* con el fago recombinante. Los cultivos de bacterias lisogénicas producirán proteínas de fusión cuando sean inducidos con IPTG.

La bacteria que se utiliza en este caso es la *E. coli* RY 1089 que no tiene Sup F y no puede suprimir la mutación lisis defectiva del fago. Infectando a 32°C, temperatura a la que el represor de la lisis es activo, se favorece el ciclo lisogénico del fago (Fig 4). La lisogenia se verifica incubando las bacterias a 42°C y 32°C, debido a la presencia de un represor cI857 de λ gt11 las bacterias lisogénicas crecen a 32°C y no crecen a 42°C (ver 2.6.1. y la Fig 4).

Una vez obtenida la bacteria lisogénica, se cultiva en medio líquido a 32°C y luego se termoinduce a 44°C, a esta temperatura el fago se replica dentro de la bacteria (Fig. 4, 2.6.1 y 2.6.2). La síntesis de proteínas de fusión se induce por agregado de IPTG; así, al efecto del IPTG se suma el efecto de amplificación del templado por termoinducción. La combinación de ambos efectos permite obtener altos rendimientos en la síntesis de proteínas de fusión (ver 2.6.2.).

1.5.3. Identificación y síntesis química de determinantes antigénicos en proteínas.

Una vez clonado y secuenciado un antígeno parasitario, pueden usarse varios métodos para predecir la localización de determinantes antigénicos, a partir de la secuencia aminoacídica (Van Regenmortel y De Marcillac, 1988).

Los anticuerpos tienden a reconocer las partes más expuestas de las proteínas, en este principio está basado el método de Kyte y Doolittle (1982) que correlaciona antigenicidad con hidrofiliidad de un segmento de la molécula proteica. Por su simplicidad, este método y sus variaciones empleando distintas escalas de hidrofiliidad son los más utilizados (Van regenmortel y De marcillac, 1988).

Las secuencias C- y N-terminales de las proteínas siempre están orientadas hacia la superficie y son antigénicas, esto también sucede porque son zonas muy móviles de la molécula. La mayor flexibilidad de un segmento de la molécula proteica contribuye a un mejor amoldamiento entre epitope y anticuerpo contribuyendo a la antigenicidad. Existen otros métodos de predicción que están basados en este principio (Van Regenmortel y De Marcillac, 1988).

Una vez identificada la secuencia de los determinantes antigénicos se pueden sintetizar químicamente utilizando el método de fase sólida de Merrifield (Van Regenmortel *et al.*, 1988). La utilidad de estos péptidos sintéticos reside en que generalmente presentan reactividad inmunológica cruzada con las proteínas nativas y se pueden emplear como antígenos y como inmunógenos sintéticos (Arnon, 1986). Por esta razón tendrían aplicación en el diagnóstico y la prevención de enfermedades parasitarias. Para

Malaria por ejemplo, existen varias vacunas hechas a base de péptidos sintéticos que se encuentran en fase experimental (Perrin *et al.*, 1988).

1.5.4. Clonado de antígenos y otros genes de *Trypanosoma cruzi*

En un primer momento las investigaciones en la biología molecular de *T. cruzi* se centraron en el estudio del ADN del kinetoplasto util en la clasificación de poblaciones parasitarias (Ver 1.1.3.), y en el estudio de la expresión genética específica de cada estadio del parásito y su posible rol en la diferenciación. Desde que se descubrió el mini-exón y el splicing inter-molecular molecular en *T. brucei* (Borst, 1986), y se verificó la presencia del mini-exón en *T. cruzi*, se trató de comprobar si este último, aunque sin experimentar variación antigénica, poseía este mecanismo. Gonzales *et al.* (1985) informaron el aislamiento de un mRNA abundante de *T. cruzi* que contenía en su extremo 5' la secuencia del mini-exón, dicha secuencia no pudo ser encontrada en el ADN genómico del que se transcribía el mensajero por lo que los autores concluyeron que en *Trypanosoma cruzi* debía existir un mecanismo por el cual la secuencia del mini-exon y el gen se transcriben por separado y mediante un ensamblado intermolecular forman un mismo mRNA. En este trabajo también se comprobó por primera vez la existencia de secuencias repetitivas en el ADN de *T. cruzi*. Por digestión parcial con enzimas de restricción se determinó que el gen a partir del cual se transcribe el ARNm está formado por repeticiones de 940 pb organizadas en tandem (Gonzales *et al.*, 1985).

A partir de los éxitos obtenidos en el clonado de antígenos de *Plasmodium falciparum* (Kemp *et al.*, 1987) varios grupos se esforzaron en clonar antígenos de *T. cruzi* con especial interés en el clonado de antígenos de superficie específicos de tripomastigo-

tes, involucrados en la respuesta inmune protectora o la penetración celular, y de antígenos reconocidos por humanos infectados, de posible aplicación diagnóstica (ver Tabla IV).

1.5.4.1. Clonado de antígenos y genes estadio-específicos.

A partir del rastreo inmunológico de una biblioteca en λ gt11 de ADN genómico con suero de conejo inmunizado con antígenos de superficie de trypomastigotes iminobiotinilados, Peterson *et al.* (1986), clonaron un fragmento de ADN genómico de 500 pb que codifica para un determinante antigénico de una proteína de 85K específica de trypomastigotes. La secuenciación reveló que contenía cinco repeticiones de 9 aminoácidos DKKESGDSG lo que significa una semejanza con la estructura de los antígenos de *Plasmodium falciparum* (Kemp *et al.* 1987, Peterson *et al.* (1986). En un estudio reciente (Peterson *et al.*, 1989), se presentan evidencias indicando que el gen del antígeno de superficie de 85 KD es miembro de una familia multigénica y que la repetición de 27 pb define un subset de genes de esa familia; experimentos de sensibilidad a la nucleasa bal 31 del fragmento genómico que contiene al fragmento de 500 pb anteriormente citado demostraron la localización telomérica del miembro de la familia multigénica que es transcripcionalmente activo. Esto sugiere una analogía con las VSG de *T. brucei* cuyos genes se expresan cuando se traslocan a sitios de expresión teloméricos durante la infección (Peterson *et al.*, 1989). Con un enfoque similar este grupo clonó un ADNc de *T. cruzi* que codifica para determinantes antigénicos de una glicoproteína de 90 kd específica de tripomastigotes. El gen de esta gp90 forma parte de otra familia multigénica de 20 miembros. Esta gp90 se encuentra en algunas cepas y se detectaron anticuerpos específicos en el suero de unos pocos pacientes chagásicos (Beard *et al.*, 1988).

Varios grupos intentaron el clonado de genes específicos de estadio utilizando estrategias de hibridización. Se pudieron clonar ADNcs específicos de trypomastigotes metacíclicos; uno de estos clones codifica para una proteína cuya expresión es regulada por AMPc y presenta homología con el proto-oncogen *c-fos*, proteína que regula la transcripción de genes inducidos por AMPc (Heath *et. al*, 1988). Dado que la metaciclogénesis está influenciada por el AMPc este hallazgo sugiere que la proteína clonada se halla involucrada en la diferenciación de *T. cruzi* (Heath *et. al*, 1988). En otro estudio, se identificaron genes estadio-específicos de una biblioteca genómica de *T. cruzi* utilizando una estrategia de hibridización diferencial (Takle *et. al*, 1988); uno de estos clones genómicos fue secuenciado y expresado en *E. coli*. Se verificó que codifica para un antígeno de superficie de 85 KD específico de trypomastigote diferente al clonado por Peterson *et al.* (1986). Finalmente, en un enfoque inmunológico informado por Gruber y Zingales (1989), donde una biblioteca en λ gt11 fue rastreada con el suero de un conejo inmunizado con tripomastigotes y pre-adsorbido con epimastigotes; se clonaron dos antígenos formados por repeticiones de 8 y 12 aa reconocidos por suero de humanos infectados (Gruber y Zingales 1989).

1.5.4.2. Clonado de proteínas de *T. cruzi* involucradas en la respuesta autoinmune.

Varios grupos intentaron el clonado de proteínas altamente conservadas que son antigénicas durante la infección o proteínas cuyos epitopes que presentan reactividad cruzada con determinantes antigénicos del huésped, la respuesta inmune hacia este tipo de antígenos podría estar involucrada en la producción de autoanticuerpos (ver 1.2.3.2.2 y 1.2.3.2.3).

Utilizando una biblioteca de ADNc de *T. cruzi* en plásmidos, y una estrategia de selección de recombinantes por hibridización-selección-traducción-inmunoprecipitación, Dragon *et al.* (1987), ais-

laron un ADNc que codifica para un fragmento de una proteína de 85 KD que reacciona con suero de pacientes chagásicos. Utilizando oligonucleótidos derivados del ADNc aislaron clones genómicos y verificaron que el gen se encontraba organizado en un tandem de 6 a 10 copias. La secuencia esta proteína de 85 KD mostró un alto grado de homología con las "proteínas de choque térmico hsp90 de levadura, hsp83 de *Drosophila* y hsp90 de pollo. Respecto a este alto grado de conservación los autores especulan que los anticuerpos contra la hsp85 de *T. cruzi* podrían reaccionar en forma cruzada con la hsp del huésped Dragon *et al.* (1987). En un informe más reciente este mismo grupo describe el clonado de una hsp70 de dos cepas de *T. cruzi* por rastreo de una biblioteca de ADNc con el suero de un paciente chagásico (Engman *et al.*, 1989). Es de hacer notar que se ha descubierto que las hsp70 estarían involucradas en la autoinmunidad inducida por agentes infecciosos (Young, 1990). Utilizando suero de ratones infectados, Kirchhoff *et al.* (1988) clonaron la ubiquitina de *Trypanosoma cruzi*. Para intentar identificar antígenos clonados de *T. cruzi* que reaccionen en forma cruzada con el huésped infectado, Van Vooris y Eisen (1989), ensayaron la reactividad anti-tejidos del huésped de anticuerpos producidos contra diversas proteínas clonadas en λ gt11 y comprobaron que los anticuerpos que reconocían una proteína flagelar de *T. cruzi* de 160 KD específica de trypomastigote reaccionan con nervio ciático y con una proteína de cerebro de 48 KD (Van Vooris y Eisen, 1989) (ver 1.2.3.2.2. y Tabla III).

1.5.4.3. Clonado de antígenos definidos por sueros de pacientes chagásicos.

En los últimos tiempos varios grupos han intentado aislar de bibliotecas de expresión en *xgt11* genes de antígenos de *T. cruzi* definidos por sueros de pacientes chagásicos. Ibañez *et al.* (1988), clonaron proteínas de *T. cruzi* antigénicas para un alto porcentaje de los infectados crónicos de distintas zonas endémicas y comprobaron que la mayoría estaba formada por repeticiones de aminoácidos, varias de estas y otras repeticiones fueron también aisladas por otros grupos que emprendieron enfoques similares (Lafaille *et al.*, 1989, Hoft *et al.*, 1989, Clarke y Miles 1989).

Algunos grupos estudiaron la reactividad de antígenos clonados con sueros de infectados en la etapa aguda y crónica de la enfermedad de Chagas. Paranhos *et al.* (1989) clonaron un antígeno reconocido por sueros de infectados agudos y crónicos mientras que Affranchino *et al.* (1989), identificaron un antígeno reconocido por un alto porcentaje de sueros de infectados agudos y un bajo porcentaje de infectados crónicos. Dicho antígeno sería liberado en sangre por los trypomastigotes durante la etapa aguda de la infección, por esta razón los autores lo denominaron SAPA "*shed acute phase antigen*". Reyes *et al.* (1990) utilizaron este y los antígenos clonados por Ibañez *et al.* (1988) para estudiar la especificidad del reconocimiento inmunológico de neonatos infectados congénitos y sus madres y encontraron que las Ig de madre e hijo diferían en la especificidad del reconocimiento hacia ciertos antígenos especialmente SAPA, por lo que dicho perfil de reactividad podría utilizarse para diagnosticar la infección congénita. En ninguno de los enfoques aquí descritos los antígenos clonados de *T. cruzi* han sido utilizados para tratar de diferenciar sueros de infectados con cardiopatía chagásica de sueros de infectados sin cardiopatía.

TABLA IV: Antígenos y genes clonados de *Trypanosoma cruzi*

PM	Est.	Clonado	Características	Autores
85 Kd	try/	DNA g.λgt11 c/suero conejo inmunizado.	repeticiones de 9 aa. Familia multi- génica. localización telomérica. Superficie	Peterson <i>et al.</i> 1986; Peterson <i>et al.</i> 1989.
90 Kd	try	cDNA. λgt11	Superficie. Familia multigénica, 20 genes anti-gp90/algunos sueros	Beard <i>et al.</i> 1988
ND	try	cDNA, hibrid. sonda especif.	expresión regulada por AMPc, homología con <i>c-fos</i> .	Heath <i>et al.</i> 1988
85 Kd	try	cDNA, hibrid. cDNA-epi/try	Superficie	Takle <i>et al.</i> 1988.
ND	try	cDNA. λgt11 c/suero conejo immuniz c/try- epi.	Repeticiones de 8 y 12 aa.	Gruber y Zingales, 1989.
83 Kd	T/A/E	cDNA pl. hibr selecc/traduc. DNA gen.	6/10 Genes en tandem Homología con HSP 83 anti HSP/ sueros pac.	Dragon <i>et al.</i> 1987.
ND	T/A/E	cDNA λgt11, suero ratón	genes en tandem, ubiquitina.	Kirchhoff <i>et al.</i> 1988
160 kd	T	DNA λgt11, suero ratón.	Anti fl 160 reacción con SNC y SNP. prot cerebro de 48 kd	Van Vooris y Eisen, 1989
	T/A/E	DNA λgt11, suero hum.	secuencias repetitivas antigenicas alto % de infectados.	Ibañez <i>et al.</i> 1988
varios	T/A/E	cDNA λgt11		Hoft <i>et al.</i> , 1989.
varios	T/A/E	DNA λgt11	localiz citopl o flagel	Lafaille <i>et al.</i> 1989
165-205	Try	DNA λgt11	antigénico infecc. aguda. Antígeno liber ado al medio por try.	Affranchino <i>et al.</i> 1989.
ND	ND	DNA λg11	antigénico infecc. aguda y crónica	Paranhos <i>et al.</i> 1989.

ND: No determinado, Try o T: tripomastigote, E: epimastigote, A: amastigote

1.6. OBJETIVOS Y ALCANCES DE LA PRESENTE TESIS. HIPOTESIS DE TRABAJO.

Los hallazgos anatomopatológicos junto con las evidencias experimentales sugieren el origen inmunológico de la Enfermedad cardíaca de Chagas, por lo tanto es lícito postular que la respuesta inmune en individuos con sintomatología clara de daño cardíaco y en individuos infectados sin evidencias clínicas de compromiso cardíaco son distintas. Esto permite especular sobre la probable existencia de algún marcador serológico, por ejemplo alguna especificidad de anticuerpos anti-*T. cruzi*, que sirva para diferenciar ambas formas clínicas de la enfermedad. Las experiencias realizadas por Santos Buch *et al.*, (1985) (ver 1.2.3.2.2.) con la p25 de *T. cruzi* o las de De Titto *et al.* (1982, 1983) (ver 1.3.3.) demuestran la existencia de diferencias en la respuesta humoral anti-*T. cruzi* entre pacientes chagásicos con distintas formas clínicas, sin embargo las limitaciones de los métodos empleados impidieron su aplicación clínica inmediata y la identificación de los antígenos de *T. cruzi* involucrados.

En el presente trabajo de Tesis se propone utilizar una estrategia de clonado para tratar de identificar y caracterizar determinantes antigénicos de *T. cruzi* que sirvan para el diagnóstico serológico diferencial de la cardiopatía chagásica y de la infección por *T. cruzi*. Se intentará además elucidar las bases moleculares de la reactividad inmunológica de los antígenos clonados y su posible relación con la patología.

Para alcanzar estos objetivos es que se propone:

Construir una biblioteca de ADNc de *T. cruzi* en el fago vector λ gt11.

Clonar antígenos de *T. cruzi* definidos por sueros de pacientes con Cardiopatía Chagásica.

Identificar a los antígenos clonados que reaccionan con el suero de todos los infectados, y los que reaccionan en forma diferencial con sueros de pacientes con distintas formas clínicas de la cardiopatía chagásica.

Identificar la o las proteínas de *T. cruzi* que contienen los antígenos clonados a través de la caracterización inmunológica y molecular de ADNc y sus productos: Determinación de su peso molecular, secuencia aminoacídica, estudio de la organización genética, identificación de los transcritos, y por mapeo de los determinantes antigénicos utilizando péptidos sintéticos.

2.MATERIALES Y METODOS

2.1. CONSTRUCCION DE UNA BIBLIOTECA DE ADNc DE *Trypanosoma cruzi* EN EL FAGO VECTOR λ gt11

La biblioteca se construyó siguiendo el procedimiento descrito por Huynh *et al.* (1985), la segunda cadena del ADNc se sintetizó por el método de la ARNasa H (Gubler y Hoffman, 1983) con modificaciones descriptas por Picard *et al* (1986).

2.1.0. Parásitos.

Los epimastigotes de cultivo *Trypanosoma cruzi* de la cepa Tulahuen 2 (Tul 2) se cultivaron 7 días a 28 °C, sin agitación y se cosecharon en fase exponencial tardía tal como se describe en Segura *et al.*, 1986.

2.1.1. Obtención de ARN total de *Trypanosoma cruzi*

El ARN total se obtuvo por el método del Cloruro de Guanidinio (ClGu) (Levin *et al*, 1983). Para evitar la acción de las ARNasas todas las soluciones fueron autoclavadas a 1,2 atm. el material de vidrio fue horneado 2 hs a 200°C. En todo momento se utilizaron guantes.

Resuspender 4 g de parásitos en una solución ClGu 7M, AcNa 20 mM, 0.5% Lauril-sarcosina (LSS), 1 mM DTT, pH 5 previamente enfriada a -20°C (20 ml de solución por gramo de parásitos húmedos).

Homogeneizar en un Omni-Mixer 1 a 2 min enfriando con hielo (es imprescindible homogeneizar para romper el ADN en fragmentos pequeños que serán solubles en condiciones en que el ARN precipita).

Materiales y Métodos

Centrifugar 30 min a 10.000 rpm (-10°C), recuperar el sobrenadante y filtrarlo con una gasa estéril.

Añadir 0.55 volúmenes de etanol abs. enfriado a -20°C (en aquellos casos donde la concentración de ARN es baja se puede añadir hasta 0.6 volúmenes).

Se deja precipitar 30 min. a -20°C .

Centrifugar 30 min a 10.000 rpm (10°C). Recuperar el precipitado.

Redisolver agitando enérgicamente con vortex en 4ml de una solución de ClGu 7 M, AcNa 20 mM, 0.5 % LSS, 1 mM DTT pH 7 (ClGu pH 7); añadir 200 ul de AcNa 2M pH 5 y 2.25 ml de EtOH enfriado a -20°C . Dejar precipitando 30 min a -20°C

Recuperar el precipitado por centrifugación 10 min a 10.000 rpm (-10°C) y redisolver agitando violentamente en 2 ml de ClGu pH 7).

Reprecipitar con AcNa 2M (100ul) pH 5 y EtOH (1.165 ul) como en el paso anterior y repetir la operación de redisolución y precipitación con 1 ml de ClGu pH 7 y con 50 ul de AcNa y 658 μl de EtOH.

Lavar el precipitado 2 o 3 veces con 2 ml de AcNa 3M 0.5% LSS pH 5 enfriado a -20°C . Recuperar el precipitado cada vez centrifugando 10 min a 10.000 rpm (10°C). Conservar a -20°C hasta que se prosigue con el protocolo.

Resuspender el precipitado (con vortex) en 8 ml de EDTA 20 mM, 0.5 % LSS pH 7 helado (EDTA), agregar 8 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, V/V) y agitar enérgicamente con vortex por lo menos 10 min. (Como ya se explicó, la agi-

tación energética de 10 minutos como mínimo en esta y en todas las extracciones que siguen es imprescindible para lograr una buena separación del ADN).

Separar las fracciones por centrifugación a 3500 rpm, retirar la fase acuosa superior, agregar 4 ml de EDTA y re-extraer.

Reunir todas las fases acuosas y reextraerlas con 12 ml de cloroformo-isoamílico. Recuperar la fase acuosa por centrifugación y añadir 1/20 vol de AcNa 2M pH 5 y 1.2 vol de EtOH preenfriado a -20°C. Dejar precipitar 30 min a -20°C.

Centrifugar 10 min a 10000 rpm (-10°C).

Lavar 2 veces el precipitado con EtOH 70%.

Secar al vacío. El rendimiento es de aproximadamente 1 mg ARN por gramo de parásito. Disolver el ARN en H₂O dd estéril 0.1% SDS de manera de obtener una concentración de ARN de 4-5 ug/ul.

Guardar fraccionado a -70°C

2.1.2 Purificación parcial de ARN mensajero: Obtención de ARN poli A+

El enriquecimiento de mensajeros se llevó a cabo siguiendo la técnica de Aviv y Leder (1972) descrita en Maniatis *et al.* (1982), que consiste en una cromatografía de afinidad en una columna de oligo-deoxi timidina celulosa que retiene específicamente los mensajeros poliadenilados.

Se utilizaron columnas de 1 ml (Pharmacia, Uppsala, Suecia), respetando las mismas indicaciones que en 2.1.

La columna se equilibró con *buffer* de alta fuerza iónica HF (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5% LSS, 0,5 M ClNa). El ARN se calentó a 65°C durante 5 min para desestabilizar la estructura secundaria y se enfrió rápidamente en hielo, de manera que no pueda recuperar su estructura original y permanezca desnaturalizado. Se le agregó 1 vol de HFI 2X, se sembró en la columna y se lavó con 10 vol de HFI. La elución se llevó a cabo con *buffer* LSS). El ARN se precipitó en 0,3 M ClNa y 2,5 vol de EtOH y se resuspendió en H₂O dd estéril de manera de obtener una concentración de 5 µg/µl.

Para controlar la integridad del ARN+ poliA+ obtenido, se corrió en un gel de agarosa desnaturalizante (ver 2.9.6.). También se corrieron el ARN poli- y el ARN total como controles. La columna se regeneró con HONa 0,1N y se lavó con H₂O hasta que el pH del percolado fue neutro.

2.1.3 Dosaje del ARN

Se utilizó el método del orcinol que se basa en la reacción de los residuos ribosa, liberados por la hidrólisis ácida del ARN con el orcinol, que en presencia de Fe³⁺ produce una coloración verde.

A 330 µl de distintas diluciones de ARN en dd H₂O estéril, se le agregan 670 de reactivo orcinol preparado en el momento (orcinol 1% P/V, FeCl₃.6H₂O 0,5% P/V en HCl concentrado) y se calienta en baño de agua a 100°C durante 5 min y luego se enfría 5 min en hielo.

La D.O. se lee a 660 nm. 1 D.O. = 25 µg/ml de ARN.

2.1.4. Síntesis de ADNc por el método de la ARNasa H

2.1.4.1. Síntesis de la primer cadena

La primer cadena del ADNc se sintetizó por la acción de la enzima transcriptasa reversa del virus de la Amieloblastosis aviaria (Boehringer, Mannheim, RFA), utilizando oligo deoxitimidina (Boehringer) como secuencia iniciadora específica de mensajeros poliadenilados y en presencia de una baja concentración de nucleótidos marcados con P³² para monitorear la incorporación de nucleótidos al ADN sintetizado.

2.1.4.1.1. *Desnaturalización del RNA*

Se trataron 5 µg de ARN poliA⁺ con 1 vol de hidróxido de metil mercurio 25 mM, y se dejaron reposar 10 min a temperatura ambiente. A continuación se agregó 1 µl de β-mercaptoetanol (β-EtSH) y se enfrió en hielo. Esta solución se utilizó directamente en la síntesis.

2.1.4.1.2. *Síntesis*

La solución de síntesis de la primer cadena de ADNc (50 µl) contenía, además del total del ARN desnaturalizado:

RNASIN (Promega Biotec) 25 U/µl	4 µl
10X FSB	5 µl
d(ACGT)TP 25 mM/nucl	8 µl
Oligo dT ₁₂₋₁₈ 1 µg/µl	1,5 µl
5'-[α ³²]P dCTP 10 µCi/µl	2 µl
Transcriptasa reversa AMV 17 U/µl	3 µl
dd H ₂ O csp	50 µl

1 FSB = Tris-CLH pH 8,3 100 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 140 mM

La mezcla se incubó 1 hora a 42°C y se sembró sobre una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) equilibrada con TE (1 mM EDTA.Tris-ClH 50 mM). Las fracciones eluidas se

colocaron en tubos Eppendorf y se contaron en un contador de centelleo en el canal de ^3H . A las fracciones que contenían el híbrido ARN-ADNc se les realizó una extracción con fenol y tres extracciones con éter, y se precipitaron en 0,3 M ClNa por el agregado de 2,5 vol de etanol.

2.1.4.3. Síntesis de la segunda cadena

El híbrido ARN-ADN obtenido en la etapa anterior se trató con ARNasa H (Boehringer, Mannheim, RFA) en presencia de ADN polimerasa I (Kornberg) (Boehringer) de *Escherichia coli*-I y ADN ligasa del fago T₄.

El precipitado obtenido en la etapa anterior se resuspendió en 42 μl de dd H₂O y se le agregó:

10X SSB	4 μl
d(ACGT)TP 10 mM/c nucl	1 μl
5'-[α^{32}]P dCTP 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$	1 μl
ARNsa H	10 u (1 μl)
ADN Polimerasa	10 u (2 μl)
T ₄ ADN ligasa (Boehringer)	1 u (1 μl)

1XSSB = Tris-CLH pH 7,5:20 mM, MgCl₂ 4 mM, KCl 80 mM, NAD 150 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, BSA 2,5 μg

La mezcla se incubó 1 hora a 15°C (actividad de ARNsa H) y 1 hora a 37°C (actividad de ADN polimerasa y ligasa).

Los nucleótidos no incorporados se separaron por pasaje por una columna Sephadex G-50 (Pharmacia) en forma análoga a la síntesis de la primer cadena.

A las fracciones que contenían el ADNc se les hizo una extracción con fenol y tres con éter, y se precipitaron en 0,3 M ClNa y 2,5 vol de EtOH.

El ADNc precipitado se resuspendió en 10 μ l de dd H₂O.

2.1.5. Metilación de los sitios EcoRI del ADNc

La metilación de los sitios EcoRI se llevó a cabo por la acción de la EcoRI metilasa (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) de *Escherichia coli* utilizando S-adenosil-metionina (New England Biolabs) como sustrato (SAM). A los 10 μ l provenientes de la síntesis de ADNc se les agregó 40 μ l de *buffer* metilasa 10X (1 M Tris-ClH, pH 8, 100 mM EDTA), 3 μ l de BSA libre de ARNsas, 1 μ l de SAM 0.1 mM y 1 μ l de EcoRI metilasa, siendo el volumen final de trabajo 400 μ l.

Se incubó durante 1 h a 37°C y la enzima se inactivó calentando durante 20 min a 65°C.

2.1.6. Rellenado de los extremos 3' recesivos

Al producto de la reacción anterior se le agregó 10 μ l de TMN 10X, 4 μ l de d(ACGT)TP 10 mM y 66 μ l de H₂O, 1 U de ADN polimerasa Klenow (BRL, Bethesda, MD, USA) y se incubó 15 min a temperatura ambiente.

Se le hicieron dos extracciones con fenol y tres con éter, se precipitó en 0,3 M ClNa por el agregado de 2,5 vol de EtOH y se resuspendió en 5 μ l.

2.1.7. Ligación de *polylinkers* EcoRI

La mezcla de ligación contenía los 5 μ l del ADNc obtenido en el paso anterior, y además:

<i>polylinkers</i> EcoRI 1 μ g/ μ l	
(Boehringer, Mannheim, RFA)	1 μ l
Ligasa T4 (Boehringer)	1 μ l
<i>buffer</i> metilasa	1,5 μ l
ATP 10 mM	1,5 μ l
DTT 10 mM	1,5 μ l
H ₂ O csp 15 μ l	3,5 μ l

Se incubó O.N. a 15-16°C y la ligasa se inactivó calentando por 10 min a 70°C.

2.1.8. Corte con EcoRI para generar extremos cohesivos

A los 15 μ l de la mezcla de ligación se le agregó 1 μ l de *buffer* para EcoRI, 1 μ l de enzima (BRL, Bethesda, MD, USA) (100 u/ μ l) y dd H₂O como para llevar a un volumen final de 100 μ l. Se incubó por 4 hs a 37°C y se agregó EDTA para frenar la reacción.

2.1.9. Separación del exceso de *polylinkers* y fraccionamiento por tamaño de los ADNcs

Se utilizó una columna de Sepharosa 4B de 1 ml (Pharmacia, Uppsala, Suecia)) equilibrada en el *buffer* SB (0,1 M Tris-ClH, pH 7,5, 1 M ClNa, 10 mM EDTA):

Se lavó la columna cuatro veces en el *buffer* SB

Materiales y Métodos

Se sedimentó la columna y se lavó durante 48 hs con 50 ml de *buffer* SB (1 ml/hora)

Se le agregó 3 μ l de BFB 6X a la muestra del corte con EcoRI (19 μ l) y se cargó en la columna. El flujo se ajustó a 0,5-0,6 ml/h.

Se colectaron fracciones de 3 gotas (50-60 μ l) y se contaron en contador de centelleo.

Se corrieron alicuotas de 3 μ l de las muestras radioactivas en un gel 1% de agarosa.

Finalizada la corrida (el BFB saliendo del gel), se expuso con película X-Omat (Kodak) a -70°C con pantalla amplificadora.

2.1.9. Clonado de los ADNc en el vector λ gt11

2.1.9.1. Determinación de la relación óptima de ligación inserto/brazos del vector

Una vez juntas las fracciones de interés se procedió a ligarlas con los brazos de λ gt11 en distintas proporciones, para determinar, luego del empaquetamiento, cuál es la relación con la que se obtiene el mayor número de fagos recombinantes.

Se coprecipitaron 1 μ l de brazos de λ gt11 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) con 1/6 y 3/6 de las fracciones colectadas (ver 2.1.7.) (0,3 M ClNa con el agregado de 2,5 vol de EtOH, durante 20 min a -70°C). Como control de ligación, se coprecipitó con 1 μ l de los brazos de λ gt11 y 1 μ l de inserto ADNc control.

Para la ligación el ADN precipitado se resuspendió en la siguiente mezcla:

<i>buffer</i> ligasa	1 μ l
H ₂ O	6 μ l
ATP 10 mM	1 μ l
DTT 10 mM	1 μ l
Ligasa T ₄ 1 U/ μ l (Boehringer)	1 μ l

y se incubó durante la noche a 15-16°C.

2.1.9.2. Empaquetamiento *in vitro* del ADN ligado

Se utilizaron los extractos Packagene (Promega Biotec, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante: 2 μ l de cada mezcla de ligación (incluyendo también en este paso ADN de λ gt11 como control, y el control de ligación) se mezclaron con 10 μ l de extractos de Packagene y se incubó 2 hs a 22°C. A continuación se le agregó a cada tubo 0,3 ml de SM y 10 μ l de cloroformo.

2.1.9.3. Titulación de los recombinantes

De cada empaquetamiento se titulan 1 y 10 μ l en bacterias *Escherichia coli* RY1090, de manera análoga a la descrita en 2.2.3.2, con la salvedad de que en el momento previo a mezclar las bacterias infectadas con el agar blando, se le debe añadir 40 μ l de X-gal (BRL, Bethesda, MD, USA) 20% en DMF y 20 μ l de IPTG (BRL) 100 mM.

Las placas se incuban por 3 hs a 42°C y se cuentan las placas blancas Lac⁻ (recombinantes), y las azules LacZ⁺ (no recombinantes). Se calcula el número de recombinantes en el volumen total.

2.1.9.4. Empaquetamiento en gran escala

El resto de la mezcla de ligación con que se obtuvo la mayor eficiencia se empaquetó con un extracto de Packagene (Promega Biotec) y se procedió como se describe en (2.1.8.3).

2.1.10. Amplificación de la biblioteca en λ gt11

Los productos de los empaquetamientos se plaquearon (ver 2.2.3.2) en cajas de 15 mm ($3 \cdot 10^4$ fagos por caja, aproximadamente), utilizando bacterias *Escherichia coli* Y1090 que deben ser r-m⁺ para no afectar a los recombinantes. Las cajas se incubaron a 42°C durante 3-4 hs hasta que se obtuvieron placas de lisis grandes pero que no deben llegar a ponerse en contacto entre sí, para evitar recombinaciones.

Se agregaron 8 ml de SM a cada caja, y se las incubó a 4°C durante la noche. El SM de las cajas se colectó y cada caja se enjuagó con 2 ml más de SM. Se agregó 3% de cloroformo y se incubó con agitación 30 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 min a 7000 rpm, el precipitado (restos bacterianos) se descartó, y al sobrenadante se le agregó 30 μ l/ml de cloroformo.

La biblioteca así amplificada se guarda a 4°C.

2.2. RASTREO INMUNOLOGICO DE LA BIBLIOTECA EN λ gt11

2.2.0. Buffers , soluciones , medios y cepas utilizadas

2.2.0.1. Medios

LB:

(Luria-Bertani): extracto de levadura Difco 5 g/l. ClNa 10 g/l, bacto-triptona 10 g/l, autoclavado a 1,2 atm.

LB-agar:

(LB-a) LB 1,5% agar

LB-ampi:

una vez autoclavado el LB (o LB-a), se enfría a 55-50 °C y se le agrega ampicilina sódica para llevar a 100 µg/ml

LB-agarosa-blanda:

LB-a-bl = LB.0,7% agarosa (BRL)

2.2.0.2. Soluciones y buffers.

SM:

Solución de dilución fagos: ClNa 0,58%, MgSO₄ 7H₂O 0,2%, Tris-ClH 100 mM, pH 7,5, gelatina (Merck) 0,01%

TBS:

Tris-ClH 50 mM, pH 7,4. ClNa 150 mM

TBS-T:

TBS, 0,05% Tween 20

TBS-G-L (Solución de bloqueo e incubación con sueros):

TBS 3% leche descremada en polvo (Molico), 2% glicina (Mallinckrodt) 1 mM PMSF (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) 0.01% azida

2.2.0.3. Cepas bacterianas utilizadas

Escherichia coli RY1090 (ATCC no. 37197): *E. coli* lac U169, proA⁺, lon araD139, strA, trpC22::Tn10, Sup F, pMC9 (pBR322 lacI⁺)

Escherichia coli RY1089 (ATCC no. 37196): *E. coli* lac U169, proA⁺, lon araD139, strA, hflA150[chr::Tn10], pMC9.

2.2.1. Sueros de humanos

Los sueros se obtuvieron de individuos infectados por *Trypanosoma cruzi* de las zonas endémicas del norte y centro de Argentina. Fueron examinados en el Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía por el grupo de médicos coordinados por el Dr. Pablo Chiale (Director Dr. M.B. Rosebaum),

Se consideraron individuos infectados aquéllos que dieron reacción seropositiva con por lo menos dos de los siguientes ensayos: fijación de complemento, hemaglutinación indirecta e inmunofluorescencia indirecta (ver 1.4.2. y Van Meirvenne y Le Ray, 1985). Los sujetos seronegativos para los tres ensayos se consideraron no infectados.

El estudio clínico cardiológico incluyó: examen clínico de rutina, radiografía de tórax, ECG en reposo, test de Ajmalina (Chiale *et al*, 1982) y ecocardiografía en modo B y M. En base a

los resultados serológicos y clínicos, los pacientes fueron clasificados en los siguientes grupos:

- ECCh: Individuos entre 20 y 35 años con Enfermedad cardíaca de Chagas (N=15)
- ITsC: Individuos Infectados con *Trypanosoma cruzi* sin evidencia clínica de compromiso cardíaco
- NI: Individuos no infectados, clínicamente normales
- CCI: Individuos con cardiopatía congestiva idiopática no Chagásica

Todos los individuos infectados por *T. cruzi* (ITsC + ECChc) fueron seronegativos para anticuerpos antinucleares (ANA) medidos por inmunofluorescencia indirecta a bajas diluciones de suero (1:50 a 1:100). Solo en 25% de los infectados se detectó la presencia de autoanticuerpos anti-ADN simple y doble cadena con títulos 3 a 5 veces mayores que el promedio de los sueros normales.

Se incluyó un grupo de individuos infectados con *Leishmania* (IL) Estos sueros sirvieron para verificar que los antígenos clonados de *Trypanosoma cruzi* detectan anticuerpos específicos de la infección chagásica.

2.2.1.1 Individuos con Lupus eritematoso sistémico

Para los ensayos de caracterización inmunoquímica del clon JL5, se utilizaron sueros de individuos europeos con *Lupus eritematoso sistémico* (LES). La caracterización de los sueros se

realizó en la Unité d'Immunohematologie et Immunopatologie del Instituto Pasteur (París), dirigido por el Dr. G. Dighiero.

Todos los sueros fueron positivos para anticuerpos antinucleares detectados por inunofluorescencia indirecta a diluciones mayores que 1:1000 (Tan *et al*, 1988). Todos los sueros LES tenían títulos de anticuerpos anti-ADN simple y doble cadena 10 veces mayores que el promedio de los sueros normales. Seis de ellos presentaron actividad anti-proteínas P ribosomales de células HeLa.

2.2.3. Rastreo inmunológico de la biblioteca en λ gt11

2.2.3.1. Obtención de bacterias competentes *Escherichia coli* RY1090

Una colonia aislada crecida en LB-ampí se inoculó en 100 ml de LB, 100 μ g/ml ampicilina 0,2% maltosa y se incubó durante la noche a 37°C con buena agitación. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4000 rpm durante 6 min a 4°C, y se resuspendieron en 0,4 vol de MgSO₄ 10 mM estéril y helado. Las bacterias competentes preparadas se guardaron hasta 15 días a 4°C.

2.2.3.2. Plaqueo de la biblioteca de λ gt11 en *Escherichia coli* RY 1090 (Procedimiento descrito para placas de 9 cm)

Aproximadamente $2 \cdot 10^4$ ufp en 100 μ l de SM se mezclaron con 100 μ l de bacterias competentes (ver paso anterior) y se incuban durante 20 min a 37°C. Se vertieron sobre 3,5 ml de LB-a-bí fundido a 50°C, se homogeneizó y se volcó sobre cajas de Petri conteniendo LB-ampí precalentadas a 42°C. Se dejó secar cerca de un mechero durante 10 min y se incubó a 42°C hasta que las placas de lisis fueron visibles (alrededor de 3 hs).

2.2.3.3. Transferencia a nitrocelulosa de las proteínas producidas por los fagos recombinantes e inducción con IPTG

Con la ayuda de dos pinzas de puntas planas, se cubrieron las placas de lisis obtenidas en el paso anterior con un filtro de nitrocelulosa (BA85, Schleicher and Schuell, Dassel, RFA), previamente embebido en una solución de IPTG 10 mM (BRL) y secado sobre papel de filtro (Nota: se puso sobre los fagos la cara del filtro que no estuvo en contacto con el papel, una vez colocado el filtro sobre el cespel, éste no debe moverse hasta su retiro definitivo para la incubación con suero).

La posición del filtro se marcó pinchando el filtro y el agar con una aguja o alfiler embebido en tinta china (Nota: Se aconseja realizar tres marcas asimétricas de uno, dos y tres puntos).

Las cajas de Petri con los filtros se incubaron invertidas durante 2 hs a 37-38°C. Luego, se retiraron los discos de nitrocelulosa cuidando de no desprender agar, y se los lavó durante 10 min con TBS. Para obtener una réplica, se volvió a colocar un nuevo filtro con IPTG y se incubó nuevamente 3 hs a 37-38°C.

2.2.3.4 Detección inmunológica de las proteínas recombinantes

2.2.3.4.1. *Bloqueo e incubación con el suero*

Para el bloqueo de los sitios inespecíficos y para degradar el ADN que podría reaccionar con inmunoglobulinas del suero, se incubaron los filtros durante 30 min con TBS-G-L, al que se adicionó 1 U/ml de ADNasa (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). Los filtros se incubaron con una dilución del suero en TBS-G-L con el agregado de 5% de lisado de *Escherichia coli* RY1089-Lys (ver 2.6.5.), 0,05% Tween 20, 1 mM PMSF, 0,01% azida.

La incubación se realizó durante la noche a temperatura ambiente con agitación, o durante 3 hs a temperatura ambiente dejándolo luego durante la noche a 4°C.

2.2.3.4.2. Revelado inmunoenzimático de las IgG que reaccionan con las proteínas transferidas

Luego de la incubación con suero, este se recuperó y el filtro se enjuagó con TBS-T. Luego se le realizó el siguiente tratamiento:

4 lavados de 10 min con TBS-T

Incubación con una solución de 45 µl de anticuerpo anti-Ig humana biotinilada (hecho en cabra, Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluido en 10 ml de TBS-G-L, 0,05% Tween 20.

4 lavados de 10 min con TBS-T. Durante estos lavados se prepara el Vectastain (Vector, ver arriba): 10 ml de TBS + 2 gotas Vectastain A (Avidina) + 2 gotas Vectastain B (Biotina peroxidasa)

Se homogeniza y se deja a temperatura ambiente por lo menos 30 min antes de usar.

Incubación con el reactivo Vectastain 1 h a temperatura ambiente

3 lavados de 5 min con TBS (sin Tween ni azida)

Revelado: el revelador se preparó en el momento, 60 mg de 4-cloro, 1-naftol (Merck, Darmstadt, RFA) se disuelven en 20 ml de metanol helado y se mezclan con 100 ml de TBS, 0,01 M imidazol (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA, San Louis, MO,

USA). Se homogeniza rápidamente y se le agregan 60 μ l de agua oxigenada H₂O₂ 30% (100 vol), y esto se agrega a cada filtro que debe estar bien escurrido del último lavado.

Se dejó evolucionar el color, resguardando de la luz directa, hasta que la relación señal-ruido de fondo fue la deseada. La reacción de revelado se detuvo lavando con agua y secando sobre papel de filtro. (Nota: No es conveniente dejar revelando más de 40 min)

2.2.3.4.3 *Extracción de fagos con señal positiva*

Siguiendo las marcas del filtro, se ubicó la zona correspondiente al fago positivo (Nota: Es útil hacer un calco del filtro en papel transparente para ubicar las playas de lisis). La zona correspondiente a la señal positiva se extrajo con una pipeta Pasteur de diámetro grueso o bien con una pipeta automática cuyo cono plástico se cortó para permitir un diámetro mayor. El fragmento de agar con las placas de lisis y se introdujo en 1 ml de SM con 30 μ l de cloroformo, y se dejó una noche a 4°C.

2.2.3.5. Rastreos sucesivos :purificación de un fago positivo

Una vez extraídos los fagos correspondientes a la señal positiva del primer rastreo, este se repitió (segundo rastreo) con los fagos aislados, pero a una densidad de u.f.p. por caja de Petri menor. Los fagos positivos en este rastreo, se volvieron a extraer y rastrear, y el procedimiento se repitió, respetando las cantidades de u.f.p. por caja de Petri que se indican en la Tabla a, hasta que en dos rastreos sucesivos (el cuarto y el quinto en general), todos los fagos sean positivos. Entonces se consideró que el fago recombinante fue purificado y clonado. Los fagos puros así obtenidos pueden ser amplificados para su caracterización.

Tabla a: Cantidades de u.f.p. aconsejadas para plaquear en los rastreos sucesivos durante la purificación de un fago positivo.

	Placa grande 15 cm	Placa chica 9 cm
1° rastreo	50000 ufp	20000 ufp
2° rastreo		2000 ufp
3° rastreo		200 ufp
4° rastreo		0-20 ufp
5° rastreo		10 ufp

2.2.3.6 Amplificación de los fagos clonados

Siguiendo el procedimiento descrito en 2.2.3.2 10^6 ufp del fago puro se plaquearon con 200 μ l de bacterias competentes en placas LB-ampi (9 cm) y se procedió como en 2.2.3.2., incubando con 5 ml de SM durante la noche. El título de la preparación de fagos fue de aproximadamente 10^{10} - 10^{11} ufp.

2.3. RASTREO SEROLOGICO DIFERENCIAL

2.3.1. Evaluación de los sueros para el rastreo inmunológico diferencial

Para evaluar el título de Igs anti *T. cruzi* y realizar el rastreo serológico diferencial con diluciones de sueros que contengan títulos similares de Igs anti *T. cruzi*, se realizó un inmunoensayo sembrando 1 µl de diluciones crecientes de un homogenato total de *T. cruzi* en TBS (de 1 µg hasta 0,2 ng de proteínas) en filtros de nitrocelulosa. Los filtros fueron incubadas con cinco diluciones distintas del suero (1:250, 1:500; 1:750; 1:1000 y 1:2000) y revelados tal como se describe en 2.2.3.4.

2.3.2. Rastreo inmunológico diferencial de los clones

Se mezclaron 600 µl de bacterias competentes RY1090 con 3,5 ml de LB-a-bl fundida y termostatzada a 50°C, y se virtieron sobre placas LB-ampi, precalentadas a 42°C. Se secaron 10 min cerca de una llama, y se incubaron durante 40 min a 37°C.

Sobre el césped bacteriano obtenido se sembraron gotas de 1 µl del stock de fagos recombinantes (10¹¹ pfu/ml) ordenadas de hileras. Se incubó 30 min a 42°C, y la zona correspondiente a las placas de lisis en formación se recubrieron con un filtro de nitrocelulosa previamente impregnado en IPTG 10 mM. Se incubó a 39°C hasta que se formaron placas de lisis nítidas (2-3 hs).

Las filtros de nitrocelulosa con la impronta de las proteínas recombinantes se retiraron y se procedió en forma análoga a la descripta para el rastreo inmunológico convencional (2.2., 3.2, 2.2.3.3. y 2.2.3.4.) incubandose cada hoja con el

Materiales y Métodos

suero correspondiente. Se utilizaron diluciones de suero con reactividad anti-*T. cruzi* semejante, determinada según se explica en 2.3.1.

Para la valoración de la reactividad hacia los recombinantes se fijó una escala semicuantitativa: la reactividad hacia λ gt11 no recombinante fue considerada negativa; + + +, se consideró reacción fuerte y correspondió a intensidades de reacción similares con la de un depósito 0.4-1 μ g de homogenato de *T. cruzi* (epimastigote, suero JL) según la determinación descrita en 2.3.1., + + reacción media (intensidad similar a 0.15 μ g de homogenato, suero JL), y +, reacción débil (intensidad similar a 0.06 μ g de homogenato).

2.4. DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS POR ELISA

2.4.1. Determinación de titulo de anticuerpos anti-péptidos y anti-proteínas de fusión

Se incubaron placas de 8x12 micropocillos a 4°C durante la noche con una solución 3 µM de péptido conjugado en *buffer* carbonato 0,1 M pH 9,6 o con una solución de proteínas (proteína de fusión, homogenato de *T. cruzi*) 20 µg/ml en PBS-azida (100 µl por pocillo).

Al día siguiente las placas fueron lavadas 5 veces con PBS 0,1% Tween (PBS-T) y se incubaron con los distintos sueros diluidos en PBS-T 0.5% gelatina durante 2 hs a 37°C tapados, para evitar evaporación.

A continuación se lavó 5 veces con PBS-T y se incubó con antisuero anti-IgG AM humano conjugado con peroxidasa (Biosys, Compiègne, Francia), diluido en PBS-T 0.5% gelatina durante 2 hs a 37°C.

Se le hicieron 5 lavados con PBS-T y la peroxidasa se reveló con OPD (Ortho-fenilen-Diamina, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA Chemical Co) utilizando un equipo de Diagnostics Pasteur (Paris, Francia). Se detuvo la reacción a los 60 segundos con ClH 3 M y la D.O. fue leída a 490 nm utilizando un lector automático de placas Titertek-multiskan (Flow Laboratories, Rockville, MD, USA).

2.4.2. Determinación del título de anticuerpos anti-proteínas de fusión presentes en extractos crudos.

2.4.2.1. Obtención de extractos crudos de proteínas de fusión para la su utilización en ELISA.

Siguiendo el procedimiento descrito en 2.2.3.2. se infectaron 600 µl de bacterias competentes con 30 µl de *stock* de fagos (10^9 - 10^{10} u.f.p). Previo al plaqueo en cajas de 9 cm se agregaron 100 µl de IPTG 100 mM. Se incubó a 42 °C hasta lisis completa (2-3 hs). Las proteínas del lisado se obtuvieron en 4 lavados de 10 min con 3 ml de PBS conteniendo 10 U/ml de ADNasa, a temperatura ambiente y con agitación. Este lisado se guardó fraccionado a -20°C.

2.4.2.2. Determinación de títulos anti-proteínas de fusión de extractos crudos por ELISA.

El procedimiento es análogo al descrito en mas arriba (2.4.) con las siguientes modificaciones: 1-Las placas de poliestireno se incubaron con una dilución 1:10 en PBS del extracto crudo de proteína de fusión a 4°C durante la noche. 2-Las placas sensibilizadas y lavadas se incubaron con una dilucion 1:1000 o 1:500 de suero en PBS-T, 0.5% gelatina con el agregado de 10% de lisado de *E.coli* RY1089-Lys (ver 2.6.5.) _.

2.4.3. Ensayos de inhibición

En los ensayos de inhibición, los sueros fueron previamente incubados con la cantidad indicada de péptido conjugado con BSA durante 2 hs a 37°C. El ensayo de ELISA se realizó como se indica en 2.4. En todos los ensayos de inhibición se utilizó el péptido AEAELVKMALMKV acoplado a BSA como control negativo.

2.5. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS y WESTERN BLOT

2.5.0. Obtención de homogenato total de parásitos.

Los parásitos obtenidos como se describe en 2.1.0. se lavaron y resuspendieron en sacarosa 0,25 M y KCl 5 mM, Trasylol 1 U/ml, PMSF 1mM, leupeptina, benzamidina. Los parásitos fueron rotos mediante 3 ciclos de congelación-descongelación, con lo que se obtuvo el homogenato total.

2.5.1. Geles de poliacrilamida

Se utilizaron geles de Laemmli (1970) de 20x12 cm y minigeles de 6x8 cm.

Geles separadores: La concentración de poliacrilamida se eligió según los rangos de pesos moleculares de las proteínas a separar y se explicita en cada figura.

Geles concentradores: Se usaron geles de 5% de poliacrilamida.

2.5.1.1. Tratamiento de las muestras

Volúmenes iguales de extracto y *buffer* de siembra (Tris 50 mM, ClNa 150 mM, SDS 3%, azul de bromofenol 0,001%, β -mercaptoetanol (β -EtSH) 3%, pH 8), se trataron durante 5 min a 100°C.

2.5.1.2. Condiciones de corrida

Geles de 20x12 cm: 60 V tensión constante durante la noche. Minigeles de 6x8 cm: 12 mA corriente constante.

buffer DE CORRIDA =Glicina 0,192 M, Tris 0,025 M, SDS 0,1%, pH 8.

2.5.1.3. Tincion de los geles

Se utilizó una solución colorante de azul Coomasie 0,2% en 45% metanol, 10% ácido acético. -El gel se tiñó durante 4 hs y luego se destiñó por lavados con metanol 45%, ácido acético 10%.

2.5.2. Transferencia de proteínas a nitrocelulosa: Western blotting

2.5.2.1. Electrotransferencia

La electrotransferencia se realizó según el método descrito por Towbin *et al.* (1979). Luego de la corrida, se sumergió el gel en el *buffer* de transferencia (fosfato 25 mM, pH 6,5) Se recortó un trozo de nitrocelulosa (0,22 nm) del tamaño del gel, y se hizo un "emparedado": primero con papel de filtro Whatmann 3MM, y luego con esponjas tipo "Scotch Brite", el "emparedado" se ensambló en el cartucho de transferencia y éste se colocó dentro de la cuba de electrotransferencia (Bio Rad,), que se llenó con *buffer* de transferencia. La transferencia se hizo O.N. a 100 mA corriente constante, o en 2-3 hs a 400 mA.

2.5.2.2 Transferencia por peso

Se utilizó el mismo ensamblado que en la electrotransferencia, que se colocó sobre una superficie horizontal, entre láminas rígidas, sumergida en *buffer* (fosfato 25 mM, pH 6,5), y con un peso de 5 Kg. La transferencia se hizo a temperatura ambiente y durante la noche.

2.5.2.3. Tinción de proteínas transferidas

Método 1: La nitrocelulosa se lavó cuatro veces con una solución Tris 50 mM, ClNa 150 mM, pH, 7,4, Tween 20 0,05%, y luego se dejó durante la noche con la misma solución con el agregado de 1 μ l/ml de tinta china. Luego se lavó algunas veces con agua deionizada.

Método 2: La nitrocelulosa se incubó 5 min con solución colorante de amido schwartz (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA Co) 0.25% en 45% metanol, 10% acético y se decoloró con 3 lavados de 5 min. de 10% metanol, 10% acético.

2.6. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE CLONES λ GT11

2.6.1. Lisogenización de bacterias *E. Coli* Y1089 con los fagos λ gt11 recombinantes

Se siguió el método descrito en Huynh *et al.* (1985) Resultó crítica la densidad de bacterias en el momento de la infección. Esta debe ser lo más alta posible, guardando una multiplicidad de infección de 5 fagos por bacteria. Otra modificación importante fue la verificación del estado lisogénico: Las bacterias se diluyeron en LB antes de hacer las réplicas, para evitar que las revertantes produjeran falsos negativos.

Una colonia aislada de *Escherichia coli* RY1090 crecida en LB-ampí se incubó en LB, 100 ug/ml ampicilina, 0,2% maltosa (crítica) durante la noche. A continuación, el cultivo saturado se diluyó en LB 10 mM Mg²⁺ helado hasta una D.O. 660nm = 0,25, y se dejó 30 min en hielo. Se mezclaron 100 μ l de esta dilución de bacterias con 100 μ l de SM conteniendo 10⁹ ufp (una dilución 1:100 del fago recombinante amplificado), y se incubó a 32°C durante 30 min. Se diluyó de manera de tener 100 bacterias en 100 μ l (1:10⁵) y se rastrillaron los en cajas LB-ampí que se incubaron durante la noche a 32°C.

Unas 25 colonias se ensayaron de la siguiente manera: se tocó cada colonia con un escarbadiante estéril distinto, y se colocó cada escarbadiante dentro de tubos Eppendorf conteniendo 0,5 ml de LB (esto se hizo para diluir las bacterias en LB y luego hacer las réplicas).

Se retiraron los escarbadiantes del LB y con una pipeta automática se sembraron 1 μ l de cada tubo Eppendorf en sendas cajas de Petri en un mismo ordenamiento (réplicas). Una caja se incubó durante la noche a 32°C y la otra a 44°C. Aquellas bacterias

que no crecieron a 44°C y si lo hicieron a 32°C fueron consideradas lisogénicas. A 44°C se destruye el represor termosensible cI857 de λ gt11, y el fago se replica dentro de la bacteria RY1089. Si bien el fago no puede lisar la bacteria por su mutación S100 que no es suprimida por RY1089, evita su crecimiento. A 32°C el represor termosensible es activo por lo que el fago permanece en estado lisogénico y la bacteria crece normalmente.

2.6.2. Producción de proteínas de fusión

Las proteínas de fusión se obtuvieron por inducción del operón lac con IPTG de cultivos de bacterias lisogénicas previamente termoinducidas a 44°C. A esta temperatura, el represor CI157 de λ gt11 se destruye, y el fago se replica amplificándose dentro de la bacteria (ver Fig 4 y Huynh *et al.*, 1985)

Una colonia de una bacteria lisogénica, se cultivó O.N. en 5 ml de LB-ampi a 32°C. Al día siguiente, el cultivo se diluyó 1:1000 en LB-ampi y se cultivó a 32°C con muy buena aereación, hasta que alcanzó una D.O. 660nm de 0,5-0,6. En ese momento se extrajo el cultivo del incubador y se lo dejó a temperatura ambiente sin agitación mientras la temperatura del incubador se llevaba a 44°C (Nota: Es conveniente que el cultivo llegue a tener la temperatura ambiente para que el choque térmico sea más intenso).

Se incubó durante 25 min a 44°C y, sin sacar el cultivo del incubador, se llevó la temperatura rápidamente a 38°C. En ese punto se agregó IPTG sólido para llevar el cultivo a 2,5 mM, y se incubó 50 min más a 38°C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación 10 min, 3000 rpm, y a temperatura ambiente (Nota: no es conveniente enfriar).

Para obtener un lisado para *Western blot*, las células se resuspendieron en TBS 0,01% azida, 1 mM β -EtSH, 1 mM PMSF, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C .

(Nota: El cultivo *starter* se puede mezclar con un volumen de glicerol y guardar a -70°C para ser utilizado directamente en la obtención de proteínas de fusión).

2.6.3 Tratamiento del lisado bacteriano para electroforesis en PAGE-SDS y western blot

Con una espátula se extrajo una porción del lisado congelado a -70°C , se fundió a T.amb. y se le agregó 1 vol de SDS 20%. Se disolvió calentando en baño a 100°C , y agitando con vortex hasta obtener una solución transparente (Nota: En caso de disolución incompleta agregar más SDS). A esta mezcla se le agregó 1 vol de *buffer* de siembra y se calentó en un Eppendorf durante 5 min a 100°C en baño de agua.

Se sembraron 10-20 μl por calle en geles 7,5% PAGE-SDS. (Nota :En el caso de que sea dificultoso pipetear, se le puede agregar más SDS 20% y calentar unos minutos más; la sonicación previa del lisado no siempre es recomendable porque podrían clivarse las proteínas de fusión).

Como marcador de peso molecular se utilizó β -galactosidasa pre-teñida con azul de Coomassie (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA Chemical Co, St Louis, MO, USA)), que permite controlar la corrida y estimar la posición de las proteínas de fusión. Una vez finalizada la corrida electroforética, el gel se teñió y se transfirió a nitrocelulosa (ver 2.5.). Los filtros con las proteínas transferidas se incubaron con suero y se revelaron como en 2.2.3.4.

2.6.4. Purificación de anticuerpos por afinidad utilizando proteínas de fusión

Se utilizó una modificación del método descrito por Hall *et al.* (1984) que consiste en la protoplastización de bacterias lisogénicas inducidas con IPTG para de degradar la membrana externa y el peptidoglicano que albergan los componentes antigénicos principales de *E. coli*; la lisis suave con posterior ruptura del ADN y el fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial para obtener un extracto donde el único componente antigénico sea la proteína de fusión. Estos extractos se inmovilizaron en filtros de nitrocelulosa y fueron utilizados para purificar por inmunoafinidad los anticuerpos del suero que reaccionan específicamente con las proteínas de fusión.

2.6.4.1. Obtención de extractos de proteínas de fusión parcialmente purificados

Un cultivo de 250 ml de bacterias lisogénicas previamente termoinducido e inducido con IPTG (ver 2.6.2.) se cosechó a 3000 rpm y luego se procedió como sigue:

Resuspender las bacterias en 5 ml de *buffer* TNE (Tris 10 mM , ClNa 100mM, EDTA 1mM, pH 8) helado. Dejar 5 min en hielo.

Agregar 5 ml de TNE + 50 P/V de sacarosa. Dejar 10 min en hielo.

Agregar 10 ml de solución de lisozima 4 mg/ml. Incubar 15 min en hielo.

Agregar 2,5 ml EDTA 250 mM y 2,5 ml NP40 10%, agitar por inversión y congelar en nitrógeno líquido.

Fundir el lisado y romper el ADN por 5 pasajes del lisado con una aguja G-19.

Centrifugar 30 min a 13000 g. Descartar el sobrenadante (puede guardarse como control). Resuspender el precipitado en 20 ml de urea 8 M.

Centrifugar 20 min a 13000 g. El sobrenadante se fracciona en 4 ml y se guarda a -20°C.

2.6.4.2. Purificación por afinidad de los anticuerpos

Un fitro de 2x3 cm de nitrocelulosa (Scleicher & Schuell, Dassel, RFA) sumergido se incubó en 4 ml del extracto de proteínas de fusión en urea 8 M. Se lavó 3 veces con TBS y se bloqueó en TBS-G-L. Luego se incubó O.N. con 3 ml de suero diluido 1:5 en TBS-G-L, 0,01% azida, 1 mM PMSF. Al día siguiente se recuperó el suero, se enjuagó el filtro con TBS-T y se hicieron 3 lavados de 10 min a temperatura ambiente con TBS-T. Se escurrió muy bien y se le hizo un lavado con ClNa 150 mM (Nota: Este lavado es muy importante para sacar todo el *buffer* TBS remanente que pude modificar al *buffer* de elución).

Los anticuerpos se eluyeron incubando cada filtro con 3 ml de un *buffer* glicina 0,2 M, ClNa 0,150 M, pH 2,8, BSA 100 µg/ml, Tween 20 0,05%, azida 0,01%, PMSF 1 mM durante 25 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos eluidos fueron rápidamente neutralizados virtiéndolos sobre una solución de 24 mg de Tris base en 12 ml de TBS-T helado. Luego se agregaron 2 ml de TBS-G-L, PMSF hasta 1 mM y azida hasta 0,01%, y se utilizaron inmediatamente o se guardaron a -20°C

2.6.5.. Obtención de un lisado de *E. coli* RY 1089 lisogénica para xgt11.

Bacterias *E. coli* RY 1089 lisogénica para el fago xgt11 no recombinante (*E. coli* RY 1089-Lys) se cultivaron y termoindujeron tal como se describe en 2.6.2. Sin agregarles IPTG, y con las mismas precauciones que en 2.6.2. se cultivaron 40 minutos a 37-38°C y se cosecharon por centrifugación a 3000 rpm (temperatura ambiente). El precipitado se resuspendió en 1:30 del volumen inicial de *buffer* TBS, 1mM β -EtSH, 1mM PMSF y se congeló con nitrógeno líquido. El lisado se dejó fundir a T. a. y se sonicó hasta hacerlo poco viscoso. Se guardó a -20°C.

2.6.6. Purificación de proteínas de fusión por inmunoafinidad

Para purificar la proteína de fusión JL5, se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- β -galactosidasa acoplado a agarosa (Protosorb, Promega Biotec, Madison, WI, USA) y se siguieron estrictamente las instrucciones del fabricante. Bacterias lisogénicas termoinducidas e inducidas con IPTG (ver 2.6.2) se colectaron por centrifugación a 3000 rpm. El precipitado se resuspendió en 1/30 del volumen inicial de *buffer* TEP (Tris-ClH 100 mM pH 7.4, EDTA 10 mM, PMSF 1mM), se sonicó, y se centrifugó 15 min a 10.000 rpm (4°C). Al sobrenadante, se le agregaron 3 volúmenes de solución saturada de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y se dejó una noche a 4°C. Luego se centrifugó 20 min a 10.000 rpm (4°C), y se resuspendió en TEP para llevar a 20 mg proteínas /ml. Previo al pasaje por la columna se diluyó la muestra 1:5 en TBS, 0,2 % NP-40 (TBSN), y 5 ml se pasaron por la columna de Protosorb (1 ml) equilibrada con TBSN. La columna se lavó con 5 pasajes de 1 ml de TBSN, y las proteínas de fusión se eluyeron con tres pasajes de 1 ml de *buffer* carbonato pH 10.8.

Materiales y Métodos

La purificación fue verificada por PAGE-SDS y western blot. Luego del pasaje por la columna se observó una banda mayoritaria en la electroforesis correspondiente a la proteína de fusión.

2.7. SINTESIS QUIMICA DE PEPTIDOS

La síntesis de péptidos se llevó a cabo utilizando una modificación del método en fase sólida de Merrifield descrita en Muller *et al.*, (1982) y Van Regenmortel *et al.* (1988). Se utilizó el aparato de síntesis semi-automática Neosystem NPS4000 (Neosystems, Strassbourg, Francia) que permite realizar automáticamente los protocolos de desprotección y acoplamiento, bajo constante supervisión de la integridad de estos pasos verificando la presencia de los grupos NH₂ libres o protegidos del extremo N-terminal de la cadena de péptido con el ensayo de ninhidrina.

Se comenzó a partir de 1,3 mM de resina PAM-Asp-BOC (aspartato de *t*-butoxi-carbonilo acoplado a la resina por fenilacetamido-metilo).

2.7.1. Protocolo de desprotección

2 lavados con TFA 1/2 min	Desprotección propiamente dicha
1 lavado con TFA 1/2 min	
3 lavados con TFA-CH ₂ Cl ₂ 1/2 min	lavado del TFA
4 lavados con CH ₂ Cl ₂	
2 lavados con DMF 1/2 min	cambio de solvente
3 lavados de DMF	

Para verificar que la desprotección fue total, se hizo la reacción de ninhidrina (ver más adelante). Debe verificarse bajo la lupa microscópica que todas las partículas de resina se colorea; n de rojo o violeta (grupos amino terminal libre).

2.7.2. Reacción de acoplamiento

Se mezclaron 3 moles de BOC-aminoácido con 3 moles de HOBt (1-hidroxibenzotriazol) y 3 moles de BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-[dimetilamino]fosfonio), y se agitó en presencia de CH_2Cl_2 y DIEA (di-isopropil-etil-amina). Esta mezcla se agregó al reactor, y se procedió a burbujeo de N_2 (agitación por burbujeo de la mezcla reactante con agregado de CH_2Cl_2 para mantener el volumen constante).

A la hora se sacó una muestra con una varita de polipropileno y se realizó el ensayo de ninhidrina (ver más adelante) que debe ser negativo para todas las partículas de resina (grupo amino terminal protegido) (Nota: De no ser así, se prosigue durante 30 min más. También puede agregarse más BOC-aminoácido activado en aquellos casos en que el acoplamiento es dificultoso).

Generalmente este paso es rápido en los primeros aminoácidos acoplados, pero se hace mas lento a medida que crece la cadena.

2.8.2. Ensayo de ninhidrina

Al finalizar la desprotección o el acoplamiento, se extrajeron con una tubo fino de polipropileno unas partículas de resina del reactor, y se enjuagaron en un tubo de hemólisis conteniendo EtOH. Se extrajo el EtOH por aspiración cuidando que las

partículas queden decantadas en el fondo del tubo. Se agregaron 2 gotas de solución de KCN-piridina (Nota: 2 ml de KCN 0.01 M se llevan a 100 ml con piridina), 2 gotas de solución de ninhidrina (Nota: 500 mg de ninhidrina en 10 ml de *n*-butanol), y dos gotas de fenol (Nota: 80g de fenol + 20 ml de butanol); y se incubó 2 min a 65°C. Se observó con una lupa microscópica (50X). Luego de la desprotección todas las partículas de resina deben mostrar un color rojo-violáceo (grupo NH₂ terminal libre). Se considera que un acoplamiento ha sido total cuando todas las partículas son blancas o levemente amarillentas (grupo NH₂ formando unión peptídica).

2.8.3. Corte con ácido fluorhídrico anhidro

Durante el tratamiento con HF anhidro (alto HF) descrito en Van Regenmortel *et al* (1988) se rompen todas las uniones éster, respetándose las uniones peptídicas. De esta forma se cliva la unión del péptido a la PAM-resina y también los grupos protectores que esterifican a los grupos (ácidos y básicos) NH₂, OH y COOH de aminoácidos ácidos y básicos que no están involucrados en la unión peptídica.

Dado que las condiciones de este tratamiento son sumamente drásticas, se utiliza *p*-cresol como secuestrante de carbocationes que podrían producir sustituciones nucleofílicas. En el caso que los péptidos tengan aminoácidos con azufre (Met o Cys) debe usarse etano-ditiol (EDT) como reductor para evitar que el azufre se oxide y se forme Met(O) o Cys(O).

El tratamiento con HF es delicado. El HF reacciona explosivamente con el agua y los metales; por lo tanto esta reacción debe realizarse en una línea HF completamente aislada del exterior, especialmente diseñado y construido en teflón.

El procedimiento que se siguió se detalla a continuación:

Se pesó el péptido secado al vacío y se introdujo en el reactor de teflón. Por cada gramo de péptido seco más resina (conteniendo 200 µg péptido), se agregó 1 ml de p-cresol y 400 µl de EDT, y se congeló a -70°C. Una vez congelado, se adosó a la línea de HF y se introdujeron 10 ml de HF por gramo de péptido más resina, enfriando a -70°C. Se colocó sobre un agitador magnético y se dejó que la reacción prosiga durante 1 h a 0°C.

Una vez finalizado el HF se extrajo por destilación y el producto se lava sobre un embudo de vidrio fritado en un kitsato. (Nota: El agua destilada que puede contener AcOH glacial o NH₃ dependiendo que el péptido sea muy básico o muy ácido, ya que de otra forma son generalmente solubles en agua).

La solución de péptido obtenido se liofilizó previo a su purificación.

2.8.4. Purificación de los péptidos

El péptido liofilizado se disolvió en H₂O y se purificó por MPLC (*Medium pressure liquid chromatography*) preparativa con una columna *bondapak C-18* de 50 cm de largo y 21 mm de ancho. Para R-7 y R-10 se utilizaron gradientes 10-66%B donde A = H₂O, 0,1% PO₄H₃, 0m1% (Et)₃N, y B = acetonitrilo. Para R-13 se utilizó un gradiente 10-100%B donde A = H₂O, 0,1% TFA, y B = acetonitrilo.

La presión utilizada fue de 15 bar y la velocidad de flujo de 20 ml/min.

Materiales y Métodos

La purificación se monitoreó con un HPLC analítico con columna *bondapak* C-18 de 30 cm de largo x 3,9 mm de diámetro, utilizando un gradiente de solvente 10-60%B, donde A = H₂O, 0,1% PO₄H₃, 0,1% (Et₃)N y B = acetonitrilo.

Cada pico importante del MPLC fue monitoreado en el HPLC. Aquéllos que presentaron mayor pureza se juntaron y se volvieron a pasar por el MPLC hasta que se verificó en el HPLC que la preparación tuvo por lo menos 90% de pureza.

2.8.5. Análisis de la composición del péptido sintetizado

El péptido fue hidrolizado en ClH 6 N durante 24 hs a 110°C y derivatizado. Luego se le hizo una cromatografía gaseosa y, por integración de los picos y el R_f se pudo determinar la composición en aminoácidos.

El análisis del péptido (secuencia) fue realizado por espectrometría FAB (Fast Atom Bombardment)-masa.

2.8.6. Acoplamiento del péptido a las proteínas portadoras.

Se realizó con glutaraldehído 2% según el protocolo de Briand *et al* (1982).

La relación de péptido-proteína fue de 100:1 de manera que con un 50-60% de eficiencia (eficiencia del método) se obtiene una relación aproximada 50:1.

El péptido sólido se mezcló con la cantidad de proteína disuelta en PBS (1 mg/ml de proteína), y se dejó unos minutos a 0°C. A continuación se le agregó 1 vol de glutaraldehído diluido

Materiales y Métodos

(Serva, Heidelberg, RFA) al 2%, gota a gota y agitando, a t. amb., y se dejó agitando suavemente una hora mas. Luego se agregó 10 mg de borohidruro de sodio BH_4Na_2 (Merck, Darmstadt, RFA) por ml de solución y se dejó a 4°C durante 2 hs. Finalmente se dializó contra PBS realizando por lo menos 4 cambios y una dialisis O.N. a 4°C.

2.9. MÉTODOS DE PREDICCIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE DETERMINANTES ANTIGENICOS EN PROTEINAS.

Se utilizó el método de Kyte y Doolittle (1982). Para cada aminoácido de la secuencia se graficó la hidropatía promedio (según la escala de Kyte y Doolittle, 1982) de un tracto de 9 aminoácidos de los cuales el aminoácido considerado fue el central. Para los cálculos se utilizó el programa de computación HYDRFIL (Van Regenmortel y de Marcillac, 1988).

2.10. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

Para evaluar la correlación entre la reactividad inmunológica con los antígenos clonados y cardiopatía se construyeron tablas de 2 X 2 con los datos obtenidos con los sueros de pacientes con ECChc y con sueros de pacientes ITsC. El análisis de los datos se hizo por el test exacto de Fisher (Snedecor y Cochran, 1980) valores de $P < 0.005$ fueron considerados significantes.

El promedio del título de anticuerpos de sueros de pacientes con ECChc se comparó con el de los ITsC utilizando el test t de Student. La correlación entre los títulos anti-JL5 y anti-R-13 se hizo por regresión lineal. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados significantes.

2.11. CARACTERIZACION GENETICA DE LOS ADNc CLONADOS

2.11.1. Buffers, soluciones y medios de cultivo utilizados comúnmente

Buffersy soluciones

TBE 10X= (Para 1 litro) Tris base 108 g, ácido bórico 55 g, EDTA 0,5 M (pH 8,0) 40 ml.

TAE 50X= (Para 1 litro) Tris base 242 g, NaAcO 57,1 g, EDTA 0,5M (pH 8,0) 100 ml.

TE= 1 mM EDTA, 10 mM Tris-ClH pH 8

MOPS 10X= MOPS 0,2 M, NaAcO 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7,0.

TMN 10X = 100 mM Tris-ClH pH 8, 100 mM ClNa, 5 mM MgCl₂

BPB 6X = TBE 6X, 60% glicerina, 0,25 BPB

SSC 20X = NaCl 3 M, citrato de sodio 0,15 M, pH 7,0.

Solución de hibridación (SH)= formamida deionizada 50%, 5.85% ClNa (o SSC 4X), SDS 1%, ADN de timo precalentado 10 min a 100°C 100 µg/ml, Denhardt 5X.

Denhardt: 1% glicina, 1% polivinilpirrolidina, 1% ficoll

Medios de cultivo

2xTY (para 1 litro)= Bacto triptoná 16 g, extracto de levadura 10 g, NaCl 5 g.

Medio mínimo: Na₂HPO₄ 1 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1 g/l, MgSO₄ 2 mM, glucosa 2 g/l, CaCl₂ 2 g/l, CaCl₂ 0,1 mM adicionado con tiamina 0,5 µg/ml

2.11.2. Preparación en gran escala de ADN de λgt11

2.11.2.1. Obtención de fagos purificados por ClCs

Utilizando el método descrito en 2.5.3.1., se plaquearon 30 cajas chicas (9 cm) con 10⁶ ufp de fagos por placa (Nota: Se debe usar LB-a-bl para evitar la presencia de inhibidores de las enzimas de restricción). Los fagos se incubaron a 37°C durante la noche o hasta confluencia. A cada caja se le agregó 5 ml de SM y se guardó a 4°C durante la noche (mínimo 14 hs). Al día siguiente se recogió todo el SM y se lavó con 1 ml mas de SM por placa, que se reunió con el restante. Se prosiguió como sigue:

Centrifugar a 9000 rpm durante 10 min a 4°C.

Descartar el precipitado (restos bacterianos) y repartir el sobrenadante en butos correspondientes al rotor de SW28. Centrifugar a 20000 rpm durante 3 hs a 4°C.

Eliminar el sobrenadante y sacar los tubos por inversión sobre papel de filtro.

Resuspender el precipitado transparente que quedó en el fondo en 500 µl de TMC (por tubo: 2 ml en total) durante la noche a 4°C.

Terminar el proceso de resuspensión ayudándose con una pipeta automática de 1 ml con el cono plástico recortado. Reunir todos los precipitados resuspendidos en un tubo al que se le

agrega 3 g de cloruro de cesio y agitar suavemente en agitador rotativo, hasta disolución.

Ajustar el índice de refracción 1,3815 agregando TM o ClCs según sea el caso, y centrifugar en el rotor Ti50 a 35000 rpm durante 22-24 hs a 5°C.

Extraer la banda de fagos con pipeta Pasteur afilada o con jeringa y dializar contra TM con cambios a la hora, a las dos y a las tres horas, a temperatura ambiente. Dejar dializando durante la noche a 4°C

2.11.2.2. Extracción del ADN

Se agregó EDTA 0,5 M pH 8 al dializado hasta hacerlo 20 mM, y se extrajo 3 veces con fenol equilibrado con Tris 0,5 M pH 8,5. (Nota: Si la fase acuosa está muy espesa, se agregó TE EDTA 1 mM, Tris 10 mM pH 8). La fase acuosa se dializó contra TE 1 mM (EDTA 1 mM, Tris 10 mM con cambios a la hora, las dos y tres horas. Se dializó durante la noche con TE 0,1 mM (0,1 mM EDTA, Tris 50 mM, pH 8).

La concentración ADN se determinó por espectrofotometría U.V. con lecturas a 280 y 260 nm. $1 \text{ D.O.}_{260} = 40 \mu\text{g ADN/ml}$.

2.11.3. Determinación del tamaño del inserto de ADNc

2.11.3.1. Extracción del inserto por digestión con EcoRI

Aproximadamente 5 μg de ADN de los clones en λgt11 (obtenido en 2.5.1.) se digirieron con 30 U de enzima EcoRI (Amersham, Biolabs o Promega Biotec). La solución de incubación contenía:

Materiales y Métodos

λ gt11, ADN	10 μ l (o lo calculado)
DTT 0,1 M	3 μ l
Spermidina 40 mM	1,5 μ l
Buffer EcoRI (Amersham)	3 μ l
EcoRI (Biolabs, Promega o Boheringer)	3 μ l
H ₂ O csp 30 μ l	

La mezcla se incubó unas 3-4 hs, y el corte se verificó por corrida en un gel 0,4% agarosa en TBE. Se consideró al corte completo cuando la banda del ADN sin cortar dejó de verse o cuando las de los brazos fueron mayoritarios respecto de esta. Finalizado el corte se agregó 5 μ l de TE, y se hizo una extracción con 1 vol de fenol equilibrado y 3 extracciones con éter.

2.11.3.2. Determinación del tamaño del inserto de ADNc

4 μ l del fago cortado con EcoRI se marcaron con ATP* en presencia de ADN polimerasa I Fragmento "Klenow" (BRL o Promega) la solución de incubación contenía:

ADN λ gt11 cortado con EcoRI	4 μ l
TMN	2 μ l
dATP α P ³²	1 μ l
ddH ₂ O	13 μ l
	<hr/>
	20 μ l

La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 5 μ l de LB 6X y se corrió en un gel de poliacrilamida nativo 6% junto con los marcadores de peso molecular (ver más abajo). Se corrió a 33 W potencia constante hasta que el BPB recorrió las 3/4 partes. Se separó uno de

los vidrios, el gel se recubrió con un celofán transparente y se autorradiografió a temperatura ambiente durante 30 minutos. Como marcadores de peso molecular se utilizó el plásmido pAT cortado con la enzima Hinf III y marcado con ATP αP^{32} en forma análoga a la descrita en esta sección.

2.11.4. Subclonado en el fago M13mp18

2.11.4.1. Ligación de los insertos de ADNc al vector M13mp18/mp10

Como fuente de inserto se utilizó el ADN de los fagos λ gt11 recombinantes cortados con EcoRI (ver 2.5.2) (Nota: como los brazos de λ gt11 no pueden ligarse al fago M13 para formar un fago recombinante viable no es necesario separarlos del inserto).

Se ligaron 10 ng de fago M13mp18 (Messing, 1983) doble cadena cortado con EcoRI (Biolabs M13 *cloning kit*, New England Biolabs, Beverly, MA, USA) con distintas cantidades de λ gt11 cortado con EcoRI, en un volumen de 10 a 20 μ l como máximo. En un tubo se colocó:

ADN λ cortado (inserto)	1 μ l/2 μ l/5 μ l
M13mp18/EcoRI (10 ng/ μ l)	1 μ l
<i>Buffer</i> ligasa 10X	1 μ l
ATP 10 mM	1 μ l
DTT 0.1 M	1 μ l
ADN ligasa T4 (1 u/ μ l)	1 μ l
ddH ₂ O csp	10 μ l/ 20 μ l

La mezcla se incubó a 14°C por 16 hs y se utilizó para transformar las bacterias *E. coli* JM101 competentes. Como control de ligación se ligó el M13mp18/EcoRI sin inserto.

2.11.4.2. Obtención de bacterias *E. coli* JM101 competentes

Inocular una colonia aislada de *E. coli* JM101 seleccionado en medio mínimo (selección F') en 2 ml de medio 2TY, e incubar O.N. a 37°C con agitación.

Diluir el cultivo saturado obtenido. Por una parte, en 1:5 en 2TY (5 ml) para utilizar como cultivo estacionario, e incubar a 37°C. Por la otra parte, diluir 1:100 en 50 ml de 2TY, e incubar hasta que la D.O. sea 0,2-0,4.

Cosechar centrifugando 10 min a 3000 rpm.

Resuspender suavemente el precipitado en medio volumen (25 ml) de Cl₂Ca 50 mM estéril helado. Dejar 1 h en hielo.

Centrifugar 10 min, a 3000 rpm a 4°C. Resuspender el precipitado en 1/10 del volumen original (5 ml). Estas células alcanzan el máximo de eficiencia de transformación a las 2-3 hs y pueden ser guardadas en hielo hasta una noche.

2.11.4.3. Transformación de *E. coli* JM101

Agregar 200 µl de bacterias competentes sobre el ADN proveniente de la ligación.

Dejar 1 h en hielo.

Incubar las bacterias 2 min a 42°C (choque térmico).

Agregar a cada tubo: 200 µl del cultivo estacionario (obtenido en la sección anterior), 40 µl de Xgal 2% y 20 µl de IPTG 100 mM, y plaquear con 3,5 ml de LB-agarosa fundido como se hizo en 2.2.2.

Incubar O.N. a 37°C.

Como controles de esta experiencia, se realizó una transformación sin ADN y otra con fago M13 doble cadena.

Las placas de retardo de crecimiento azules correspondieron a los fagos no recombinantes (M13 WT lac Z+) y las blancas podían corresponder a M13 recombinantes (lac Z-) de entre los cuales se identificó a los que contenían el inserto de interés. Esta selección se hizo una vez que se obtuvo ADN simple cadena a partir de varias placas blancas.

2.11.4.4. Obtención de ADN simple cadena de fagos recombinantes M13

Se utilizó una modificación del método de Messing, (1983). Un cultivo saturado de *E. coli* JM101 en 2TY se diluyó 1:50. En tubos de hemólisis conteniendo 2 ml de esta dilución, se inocularon con un escarbadientes estéril las placas blancas, y se incubaron durante 5 hs a 37°C con agitación energética (Nota: Si se partió del stock de fagos se inocula con 30 µl de los fagos en glicerol).

El siguiente protocolo se realizó para obtener preparaciones de alta calidad, susceptibles de ser utilizadas para secuenciación con Sequenase (USB, Cleveland, Ohio, USA) (2.11.9.)

Al finalizar la incubación de 5 hs, se centrifugan los tubos de hemólisis en una centrífuga clínica durante 10 min a 3000 rpm.

Se extraen 1,5 ml del sobrenadante que se traspasa a tubos Eppendorf, y se vuelve a centrifugar durante 10 min a 16000 rpm.

Materiales y Métodos

De estos tubos se extraen sólo 1,2 ml del sobrenadante, y el resto se guarda para usar como inóculo, en la obtención de nuevas preparaciones de DNA SS. adicionándole 1 vol de glicerol y guardandolos a -20°C .

A los 1,2 ml se le agregan 300 μl de PEG 6000 20%/3.5 M AcONH_4 . Se mezcla bien por inversión, y los fagos se precipitan en hielo durante 1 h.

Se centrifuga 10 min en 13000 rpm y con una pipeta Pasteur afilada se aspira todo el sobrenadante que se descarta; En este punto debe observarse un precipitado de fagos blancuzco. En aquellos casos donde no se observa precipitado, la preparación se desechará.

Se vuelve a centrifugar (1 min) para que todo el PEG residual decante y pueda ser extraído con pipeta Pasteur afilada. Se repite la operación hasta que no se observe más PEG. Esta precaución es indispensable para obtener preparaciones aptas para secuenciación.

El precipitado se resuspende en 100 μl de T.E., ayudándose con una pipeta automática y vortex. Se agrega 50 μl de fenol equilibrado con Tris-HCl, pH 8,0 y se agita con vortex durante 1 min y luego 1/2 min.

Se centrifuga 5 min a 13000 g y a la fase acuosa se le hacen 2 extracciones con 600 μl de éter etílico.

El ADN SS se precipita por el agregado de 0,5 vol de AcONH_4 7,5 M. Al volumen resultante se le agrega 2 vol de EtOH.ABS.

Se precipita durante la noche a -20°C . Se centrifuga 10 min a 13000 g y se lava 2 veces el precipitado con EtOH 80, se seca al vacío, y el ADN se disuelve en 23 μl de TE. El rendimiento es de aproximadamente 3 μg de ADN SS por minipreparación.

2.11.4.5. Controles de subclonado

Para verificar que los ADN SS obtenidos provenían de fagos M13 recombinantes que contienen el inserto de ADNc, se les hicieron los siguientes controles:

- 1- Retardo en la migración electroforética de las ADN SS con respecto al ADN SS de M13 no recombinante.
- 2- Test de complementaridad.
- 3- Reacción de extensión de la cadena, donde se verificará el tamaño del inserto.

2.11.4.5.1 *Verificación de la presencia del inserto en SS M13 por electroforesis*

Para verificar la presencia del inserto en los clones recombinantes M13, se corrieron 2 μ l de preparación de SS ADN en un gel de 0.7% de agarosa en TBE a 100 V v.c., preteñido con BrEt. Se utilizaron preparaciones provenientes de placas de M13 no recombinante, como control de fago sin inserto.

2.11.4.5.2. *Test de complementaridad de insertos de fagos SS M13*

El método consiste en verificar el retardo de la migración en geles de agarosa, del ADN simple cadena de un fago recombinante M13 producido cuando el ADNc simple cadena de su inserto puede formar un híbrido parcial con otro fago M13 que lleva su cadena complementaria (inserción en M13 del mismo ADNc en la otra orientación). Así se identifican pares de fagos M13 que contienen las dos orientaciones del inserto.

Se mezclaron en un Eppendorf, 5 μ l de las preparaciones de ADN SS de un par de clones M13 (Nota: se incluyeron clones con insertos complementarios como control positivo y algún ADN SS como control negativo), con 1 μ l de ClNA 2.5 M, y se incubaron durante 30 min a 60°C en baño de agua. Se dejó enfriar muy lentamente en el baño de agua. Se agregó BPB y se corrió en un gel agarosa-TBE 0.7% a 100 V. Se incluyeron preparaciones de DNA SS sin tratamiento alguno como control.

2.11.4.5.3. *Determinación del tamaño de los insertos M13*

Se realizó como en 2.11.5. y sólo se utilizaron para secuenciación aquéllos pares de clones M13 que dieron positivo el test de complementaridad y cuyo tamaño coincidió con el del inserto determinado según se lo determinó por la técnica descrita en 2.11.3.2. Esta es la única manera de asegurar que los subclones en M13 no han sufrido deleciones.

2.11.5. Obtención de sondas radiactivas monocatenarias a partir de los ADN SS de M13

Se siguió el método descrito por Kornblihtt *et al.* (1984). Para la obtención de las sondas, se utilizaron los mismos ADN SS de fagos recombinantes que se usaron para secuenciación.

El principio es similar. A partir del *primer* universal, se sintetiza la cadena complementaria al ADN SS del inserto por acción de la ADN polimerasa I Klenow en presencia de altas concentraciones de nucleótidos marcados. Una vez que la zona del ADNc insertado se ha copiado por la acción de la Klenow, el sitio de restricción EcoRI que se forma, puede ser digerido por EcoRI.

El inserto marcado se separa del resto de M13 por electroforesis en PAGE. La banda radioactiva se eluye del gel y se desnaturaliza antes de ser utilizada como sonda (ver Fig.).

2.11.5.1 Hibridización del M13 SS con el primer universal (annealing).

Un tubo eppendorf que contiene 10 μ l de ADN SS, 1 μ l de *primer* universal M13 y 2,5 μ l de TMN se calentó durante 3 minutos en un baño de agua a 100°C y se dejó enfriar dentro del mismo baño hasta temperatura ambiente.

2.11.5.2 Primer extension, corte con EcoRI y separación del inserto marcado por electroforesis

Una vez finalizado el annealing, a cada tubo (con 12.5 μ l) se le agregó

dTTP 0,5 mM	1 μ l
dATP 0,5 mM	1 μ l
dGTP 0.025 mM	2 μ l
dCTP 0.025 mM	2 μ l
DTT 0,1 M	0,5 μ l
Spermidina 40 mM	0,5 μ l
5'-[α P ³²] dGTP	1 μ l
5'-[α P ³²] dATP	1 μ l
H ₂ O	csp 25 μ l

Luego de homogeneizar, se agregó 1 μ l de Klenow (10 u) (BRL o Promega Biotec) y se incubó durante 1 h a 20°C. A continuación se añadieron 2 μ l de d(ACGT)TP 10 mM/nucl. La Klenow se

destruyó por incubación durante 10 min a 70°C, y luego se agregaron directamente 2 µl de EcoRI (20 U) y se incubó 2 hs a 37°C.

A continuación se le agregaron 6 µl de LB 6X y se corrieron en un gel de poliacrilamida nativo 6% junto con marcadores de peso molecular (ver 2.11.3.2) a 33 W potencia constante hasta que el BPB recorrió las 3/4 partes. Se separó uno de los vidrios, el gel se recubrió de un celofán transparente y se autorradiografió a temperatura ambiente durante 30 minutos marcando previamente la posición del gel sobre el papel fotográfico. Luego del revelado se recortó cuidadosamente la porción del gel que corresponde a la banda que contiene el inserto, la que se colocó en un Eppendorf con 400 µl de AcO 0,3 M y se incubó durante la noche a 37°C.

Al día siguiente se separó la solución de la poliacrilamida y se hirvió con 1,00 ml de solución de prehibridización para ser inyectada en la bolsa de hibridización en experiencias de *Northern y Southern blot*.

2.11.6. Northern blot de ARN total de *Trypanosoma cruzi*

El northern blot se realizó según la técnica de Southern (1975). el ARN fue separado electroforéticamente en un gel de agarosa-formaldehido (Lehrach *et al.*, 1972).

2.11.6.1. Gel de agarosa - formaldehido

Se disolvieron 2,25 g de agarosa en 110 ml de agua hirviendo. Cuando la temperatura bajó a 50-60°C se agregaron 15 ml de MOPS 10X, 25 ml de formaldehido (Nota: si el pH del formaldehido es menor que 6,5 debe ser deionizado con resina Amberlite MB1, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), y se vertió sobre un molde apropiado (10x15x1 cm).

2.11.6.2. Preparación de la muestra y corrida del gel

Para geles con calles de 8 mm-1 cm se sembraron 15-20 µg de ARN por calle. El ARN se trató apenas descongelado con 0,25 vol de formaldehído (6% de formaldehído final), 2 vol de formamida deionizada, y 0,3 vol de MOPS. Esta mezcla se calentó a 65°C, 15 min y se colocó luego en hielo, donde se le agregaron 0,2 vol de BPB (con SDS) y 0,01 vol de BrEt 1%.

Las muestras se corrieron en en *Buffer* MOPS a 5 V/cm v.c., hasta que el color BPB se encontró 1 cm antes del final del gel. Una vez finalizada la corrida, el gel se lavó con abundante agua, y se fotografió sobre un transiluminador con luz UV. Los ARN ribosomales de *T. cruzi* fueron utilizados como marcadores de peso molecular para el cálculo del peso molecular de los transcritos (Castro et al., 1981).

2.11.6.3. Tratamiento del gel para transferencia

Al gel, que es muy rígido, se le hicieron los siguientes tratamientos agitando suavemente:

3 lavados de 5 min con ddH₂O

30 min en HONa 50 mM (no superar este tiempo)

Lavado durante 15 min en Tris 100 mM pH 7,5

15 min en SSC 10X

2.11.6.4. Transferencia a GENE SCREEN PLUS

Se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (NEN, Dupont, Boston MA, USA), y la técnica de transferencia de Southern (1975).

Una vez marcado el lado cóncavo (B), se lavó en H₂O dd 5 min, y se dejó sumergido en SSC 10X. El lado marcado B es el que debe ponerse en contacto con el gel para la transferencia, que se hace durante toda la noche, a temperatura ambiente utilizando SSC 10 X como *Buffer*

2.11.6.5. Tratamiento posterior de la transferencia

La membrana se lavó con agua y se secó bien sobre papel de filtro. Se envolvió en papel de filtro Whatman 3 MM y papel de aluminio, y se horneó durante 2 hs a 80°C.

2.11.7. *Southern blot de Trypanosoma cruzi*

2.11.7.1. Obtención de ADN de *Trypanosoma cruzi*

Se resuspende suavemente 1 g de parásito en 20 vol de Tris 10 mM pH 8, EDTA 100 mM, SDS 1%.

Se lleva a 100 µg de proteinasa K y se incuba durante la noche a 37°C.

Se hacen 3 extracciones con fenol equilibrado con Tris 0,5 M pH 8, y 3 extracciones con cloroformo isoamílico (24:1 V/V). Se Separan las fases por centrifugación a 3500 rpm durante 10 min y se recupera la fase acuosa cuidando de no traspasar las proteínas de la interfase.

Materiales y Métodos

Precipitar el ADN se por agregado de 2,5 vol de EtOH y resuspender en 10 ml de TE.

Llevar a 0,83 g/ml de ClCs (15 g para 18 ml) y 0,01% de BrEt.

Centrifugar en un rotor SWti 40000 rpm durante 36 hs a 20-26°C.

Recuperar el ADN de la banda en la parte superior del tubo.

Extraer el BrEt con 7 extracciones con alcohol butílico.

Agregar 0,1 vol de AcO Na 3 M y 2,5 vol de EtoH y precipitar 15 min a -70°C

Lavar 2 veces con EtOH 70% secar al vacío.

Guardar disuelto en TE en una concentración aproximada de 10 µg/µl.

2.11.7.2. Digestión del ADN con las enzimas de restricción

El ADN fue digerido en un gran volumen para evitar inhibiciones. La digestión total (o parcial, según se requirió) fue seguida corriendo en minigeles de 1%. Una vez que se concluyó la digestión, se precipitó todo el ADN por el agregado de 0,1 Vol. de ACONa 3 M y 2,5 vol de EtoH, y se resuspendió en 10-20 µl de TE. Se corrió en un geles analítico de agarosa 1%.

Materiales y Métodos

	EcoRI	BamHI	HindIII
ADN <i>T. cruzi</i> (20 µg/ml)	20 µl	20 µl	20 µl
Buffer 10 X Amersham	40 µl	40 µl	40 µl
Espermidina 100 mM	16 µl	16 µl	16 µl
DTT 100 mM	8 µl	8 µl	8 µl
Enzima 10 u/ul	3 µl	3 µl	3 µl
H ₂ O csp	400 µl	400 µl	400 µl

2.11.7.3. Geles analíticos de agarosa 1% para *Southern blot*

Los 20 µl de la muestra de siembra se mezclaron con 4 µl de BPB 6X y 1 µl de BrEt 0,1%, y se sembraron en un gel TAE o TBE 1% de 15x20 cm. La corrida se realizó a 25 V v.c. durante la noche o a 5 V/cm.

Una vez finalizada la corrida, el gel se lavó con abundante agua, y se fotografió sobre un transiluminador con luz UV.

2.11.7.4. Tratamiento del gel

Una vez fotografiado el gel, se hizo el siguiente tratamiento:

Se incubó durante 30 min en una solución 0,4 N NaOH, 0,6 M ClNa.

Se incubó para neutralizar en TBS 10X pH 7,4 (Tris-ClH pH 7,4 0,5 M ClNa 1,5 M).

Para la transferencia a Gene Screen plus (NEN, Boston, MA, USA) (ver tratamiento de la membrana en 2.11.6.4.) se procedió en forma análoga al procedimiento de Southern (1975), y

Materiales y Métodos

la única diferencia con el Northern en el tratamiento posterior de los filtros fue que estos no se hornearon, sino que se los dejó secar sobre papel de filtro antes de prehibridizar e hibridizar.

2.11.8. Hibridización con sondas radioactivas

2.11.8.1. Prehibridización

Se utilizó 1 ml/20 cm² de solución de hibridización SH como mínimo (Nota: Para obtener 10 ml, se mezclan 5 ml de formamida deionizada con 2 ml de solución Denhardt, 1 ml de SDS y 5,8 g de ClNa y se llevan a 10 ml, luego se agregan 100 µl de ADN de timo o esperma de salmón 10 mg/ml previamente calentado 10 min a 100°C). Cada tira de Gene Screen, con el volumen necesario de solución de SH, se dejó 4-5 hs a 42°C.

2.11.8.2. Hibridización

Al filtro prehibridizado, sin extraer la SH, se agregó la sonda precalentada 10 min a 100°C en 1 ml de SH y se dejó hibridizando a 42°C con agitación en baño termostaticado durante la noche (16-20 hs).

La sonda se recuperó y, sin dejar en ningún momento que el filtro se seque, se hizo un enjuague en SSC 2X y 4 lavados durante 3-5 min en SSC 2X 0,1% a temperatura ambiente.

Una vez finalizados estos lavados, se hicieron 2 lavados de 30 min a 65°C con agitación, con 0,2X SSC 0,1% SDS precalentado a 65°C, y se midió con un contador Geiger colocando la tira entre láminas de polietileno (para que no se seque) hasta

que se obtuvo una buena relación señal/ruido de fondo. Se autoradiografió con pantalla intensificadora durante 24-48 hs a -70°C .

2.11.9. Secuenciación de los clones en M13 por el método de Sanger

2.11.9.1. Geles de secuencia

Se utilizaron geles desnaturalizantes de 30x42 cm de poliacrilamida 8% que se prepararon de la siguiente manera:

Se disolvieron 42 g de urea (BRL, Bethesda, MD, USA) en una solución de 15 ml de acrilamida 40% (38% acrilamida, 2% Bis-Acrilamida), 10 ml de TBE 10 X y 25 ml de agua destilada, y se llevaron luego a un volumen final de 100 ml. Para la polimerización se agregó 280 μl de TEMED y 100 μl de PSA 25%.

La electroforesis se corrió en TBE 1X a 40 W o 60W de potencia constante en el caso de disponer de cubas especiales con alta disipación de calor (BRL SS2, BRL, Bethesda, MD, USA)

2.11.9.2. Reacciones de secuencia

Se utilizó el método de Sanger *et al.* (1977), utilizando los ADN M13 SS obtenidos en 2.11.4.4. Como nucleótido marcado se utilizó ATP S^{35} (NEN, Boston, MA, USA). Las reacciones de secuencia fueron llevadas a cabo con el *kit* de SEQUENASA (USB, Cleveland, Ohio, USA) utilizando tanto la enzima T7 ADN polimerasa como las mezclas con dideoxinucleótidos y de deoxinucleótidos provistas en el *kit*. Se siguieron las instrucciones del fabricante. A continuación se enumeran los pasos y las modificaciones introducidas para lecturas de aproximadamente 200 nucleó-

Materiales y Métodos

tidos. En el caso de la secuencia de JL7 para resolver la secuencia de una zona rica en G y C de lectura muy ambigua se utilizaron mezclas de nucleótidos y dideoxinucleótidos donde el GTP fue reemplazado por ITP (inositol trifosfato):

Colocar en un Eppendorf 10 μ l de ADN SS obtenido en 2.11.4.4. 3 μ l de *Buffer* Sequenase y 1,5 μ l de *primer*, e incubar durante 2 min a 65°C en bloque calefactor.

Sacar la placa calefactora y dejar enfriar hasta que la temperatura sea <35°C.

Mientras se enfría y se completa la hibridización, se ponen en tubos rotulados A,C,G y T. 3,8 μ l de la mezcla con dideoxi (mezcla de terminación) en el fondo de los tubos, y se diluye la mezcla de marcación (LM) 1:5 (1 LM + 4 dd H₂O). Se utilizarán 3 μ l por secuencia.

Cuando se enfrió a la temperatura indicada, se hace un *spin down*, y se agregan a los 15 μ l de la hibridización lo siguiente:

DTT	1,5 μ l
LM	3 μ l
S ₃₅	1 μ l

spin down y agregar a la pared del tubo 3 μ l de Sequenasa diluida 1:8 en TE (7 μ l TE + 1 μ l Sequenasa). Debe diluirse inmediatamente antes de ser utilizada.

spin down y contar 5 min de incubación a temperatura ambiente. Mientras, poner a calentar los tubos con mezcla de terminación a 37°C.

Materiales y Métodos

Cuando pasaron los 5 min rápidamente se agregan a cada tubo de con los dideoxi (A,C,G,T) 5,5 μ l de cada tubo de reacción de marcación. *spin down* y contar 5 min.

A los 5 min poner en hielo, y agregar por tubo 7 μ l de BPB-formamida (mezcla detenedora).

spin down y guardar a -20°C . Antes de correr la electroforesis la reacción de secuencia se debe calentar a 100°C en baño de agua durante 2 min para desnaturalizar el ADN. Lo obtenido en una reacción de secuencia a partir de 10 μ l de ADN SS alcanzó para correr 2 geles de 2 depósitos cada uno (hasta 5 depósitos en total de 3 μ l cada uno). Puede utilizarse una semana después de realizada la reacción de secuenciación.

2.11.9.3. Condiciones para lecturas extensas

Para secuencias en que se requiere leer más de 200 nucleotidos se hicieron las siguientes modificaciones al protocolo:

La reacción de marcado se hizo utilizando la solución provista en el kit sin diluir, con mayor concentración de Sequenase y ATP marcado (un 50% más) y se incubó hasta 8-15 min. La reacciones de terminación de cadena con los dideoxinucleótidos también se incubaron más tiempo (4-8 min dependiendo del caso). Con estas modificaciones pudieron leerse hasta 350-400 pb (clon JL7). Generalmente estas secuencias fueron corridas en geles de tres depósitos (ver 2.11.9.3).

2.11.9.4. Corrida de geles de secuencia

Se utilizaron geles grandes (42x33) y geles chicos (22x42) con TBE 1X como *Buffer* de corrida. Todos los geles se pre-corrieron 20-30 min a 35 W (geles chicos) o a 40 W con disipador de aluminio (geles grandes). A continuación se lavó la urea y se sembró 3 µl de cada letra. El primer depósito se corrió hasta que el marcador de Xylen-Cianol recorrió 26-30 cm. Luego se realizó el segundo depósito y se corrió hasta que el xylen-cianol del segundo depósito hubo corrido 30 cm.

Los geles se fijaron 15 min en AcOH 10% MeOH 10% y se secaron a 80°C y con vacío en un secador BIO-RAD (Biorad, Richmond, CA, USA). Fueron expuestos durante 2 días a temperatura ambiente y revelados.

Los geles para lecturas extensas se corrieron a 30 W. Se hicieron 3 depósitos; el tercer depósito se hizo cuando el xylen-cianol del segundo depósito recorrió 30 cm. Algunas veces se hizo sólo el equivalente del 2° y 3° depósito.

2 . RESULTADOS

3.1 CLONADO DE ANTIGENOS DE *Trypanosoma cruzi* DEFINIDOS POR ANTICUERPOS PRESENTES EN EL SUERO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD CARDIACA DE CHAGAS.

Para clonar antígenos de *T. cruzi* definidos por anticuerpos presentes en el suero de pacientes con enfermedad cardíaca de Chagas crónica (ECCh) se construyó una biblioteca de ADNc de *T. cruzi* en el vector λ gt11, y se realizó el rastreo inmunológico la biblioteca con el suero de un paciente chagásico crónico con cardiopatía severa.

3.1.0. Construcción de la biblioteca en λ gt11

Siguiendo la metodología descrita en 2.1. se obtuvo el ADNc a partir del ARN poli A+ de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Tul 2).

El ADNc D.S. fue ligado a *polylinkers* EcoRI, digerido por la enzima y fraccionado por tamaño en una columna de sepharosa 4B (figura 6). Para la ligación con los brazos de λ gt11 se incluyeron las fracciones de ADNc a partir de 200pb.

Luego del empaquetado *in vitro* del producto de la ligación se obtuvieron $1.2 \cdot 10^6$ fagos de los cuales $1.0 \cdot 10^6$ fueron recombinantes. La biblioteca amplificada tuvo un título de $4.5 \cdot 10^9$ u.f.p.

3.1.1. Caracterización del suero.

Ademas de los hallazgos clínicos correspondientes a un individuo con cardiopatía chagásica en estado terminal (ver hallazgos clínicos en la tabla (ver 3.3.5.)), para la elección del suero utilizado en el rastreo inmunológico de la biblioteca se tomaron los siguientes criterios:

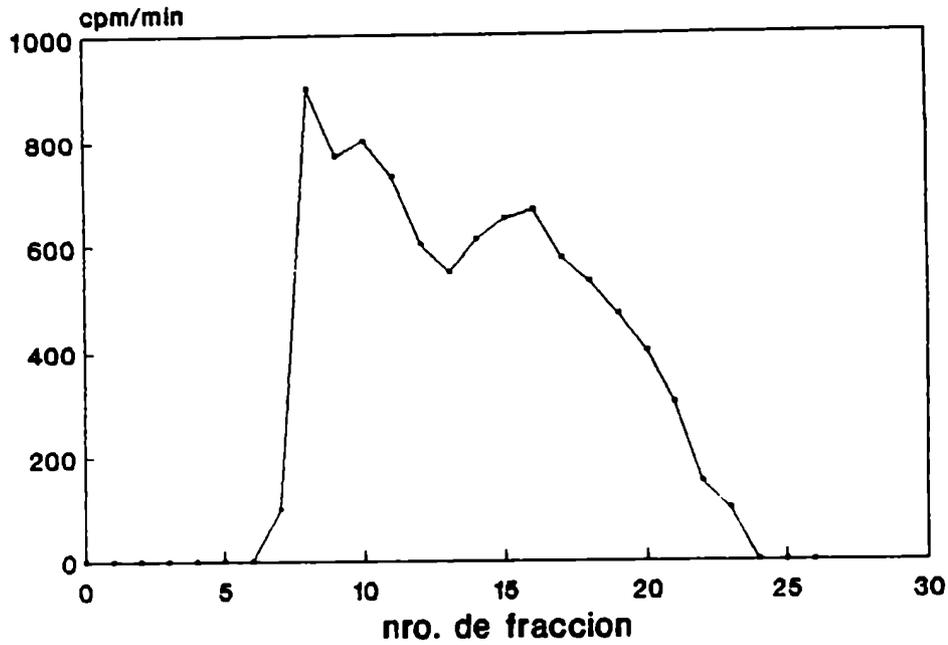


Figura 6:

Perfil de elución de los ADNc de una columna de Sepharosa-4B. El ADNc doble cadena ligado a los *polilinkers* EcoRI, se digirió con EcoRI y se sembró en una columna de Sepharosa-4B. Se colectaron fracciones de 50 μ l y se contaron en contador de centelleo.

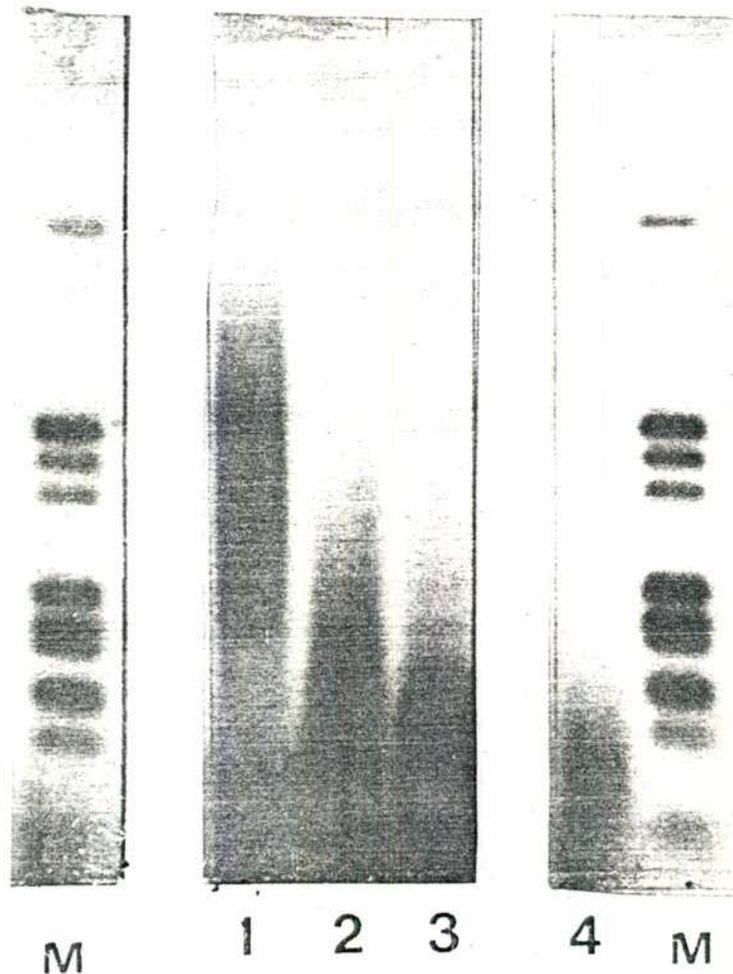


Figura 7:

Fraccionamiento por tamaño del ADNc de *T. cruzi*: 3 μ l de algunas fracciones del ADNc eluidas de la columna de sepharosa 4B (ver fig. 6) se corrieron en un gel de agarosa 1% y el gel se autoradiografió. M= marcadores de peso molecular: 5 kb, 4.2 kb, 3.5 kb, 2 kb, 1.6 kb, 1.4 kb, 0.9 kb, 0.5 kb, 0.1 kb. 1, fracción nro 10; 2, fracción 15 y 3, fracción 20, 4, fracción 23 (ver Fig. 6).

1. Fuerte reacción con antígenos del parásito: El suero elegido, a una dilución 1:1000 reaccionó positivamente hasta con 0,2 ng de homogenato total de *T. cruzi*.
2. Reactividad con tejidos del huésped: El suero elegido reacciona en *western blot* de músculo humano con proteínas de alto peso molecular. La autorreactividad detectada, indicaba que el suero podría servir para identificar antígenos de *T. cruzi* que presenten reacción inmunológica cruzada con tejidos del huésped.

3.1.2. Resultados del rastreo inmunológico-Optimización del método

A partir del rastreo de $2 \cdot 10^4$ fagos utilizando distintas diluciones del suero JL, se detectó a la dilución 1:1000 un fago con señal positiva que pudo purificarse a homogeneidad. El clon poseía el fenotipo *lac Z-*, indicando que podía tratarse de un recombinante. Este clon denominado JL1 se utilizó para optimizar las condiciones del rastreo inmunológico antes de emprender el rastreo de un gran número de fagos de la biblioteca. Con este objetivo se rastrearon entre 100-200 fagos correspondientes a la tercera etapa de la purificación del fago JL1 (tercer rastreo, ver 2.2.3.5.) de los cuales solo aproximadamente la mitad son positivos y se ensayaron distintas condiciones para aumentar la relación señal positiva/ruido de fondo.

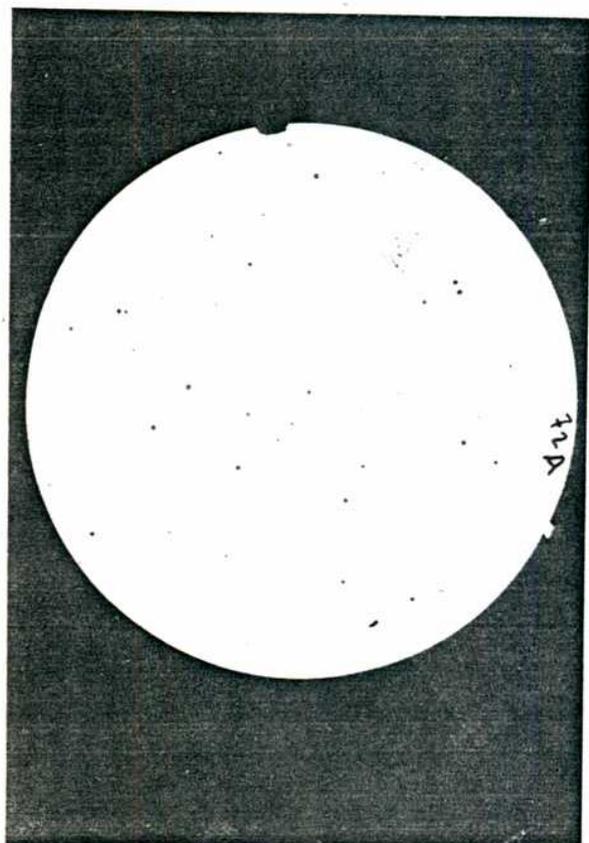
La mayor dilución con la que se obtuvo una señal positiva neta diferenciable de los fagos negativos fue 1:2000, con esta dilución se ensayo el efecto de distintos agentes que podrían disminuir el ruido de fondo. Los resultados se detallan en la Tabla IV, donde se compara el efecto del agregado de los distintos factores. Pudo verificarse que el Tween 20 y el lisado de bacterias *E. coli* RY1089-Lys resultan efectivos (Figura 8). En una

Resultados

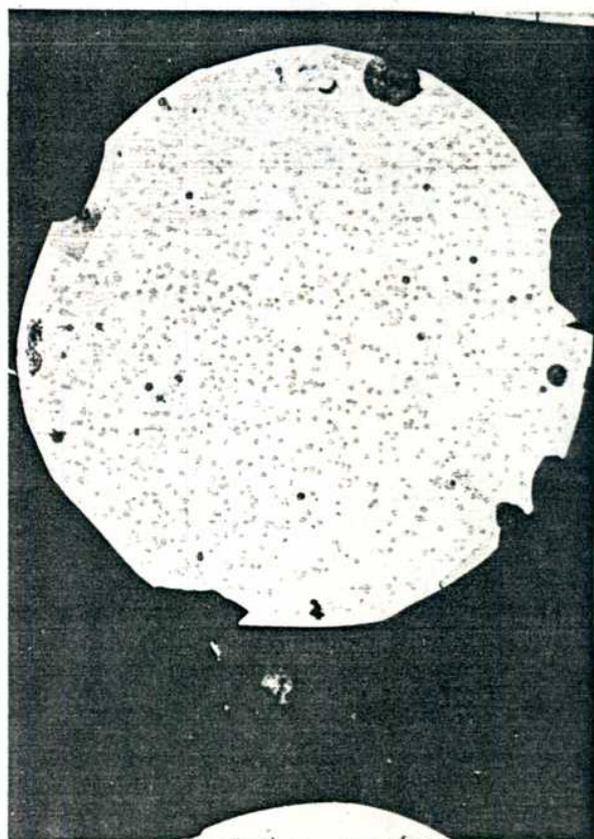
TABLA V: Efecto de distintos agregados sobre el ruido de fondo en el rastreo inmunológico de un biblioteca en λ gt11.

Agregado	Efecto Teorico sobre el ruido de fondo	Resultado*	
		Cesped	Placa
Ninguno		10	10
Tween 20	Disminuye interaccion proteina NC-suero	7	7
Lisado RY 1090 (P*)	Adsorcion Ac. anti-E. coli.	4	7
Lisado RY 1090 (C@)	Compite Ac. Anti-E.coli	3	5
Lisado RY 1089 Lys* (C)	Compite Ac. Anti-E.coli + anti-placa.	3	3
Lisado 1089 Lys + Tw 20		1	0
Lisado 1089 Lys + Tw 20 + DNAsa		0	0

* Comparación con el ruido de fondo correspondiente a la reactividad de las señales negativas (placa) y de la reactividad del cesped bacteriano del tercer rastreo inmunológico del clon JL1 en una experiencia sin ningun agregado (escala arbitraria 10). # (P) El suero fue preincubado con filtros de nitrocelulosa previamente incubados con el lisado y bloqueados con TBGL. @ (C) El lisado fue agregado directamente al suero (5% vol/vol) preincubado con agitación 30 minutos a T. a. antes de ponerlo en contacto con los filtros del rastreo inmunológico. & E. coli RY 1089 Lys: Lisado de bacterias *E. coli* 1089 lisogenicas para el fago λ gt11 no recombinante, termoinducidas a 42°C.



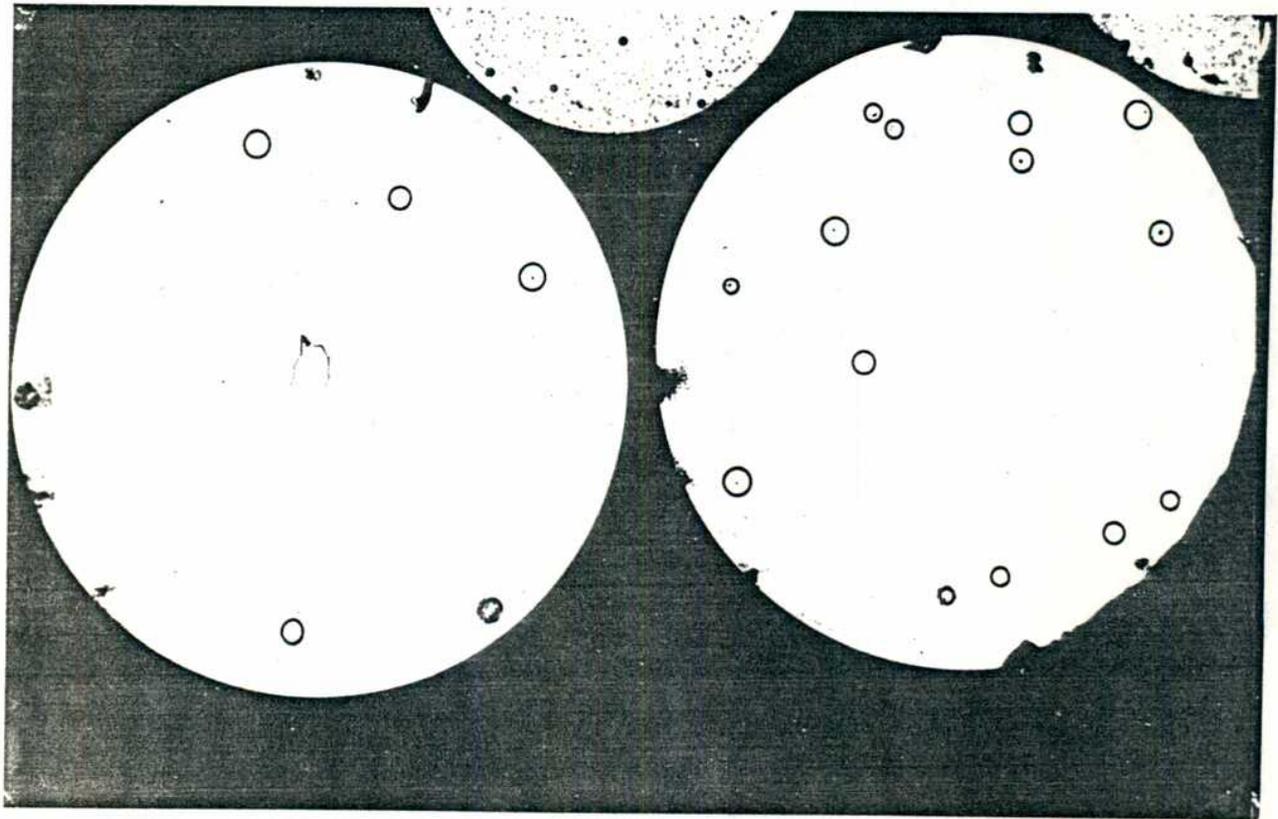
A



B

Figura 8:

Efecto de los agentes anti-ruido de fondo en el tercer rastreo del clon JL1. Los filtros de nitrocelulosa fueron incubados con una dilución 1:2000 en TBGL del suero JL. (A) con agregado de 5% de Lisado de *E. coli* RY 1089-Lys, 0.05% Tween 20.; (B) Diluido 1:2000 en TBGL sin agregado alguno, y revelados con Vectastain.



A

B

Figura 9: Rastreo inmunológico de una réplica de 50.000 fagos de la biblioteca de *T. cruzi* en λ gt11. Los filtros de nitrocelulosa fueron incubados con una dilucion del suero en TBGL A: 1:2000, 5% de lisado de *E. coli* RY 1089. B: 1:500, 20% de lisado de *E. coli* RY 1089-Lys. Las IgG fueron reveladas con el sistema vectastain.

experiencia paralela se determinó que estos agregados no varían la reactividad del suero con un *Western Blot* de *T. cruzi*. Una vez fijadas estas condiciones de rastreo se estudió el efecto de la dilución del suero. Con este fin se rastrearon réplicas de una misma placa con $5 \cdot 10^4$ fagos utilizando diluciones 1:500 y 1:2000 (Figura 9). Con la dilución 1:500 se obtuvieron 9 positivos mientras que con 1:2000 se obtuvieron solo 3. Se eligió la dilución 1:2000 para trabajar con un ruido de fondo menor y para aislar los clones que expresen los péptidos más antigénicos.

Del rastreo inmunológico de $1 \cdot 10^6$ clones con las se detectaron 52 señales positivas (ver Figura 10) de las cuales se purificaron a homogeneidad 20 clones.

3.1.3. Criterios de identidad entre clones

Los 20 clones purificados fueron clasificados para descartar los clones repetidos y a los inmunológicamente equivalentes, es decir aquellos clones que expresaban los mismos determinantes antigénicos. Esto se realizó sin tener que recurrir a una caracterización completa de los clones, fijándose los siguientes criterios:

Inmunológicos

Misma reactividad con varios sueros distintos (n=10)
(Ensayo por la técnica descripta en 2.3.2.)

2. Reactividad inmunológica cruzada (Ensayada por elución de anticuerpos específicos obtenidos según el procedimiento detallado en 2.6.4.)

Genéticos

3. Mismo tamaño de ADNc.
4. Hibridización cruzada.

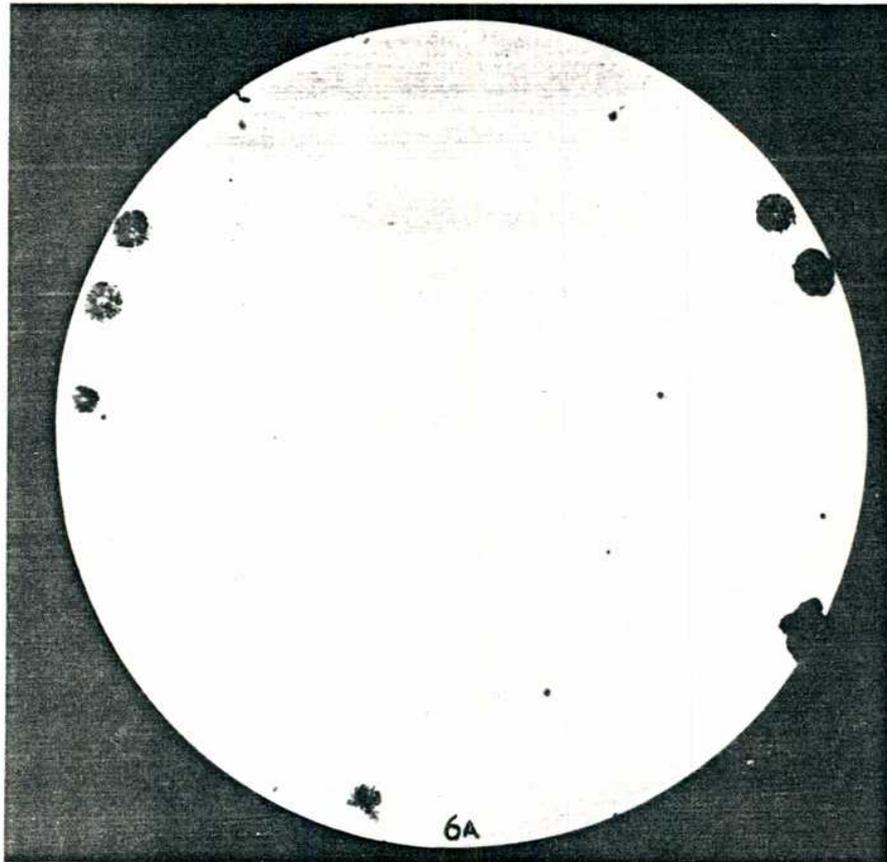


Figura 10:

Rastreo inmunológico de 50.000 fagos de la biblioteca de cDNA de *T. cruzi* en λ gt11 con el suero de un paciente con cardiopatía chagásica crónica: Las placas de lisis fueron recubiertas con un filtro embebido en IPTG 10 mM e incubadas 2 hs. A continuación los filtros fueron bloqueados con TBGL e incubados O.N. con una dilución 1:2000 del suero JL en TBGL con el agregado de 5% de lisado de *E. coli* RY 1089-Lys. Las IgGs fueron reveladas por el sistema vectastain.

Resultados

Se consideraron "iguales" aquellos clones que cumplieron los cuatro criterios. Se definieron como clones equivalentes aquellos que cumplieron con el criterio 1 y 2.

Una vez analizados los 20 clones se identificaron 7 fagos recombinantes diferentes: JL1, JL5, JL7, JL8, JL9, JL43 y JL52. Se procedió a su caracterización y fueron posteriormente utilizados para el estudio de diferencias entre sueros de pacientes con distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas.

3.2. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LOS CLONES λ gt11

La caracterización inmunológica de un clon recombinante λ gt11 se basa en la especificidad del reconocimiento inmunológico del polipéptido codificado por el ADNc clonado. En nuestro caso, los anticuerpos del suero del paciente que reaccionaron con el antígeno clonado deben a su vez definir determinantes antigénicas del parásito.

Se debe verificar que, los fagos inducidos por IPTG produzcan proteínas de fusión que reaccionan específicamente con anticuerpos presentes en el suero de pacientes chagásicos. Dichos anticuerpos deben estar dirigidos contra alguna proteína de *T. cruzi*. Este hecho puede servir para identificar a la proteína del parásito clonada.

3.2.1. Producción de proteínas de fusión

Para poder llevar a cabo la caracterización inmunológica es necesario producir en cantidad y poder visualizar la proteína de fusión β -gal-péptido clonado. Con este fin se lisogenizaron bacterias *E. coli* RY1089 (ver 2.6.1 y 1.5.2.2.) con los fagos recombinantes. los cultivos de bacterias lisogénicas produjeron proteínas de fusión al ser inducidos por IPTG.

Una vez que se obtuvo una bacteria lisogénica para cada fago recombinante se cultivaron a 32°C y se termoindujeron a 44°C (Ver 1.5.2.2 y 2.6.2.). Luego se indujo con IPTG y se incubó a 38°C. En la Figura 11 puede verse que el agregado de IPTG a un cultivo en fase exponencial tardía de lisogénicas para los fagos JL1 y JL5 produce grandes cantidades (aprox 5% de las proteínas totales) de una proteína de peso molecular similar al de la β -galactosidasa. En un *Western blot* de lisogénicas (Figura 12) puede

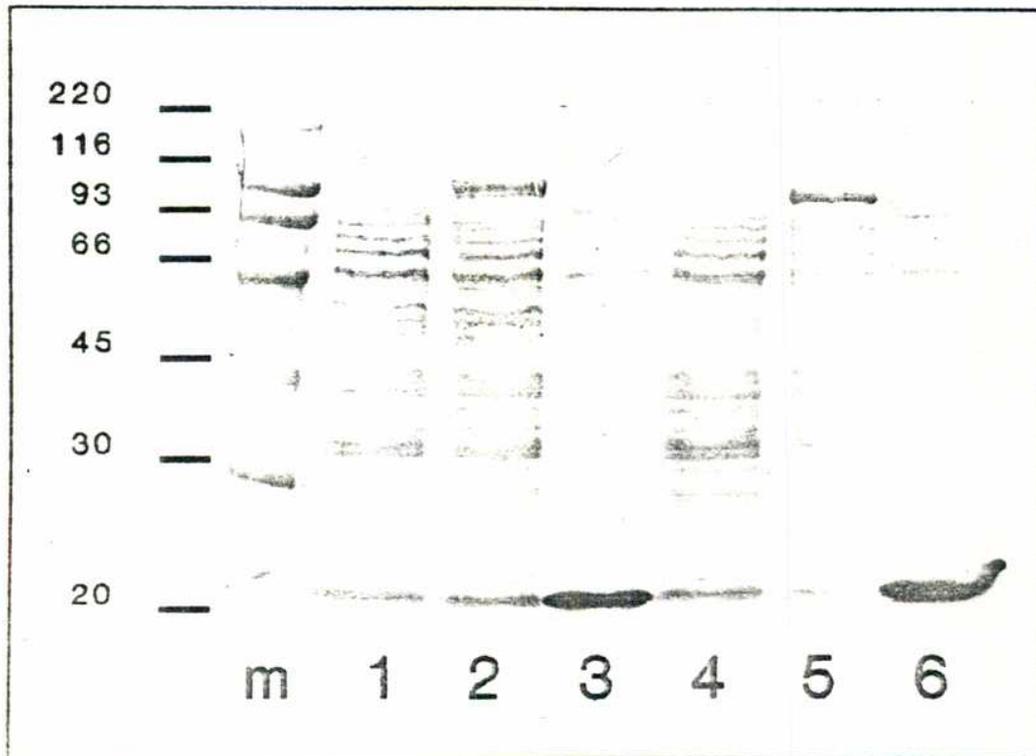


Figura 11:

Producción de proteínas de fusión en cultivos de bacterias lisogénicas inducidas: Cultivos de bacterias lisogénicas para los fagos JL5 y JL1 fueron termoinducidos a 44°C. Calles 2, 6, se agregó IPTG hasta 10 mM y se incubó a 38°C. Calles 1, 4 no se agregó IPTG. Calle 3 y 6 lisados purificados por el método de Hall *et al.*, 1984. Calle m, marcadores de peso molecular. A continuación las bacterias se cosecharon y se lisaron; los lisados fueron separados en geles SDS-PAGE 7,5% y teñidos con coomasie blue.

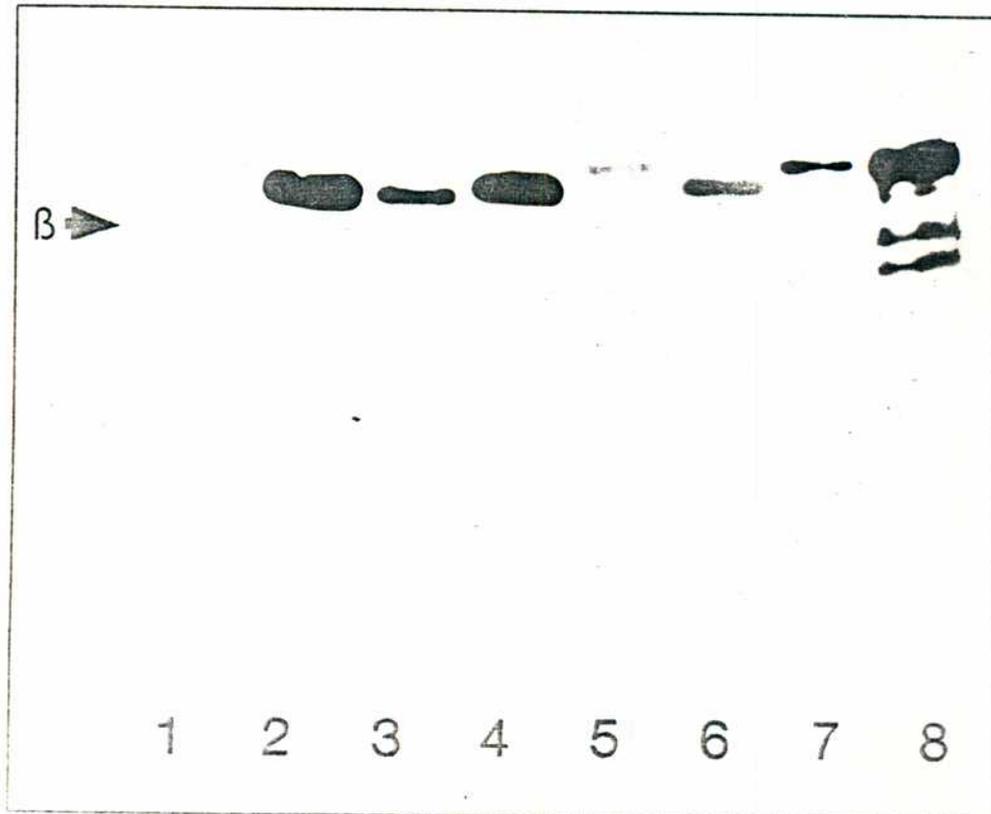


Figura 12:

Western blot de lisados de *E. coli* RY 1089 lisogénicas inducidas con IPTG.: Lisados de lisogénicas para los fagos recombinantes JL1, JL5, JL8, JL7, JL9. Calles 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente fueron corridos en geles PAGE-SDS 7.5% y transferidas a nitrocelulosa. Los filtros fueron bloqueados con TBGL e incubados O.N. con una dilución 1:500 de suero JL en TBGL, 20% Lisado de *E. coli* RY 1089-Lys. Las IgG fueron reveladas con el sistema Vectastain.

verificarse que las proteínas inducidas por IPTG reaccionan específicamente con los anticuerpos del suero JL. Estos anticuerpos no reaccionan con la β -galactosidasa producida por una lisogénica para λ gt11 no recombinante (Figura 12), lo que demuestra que la reactividad inmunológica está exclusivamente dirigida hacia el péptido clonado fusionado a β -gal. Los pesos moleculares observados se muestran en la Tabla IX capítulo 3.3.4. Estos se corresponden con los distintos tamaños de los marcos de lectura abiertos de los ADNc clonados que se continúan con el de la β -galactosidasa como se pudo confirmar por secuenciación (Tabla IX)

3.2.2. Identificación de las proteínas de *T. cruzi* que contienen los epitopes clonados

Si los polipéptidos clonados pertenecen a *T. cruzi*, los anticuerpos que reaccionan con las proteínas de fusión deben reaccionar con antígenos del parásito. Esto puede aprovecharse para identificar la(s) proteína(s) de *T. cruzi* que contienen los determinantes antigénicos clonados.

Se utilizó una modificación del método descrito por Hall *et al.* (1984), que consiste en la purificación parcial de las proteínas de fusión producidas por bacterias lisogénicas para purificar por afinidad los anticuerpos anti-péptido clonado (ver 2.6.4.). Los anticuerpos eluidos fueron incubados con *Western blots* de homogenato total de *T. cruzi*. En la figura 13 se muestran los resultados de esta experiencia: los anticuerpos anti-JL1 reaccionan con una proteína de *T. cruzi* de 25 KD presente en todos los estadios del parásito (Fig 13, calles 1, 3 y 5). Los anti-JL5 reaccionan con una proteína de 38 KD presente en tripomastigote, epimastigote y amastigote lo mismo que los anticuerpos anti-JL52. Los anticuerpos que reaccionan con JL9 reconocen un doblete de 40-45 KD y los anti-JL7 y anti-JL8 reconocen proteínas de PM > 180 KD todas presentes en epimastigote y tripomastigote.

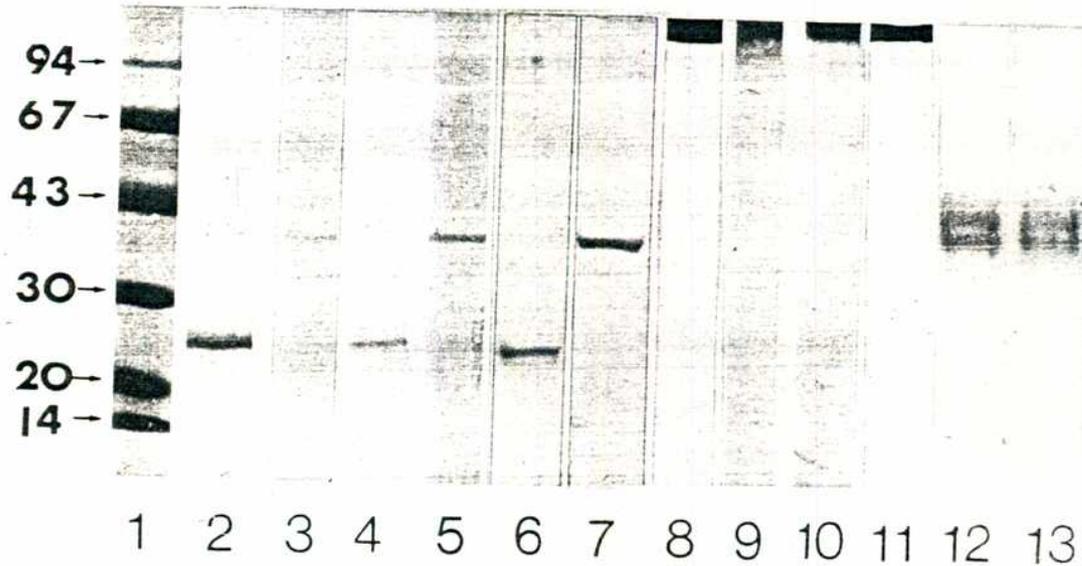


Figura 13: Identificación de las proteínas de *Trypanosoma cruzi* que contienen los determinantes antigénicos clonados. *Western blots* de homogenato total de epimastigotes (calles 2, 3, 8, 10 y 12), trypomastigote (calles 4, 5, 9, 11 y 13) y amastigote (calles 6 y 7) fueron incubados con anticuerpos inmunoseleccionados con proteínas de fusión de JL1 (calles 2, 4 y 6), JL5 (calles 3, 5 y 7), JL7 (calles 8 y 9), JL8 (calles 10 y 11) y JL9 (calles 12 y 13). Las IgG fueron reveladas por el sistema vectastain-peroxidasa. Calle 1, marcadores de peso molecular: fosforilasa b (94 KD), BSA (67 KD), ovoalbúmina (43 KD), anhidrasa carbónica (30 KD), inhibidor de la tripsina de soja (20 KD) y α -lactoalbúmina.

3.3. ESTUDIO DE DIFERENCIAS SEROLOGICAS ENTRE PACIENTES CON DISTINTAS FORMAS CLINICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS UTILIZANDO LOS ANTIGENOS CLONADOS.

Finalizada la caracterización inmunológica se estudió la posibilidad de correlacionar el perfil de reactividad contra los antígenos recombinantes de sueros de individuos infectados por *T. cruzi* con el estado clínico del donante. Todos los antígenos clonados reaccionaron con el suero de referencia JL (suero marcador de cardiopatía chagásica). Según lo postulado en 1.6., si la respuesta inmune humoral de los pacientes con cardiopatía chagásica fuese distinta a la de los pacientes con la forma indeterminada de la enfermedad; entonces, alguno de los antígenos clonados tendría que reaccionar preferentemente con suero de cardiopatas mientras que otros reaccionarían con los sueros de individuos infectados por *T. cruzi* independientemente de su estado clínico. Para comprobar la veracidad de esta hipótesis se impuso:

1. Diseñar un ensayo que permita evaluar la reactividad de los antígenos clonados con un gran número de sueros y con sensibilidad para detectar diferencias de intensidad de reacción.
2. Utilizar sueros de pacientes clínicamente bien caracterizados.

Se estudió de la reactividad de los 7 clones con sueros de pacientes del Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía, clínicamente caracterizados y clasificados en dos grupos (ver 2.2.1):

ECCh: Individuos jóvenes (21 a 37 años) con enfermedad cardíaca de Chagas crónica.

ITsC: Individuos infectados por *T. cruzi* sin evidencias clínicas de compromiso cardíaco.

Como grupos controles se utilizaron Individuos infectados por *Leishmania brasiliensis brasiliensis*(IL), Individuos con Cardiopatía Idiopática Congestiva (CIC) e individuos sanos (NI) (ver 2.2.1)

3.3.1. Optimización del ensayo.

Se ensayó la reactividad de los clones en forma análoga al rastreo inmunológico: Sobre un césped de *E. coli* RY 1090 se sembraron gotas de cada stock de fagos recombinantes (10^8 u.f.p.). Una vez obtenidas las placas de lisis, se procedió como se explica en (2.2.3) En la figura 14 A no se puede apreciar que clones reaccionan con el suero del grupo ECCh y no con un suero ITsC. El resultado obtenido con esta técnica es confuso y no permite hacer comparaciones de intensidad. Para poder comparar intensidades se buscaron condiciones alternativas. En la figura 14 B se obtuvieron manchas circulares nítidas, que a diferencia de los anillos de la figura 14 A, permitieron establecer una mejor comparación de intensidades, se pudo comprobar que el clon JL5 reacciona con el suero ECCh y débilmente con el ITsC. En las condiciones de la figura 14 A las proteínas de fusión son sólo las producidas por las bacterias del borde de la placa de lisis. En las condiciones descritas para la experiencia de la figura 14 B, toda la proteína de fusión sintetizada durante la formación de la placa de lisis es transferida al filtro de nitrocelulosa.

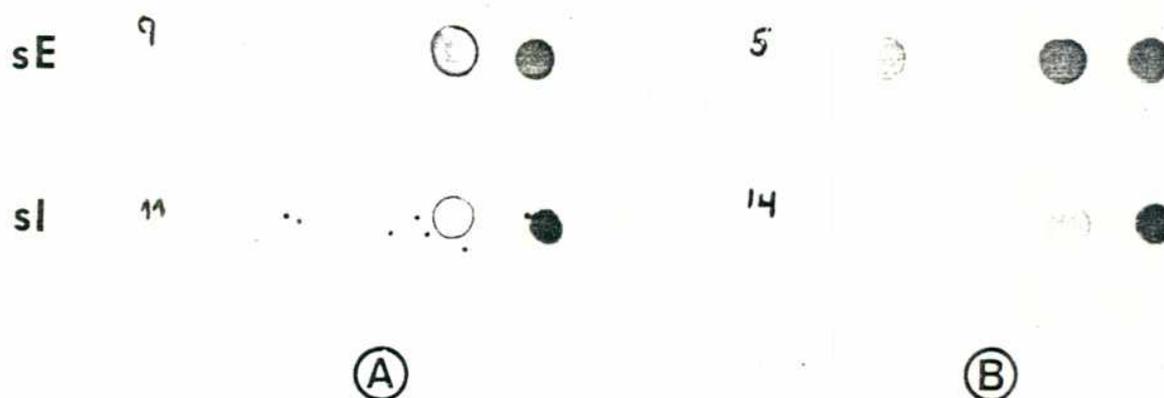


Figura 14:

Reactividad de las proteínas de fusión producidas por los fagos recombinantes: (A): Se sembraron de fagos sobre el césped de *E. coli* 1090. Una vez formadas las placas de lisis, estas fueron recubiertas con un filtro de nitrocelulosa impregnado con IPTG.

(B): Se sembraron fagos sobre un césped de *E. coli* 1090 y se incubó 20 min a 42°C (tiempo suficiente para que los fagos se adsorban e infecten las bacterias). A continuación se recubrió con el filtro de nitrocelulosa impregnado en IPTG 10mM y se incubó a 37°C hasta formación de la placa de lisis.

Los filtros obtenidos según A y B fueron incubados con suero sI (suero ECChc), sII (suero ITsC). Las IgG fueron reveladas con el sistema Vectastain. Orden de siembra JL5, JL1, JL7, 1µg de homogenato de *T. cruzi*

1. Temperatura óptima: En la experiencia de la figura 14 B, desde que se colocó el filtro con IPTG hasta la lisis transcurrieron 4 horas a 37°C. El mismo proceso a 42°C, temperatura de máxima inactivación del represor termosensible cI857, produjo la lisis en menos de 2 horas, pero la señal fue menos intensa. A 39°C se

obtuvo un resultado comparable al de 37°C y el tiempo de incubación se redujo a 2 horas y media.

2. Concentración de IPTG: El IPTG es un insumo caro por lo que se trató de reducir al máximo su utilización. Ensayando con concentraciones de IPTG cada vez menores se llegó a un resultado sorprendente: El resultado del ensayo no dependía del IPTG.

En ausencia de IPTG la transcripción del operón lactosa estaría reprimida por el producto del gen represor I_q contenido en el plásmido pMC9 (pBR322-lacI_q) (ver 1.5.2). Este plásmido lleva la resistencia a ampicilina. Como el ensayo se realiza en presencia de 100 µg/ml de ampicilina se seleccionan las bacterias que llevan el plásmido. Se verificó que la bacteria no perdió o modificó el gen I_q comparando la cepa utilizada (Promega Biotec) con otros stocks y cepas de otras fuentes comerciales (Amersham, Biolabs). Con todos los stocks de RY 1090 se obtuvo el mismo resultado.

Descartada la hipótesis de la pérdida del gen I_q se postuló que la cantidad de ADN de fago sintetizada por la bacteria termoinducida fuese tal que titulase al represor I_q presente cuya síntesis no es modulada por la temperatura. Para analizar esta posibilidad se utilizó la bacteria *E. coli* RY 1089 lisogénica para λgt11 no recombinante (WT). Se midió actividad enzimática de β-galactosidasa durante la incubación a 32°C y luego de la termoinducción a 44°C. Esto se realizó en presencia y en ausencia de IPTG. El resultado obtenido fue el esperado para un sistema dependiente de

IPTG; no se obtuvo inducción de β -galactosidasa en ausencia de IPTG, indicando que en este sistema la termoinducción por sí sola no es suficiente para desreprimir al operón lac.

Es posible que para este ensayo, debido al alto título de fagos utilizado, estos podrían superinfectar las bacterias del césped determinando su independencia del IPTG probablemente por titulación del represor I_q. Este efecto repetidamente comprobado constituye una ventaja del ensayo descrito.

3.3.2. Validez del ensayo como método para el dosaje de IgGs específicas de cada antígeno recombinante.

Para demostrar la validez del ensayo se debe probar que la reactividad de los sueros hacia los distintos recombinantes es representativa del título de anticuerpos contra estos determinantes antigénicos. Esto significa probar que: a) la reactividad que se observa en el inmunoensayo se debe a la reacción de las proteínas de fusión con los anticuerpos del suero. b) que las diferencias de intensidad no se deben a diferencias en la cantidad de proteína de fusión producida por los distintos fagos. Esto equivale a probar que el antígeno (las proteínas recombinantes) se encuentran siempre en exceso respecto de cualquier IgG específica. Estas dos condiciones se pueden evaluar comparando el inmunoensayo propuesto con un *western blot* de proteína de fusión producida por bacterias lisogénicas. Se pudo comprobar que la reactividad de los sueros está dirigida exclusivamente hacia las proteínas de fusión (ver 3.2.1.). Además en cada calle del *western blot* se corrieron 100 μ g de proteína total de lisado conteniendo entre 3 y 5 μ g de proteína de fusión, cantidad que está en exceso respecto a cualquier IgG específica del suero.

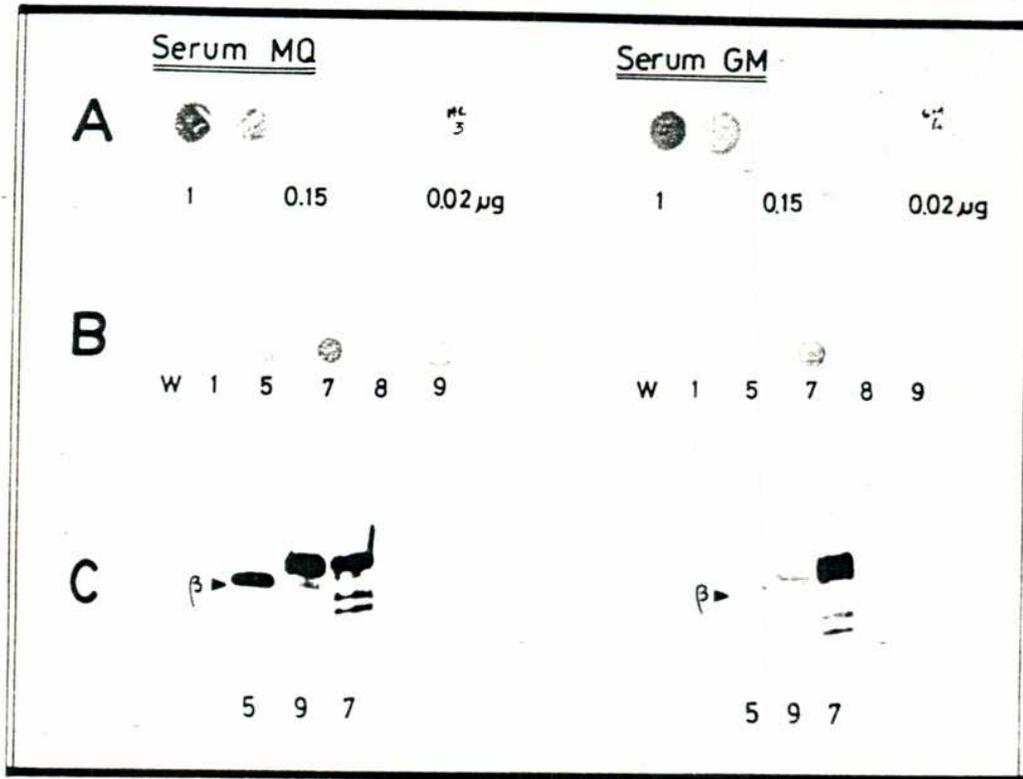


Figura 15:

Reactividad de extractos de *T. cruzi*, fagos recombinantes y proteínas de fusión con sueros de pacientes chagásicos. MQ es un suero de paciente con cardiopatía chagásica, GM es un suero de un infectado con *T. cruzi* sin evidencias clínicas de daño cardíaco; todos los sueros fueron diluidos 1:1000. A) *Dot blot* de extractos de epimastigote conteniendo cantidades decrecientes de proteína del parásito (1-0,02 µg) B) Proteínas de producidas en playas de lisis de fagos recombinantes y transferidas a nitrocelulosa: W fago λ gt11 no recombinante, 1, 5, 7, 8 y 9 son los fagos JL1, JL5, JL7, JL8 y JL9 respectivamente C) *western blot* lisado de bacterias *E. coli* RY1089 lisogénica para los fagos recombinantes 5, 9, 7, bacterias lisogénicas para JL5, JL9 o JL7 respectivamente.

Como puede observarse en la Figura 15 la inmunorreactividad de los clones en el inmunoensayo con fagos es equivalente a la observada con las distintas proteínas de fusión en el *western blot*.

Esto prueba que la reactividad de los sueros hacia un antígeno recombinante representa aproximadamente el título de IgG anti-proteína de fusión. Este hecho quedó demostrado al poder cuantificarse por ELISA los títulos de anticuerpos específicos. (ver 3.3.4.)

3.3.3. Resultados del rastreo serológico diferencial.

En la Tabla VI se resumen los resultados de la inmunoreactividad de todos los sueros utilizados, y la Figura 16 muestra un ejemplo de la reactividad de sueros ECCh e ITsC con los clones JL1, JL5 y JL7 determinada con el inmunoensayo. En la Fig. 16 puede observarse que el suero JL, el suero de referencia utilizado en los rastreos, reacciona con todos los fagos recombinantes. También se observa que el clon JL5 reacciona fuertemente con los sueros ECCh y muy débilmente con los sueros de ITsC. El clon JL1 reacciona fuertemente sólo con el suero JL ; en cambio el clon JL7 reacciona fuertemente con todos los sueros de infectados con *T. cruzi* sean o no enfermos cardíacos. En la Tabla VI se expresan los resultados semicuantitativos de la reactividad de los clones. De su análisis se desprende que:

1. Ningún antígeno recombinante reacciona con los sueros de los grupos controles
2. JL5 y JL52: Los sueros de todos los pacientes ECCh presentan una fuerte reactividad (+++ o ++) contra estos clones mientras que los sueros de ITsC no reaccionan o lo hacen muy levemente; indicando que existe una correlación significativa ($P < 0.005$) entre fuerte reactividad contra JL5 o JL52 y la enfermedad cardíaca de Chagas.

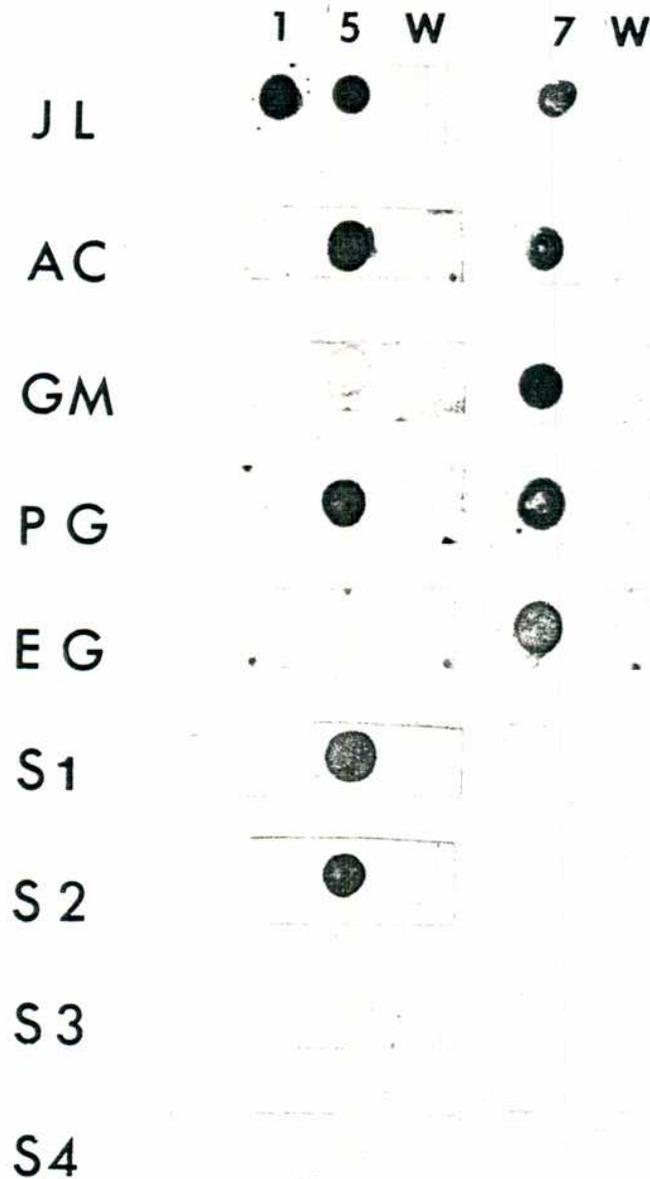


Figura 16:

Rastreo serológico diferencial de los clones recombinantes: Las proteínas producidas por las playas de lisis de los fagos fueron transferidas a nitrocelulosa y probadas con diferentes sueros. Los sueros JL, AC y PG son de pacientes con cardiopatía chagásica crónica, los GM y EG son de infectados con *T. cruzi* sin evidencias de daño cardíaco S1 a S4 son sueros de LES, S1 y S2 son anti-P seropositivos. Todos estos sueros salvo EG fueron diluidos 1:1000, salvo EG que fue diluido 1:750. W fago λ gt11 no recombinante, 1, 5 y 7 son los fagos JL1, JL5 y JL7

TABLA VI Inmunoreacción diferencial de los antígenos recombinantes codificados por JL1, JL5, JL7, JL8, y JL9.

CLON	ECCHc (n=19)	ITsC (n=8)	N (n=15)	ILb (n=7)	CIC (n=7)
JL1	2:+++ 5:+ 12:-	2:+ 6:-	15:-	7:-	7:-
JL43:	8:+++ 2:++ 2:+ 7:-	8:	15:-	7:-	7:-
JL5	14:+++ 5:++	1:++ 2:+ 5:-	15:	7:	7:
JL52	10:+++ 9:++	4:++ 4:-	15:-	7:	7:-
JL7	18:+++ 1:++	8:+++	15:	7:-	7:-
JL8	5:+++ 8:++ 6:-	4:+++ 2:++ 2:-	10:-		7:
JL9	6:+++ 2:++ 6:+ 5:-	8:	15:-	7:-	7:-
λ gt11	19:-	8:-	15:-	7:-	7:-

Leyenda de la Tabla VI.

Las condiciones se describen en la sección Materiales y Métodos. Los símbolos más y menos indican la intensidad de la inmunoreacción: +++, ++, +, y -, reacciones fuerte, media, débil y negativa, respectivamente (ver 2.3.2.). El número de muestras de suero utilizado está indicado para cada uno de los Grupos.

*ECCh: Individuos con Enfermedad cardíaca de Chagas crónica; ITsC: individuos infectados crónicos sin evidencias clínicas de daño cardíaco; NI: individuos normales; CIC: pacientes con cardiopatía idiopática congestiva; y ILb: individuos infectados por *Leishmania sp.*

3. JL9, JL1 y JL43: Nueve de 15 sueros ECCh reaccionaron fuertemente con JL9; 8 de 15 lo hicieron con JL43 y solo 3 de 15 con JL1. Ningún suero de ITsC reaccionó con estos clones. Si bien sólo los sueros ECCh reaccionan con estos clones, la correlación entre reactividad y ECCh no alcanza significación estadística.
4. JL7 y JL8: Todos los sueros chagásicos (ECCh + ITsC) reaccionaron fuertemente con JL7 y aproximadamente la mitad lo hizo con JL8. Dado que los sueros de ILb (Leishmaniasis) no reaccionan con estos clones, la reactividad anti-JL7 parece ser específica de la infección por *T. cruzi*.

3.3.4. Determinación cuantitativa de los títulos de anticuerpos hacia las proteínas de fusión por ELISA

Los resultados de la sección anterior sugieren que alguno de los antígenos clonados como JL5 y JL9 podrían proporcionar información acerca del estado clínico de individuos infectados por *T. cruzi*. Sin embargo el inmunoensayo desarrollado presenta limitaciones metodológicas en vista de posibles aplicaciones clínicas: 1) El método es semicuantitativo; para poder demostrar diferencias entre las reactividades inmunológicas de uno y otro grupo de pacientes, estas deben ser cuantificadas. 2) El ensayo con fagos recombinantes requiere para su realización capacitación técnica que no es común en los laboratorios de serología de rutina.

Para resolver estos inconvenientes, se trató de reproducir las condiciones del inmunoensayo de placas de lisis en un sistema de ELISA sin tener que purificar las proteínas recombinantes. Se pensó en obtener las proteínas de fusión producidas en las placas de lisis y utilizarlas como sustrato del ELISA. Para verificar la integridad de estas proteínas recombinantes y la especificidad de

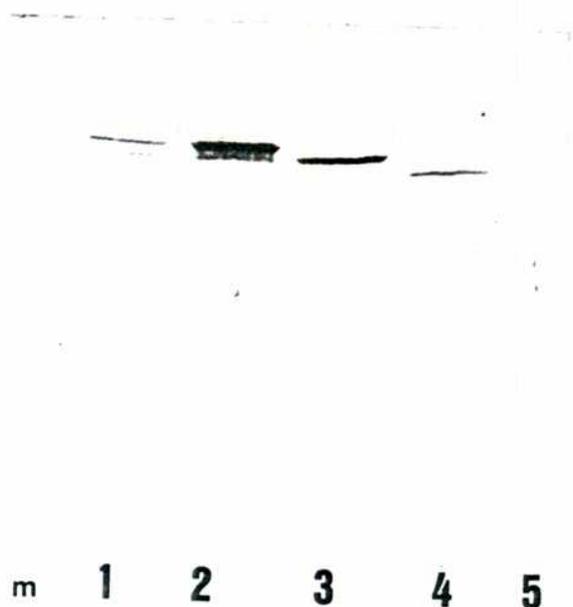


Figura 17:

Western blot de extractos crudos obtenidos a partir de placas de lisis de fagos recombinantes: Los extractos fueron separados electroforéticamente en geles de gradiente 7.5%-15% PAGE-SDS y electrotransferidos a nitrocelulosa. La nitrocelulosa fue incubada con una dilución 1:1000 del suero MS (Enfermedad cardíaca de Chagas) con el agregado de 10% de lisado de *E. coli* RY 1089-Lys. Las IgGs unidas fueron detectadas con el sistema biotina-avidina-peroxidase system: m: β -galactosidasa preteñida con azul de Coomassie (116 KD), calles 1, 2, 3, 4 extractos crudos obtenidos de los fagos recombinantes JL9, JL7, JL8 and JL5 respectivamente; calle 5: extracto obtenido de λ gt11 no-recombinante.

Resultados

la reacción inmunológica, extractos crudos obtenidos de placas de lisis fueron separados electroforéticamente y transferidos a nitrocelulosa; e incubadas con el suero MS (ECCh) Figura 17. Para evitar la reacción de los anticuerpos del suero con antígenos bacterianos y de λ gt11 se le agregó a la mezcla de incubación lisado de *E. coli* RY 1089 lisogénica. En la figura 17 se ve que las proteínas de fusión de las placas de lisis no están degradadas; además, estas proteínas de fusión fueron específicamente reconocidas por los anticuerpos del suero. Se comprobó así que la incubación en presencia de lisado bacteriano resulta eficaz para anular el ruido de fondo. Para adaptar el inmunoensayo de fagos a la metodología de ELISA, se adsorben a las paredes de placas de polipropileno los extractos crudos obtenidos de las placas de lisis. Las placas así sensibilizadas se incubaron con los distintos sueros en presencia de 10% v/v de lisado. Luego de lavar el exceso, las IgGs específicamente unidas a los antígenos recombinantes fueron detectadas anti-IgG conjugado a peroxidasa. La diferencia fundamental con el ensayo anterior estriba en que la reacción con un sustrato de la peroxidasa rinde un producto coloreado que puede dosarse.

Se compararon los títulos de anticuerpos circulantes anti-proteínas de fusión de ECCh (N=15) con el de ITsC (N=8). Se utilizaron los mismos grupos de sueros controles que en el caso anterior. La Figura 18 y la Tabla VII muestra que los títulos anti-JL5 y anti-JL9 son significativamente mayores para los sueros de ECCh comparados con los ITsC ($P < 0.005$). Se consideró un suero como fuertemente reactivo hacia un antígeno determinado cuando la D.O. 490 nm del ELISA excedió en por lo menos 10 veces la D.O. 490 nm promedio obtenida con los sueros normales. Así, para cada recombinante se tiene que (Figura 18): catorce de los quince sueros de ECCh reaccionaron fuertemente con JL5 mientras que solo uno de 8 ITsC lo hizo indicando una correlación significativa entre altos

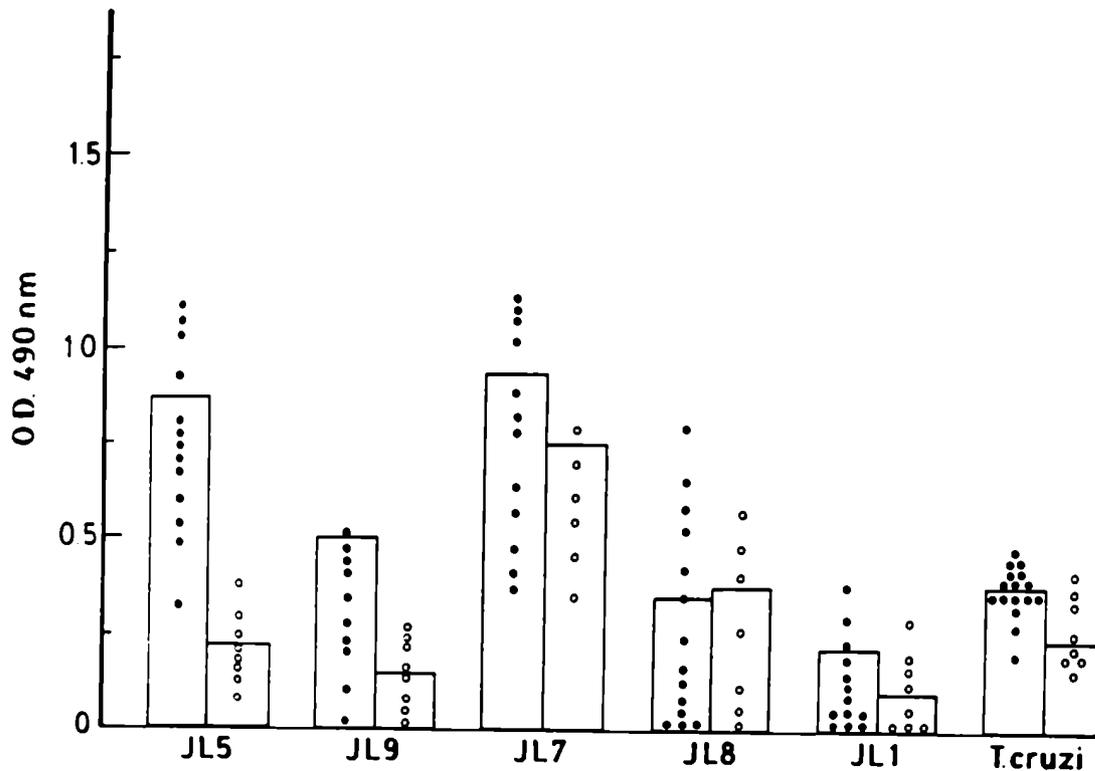


Figura 18:

Reactividad de los anticuerpos medida por ELISA hacia las proteínas de fusión β -galobtenidas de las playas de lisis de fagos recombinantes λ gt11. (●) Suero de pacientes con Enfermedad cardíaca de Chagas crónica (N=15); (○) Suero de infectados con *T. cruzi* sin evidencias clínicas de compromiso cardíaco. Los sueros fueron diluidos 1:1000 con un 10% de lisado de *E. coli* RY 1089-Lys. La D.O. 490 nm representa la D.O luego de la sustracción de la reactividad con β -gal obtenida de placas de lisis de λ gt11 no recombinante. Las barras representan valores promedio.

TABLA VII. Niveles de anticuerpos hacia los antígenos recombinantes y hacia homogenato total de *T. cruzi* en suero de pacientes chagásicos y grupos controles.

A490 1

Grupos de	JL5	JL9	JL7	JL8	JL1	<i>T. cruzi</i>
ECCh ² (15)	860 ± 339	489 ± 285	965 ± 497	332 ± 302	254 ± 200	354 ± 50
ITsC ³ (8)	220 ± 103	145 ± 96	767 ± 394	342 ± 309	120 ± 95	254 ± 83
CIdC ⁴ (7)	38 ± 25	17 ± 12	27 ± 16	18 ± 15	25 ± 17	28 ± 13
ILb ⁵ (7)	42 ± 13	34 ± 20	43 ± 22	35 ± 14	34 ± 10	85 ± 35
NI ⁶ (23)	33 ± 11	29 ± 9	35 ± 13	36 ± 8	24 ± 10	22 ± 12

1 A490 x 10³ luego de la sustracción de la reactividad con extracto de Agt11 no-recombinante, media ± desviación estándar. 2 ECChc, Enfermedad cardíaca de Chagas Crónica 3 ITsC, Infectados con *T. cruzi* sin evidencias clínicas de compromiso cardíaco 4 CIdC, cardiopatía idiópática congestiva 5 ILb, Infectados con *Leishmania brasiliensis* 6 NI, individuos normales no infectados.

titulos anti-JL5 y la ECCh. Nueve de 15 sueros de ECCh y 1 de 8 sueros ITsC reaccionaron fuertemente con JL9. Sin embargo, el nivel de correlación entre altos titulos anti-JL9 y la cardiopatía no alcanzó significación estadística. Lo mismo ocurrió con JL1 que reaccionó con solo 3 de 15 sueros ECCh. Por otra parte los sueros de ECCh y los de ITsC mostraron un nivel similar de reactividad con JL7 y JL8. Todos los sueros de individuos infectados con *T. cruzi* (ECCh+ITsC) reaccionaron con JL7 y aproximadamente la mitad de ECCh y de ITsC lo hicieron con JL8. Ningun suero de los grupos controles reaccionó con los antígenos recombinantes. Tanto los sueros ECCh como los ITsC presentaron r alta reactividad con extractos de *T. cruzi*. Además, debido probablemente a reactividad cruzada entre antígenos comunes a los Tripanosomátidos, pudo observarse un cierto nivel de reactividad anti-*T. cruzi* en los sueros de individuos con Leishmaniasis (ILbb) (Tabla VII).

3.3.5. Comparación de la reactividad de los sueros con los antígenos clonados y los hallazgos clínicos en pacientes chagásicos.

En la Tabla VIII se muestran los hallazgos clínicos cardiológicos y los títulos de anticuerpos hacia las proteínas recombinantes obtenidos por ELISA de cinco pacientes ECCh y cuatro ITsC. Se observa que la fuerte reactividad con JL5 y JL9 se correlaciona con los hallazgos clínicos característicos de la enfermedad cardíaca de Chagas. Una fuerte reactividad hacia JL7 y JL8 fue observada en todos los infectados con *T. cruzi* tuvieran o no síntomas de ECCh. Por lo tanto, el perfil de reactividad hacia el panel de antígenos clonados podría proveer información tanto acerca de la infección con *T. cruzi* como del estado clínico del paciente.

Resultados

TABLA VIII. Hallazgos clínicos y título de anticuerpos hacia los antígenos recombinantes de *T. cruzi* en pacientes chagásicos con y sin cardiopatía.

Paciente	Edad	Sexo	CF	Hallazgos clínicos					A ₄₉₀ ⁷				
				ECG ²	M-BE ³	ICT ⁴	FE ⁵	TA ⁶	JL5	JL9	JL7	JL8	JL1
ECCh⁸													
JL	28	M	IV	BCRD + HBA 3V.	ND	0.62	0.19	ND	<u>1450</u>	<u>950</u>	<u>1650</u>	<u>350</u>	<u>375</u>
EW	30	M	III	BCRD + HBA EV, AP	ND	0.56	0.27	ND	<u>795</u>	276	<u>1094</u>	<u>586</u>	100
EX	23	M	I	BCRD + HBAI	ND	0.47	ND	ND	<u>1077</u>	<u>782</u>	<u>1275</u>	157	<u>575</u>
EF				BAVC + EV	ND	0.50	0.50	ND	<u>967</u>	<u>687</u>	<u>1077</u>	<u>422</u>	60
EZ	28	M	I	BCRI + EV 2JAVB	ND	0.45	0.48	ND	<u>625</u>	<u>390</u>	<u>1129</u>	<u>523</u>	
ITsC⁹													
IW	41	M		Normal	Normal	0.47	ND	(-)	265	206	<u>1090</u>	<u>566</u>	102
IX	55	F	I	Normal	Normal	0.45	ND	(-)	128	158	<u>695</u>	<u>492</u>	25
IY	37	M		Normal	Normal	0.47	ND	(-)	167	15	<u>792</u>	45	60
IZ	30	M	I	Normal	Normal	0.48	ND	(-)	209	77	<u>612</u>	42	15

¹ FC. Clase funcional (NYHA), ² BCRD, bloqueo completo de rama derecha; HBA, Hemibloqueo anterior; EV, Extrasístoles ventriculares AP, alteraciones en la repolarización; BAVC, bloqueo aurículo ventricular completo; 2JAVB, Bloqueo aurículo ventricular de segundo grado ³ M-BE, Ecocardiograma en modo M y B. ⁴ ICT, Índice cardio torácico. ⁵ Fracción de eyección del ventrículo izquierdo en reposo medida con Tc ^{99m}. ⁶ TA, Test de Ajmalina. ⁷ A₄₉₀ x 10³ luego de la sustracción de la reactividad hacia Agt11 no recombinante. Los valores de A₄₉₀ subrayados son para cada antígeno recombinante, aquellos que superan 10 veces el valor de la A₄₉₀ obtenida con sueros normales (Tabla V). ⁸ ECCh, Enfermedad cardíaca de Chagas. ⁹ ITsC, infectados con *T. cruzi* sin evidencias clínicas de compromiso cardíaco.

3.3.6. Capacidad diagnóstica del ensayo.

Para realizar una evaluación de la capacidad diagnóstica del ELISA se realizó una experiencia de doble ciego con suero de 23 individuos de los cuales 5 eran sueros controles, y 18 sueros de pacientes chagásicos. Para clasificar los sueros en chagásicos y no-chagásicos se utilizó el criterio de reactividad hacia los antígenos recombinantes JL7 y JL8: Diecisiete de los 23 sueros reaccionaron fuertemente con JL7 y resultaron ser de individuos chagásicos. Seis sueros de los 23 no reaccionaron con JL7, de estos, cinco eran de individuos controles y el restante resultó ser chagásico. La reactividad hacia JL8 fue detectada en 9 de los 23 sueros, los 9 correspondían a individuos chagásicos. Por lo tanto 22 de los 23 sueros (96%) pudieron ser clasificados siguiendo el criterio de reactividad anti-JL7 y -JL8. El único suero que no pudo ser clasificado fue el de un infectado con *T. cruzi* con bajo nivel de reactividad con anti-*T. cruzi*. Para clasificar los 18 individuos chagásicos en los grupos ECCh o ITsC se recurrió al criterio que correlaciona fuerte reactividad anti-JL5 y -JL9 con el daño cardíaco en individuos infectados por *T. cruzi*. Once de los 18 sueros reaccionaron fuertemente con JL5, de los cuales, diez correspondían a pacientes con ECCh y sólo uno con alto título anti-JL5 correspondía a un ITsC. Siete de 18 sueros mostraron baja reactividad con JL5; de estos, cinco eran del grupo de ITsC y sólo 2 correspondían a pacientes ECCh. En el caso de JL9, 8 de los 18 sueros reaccionaron fuertemente y todos correspondieron a pacientes ECCh. En suma, 15 de 18 sueros chagásicos presentaron títulos anti-JL5 y JL9 que permitieron una clasificación de los dadores de acuerdo a su estado clínico.

3.3.8. Comparación del método de ELISA y el inmunoensayo de fagos.

Comparando los datos de la figura 16 con los de la tabla VIII se ve que la reactividad observada en el inmunoensayo de placas de fagos se correlaciona con el título medido por ELISA. Los sueros JL, AC y PG que reaccionan fuertemente con el clon JL5 (fig 16) presentan altos títulos en el ELISA con JL5, y los sueros GM y EG que reaccionan muy débilmente con JL5 presentan títulos bajos en ELISA. Para el clon JL7 se observa que todos los sueros chagásicos reaccionan fuertemente en el inmunoensayo de fagos y presentan altos títulos medidos por ELISA. Esta tendencia pudo verificarse en la mayoría de sueros analizados. De esta forma quedaría demostrado que, en el inmunoensayo de fagos, la reactividad de los sueros hacia un antígeno recombinante es representativa del título de IgG anti-proteína de fusión.

3.4. CARACTERIZACION GENETICA DE LOS CLONES

La caracterización genética de los determinantes antigénicos clonados se realizó siguiendo las siguientes etapas:

- I. Caracterización de los ARN mensajeros que codifican los epitopes clonados por la técnica de *Northern Blot*
- II. Estudio de la organización genética por *Southern Blot*.
- III. Secuenciación de los ADNc clonados.
- IV. Deducción de la secuencia aminoacídica a partir de la secuencia nucleotídica y comparación con las secuencias presentes en bancos de datos de proteínas.

El primer paso para llevar a cabo este trabajo fue obtener los insertos de ADNc a partir de los ADN de los fagos recombinantes por digestión con EcoRI. Los insertos se subclonaron en el vector M13mp18. Los subclones en M13 se utilizaron para la obtención de sondas monocatenarias para la hibridación de los *Northern* y *Southern blot*, y para secuenciar los ADNc por el método de los dideoxinucleótidos.

3.4.1. Determinación del tamaño de los insertos

El ADN de los fagos recombinantes se preparó en gran escala, se digirió con EcoRI y se marco con ATP-P³² por acción de la ADN polimerasa Klenow. La comparación de la movilidad electroforética de los insertos con marcadores de peso molecular permitió evaluar su tamaño, el que fue en todos los casos confirmado por secuenciación (ver 3.4.4.). El tamaño del ADNc del clon JL52, que per

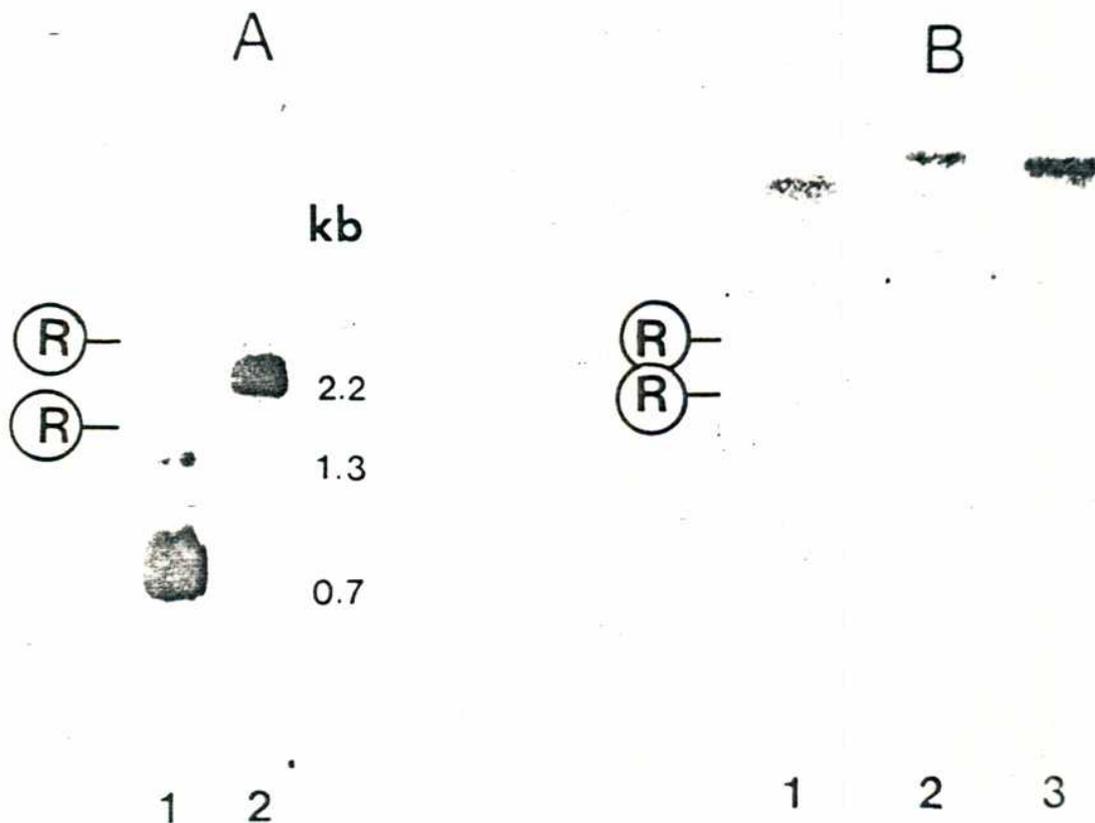


Figura 19:

Northern blot de ARN total de *T. cruzi*: El ARN total de epimastigotes se corrió en geles de 1,5% de agarosa/formaldehído y se transfirió a Gene Screen Plus, y se hibridizó con las siguientes sondas derivadas de los subclones en M13mp18.

(A) calle 1: JL5, calle 2: JL4

(B): calle 1: JL53, calle 2: JL7 y calle 3: JL9.

dió uno de los sitios EcoRI durante su clonado fue deducido del tamaño del fragmento KpnI-SacI (Huynh *et al.*, 1985) de JL52, tras su comparación con el del fago λ gt11 no recombinante.

3.4.2. Caracterización de los ARN mensajeros que codifican para los antígenos clonados El ARN total de *T. cruzi* fue obtenido por la técnica del Cloruro de Guanidinio, y corrido en geles de formaldehído y transferido a membranas de nylon. Los *northern blot* fueron hibridizados con las sondas radiactivas monocatenarias.

El análisis de *Northern blot* (Figura 19) indica que los ARN mensajeros que codifican para la proteína de 25 kd (JL1) tienen un tamaño de 2,2 kb, mientras que los que hibridan con la sonda JL5 muestran una banda ancha de 0,7 kb y otra de 1,3 kb.

El ARN mensajero detectado por el inserto JL7 posee un tamaño de aproximadamente 8,5 kb, el detectado por el inserto JL9 8 kb y

finalmente el inserto de JL8 detectaría dos mensajeros distintos uno de 6,5 kb y otro de 7.5 kb.

3.4.3. Southern blots

Sondas semejantes a las utilizadas en los *Northern blots* fueron utilizadas para hibridizar *Southern Blots* de ADN de *T. cruzi* digerido con distintas enzimas de restricción. En la figura 20 se muestran los resultados para los clones JL1, JL5, JL8, JL7, y JL9.

Las sondas JL1, JL7, JL8 y JL9, en el caso de ADN genómico cortado con enzimas que no poseen sitios dentro del ADNc clonado

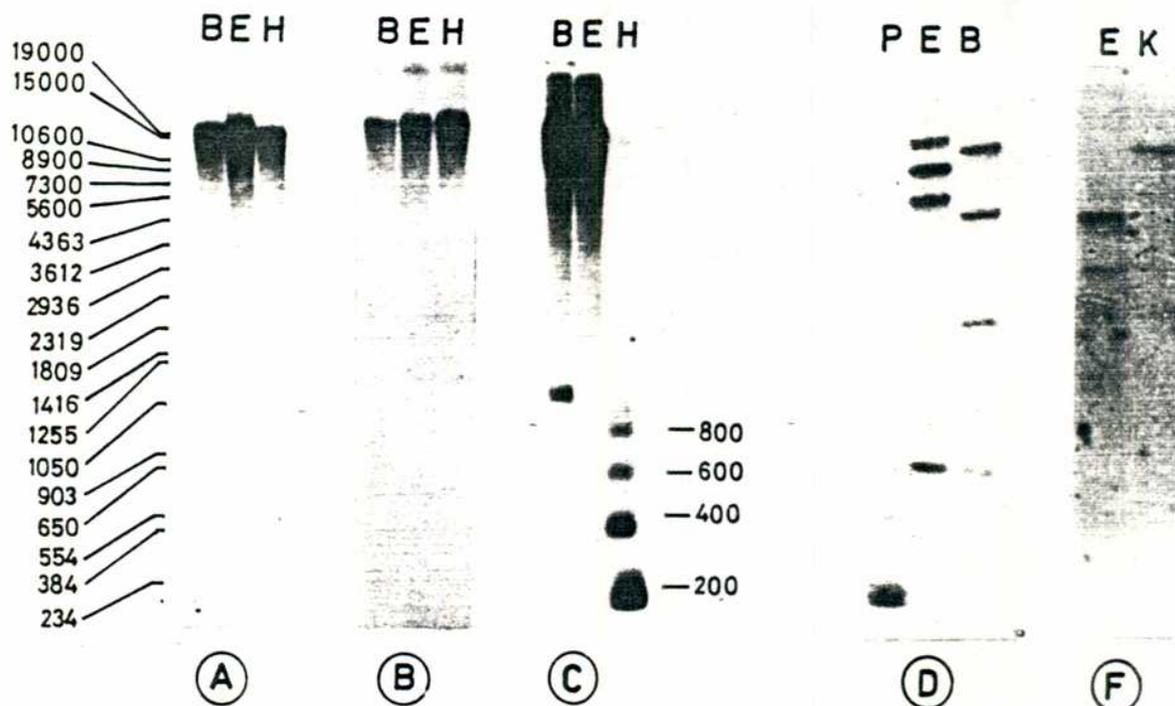


Figura 20:

Southern blot de ADN genómico de *T. cruzi*: El ADN se digirió con las siguientes enzimas de restricción E=EcoRI, P=PstI, H=Hind III, B=BamHI, K=KpnI, se corrió en un gel 1% agarosa, se transfirió a una membrana de nylon. Se hibridizó con las sondas de los clones (A), JL8; (B) JL9; (C) JL7; (D) JL5, (E) JL1 y se autorradiografió con pantalla intensificadora.

reaccionan con una o dos bandas de alto peso molecular indicando que se trataría de genes únicos. En cambio la sonda JL5 hibridiza con cuatro bandas, indicando que el fragmento JL5 se halla representado cuatro veces en el genoma de *T. cruzi* con entornos génicos distintos. Con Pst I, enzima que corta el ADNc de JL5, se obtienen menos bandas de las esperadas indicando que este sitio interno de JL5 podría no estar conservado en todos los genes homólogos (A. Schijman, comunicación personal).

Cuando el ADN genómico de *T. cruzi* parcialmente digerido con Hind III, enzima que posee un sitio de corte dentro del ADNc de JL7. Y se hibridiza con la sonda JL7 se verifica que todas las bandas obtenidas son múltiplos de 200 pb (bandas a 200, 400, 600, 800, 1000 pb). Este tipo de resultado está de acuerdo con la existencia de repeticiones de aproximadamente 200 pb, en el gen JL7.

3.4.4. Secuenciación de los ADNc clonados y comparación de secuencias

Los insertos subclonados en M13 mp18 fueron secuenciados por la técnica de Sanger. Los ADNc de JL7 y JL9 se secuenciaron utilizando geles de tres depósitos, y las ambigüedades fueron resueltas secuenciando con dITP. Las secuencias se muestran en la Figura 21. Todas presentan marcos abiertos de lectura que continúan el de la β -galactosidasa (ver páginas siguientes). El tamaño de los marcos de lectura, alguno de los cuales continúan en el extremo 5' del gen β -gal de λ gt11, se correlaciona en todos los casos con el tamaño de la proteína de fusión (Tabla IX).

La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de los ADNc también se muestra en la Figura 21. JL1 presenta una secuencia rica en lisinas que no tiene homologías con otras proteínas conocidas.

TABLA IX: Tamaño de los ADNc clonados, marcos abiertos de lectura y peso molecular de los polipéptidos expresados como proteínas de fusión.

CLON	ADNc (pb)	M.L.A.*	PM PF. β -gal *	
			Teórico [©]	Experimental
JL1	162	162(- β)	122 KD	123 KD
JL5	198	105(nc)	118 KD	119 KD
JL7	744	744(nc)	141 KD	140 KD
JL8	351	351(nc)	127 KD	130 KD
JL9	663	663(nc)	138 KD	138 KD

MLA: Tamaño del marco de lectura abierto del inserto que continúa al de la β -gal. (- β) indica que el marco de lectura del ADNc es continuado por el de la β -galactosidasa, es decir que el extremo C-terminal de estas proteínas de fusión corresponde al de la β -gal; (nc) significa que el marco de lectura abierto no se continúa con el de la β -gal, el extremo C-terminal corresponde al extremo C-terminal del péptido codificado por el ADNc (JL5), o a otro marco de lectura dentro del extremo 3' del gen lacZ. * Peso molecular de la proteína de fusión β -galactosidasa-péptido codificado por el ADNc. © El peso molecular teórico se calcula considerando que el sitio EcoRI de λ gt11 se encuentra 53 pb antes del codón stop de la β -galactosidasa (Huynh et al., 1985):
 Para marcos de lectura (- β): $114 \text{ KD} + \text{MLA}/3 \times 0.11 \text{ KD} + 2 \text{ KD}$.
 Para marcos de lectura (n.c.): $114 \text{ KD} + \text{MLA}/3 \times 0.11 \text{ KD}$.

Clon JL1

```

          10          20          30          40          50
          *          *          *          *          *
GAA TTC CCT CTT CCC CGC GTC TCA GTG ACG AAG TTG ATG AAG CCC AGC GGG AGC GGG
E   F   P   L   P   R   V   S   V   T   K   L   M   K   P   S   G   S   G

    60          70          80          90          100          110
    *          *          *          *          *          *
AAA CAC GCT CTG TCG TCA TTC TTG TTG AAG GAC AAG AAG AAG GTG GCC ACC GCA AAA
K   H   A   L   S   S   F   L   L   K   D   K   K   K   V   A   T   A   K

    120          130          140          150          160
    *          *          *          *          *
GTT GCT GTG CCG CCG AAA AAG AAG AGG GCT TTA AAG GTG AGG GAA TTC
V   A   V   P   P   K   K   K   R   A   L   K   V   R   E   F

```

Clon JL5

```

          10          20          30          40          50
          *          *          *          *          *
GAA TTC CCC GCT TCT GCA CCC ACT GCC GCT GCC GCC GCC TCT GGT GGT GCC GCC GCG
E   F   P   A   S   A   P   T   A   A   A   A   A   S   G   G   A   A   A

    60          70          80          90          100          110
    *          *          *          *          *          *
CCT GCT GCA GCT GCG GAA GAG GAG GAG GAC GAT GAC ATG GGA TTT GGT CTT TTT GAC
P   A   A   A   A   E   E   E   E   D   D   D   M   G   F   G   L   F   D

    120          130          140          150          160          170
    *          *          *          *          *          *
TAA AGA CAA ATG CTT ATT TTA TTT TAT TTT TGA TTT TGT TTC TGT GTT GTC CAT GAA
  e                e

    180          190          200
    *          *          *
GAG GCG CTA AAA AAA AAA AAA AAA AAA GGA ATT C

```

Clon JL7

```

      10      20      30      40      50
      *      *      *      *      *
GAA TTC CCG CGC AGG AAC GCG AGG GAG ATC GCT GCG CTT GAG GAG AGC ATG AAT GCC
E   F   P   R   R   N   A   R   E   I   A   A   L   E   E   S   M   N   A

      60      70      80      90      100     110
      *      *      *      *      *      *
CGC GCA CAG GAG CTG GCA CGC GAG AAG AAG CTT GCT GAC CGC GAG TTC CTC GAC CAG
R   A   Q   E   L   A   R   E   K   K   L   A   D   R   E   F   L   D   Q

      120     130     140     150     160     170
      *      *      *      *      *      *
AAG CCG GAG GGC GTG CCG CTG CGA GAG CTG CCG CTC GAC GAC GAC AGC GAC TTT GTT
K   P   E   G   V   P   L   R   E   L   P   L   D   D   D   S   D   F   V

      180     190     200     210     220
      *      *      *      *      *
GCG ATG GAG CAG GAG CGC AGG CAA CTG CTC GAG AAG GAC CCG CGC AGG AAC GCG AAG
A   M   E   Q   E   R   R   Q   L   L   E   K   D   P   R   R   N   A   K

      230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *
GAG ATC GCT GCG CTT GAG GAG AGC ATG AAT GCC CGC GCA CAG GAG CTG GCA CGC GAG
E   I   A   A   L   E   E   S   M   N   A   R   A   Q   E   L   A   R   E

      290     300     310     320     330     340
      *      *      *      *      *      *
AAG AAG CTT GCT GAC CGC GCG TTC CTC GAC CAG AAG CCG GAG GGC GTG CCG CTG CGA
K   K   L   A   D   R   A   F   L   D   Q   K   P   E   G   V   P   L   R

      350     360     370     380     390
      *      *      *      *      *
GAG CTG CCG CTC GAC GAC GAC AGC GAC TTT GTT GCG ATG GAG CAG GAG CGC AGG CAA
E   L   P   L   D   D   D   S   D   F   V   A   M   E   Q   E   R   R   Q

      400     410     420     430     440     450
      *      *      *      *      *      *
CTG CTC GAG AAG CAG CCG CGC AGG AAG GCG AAG GAG ATC GCT GCG CTT GAG GAG AGC
L   L   E   K   Q   P   R   R   K   A   K   E   I   A   A   L   E   E   S

      460     470     480     490     500     510
      *      *      *      *      *      *
ATG AAT GCC CGC GCA CAG GAG CTG GCA CGC GAG AAG AAG CTT GCT GAC CGC GCG TTC
M   N   A   R   A   Q   E   L   A   R   E   K   K   L   A   D   R   A   F

```

Resultados

```

      520          530          540          550          560          570
      *          *          *          *          *          *
CTC GAC CAG AAG CCG GAG GGC GTG CCG CTG CGA GAG CTG CCG CTC GAC GAC GAC AGC
 L  D  Q  K  P  E  G  V  P  L  R  E  L  P  L  D  D  D  S

      580          590          600          610          620
      *          *          *          *          *
GAC TTT GTT GCG ATG GAG CAG GAG CGC AGG CAA CTG CTC GAG AAG GAC CCG CGC AGG
 D  F  V  A  M  E  Q  E  R  R  Q  L  L  E  K  D  P  R  R

      630          640          650          660          670          680
      *          *          *          *          *          *
AAC GCG AAG GAG ATC GCT GCG CTT GAG GAG AGC ATG AAT GCC CGC GCA CAG GAG CTG
 N  A  K  E  I  A  A  L  E  E  S  M  N  A  R  A  Q  E  L

      690          700          710          720          730          740
      *          *          *          *          *          *
GCA CGC GAG AAG AAG TTT GCC GAC CGC GCG TTC CTC GAC CAG AAG CCG GAG GGC GTG
 A  R  E  K  K  F  A  D  R  A  F  L  D  Q  K  P  E  G  V

      750
      *
CCG CTG GCA GGG AAT TC
 P  L  A  G  N

```

Clon JL8

```

      10          20          30          40          50
      *          *          *          *          *
GAA TTC CAG GCA GCT GAG GCC ACG AAG GTT GCT GAA GCA GAG AAG CAG AAG GCA GCT
 E  F  Q  A  A  E  A  T  K  V  A  E  A  E  K  Q  K  A  A

      60          70          80          90          100          110
      *          *          *          *          *          *
GAG GCC ACC AAG GCC GTG GAG ACG GAG AAG CGT AAG GCA GCT GAG GCC ACG AAG GTT
 E  A  T  K  A  V  E  T  E  K  R  K  A  A  E  A  T  K  V

      120          130          140          150          160          170
      *          *          *          *          *          *
GCT GAA GCG GAG AAG CAG AGG GCA GCT GAG GCT ACG AAG GTT GCT GAA GCG GAG AAG
 A  E  A  E  K  Q  R  A  A  E  A  T  K  V  A  E  A  E  K

      180          190          200          210          220
      *          *          *          *          *
CAG AGG GCA GCT GAG GCC ACG AAG GTT GCT GAA GCA GAG AAG CAG AGG GCA GCT GAA
 Q  R  A  A  E  A  T  K  V  A  E  A  E  K  Q  R  A  A  E

```

Resultados

```

230          240          250          260          270          280
*          *          *          *          *          *
GCC ACC AAG GCC GTG GAG ACG GAG AAG CGT AAG GCT GCT GAG GCC ACG AAG GTT GCT
A   T   K   A   V   E   T   E   K   R   K   A   A   E   A   T   K   V   A

          290          300          310          320          330          340
*          *          *          *          *          *
GAA GCG GAG AAG CAG AAG GCA GCT GAG GCC GCG AAG GTT GCT GAA GCG GAG AAG CAG
E   A   E   K   Q   K   A   A   E   A   A   K   V   A   E   A   E   K   Q

          350          360
*          *
GTT CAG CGC GTT CAC GGG AAT TC
V   Q   R   V   H   G   N

```

Clon JL9.

```

          10          20          30          40          50
*          *          *          *          *
GAA TTC CCC TTG CCG CAG GAA GAG GAA GAG GAT GTG GGG CCG CGC CAC GTT GAT CCC
E   F   P   L   P   Q   E   E   E   E   D   V   G   P   R   H   V   D   P

          60          70          80          90          100          110
*          *          *          *          *          *
GAC CAC TTC CGC TCG ACG ACT CAG GAC GCG TAC AGG CCC GTT GAT CCC TCG GCG TAC
D   H   F   R   S   T   T   Q   D   A   Y   R   P   V   D   P   S   A   Y

          120          130          140          150          160          170
*          *          *          *          *          *
AAG CGC GCC TTG CCG CAG GAA GAG CAA GAG GAT GTG GGG CCG CGC CAC GTT GAT CCC
K   R   A   L   P   Q   E   E   Q   E   D   V   G   P   R   H   V   D   P

          180          190          200          210          220
*          *          *          *          *
GAC CAC TTC CGC TCG ACG ACT CAG GAC GCG TAC AGG CCC GTT GAT CCC TCG GCG TAC
D   H   F   R   S   T   T   Q   D   A   Y   R   P   V   D   P   S   A   Y

230          240          250          260          270          280
*          *          *          *          *          *
AAG CGC GCC TTG CCG CAG GAA GAG GAA GAG GAT GTG GGG CCG CGC CAC GTT GAT CCC
K   R   A   L   P   Q   E   E   E   E   D   V   G   P   R   H   V   D   P

          290          300          310          320          330          340
*          *          *          *          *          *
GAC CAC TTC CGC TCG ACG ACT CAG GAC GCG TAC AGG CCC GTT GAT CCC TCG GCG TAC
D   H   F   R   S   T   T   Q   D   A   Y   R   P   V   D   P   S   A   Y

```

Resultados.

```

          350          360          370          380          390
          *          *          *          *          *
AAG CGC GCC TTG CCG CAG GAA GAG GAA GAG GAT GTG GGG CCG CGC CAC GTT GAT CCC
K R A L P Q E E E E D V G P R H V D P

400          410          420          430          440          450
*          *          *          *          *          *
GAC CAC TTC CGC TCG ACG ACT CAG GAC GCG TAC AGG CCC GTT GAT CCC TCG GCG TAC
D H F R S T T Q D A Y R P V D P S A Y

          460          470          480          490          500          510
          *          *          *          *          *          *
AAG CGC GCC TTG CCG CAG GAA GAG CAA GAG GAT GTG GGG CCG CGC CAC GTT GAT CCC
K R A L P Q E E Q E D V G P R H V D P

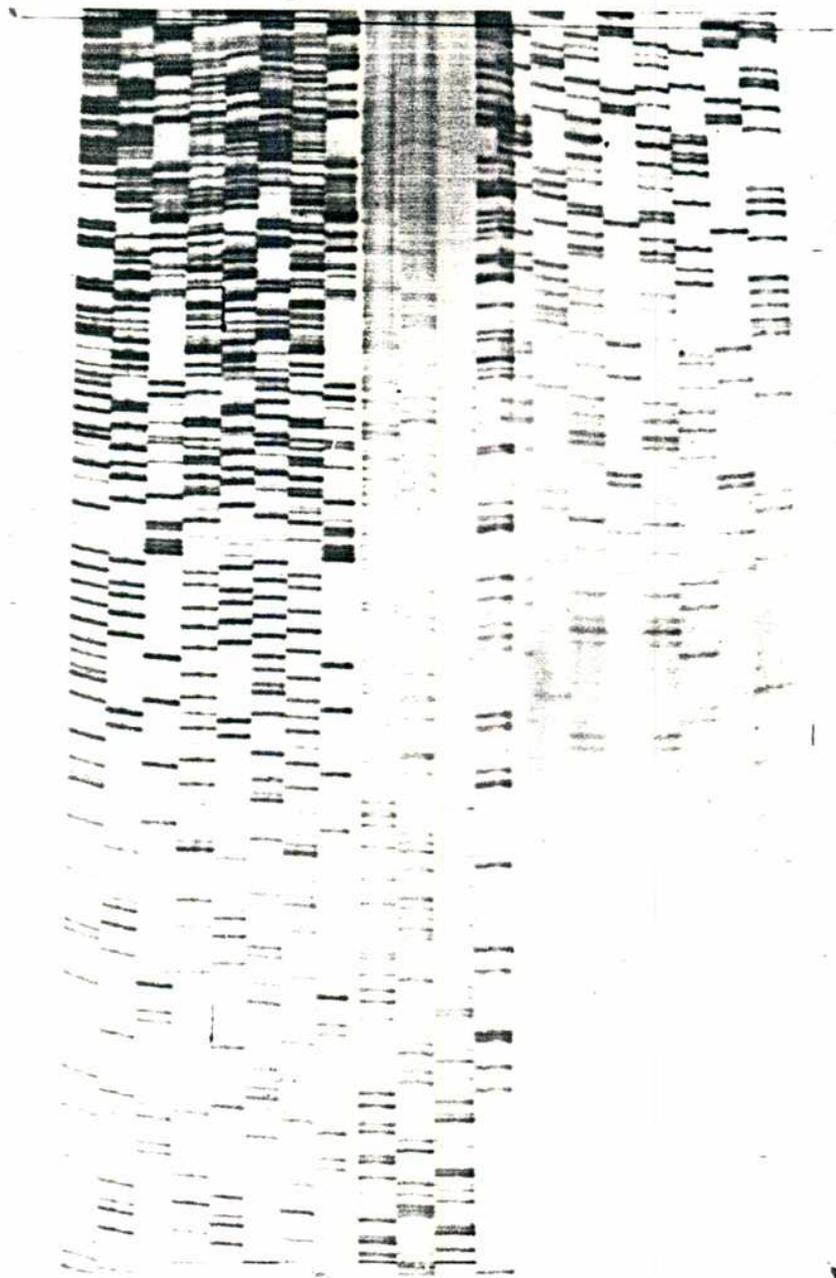
          520          530          540          550          560          570
          *          *          *          *          *          *
GAC CAC TTC CGC TCG ACG ACT CAG GAC GCG TAC AGG CCC GTT GAT CCC TCG GCG TAC
D H F R S T T Q D A Y R P V D P S A Y

          580          590          600          610          620
          *          *          *          *          *
AAG CGC GCC TTC CCG CAG GAA GAG GAA GAG GAT GTG GGG CCG CGC CAC GTT GAT CCC
K R A L P Q E E E E D V G P R H V D P

630          640          650          660          670
*          *          *          *          *
GAC CAC TTC CGC TCG ACG ACT CAG GAC GCG TAC AGG CCC GTT GGG AAT TC
D H F R S T T Q D A Y R P V G N

```

Legenda a la figura 21: Secuencias nucleotídicas y secuencias aminoacídicas codificadas por los ADNc de los clones JL1, JL5, JL7, JL8 y JL9. Las letras en **negrita** indican los nucleótidos pertenecientes al *polylinker* EcoRI. Las secuencias en **negrita** y subrayadas indican para los clones JL7, JL8 y JL9 una unidad repetitiva de aminoácidos. (@) Codones de terminación de la traducción.



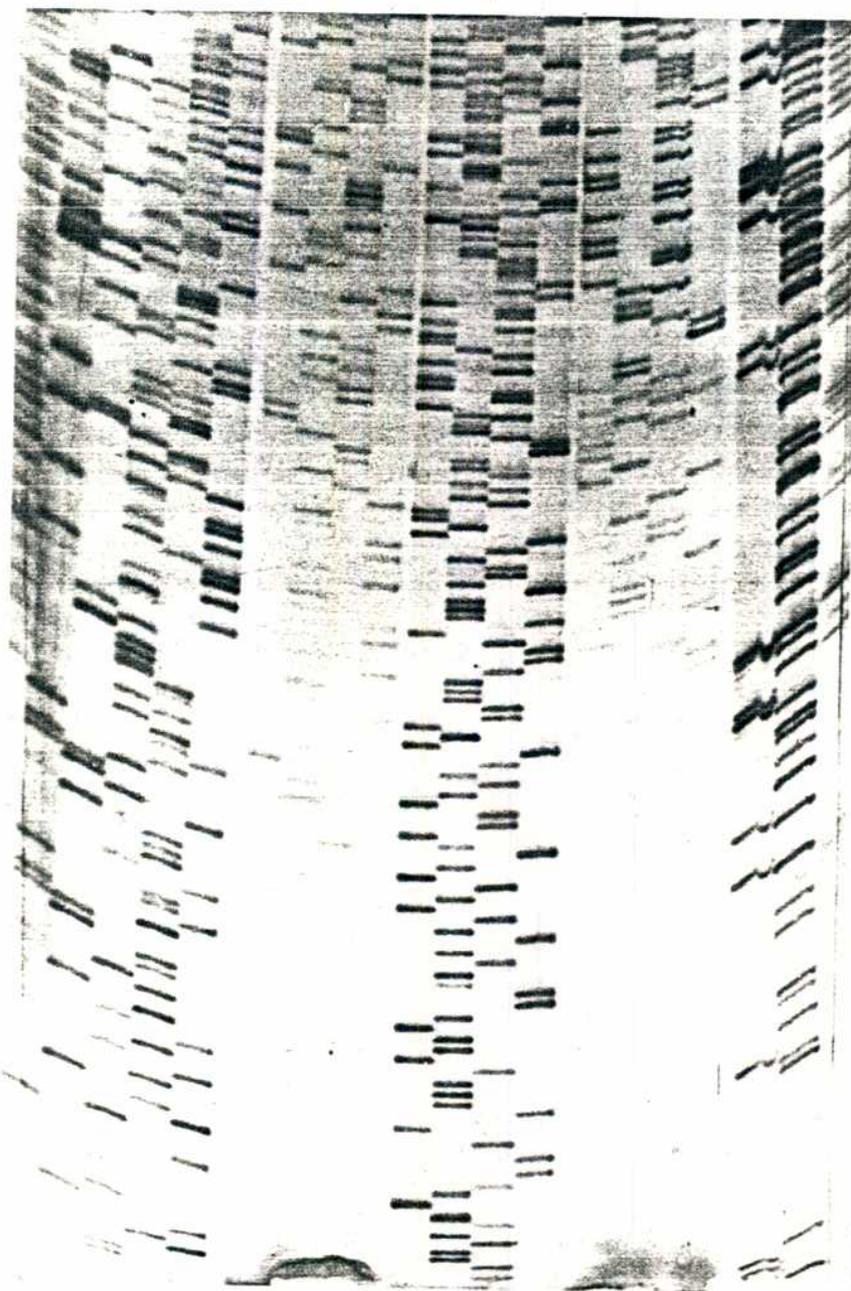
Apéndice 1 a las secuencias de la Figura 21 :

Autorradiografía de un gel de secuenciación del subclon de JL7-71 donde puede leerse la secuencia que codifica para una repetición de aminoácidos. El ADN SS fue secuenciado por el método de los dideoxinucleótidos, corrido en geles 6.6% desnaturalizantes, fijado y expuesto. Orden de siembra 2do depósito: CATGACGT, 1er depósito ACGT, 3er depósito ACGTGATC.



Apéndice 2 a las secuencias de la Figura 21 :

Autorradiografía de un gel de secuenciación de los subclones de JL8 -13 y 09 donde puede leerse la secuencia que codifica para las repeticiones de aminoácidos y la secuencia complementaria. El ADN SS fue secuenciado por el método de los dideoxinucleótidos, corrido en geles 6.6% desnaturizantes, fijado y expuesto. Orden de siembra 2do depósito JL8-13: AGACGT , 1er depósito JL8-13 ACGT, 1er depósito JL8-09 ACGT, 2do depósito JL8-09 ACGTGAT.



Apéndice 3 a las secuencias de la Figura 21 :

Autorradiografía de un gel de secuenciación de los subclones de JL9 -26 y 31 donde puede leerse la secuencia que codifica para las repeticiones de aminoácidos y la secuencia complementaria. El ADN SS fue secuenciado por el método de los dideoxinucleótidos, corrido en geles 6.6% desnaturalizantes, fijado y expuesto. Orden de siembra ACGT (4 depósitos centrales) 1er depósito JL9-26, 2do depósito JL9-26, 1er depósito JL9-31, 2do depósito JL9-31.

Los clones JL7, JL8 y JL9 contienen secuencias repetitivas de ADN (Fig. 21). JL7 está formado por repeticiones de 204 pb (68 aminoácidos), JL8 contiene repeticiones de 42 pb (14 aminoácidos) y JL9 repeticiones de 114 pb (38 aminoácidos). Estas secuencias presentan homología con las secuencias genómicas del clon Miranda 76 de *T. cruzi* informadas por Ibañez *et al.* (1988). Las mayores diferencias se observan para el clon JL8, que presenta 8 repeticiones de 14 aa, seis son homólogas a las secuencias publicadas por Ibañez *et al.*, mientras que las dos restantes difieren en 5 residuos aminoacídicos.

3.4.5. Homología entre la secuencia aminoacídica de JL9 y una proteína de *T. brucei* asociada a microtúbulos

La secuencia aminoacídica de JL9 presenta 55% de homología con una proteína de *Trypanosoma brucei* asociada a microtúbulos (MAP) (Schneider *et al.*, 1988) (Figura 22). Al igual que JL9, esta proteína está formada por repeticiones de 38 aminoácidos. Si bien el peso molecular de la MAP de *Trypanosoma brucei* es de aprox. 340 KD, esta proteína es fácilmente proteolizable originando fragmentos de 40 KD. Este es el peso molecular que corresponde a la proteína de *T. cruzi* que reaccionó con anticuerpos anti-JL9 (ver 3.2.2.).

3.4.6. Homología entre la secuencia aminoacídica de JL8 y el antígeno S de *Plasmodium falciparum*.

La secuencia de JL8 presenta homología con la región "variable" del antígeno S de la cepa NF-7 de *Plasmodium falciparum* (Saint *et al.* 1985) (Figura 23). Las repeticiones del antígeno S son de 8 aminoácidos, mientras que las de JL8 son de 14 aminoácidos, pero si se comparan dos repeticiones seguidas del antígeno S con una repetición de JL8 se comprueba una homología del 62% (Ver Figura 23).

S, *F. falciiparum* GQDEAPKSDAEAEALKSDEAEALKSDEAEARKSDEAEALKSDEAEALKSDEAEALKSDEAEARKS-
 *** * *** *+ *** ** * *+ *** * *** *+ *** * *** *+ *** *+ *** *+ *** *+
 JL8, *T. cruzi* EFQAAEATKVAEAEKQKA..AEATKAVETEKRKA..AEATKVAEAEKQRA..AEATKVAEAEKERA-

-DEAEALKSDEAEALKSDEAEARKSDEAEARKSDEAEARKSDEAEARKSDEAE1

*** * *** + *** * * * *+ *** * *** *+ **

-..AEATKVAEAEKQRA..AEATKAVETEKRKA..AEATKVAEAEKQKAAEAAKVAEAEKQVQRVHGN1

B

S-Ant	AEATKVAEAEKQKA
	*** * *** *+
JL8	EAEALKSDEAEARKSD

Figura 23:

Comparación de la secuencia aminoacídica del antígeno JL8 de *T. cruzi* con la región repetitiva del antígeno S de *Plasmodium falciparum*. * aminoácidos idénticos, + sustituciones conservativas; en el recuadro inferior se compara una repetición de JL8 con un tandem de dos repeticiones del antígeno S.

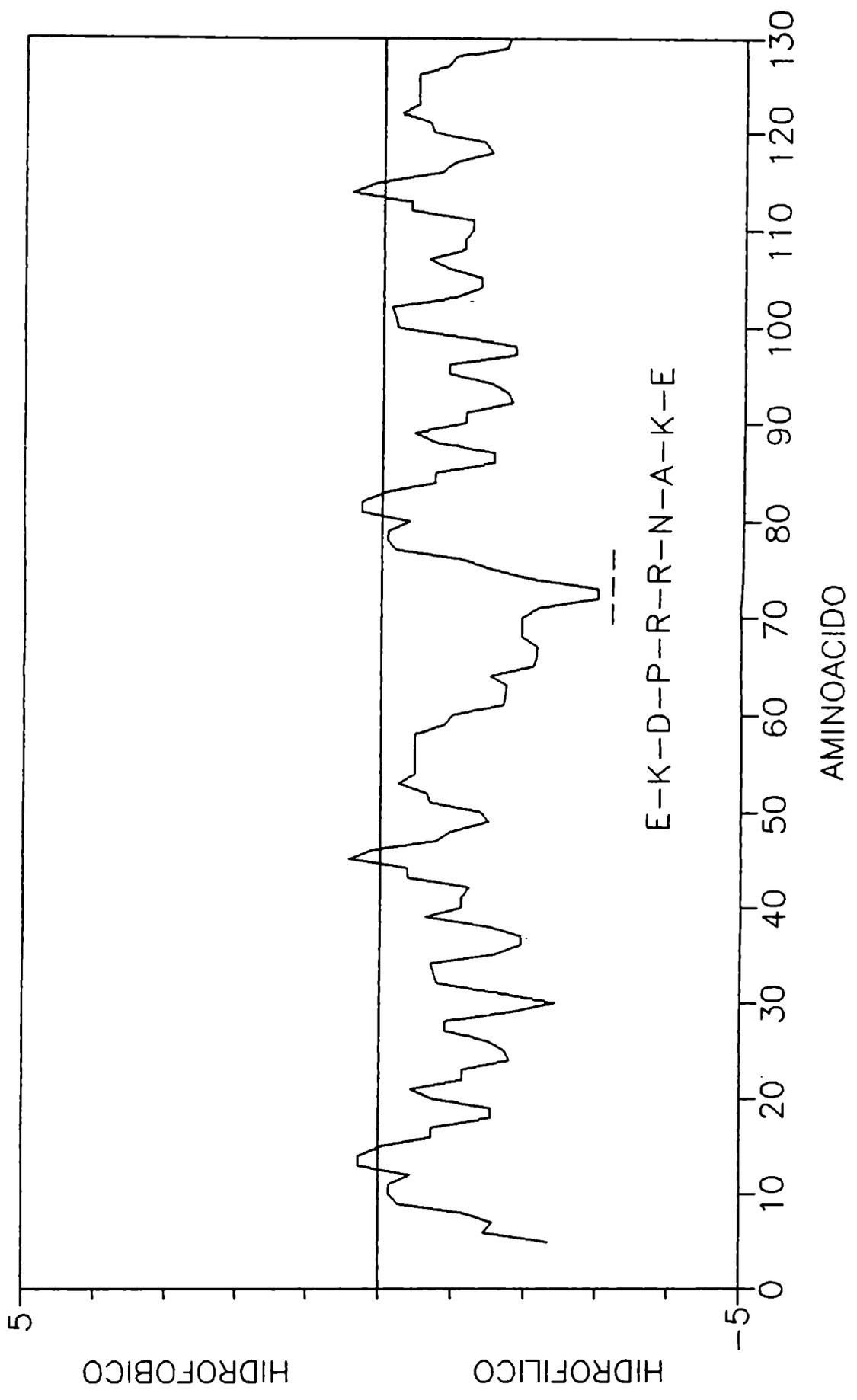
3.4.7. Predicción de la localización de determinantes antigénicos secuenciales en los antígenos repetitivos clonados.

A partir de las secuencias aminoacídicas de los antígenos clonados se puede predecir la localización de determinantes antigénicos secuenciales. Se utilizó el método de Kyte y Doolittle (1982). Se obtuvieron las curvas que se muestran en las Figura 24 donde además, se indican las secuencias peptídicas con mayor hidropatía promedio. Estas serían las mejores candidatas para definir los determinantes antigénicos de cada repetición. Todos los gráficos presentan un máximo claramente definido por lo que la predicción resulta sencilla. Además, todas estas repeticiones constituyen zonas hidrofílicas de las proteínas de *T. cruzi*

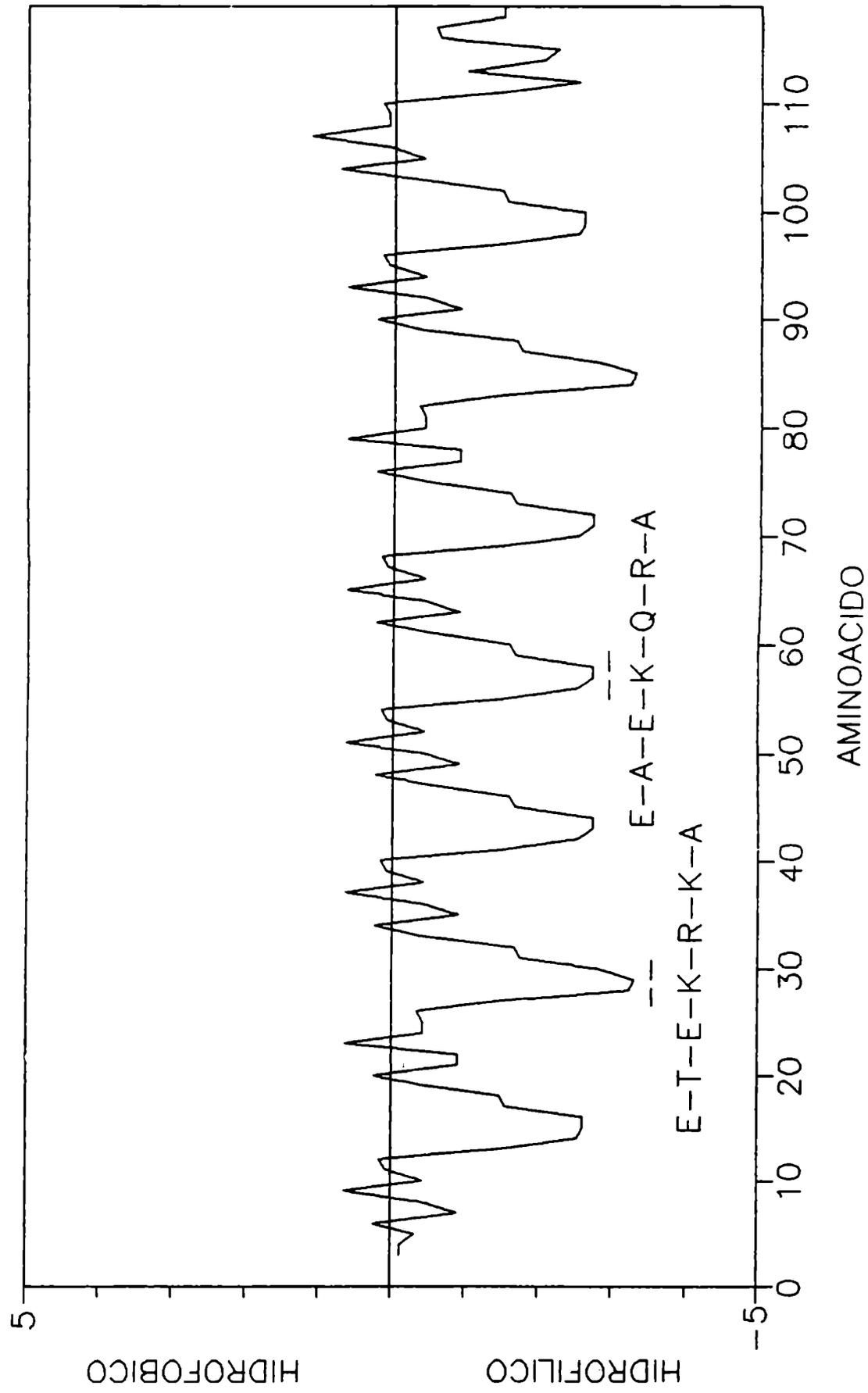
Figura 24 A, B y C (Páginas siguientes):

Perfiles de hidropatía de los antígenos JL7, JL8 y JL9: Se graficó la hidropatía calculada por el método de Kyte y Doolittle (1982), para tramos de 5 aa (JL8 y JL9) o 9 aa (JL7). La línea punteada indica la zona de mayor hidropatía promedio y su secuencia peptídica correspondiente. JL7: residuos 5 al 130; JL8: residuos 3 al 119; JL9: residuos 3 al 130.

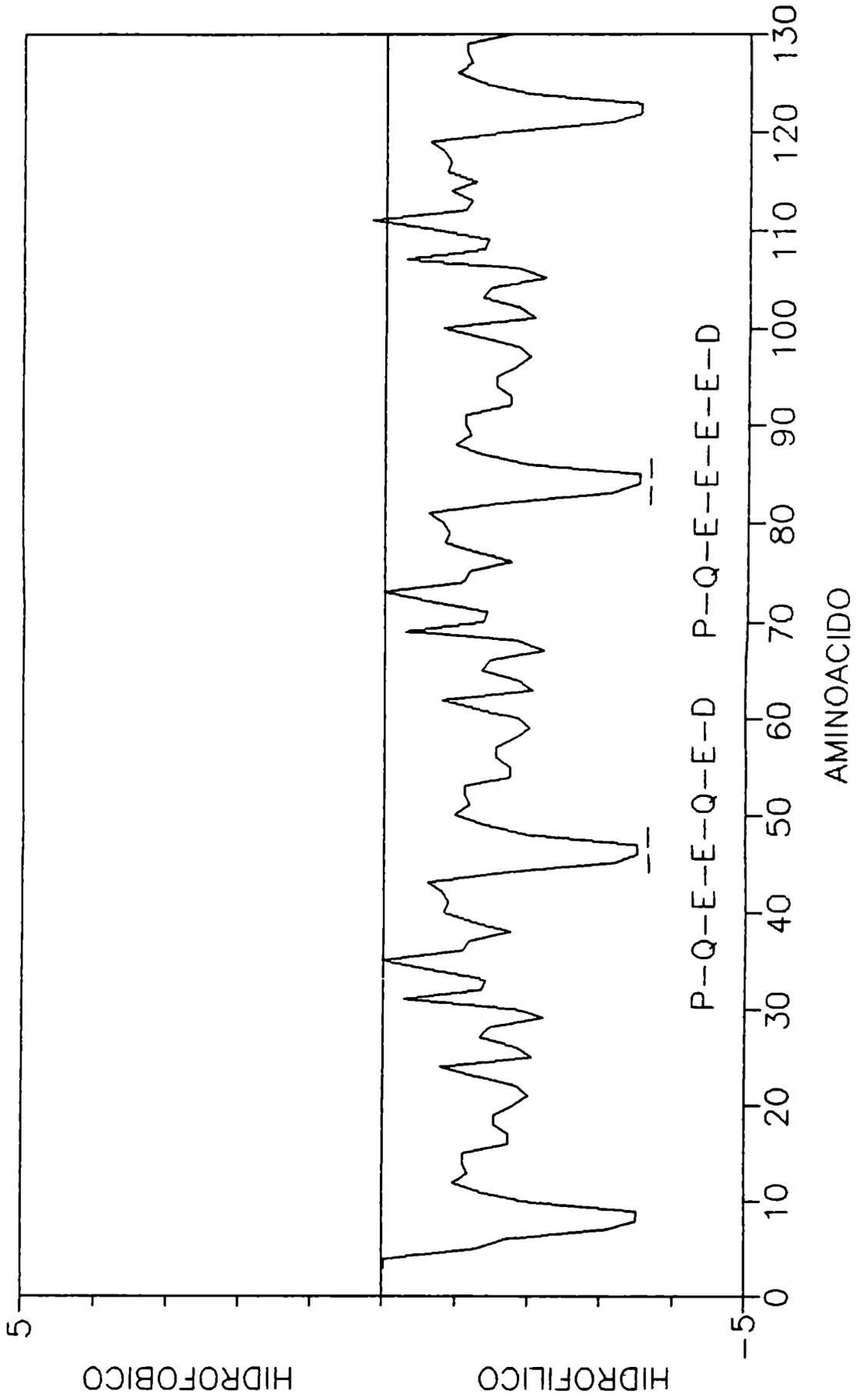
PERFIL DE HIDROPATIA DEL ANTIGENO JL7



PERFIL DE HIDROPATIA DEL ANTIGENO JL8



PERFIL DE HIDROPATIA DEL ANTIGENO JL9



3.4.7. Comparación de la secuencia de JL5 con la familia de las proteínas ribosomales P

La secuencia aminoacídica deducida de la secuencia nucleotídica del ADNc JL5 (Fig 21) muestra que el último codón antes del codón de terminación TAA codifica para aspártico, y que 27 bases mas adelante se encuentra otro codón de terminación. En el extremo 3' se observa un tracto de 19 adeninas. Todo indica que el péptido codificado por el ADNc JL5 corresponde al extremo carboxilo-terminal (C-terminal) de una proteína del parasito. La comparación de esta secuencia en el banco de datos de proteínas del Instituto Pasteur, mostró que es homóloga a los extremos C-terminales de la familia de proteínas ribosomales P o fosfoproteínas ribosomales

(Figura 25 A). Esta familia, que en *E. coli* se conocen como L12/L7 está constituida por tres proteínas: P0 de 38 KD, P1 y P2 de alrededor de 15 KD, siendo P1 algo mas pesada que P2. Las tres proteínas P comparten un determinante antigénico (Towbin *et al.*, 1982) que se mapeó en el extremo C-terminal, y cuya secuencia aminoacídica es común a las tres proteínas (Elkon *et al.*, 1986) y a todas las de proteínas ribosomales P eucarióticas.

En la Fig 25 A (ver la figura en el capítulo 3.5.1) la secuencia aminoacídica de JL5 se compara con todas las secuencias de proteínas P ribosomales eucarióticas. Se comprueba que JL5 presenta tres características comunes al extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P: 1) una región rica en alaninas 2) una región acídica compuesta por tres aspárticos y cuatro glutámicos, más corta que en las proteínas homólogas 3) El heptapéptido C-terminal MGFGLFD, motivo consenso de las proteínas ribosomales P (Liljas *et al.*, 1986). Todos estos datos coinciden con los demas hallazgos moleculares e inmunológicos de manera que el péptido de *T. cruzi* expresado en la proteína de fusión de JL5 queda perfec-

tamente identificado: a-La secuencia nucleotídica que codifica para el decapeptido C-terminal es casi idéntica a la de las proteínas P humanas, b-Los ARN mensajeros que hibridizan con el ADNc de JL5 son similares en tamaño a los mensajeros que codifican para las proteínas P0 (1.2 Kb) P1 y P2 (0.67 y 0.6 Kb) humanas (Rich y Steitz, 1987). c-La caracterización inmunológica demostró que los anticuerpos que reaccionan con JL5 definen determinantes antigénicos de una proteína de *T. cruzi* de 38 KD de peso molecular (ver 3.2.3 y Fig. 13) que coincide con el de la P0 humana. Todas estas evidencias moleculares indican sin lugar a dudas que el ADNc de JL5 codifica para el extremo C-terminal de una proteína ribosomal P de *T. cruzi*.

3.4.8. La secuencia carboxiterminal de JL5 es altamente homóloga al epítipo definido por los autoanticuerpos anti-P de Lupus eritematoso sistémico.

Estudios realizados en pacientes con Lupus eritematoso sistémico (LES) demostraron la existencia de autoanticuerpos dirigidos contra las proteínas ribosomales P (Elkon et al. 1982). Estos anticuerpos anti-P son clasificados dentro del grupo de los autoanticuerpos anti-nucleares (ANA) (Tan et al., 1988). Se demostró que son marcadores específicos de Lupus. Entre 10 y 20% de pacientes LES los presentan y se encuentran asociados a patologías del SNC (psicosis lúpica) (Bonfa et al., 1987). Estudios inmunoquímicos demostraron que el epítipo reconocido por los anticuerpos anti-P está localizado en el extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P humanas (Elkon et al., 1986). El mapeo antigénico fino mostró que los anticuerpos anti-P reaccionan con un epítipo definido por los once aminoácidos C-terminales de las proteínas P (Elkon et al., 1988). La secuencia de este epítipo, (S/E)DDDMGFGLFD, es mas de 90% homóloga a la correspondiente de JL5. Esto sugiere que la infección con *T. cruzi* podría inducir la producción de anticuerpos con una especificidad similar a los an-

anticuerpos anti-P de Lupus. Para evaluar en forma preliminar esta posibilidad se estudió la reactividad del clon JL5 con 4 sueros de LES (ver Fig. 16. en el capítulo 3.3.3) y pudo comprobarse que los 2 sueros de LES anti-P seropositivos reaccionaron con JL5. Ante este resultado y teniendo en cuenta las evidencias de fenómenos autoinmunes en Chagas, y su putativa relación con la patología; y la correlación entre altos títulos anti-JL5 y la Enfermedad cardíaca de Chagas; resultaba de suma importancia definir:

- 1- Si el epitope definido por los sueros lúpicos era semejante al definido por los anticuerpos anti-JL5 de los Chagásicos.
- 2- La relevancia en la reactividad inmunológica anti-JL5 de los anticuerpos dirigidos hacia el extremo C-terminal de JL5 homólogo al epitope de lupus.

Para tratar de elucidar estas cuestiones se llevó a cabo el mapeo antigénico de JL5 con sueros de Chagas y LES.

3.5. MAPEO ANTIGENICO DE LA PROTEÍNA P RIBOSOMAL JL5 de *T. cruzi* CON ANTICUERPOS DE ENFERMOS DE CHAGAS y DE LUPUS

Se comparó la estructura antigenica del péptido codificado por el ADNc de JL5 con el epitope P definido por anticuerpos de LES. La alta homologia del extremo C-terminal de JL5 con el epitope de lupus y el resultado discutido en (3.4.8.) indicaba la posible existencia de especificidades de anticuerpos anti-P comunes a Lupus y Chagas; por lo que se intentó definirla.

3.5.1. Localización de determinantes antigenicos secuenciales en JL5.

Las experiencias previas demuestran que la reactividad inmunológica anti-JL5 esta exclusivamente dirigida al péptido de *T. cruzi* codificado por el ADNc (ver 3.2.1. y 3.3.4); por lo tanto, es correcto restringir el análisis de la reactividad inmunológica de JL5 al peptido clonado.

Para localizar determinantes antigénicos secuenciales o lineales en la proteína de fusión JL5 se utilizó el criterio que postula que los epitopes deben estar localizados dentro de las porciones más hidrofílicas de las moléculas proteicas (ver 1.5.). La figura 26 muestra el perfil de hidrofílicidad del péptido codificado por el ADNc JL5, según Kyte y Doolittle (1982). Puede distinguirse una zona hidrofóbica rica en alaninas y una zona hidrofílica en el extremo C-terminal. En la Figura 25 se compara la secuencia aminoacídica de JL5 con la de las regiones C-terminales de las proteínas ribosomales P. Como puede verse la zona hidrofílica es la mas conservada en la evolución, y corresponde a los 13 aminoácidos C-terminales de JL5. Esta secuencia C-terminal tiene mas de

A.

```

JL5      ASAPTA AAAAASGGAAAPAAAA.....EEEEDDDMGFGLFD
YPA1     +G*S**+P*++**+G+D**...EEKEEEEAK**S*****
-ASRP12' +GVGA*P**+G+**TE*P**KEEKKEEKKEES**++*****
ASRP12   PT+GAP***G*+*****E*KEAKKEEKKEES**++*****
RLRP2    P++GAV*V**+P*****+APAAEE.KEES**KK*+*****
P2       V+VSA+P***+P***+AP***.EEKKDEKKEES**S*****
P1       *P*AG**P**+GP+P+TA**V*EEKKVEAKKEES**S*****
P0       V**APV***T+++P**A**P*...KVEAKEES**S*+*****
    
```

B.

eL12/12'	<i>A. salina</i>	E E E D E D M G F G L F D
P1/P2	<i>H. sapiens</i>	E E <u>S D D D M G F G L F D</u>
P0	<i>H. sapiens</i>	E E <u>S D E D M G F G L F D</u>
R-13	<i>T. cruzi</i>	E E E D D D M G F G L F D
R-10	<i>T. cruzi</i>	D D D M G F G L F D
R-7	<i>T. cruzi</i>	M G F G L F D

Figura 25:

(A) Comparación de la secuencia aminoacídica de JL5 de *T. cruzi* y las secuencias carboxilo terminales de la familia de las proteínas ribosomales P eucarióticas. Los intervalos fueron introducidos para permitir las comparaciones entre secuencias homólogas (líneas punteadas). YPA1: proteína ribosomal de *Saccharomyces cerevisiae*, desde el residuo 69; (Itoh , 1981) ASR12: proteína eL12 de *Artemia salina* desde el residuo 67 (Amons et. al. 1979); ASR12': proteína el12' de *Artemia salina* desde el residuo 64; (Amons et. al. 1982)); RLRP2: proteína ribosomal P2 de hígado de rata desde el residuo 68; (Lin et. al. 1981)); P2: proteína ribosomal P2 humana desde el residuo 78 (Rich y Steitz 1987); P1: proteína ribosomal P1 humana desde el residuo 74 (Rich y Steitz 1987); P0: proteína ribosomal P0 humana desde el residuo 275 (Rich y Steitz 1987). La homología respecto a JL5 se indica con un asterisco, las cruces indican sustituciones conservativas de aminoácidos, T-S, D-E, A-S and A-G se consideran pares homólogos. (B) Comparación de la secuencia de los péptidos sintéticos carboxilo-terminales de JL5 y los 13 residuos carboxi-terminales de las proteínas P de *Artemia* y humanas, los residuos subrayados definen la zona donde fue mapeado el epítipo reconocido por los anticuerpos anti-P de LES (Elkon et. al. 1988).

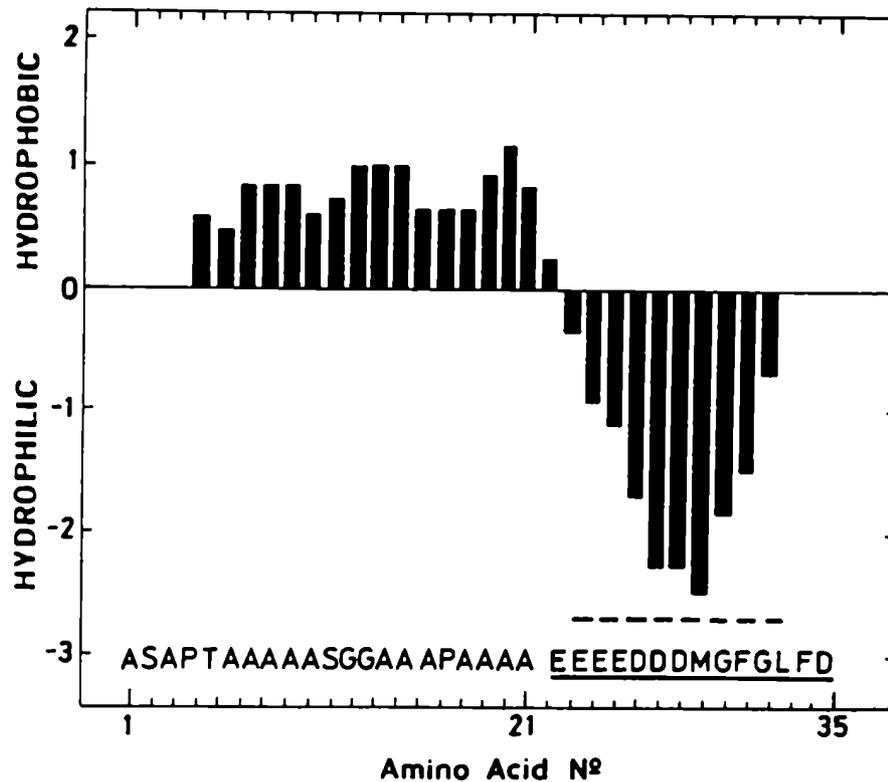


Figura 26: Secuencia aminoacídica y perfil de hidropatía de la región carboxilo terminal de la proteína ribosomal P de *Trypanosoma cruzi* codificada por el clon JL5, calculado según Kyte and Doolittle, 1982. El cálculo fue realizado con el programa HYDRPHIL (Van Regenmortel y De Marcillac, 1988). La línea punteada corresponde a la región hidrofílica carboxilo-terminal (residuos subrayados).
-198-

un 90 % de homología con la secuencia correspondiente de las proteínas P humanas. Es en esta región precisamente donde se ha localizado el epítope definido por los anticuerpos anti-P de LES (Elkon *et al.*, 1988). Para verificar si esta región hidrofílica y conservada de la proteína ribosomal P de *T. cruzi* esta involucrada en la reacción inmunológica con los anticuerpos anti-JL5 de sueros chagásicos, se realizó la síntesis química de un péptido que comprende los 13 residuos C-terminales de JL5 (R-13, Fig. 25 B); se comparó por ELISA la reactividad anti-JL5 y anti-R-13 de sueros de pacientes chagásicos. Doce sueros de individuos con LES (seis de ellos Anti-P+) fueron incluidos en el ensayo para comparar la reactividad anti-P de individuos infectados y de enfermos autoinmunes.

Tal como ilustran los resultados de la Tablas X y XI, y la Figura 27. los títulos de anticuerpos anti-JL5 y anti R-13 de ECCh son significativamente mayores que los de los ITsC ($P < 0.005$). Si bien 2 de los 15 ECCh con altos títulos anti-JL5 no reaccionaron con el péptido (H10 y H11, Tabla X) se obtuvo una buena correlación entre títulos anti-JL5 y anti-R-13 ($r = 0.7$; $p < 0.05$). Todos estos datos indican que R-13 define un determinante antigénico lineal dentro de JL5. Los sueros de individuos sanos y de pacientes con Cardiopatía idiopática congestiva no reaccionaron con JL5 ni con R-13. Sólo los sueros de individuos con LES anti-P seropositivos reaccionaron con JL5 y con R-13, indicando que ambos péptidos de *T. cruzi* contienen secuencias que reaccionan con autoanticuerpos dirigidos contra las proteínas P humanas.

3.5.2. Mapeo antigénico fino del determinante antigénico de JL5 definido por el péptido R-13.

Con el objeto de estudiar y comparar la especificidad de los anticuerpos anti-R-13 de Chagas y LES, se midió el título de

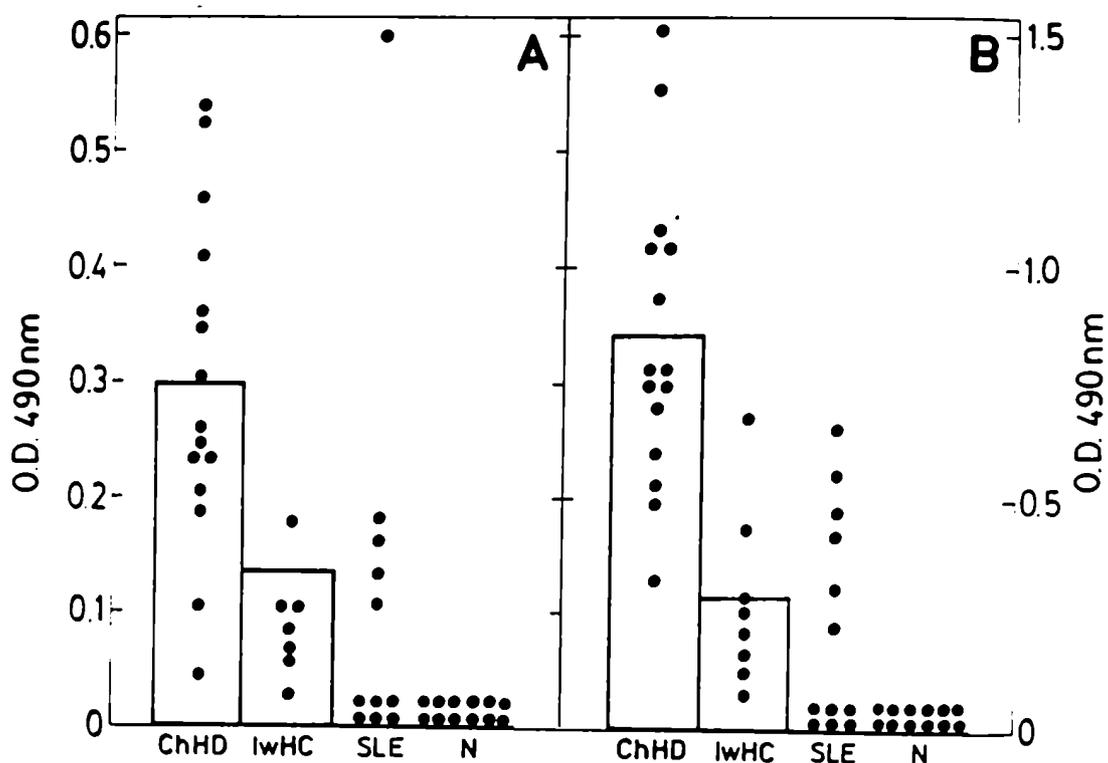


Figura 27:

Reactividad medida por ELISA de los anticuerpos hacia (A) R-13 y (B) Proteína de fusión JL5 β -gal. ChHD = ECCh: Suero de pacientes con enfermedad cardíaca de Chagas crónica (N=15); IwHC = ITsC: suero de individuos infectados con *T. cruzi* sin evidencias clínicas de daño cardíaco (N=8); SLE = LES: suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico (N=13) and NI: suero de individuos normales (N=23). Los sueros fueron diluidos 1:500. La DO representa reactividad hacia el péptido o la proteína de fusión luego de sustreída la DO obtenida hacia tyroglobulina o β -galactosidasa. Las barras representan los promedios aritméticos.

TABLA X. Reactividad medida por ELISA de los sueros de los diferentes grupos de pacientes hacia los péptidos R-13, R-10, R-7; proteína de fusión JL5 y extractos de *T. cruzi*.

Sueros [®]	JL5	R-13	R-10		R-7	<i>T. cruzi</i>	
	D.O. *	D.O.	D.O.	%*	D.O.	%	D.O.
NI+							
media	22	10	7		9		27
CIC							
media	57	30	28		25		69
ECCh ^w							
H1	752	357	144	40	120	36	412
H2	930	256	67	27	70	28	485
H3	1047	461	64	14	60	13	380
H4	604	307	205	70	169	56	372
H5	702	247	25	10	18	7	321
H6	498	237	25	11	24	10	357
H7	789	351	ND	ND	ND	ND	388
H8	746	408	189	46	112	25	361
H9	531	192	21	11	18	9	345
H10	786	95	70	50	66	46	369
H11	1080	45	27	40	31	46	417
H12	1049	204	55	27	50	25	421
H13	330	240	118	49	108	47	270
H14	1683	526	93	17	94	17	403
H15	1394	540	ND	ND	ND	ND	342

Continuación de la tabla X

ITsC ^m							
I1	294	63	48	77	54	86	344
I2	171	112	55	50	46	40	180
I3	137	36	27	77	21	60	173
I4	215	109	48	45	43	40	208
I5	88	73	21	28	ND	ND	220
I6	265	91	73	80	75	83	180
I7	449	180	13	8	15	9	345
I8	686	405	109	27	84	20	390
LES*							
S1	650	600	570	95	588	98	62
S2	300	160	135	85	115	85	75
S3	220	105	108	91	63	60	70
S4	550	260	163	63	156	60	35
S5	417	130	91	70	84	67	100
S6	370	180	135	77	90	50	68

* La D.O. representa la absorbancia a 490 medida para cada péptido acoplado a tiroglobulina luego de la substracción de la absorbancia del mismo suero con tiroglobulina libre de péptido.

• Todos los sueros fueron diluidos 1:500.

*El porcentaje (%) representa $(DO \text{ con el peptido} / DO \text{ con R-13}) \times 100$.

+NI: individuos normales (N=23).

CIC: pacientes con cardiopatía congestiva idiopática (N=7)

*ECCh: pacientes con enfermedad Cardíaca de Chagas crónica.

■ITsC: Individuos infectados con *T. cruzi* sin evidencias clínicas de compromiso cardíaco.

*LES Sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico anti-P seropositivos.

TABLA XI. Niveles de anticuerpos anti-JL5 y R-13 en suero de pacientes chagásicos.

Antígeno	A490 ¹		P
	ECCh ² (N=15)	ITsC ³ (N=8)	
JL5	861,4 ± 340,0	288,4 ± 182,6	<0.01
R-13	297,7 ± 149,6	133,6 ± 110,0	<0.05

1. Media ± desviación standard de la A490 x 10³ luego de la substracción de la A490 x 10³ obtenida con β-gal de λgt11 no recombinante (JL5), o tiroglobulina bovina (R-13).
2. ECCh, Individuos con enfermedad cardíaca de Chagas crónica.
3. ITsC, individuos infectados con *T. cruzi* sin evidencias de compromiso cardíaco.

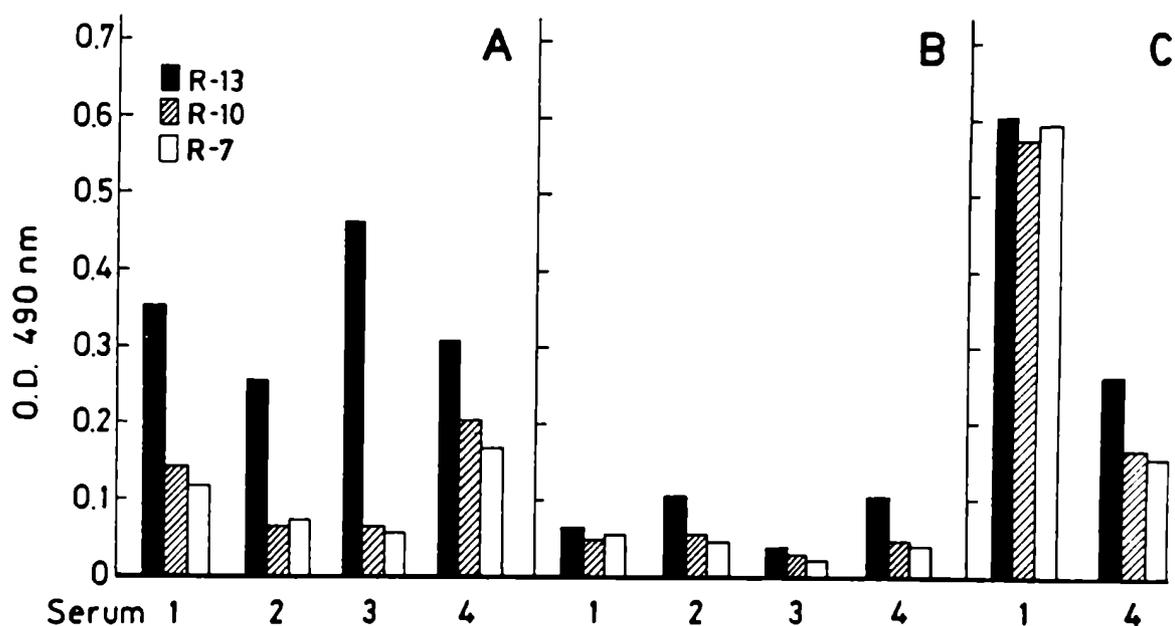


Figura 28:

Perfiles de reactividad medida por ELISA de los anticuerpos hacia los péptidos carboxilo terminales R-13, R-10 y R-7: (A) Suero de ECCh (H1, H2, H3 & H4); (B) Suero de ITsC (I1, I2, I3 & I4); (C). Sueros de pacientes con LES (S1 & S4). Los sueros fueron diluidos 1:500. La DO representa reactividad hacia el péptido luego de la sustracción de la DO hacia tiroglobulina libre de péptido.

anticuerpos contra péptidos sintéticos de los 7 (R-7), o los 10 (R-10) residuos C-terminales de JL5 (ver Fig 25 B) en sueros de ECCh, ITsC e individuos con LES Anti-P+. En la figura 28 y la Tabla X se muestran los perfiles de reactividad hacia R-7, R-10, y R-13. Se observa que la reactividad de todos los sueros ECCh con R-10 es significativamente menor que con R-13. Esto indica que los tres residuos glu(E) son esenciales para la reactividad inmunológica de R-13. No hay diferencias significativas entre la reactividad de R-7 y la de R-10. Los títulos anti-R-10 y anti-R-7 en 6 de 13 sueros de ECCh (Sueros H1 y H4 Fig 28) indican la existencia de un epitope contenido dentro de los 7 residuos C-terminales. Tres de los 6 sueros de individuos con LES anti-P seropositivos mostraron un título similar hacia los tres péptidos sintéticos. Los restantes mostraron un perfil de reactividad hacia los péptidos similar al observado para ciertos ECCh (sueros H1 Y H4 Fig. 28). La especificidad de la reactividad anti-R-13 fue verificada mediante ensayos de inhibición de la reacción inmunológica anti-R-13 con cantidades crecientes de los péptidos R-7, R-10 y R-13. Como puede verse en la figura 29 los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición concuerdan con los obtenidos en la mediciones directas

3.5.3. Mapeo antigenico de JL5 con sueros de Chagas y LES.

Para estudiar la especificidad de los anticuerpos anti-JL5 de Chagas y de Lupus, se estudió la inhibición de la reacción inmunológica de los anticuerpos anti-JL5 de Chagas y anti-P de LES contra la proteína de fusión JL5 por agregado de cantidades crecientes de péptidos R-13, R-10 y R-7.

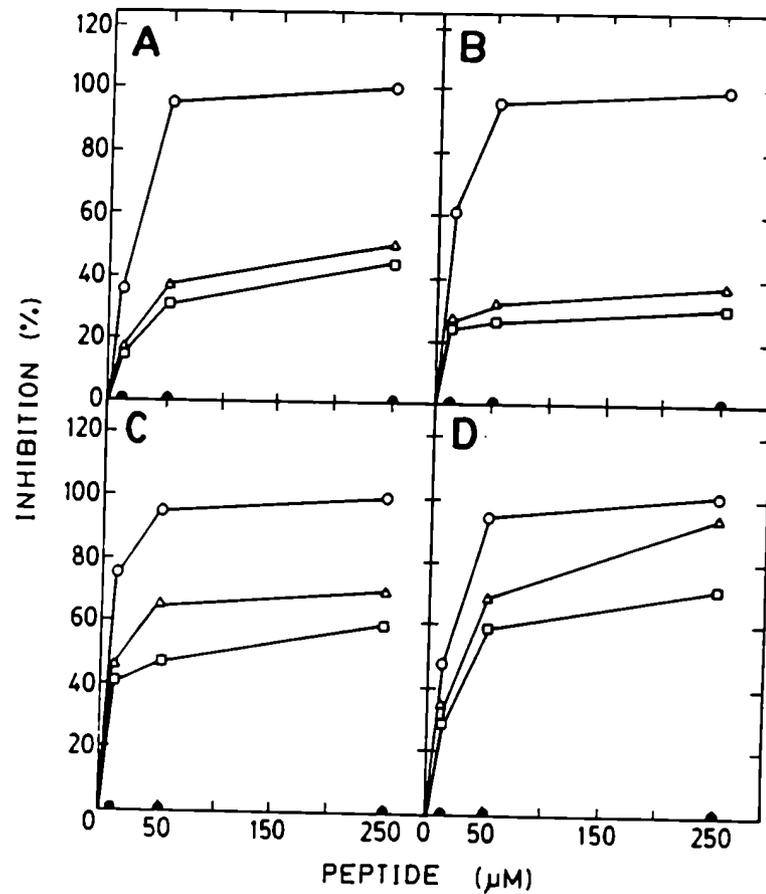


Figura 29:

Inhibición de la reacción anti-R-13 utilizando péptidos carboxiterminales. (A), (B) : sueros ECChc H1 y H2 respectivamente. (C) and (D) Sueros de LES S4 y S1 respectivamente. Los sueros diluidos 1:1000 fueron incubados con concentraciones crecientes de péptidos conjugados (○) R-13, (△) R-10, (□) R-7, o AEAELVKMALMKV (▲), y su reactividad hacia R-13 fue ensayada por ELISA.

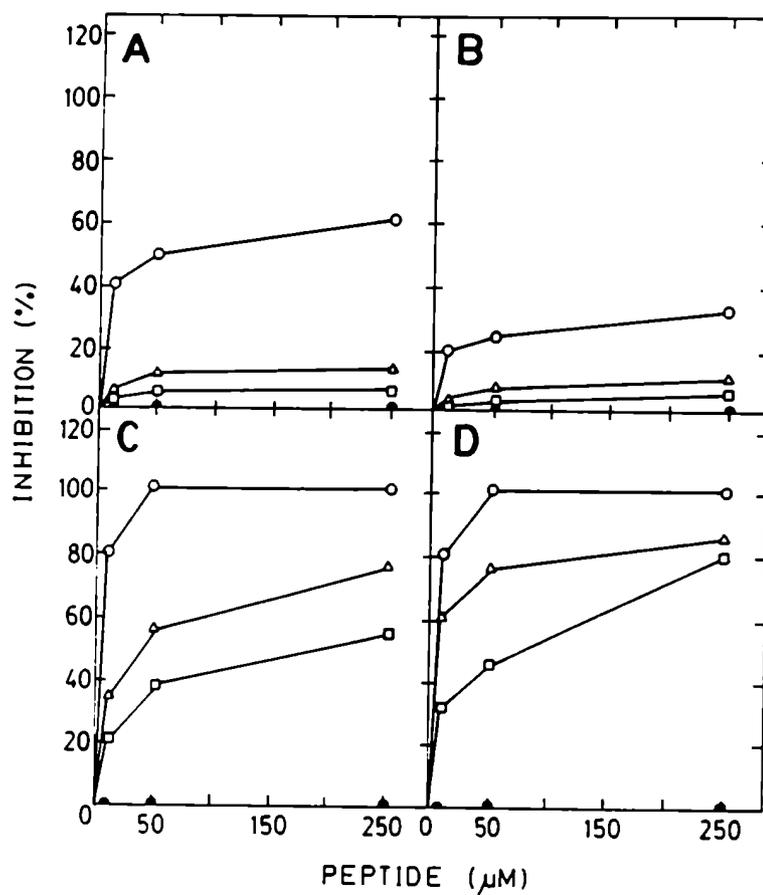


Figura 30:

Inhibición de la reacción de anti-JL5 con los péptidos sintéticos carboxilo-terminales (A) y (B). Sueros de ECChc H1 y H4 respectivamente; (C) y (D) Sueros de LES S4 y S1, respectivamente. Los sueros diluidos 1:1000, fueron preincubados con cantidades crecientes de péptidos conjugados (o) R-13, (Δ) R-10, (\square) R-7, o AEAELVKMALMKV (\blacktriangle), y su reactividad hacia JL5 fue ensayada por ELISA.

Resultados

Como se ve en la figura 30 la reacción de los sueros de ECCh con JL5 fue sólo parcialmente inhibida por R-13, indicando que los anticuerpos de ECCh definen en JL5 otros epitope/s probablemente conformacional/es que no están contenidos en R-13. La reactividad anti-JL5 de los sueros de LES fue completamente inhibida por R-13, indicando que los anticuerpos anti-P de Lupus están exclusivamente dirigidos hacia el epitope C-terminal de JL5 contenido en R-13. este péptido define la especificidad de anticuerpos anti-P común a Chagas y a LES.

4. DISCUSSION

Este trabajo de tesis, se propuso utilizar antígenos clonados de *T. cruzi* para intentar un diagnóstico serológico de la cardiopatía Chagásica. A su vez, la identificación de determinantes antigénicos permitió una posible explicación molecular de mecanismos que podrían estar involucrados en la inmunopatogénesis de la enfermedad.

La estrategia utilizada posibilitó clonar varios antígenos de *T. cruzi* definidos por suero de humanos infectados con cardiopatía. El estudio de su reactividad inmunológica con sueros de pacientes clínicamente caracterizados mostró, en forma preliminar, que podría aportar información acerca de la infección y la cardiopatía chagásicas. La caracterización inmunológica y genética de los ADNc y sus productos estableció la identidad de varios antígenos. El clon JL5, cuyo producto es reconocido por los sueros de cardiopatas chagásicos, codifica el extremo C-terminal de una proteína ribosomal P de *T. cruzi*, homólogo al epítipo definido por autoanticuerpos anti-Proteínas P de Lupus eritematoso sistémico (LES). El mapeo antigénico de JL5 con sueros de Chagas y LES mostró que el extremo C-terminal de JL5 define una especificidad de anticuerpos comunes a LES y Chagas.

4.1. DIAGNOSTICO SEROLOGICO DIFERENCIAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Para el análisis de la reactividad de los clones con sueros de individuos caracterizados clínicamente se desarrollaron diferentes métodos.

El inmunoensayo de placas de fagos detectó diferencias en la reactividad contra las proteínas recombinantes en suero de pacientes infectados con y sin cardiopatía. Se identificaron dos grupos de clones. Los que reaccionan con los sueros de todos los infectados, JL7 y JL8 (clones diagnósticos de infección), y los

que reaccionan predominantemente con los sueros pacientes con enfermedad cardíaca de Chagas (ECCh). El clon "tipo" de este último grupo es JL5, que reacciona con sueros de ECChc y es débilmente reconocido por los sueros de individuos infectados sin evidencias clínicas de daño cardíaco (ITsC). Se estableció una correlación entre una fuerte reactividad anti-JL5 y la cardiopatía chagásica (Fig 16 y Tabla VI). El clon JL52 reaccionó en forma similar a JL5. Los clones JL9, y JL1 y JL43 reaccionaron sólo con algunos sueros de pacientes con cardiopatía (Tabla VI).

El clon "tipo" del grupo de clones diagnósticos es JL7 (Fig 16 y Tabla IV). El clon JL8 reaccionó sólo con el 50% de los sueros de infectados (Tabla VI).

Ninguno de los recombinantes reaccionaron con los sueros de infectados con *Leishmania sp.*, indicando que los anticuerpos hacia los antígenos clonados son específicos de la infección chagásica. Otros laboratorios que trabajaron con recombinantes homólogos a JL7 y JL8 observaron resultados similares; asimismo en un estudio multicentro auspiciado por la OMS en el que participaron 10 laboratorios americanos incluido el nuestro (TDR, 1990), se verificó la utilidad diagnóstica del clon JL7 y sus homólogos A1 (Ibañez *et al* 1988) y H49 (Franco da Silveira, comunicación Personal). Esto indica que el ensayo utilizado tiene efectiva capacidad diagnóstica de la infección (TDR, 1990).

Los resultados semicuantitativos obtenidos por el inmunoensayo de placas fueron corroborados por un ELISA. Con dicho test se verificó que los títulos anti-JL5 y anti-JL9 son significativamente mayores en sueros de pacientes con cardiopatía chagásica que en infectados sin cardiopatía ($P < 0.005$). Asimismo se constató la correlación entre altos títulos anti-JL5 y la cardiopatía ($P < 0.005$) (Fig. 18 y Tablas VII y VIII).

Este ELISA constituye un avance comparado con otros métodos porque permite una cuantificación del título de anticuerpos hacia antígenos clonados en λ gt11 sin tener que purificar las proteína de fusión o subclonar en otros vectores de expresión. Además, permite adaptar los antígenos clonados a la serología de rutina. En el ensayo doble ciego de una muestra de 23 sueros (ver 3.3.6.) se comprobó que la reactividad hacia JL7 correlaciona con serología *T. cruzi* positiva en el 96% de los casos. La reactividad con JL5 correlaciona con la cardiopatía en el 78% de los casos, lo que indicaría el posible valor diagnóstico del test para la infección con *T. cruzi* y, en forma preliminar, la aplicación de la reactividad anti-JL5 en el diagnóstico y/o pronóstico de la cardiopatía. Debido al pequeño número de sueros que se analizaron, y sobre todo al bajo número de sueros de ITsC este resultado debe ser convalidado por futuros estudios.

4.2. CLONADO DE ANTIGENOS DE *Trypanosoma cruzi* DEFINIDOS POR SUERO DE PACIENTES CON CARDIOPATIA CHAGASICA

En la estrategia de clonado fue importante el trabajo con una biblioteca de ADNc que incluyó fragmentos de ADNc pequeños (ver 3.1.1), y el uso del suero de un individuo con una cardiopatía chagásica severa (ver 3.3.5.). Se clonaron antígenos de *T. cruzi*, como los codificados por JL5 o JL1, que no fueron aislados por otros grupos cuando se utilizaron bibliotecas de expresión de ADN genómico fragmentado y seleccionado por tamaño. En estas bibliotecas existe mayor probabilidad de clonar secuencias repetitivas; mientras que en las de ADNc el nivel de expresión de ARNm determina su representatividad. Así se clonó JL5 que si bien no presenta repeticiones tiene un alto nivel de expresión en ARN de epimastigotes (ver Fig. 19).

Se caracterizaron 5 determinantes antigénicos de *T. cruzi* definidos por el suero marcador de cardiopatía chagásica (JL). La identidad de los clones se verificó porque los anticuerpos anti-

péptidos clonados reaccionan específicamente con proteínas del parásito (3.3.2. , Fig. 13), y porque los ADNcs clonados hibridizan con ARN, y ADN de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Figs 19 y 20).

Si bien la biblioteca fue construida con ARNm de epimastigote, los antígenos clonados deben ser expresados por los estadios del parásito presentes en el huesped, ya que fueron definidos por sueros de pacientes. Esto también se comprobó en *W. blot* de amastigotes para JL1 y JL5, y en *W. blot* de tripomastigotes para todos los antígenos (Fig. 13).

La secuenciación de los ADNc permitió su identificación. El clon JL1 codifica para una porción de una proteína de 25 KD de *T. cruzi*. Su ADNc hibridiza con un ARNm de 2.2 Kb. Existen dos estudios acerca de antígenos de *T. cruzi* de 25 KD definidos por sueros de pacientes. Scharfstein *et al.* (1983) describieron una glicoproteína de superficie que reacciona con el 95% de los sueros de infectados. Esta proteína se origina por clivado de un precursor de 57 KD (Scharfstein *et al.*, 1986). El mensajero de JL1 mide 2.2 Kb, este podría codificar para el precursor de 57 kD; sin embargo los anticuerpos policlonales anti-gp25 del Dr. Scharfstein no reaccionaron con JL1. Asimismo, Santos Buch *et al.*, (1985) informaron la existencia de una proteína parasitaria de 25 KD, inmunoprecipitada por anticuerpos del suero de pacientes con cardiopatía chagásica y otras cardiopatías. El clon JL1 reacciona sólo con un bajo porcentaje de sueros de cardiopatas chagásicos (Tabla VI) y no reacciona los de cardiopatas no chagásicos. Dadas estas diferencias de reactividad, la identidad de la p25 de Santos Buch *et al.* (1985) con la JL1 no parece probable. Su secuencia aminoacídica es rica en lisinas y no presenta homologías con ninguna proteína conocida.

Tres de los antígenos clonados JL7, JL8 y JL9 tienen secuencias aminoacídicas repetitivas; clones de *T. cruzi* homólogos a estos han sido encontrados por otros autores. Así, repeticiones homólogas a JL7 y JL8 fueron descritas por Ibañez *et al.* (1988) trabajando con ADN genómico de clon Miranda 76, y también por Lafaille *et al.* (1989) trabajando con el clon Dm28c obtenido de un *Didelphis marsupialis* silvestre que es reservorio natural del parásito (Contreras *et al.*, 1988). Hoft *et al.* (1989) identificaron un clon homólogo a JL8 de una biblioteca de ADNc obtenida del clon Sivio X-10/4 (aislado de un individuo infectado de la región amazónica). Dada la homología de secuencia entre los clones JL7 y JL8 obtenidos de la cepa Tulahuén II y los obtenidos a partir de clones provenientes de otras cepas, y dado que reaccionan con sueros de individuos infectados de todas las regiones de América estudiadas se deduce que estos antígenos están conservados en las poblaciones de *T. cruzi*. Como no son reconocidos por individuos infectados con *Leishmania sp.* son los mejores candidatos para elaborar un test diagnóstico de la infección chagásica crónica.

A su vez, las repeticiones de 14 aa de JL8 resultan homólogas al tandem de 2 repeticiones de 8 aa del antígeno S de la cepa NF-7 de *Plasmodium falciparum* (Fig. 23) (Saint *et al.* 1985). Sin embargo las repeticiones del antígeno S de otras cepas son distintas y no presentan reacción cruzada con las de NF-7 (Kemp *et al.* 1987). En *T. cruzi* las repeticiones de JL8 y sus homólogos están muy conservados (Levin *et al.* 1989, Ibañez *et al.* 1988, Lafaille *et al.* 1989, Hoft *et al.*, 1989). Estas razones podrían explicar porque en zonas endémicas para malaria y Chagas no se ha observado reacción de sueros maláricos con este antígeno de *T. cruzi* (Lafaille *et al.*, 1989, y comunicación personal).

El antígeno JL9 es homólogo a una proteína de *T. brucei* asociada a microtubulos (MAP) (Fig. 22) de alto peso molecular (320 KD) que está constituida, como JL9, de repeticiones de 38 aa

(Schneider *et al.*, 1988) Las repeticiones de JL9 y MAP tienen un 63% de homología. Las MAPs se encuentran interconectando los microtúbulos del citoesqueleto formando un "esqueleto interno de membrana" que rodea todo el cuerpo de los Trypanosomas. (Seebeck *et al.* 1989). Su función sería la de estabilizar la unión de los microtúbulos entre sí, y entre los microtúbulos y la membrana plasmática. Las secuencias de la MAP de *T. brucei* y de *Trypanosoma cruzi* no tienen homología con otras MAPs; sin embargo, anticuerpos contra la MAP de *T. brucei* presentan reacción cruzada con una MAP porcina (Schneider *et al.*, 1988). El clon JL9 reacciona sólo con suero de pacientes con cardiopatía, y se demostró la presencia de anticuerpos anti-JL9 en la infección experimental murina (N. Kerner, M. Hontebeyrie, comunicación personal). En un estudio realizado por se localizó una proteína que reacciona con anticuerpos contra un antígeno homólogo a JL9 (A.36, Ibañez *et al.*, 1988) en el citoplasma, la superficie celular y el cuerpo basal, pero no se la encontró asociada a microtúbulos (Souto Padron *et al.*, 1989)

La expresión de un heterogéneo grupo de antígenos repetitivos es un fenómeno generalizado en aquellos parásitos que evaden persistentemente su destrucción por el sistema inmune del huésped. La alta inmunogenicidad de este tipo de repeticiones podría llevar a la hiperestimulación de la respuesta B hacia ellas, conllevando una respuesta menos eficiente hacia epítopos críticos (Kemp *et al.* 1987). Los datos sobre JL7, JL8 y JL9 indican que son de localización intracelular (Lafaille *et al.*, 1989, Schneider *et al.*, 1988). Souto Padron *et al.* (1990) localizaron antígenos homólogos a JL7 y JL8 en la región de unión del flagelo al cuerpo celular. La ruptura del parásito liberaría estos antígenos que podrían actuar como "cortina de humo" durante la infección (Kemp, 1987).

4.3. ANTICUERPOS CONTRA LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

4.3.1. Determinantes antigénicos del extremo C-terminal de la proteína ribosomal P de *T. cruzi* JL5, definidos por anticuerpos de Chagas y Lupus eritematoso sistémico.

Las experiencias con sueros de pacientes caracterizados muestran cierta asociación entre el título anti-JL5 y la cardiopatía chagásica. Los datos moleculares e inmunológicos señalan que JL5 codifica para el extremo C-terminal de una proteína P ribosomal de *T. cruzi*.

Las proteínas ribosomales P o fosfoproteínas ribosomales son un grupo de proteínas ácidas conocidas como L12/L7 en *E. coli*; en eucariotes se las conoce como P0, P1 y P2. Forman parte de el tallo o pedunculo de la subunidad mayor de los ribosomas, y se encuentran involucradas en la interacción con el factor de elongación EF1 y EF2 y se requieren para la union del aminoacil-ARN de transferencia y para la hidrólisis de GTP dependiente de EF2 (Liljas *et al.*, 1986; Rich y Steitz, 1987). Las tres proteínas P eucarioticas tienen un determinante antigénico común (Towbin *et al.*, 1982) que se mapeó en el extremo C-terminal de las tres proteínas (Elkon *et al.*, 1986). El extremo C-terminal está conservado entre las especies. El péptido parasitario de JL5 tiene todas las características de las proteínas ribosomales P (ver 3.4.7.). Además, recientemente se comprobó en nuestro laboratorio que los anticuerpos anti-JL5 reaccionaron con ribosomas purificados de *T. cruzi* (G. Levitus, tesis en preparación).

El extremo C-terminal de JL5 es homólogo al epitope reconocido por los autoanticuerpos anti- proteínas ribosomales P humanas de lupus eritematoso sistémico (LES) (Elkon *et al.*, 1988). De acuerdo con los criterios inmunoquímicos sobre la localización de de-

terminantes antigénicos en proteínas (Ver 1.5.3 y Van Regenmortel & De Marcillac, 1988) se predijo la localización de un epítope secuencial de JL5 en el extremo carboxilo-terminal. Comparando la reactividad anti-JL5 de sueros chagásicos con la reactividad anti-R-13 (ver 3.5.1 y Fig 27), se demostró que el péptido sintético R-13 define un epítope secuencial involucrado en la reactividad de JL5 con sueros chagásicos. Existe correlación entre títulos anti-JL5 y anti-R-13 ($P < 0.01$), y los títulos anti-R-13 están incrementados en ECCh.

Podría sugerirse que los anticuerpos anti-R-13 son un marcador serológico que se asocia con el daño cardíaco en individuos infectados; sin embargo es necesario ampliar estos resultados a un número mayor de pacientes para confirmar la utilidad diagnóstica o pronóstica de esta especificidad, trabajo actualmente en curso en el laboratorio. El test de ELISA utilizando el péptido sintético constituye un avance dado que es posible analizar un gran número de sueros de pacientes con buena reproducibilidad.

El mapeo fino del epítope R-13 con sueros chagásicos mostró la existencia de por lo menos dos epítopes. Un epítope localizado dentro de los 7 residuos C-terminales y un segundo epítope cuya reactividad depende de la presencia de los tres residuos glu de R-13 (Fig. 28). Dado que R-13 inhibe sólo parcialmente la reacción de los sueros chagásicos con la proteína de fusión JL5, se concluye que además del epítope secuencial definido por R-13, debería existir otro epítope en JL5, probablemente conformacional, definido por los sueros de pacientes chagásicos (ver Fig. 30 y 31).

Existen otras evidencias que prueban que R-13 define el epítope secuencial carboxiterminal de JL5 y la probable existencia un segundo epítope. En nuestro laboratorio se clonaron y expresaron separadamente los 15 residuos hidrofílicos C-terminales de JL5 y

la zona N-terminal de JL5 rica en alaninas. Los sueros que reaccionaron con JL5 no reaccionaron con el clon que expresa la región rica en ala sino sólo con aquel que contiene la región C-terminal. La reactividad hacia el clon C-terminal fue menor que con JL5, para los sueros de los pacientes chagásicos estudiados, indicando que al "cortar" JL5 se pierde un segundo epítope distinto al C-terminal (Levin *et. al*, 1990).

Las experiencias realizadas con sueros de LES mostraron que los autoanticuerpos anti-P reconocen tanto la proteína de fusión JL5 como el péptido R-13. El mapeo fino mostró que los autoanticuerpos anti-P definen en R-13 epítopes similares a los definidos por los anticuerpos chagásicos. La reactividad anti-P estaba dirigida, preferentemente, hacia el epítope definido por R-7. Los experimentos de inhibición demostraron que la reacción de anticuerpos anti-P de LES con la proteína de fusión JL5 es completamente inhibida por R-13 indicando que los anticuerpos anti-P reconocen sólo la parte C-terminal de JL5. Magsaam *et al.* (1989), demostraron la existencia de un sólo epítope, el C-terminal, sobre la proteína P2 humana clonada. Estos datos confirman que el epítope de JL5, no definido por R-13, sería específico de la respuesta a la infección por *T. cruzi* mientras que el epítope definido por R-13 es altamente conservado y define la especificidad de anticuerpos anti-P comunes a LES y Chagas (Fig 30 y Fig 31).

Estos resultados sugieren que un porcentaje variable de anticuerpos anti-JL5, los anti-R-13, estarían en condiciones de presentar reacción cruzada con proteínas P humanas. En efecto, experiencias realizadas por G. Levitus de nuestro laboratorio demostraron que los anticuerpos inmunoseleccionados por la proteína de fusión JL5 reaccionaron con proteínas ribosomales P humanas. La intensidad de la reacción fue proporcional al título anti-R-13 del suero chagásico utilizado (G. Levitus, Tesis en preparación).

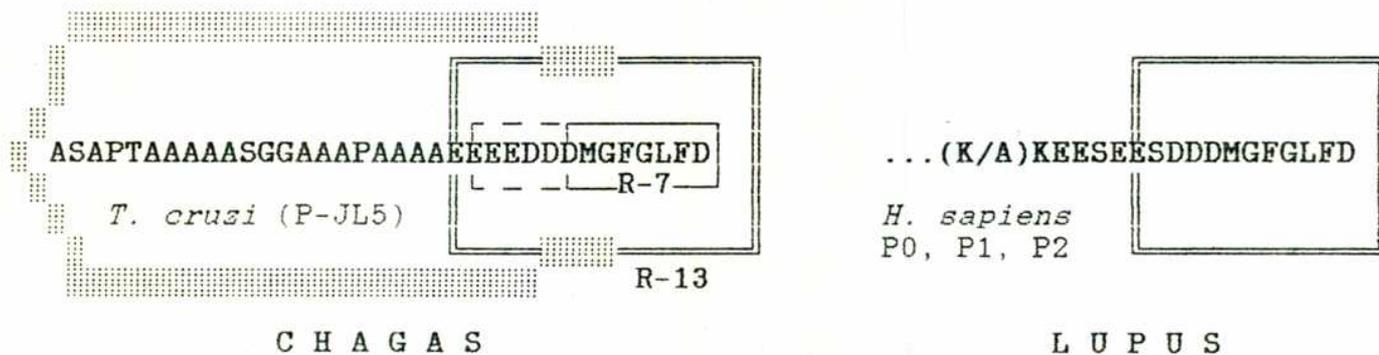


Figura 31: Epitopes P ribosomales definidos por anticuerpos anti-P de LUPUS y CHAGAS:

□ epitopes secuencial cross reactivo definido por la especificidad anti-P común a LES y Chagas , □ sub-epitopes secuenciales. ■ epitope conformacional de P (JL5), específico de la infección chagásica.

Para sintetizar los resultados del mapeo antigénico de JL5 con sueros de Chagas y LES, en la figura 31 se compara la estructura antigénica del epítoto ribosomal P humano definido por los anticuerpos de LES en el extremo C-terminal de las P0, P1 y P2 (Elkon *et al.*, 1988), con el epítoto ribosomal P de *T. cruzi* que definen los anticuerpos anti-JL5 y se muestra la localización de los epítopes P homólogos que presentarían reactividad cruzada y que definen la especificidad de anticuerpos anti-P comun a ambas enfermedades..

4.3.2. Origen de los anticuerpos anti-P en enfermedad de Chagas

Para analizar los distintos factores que puedan dar origen a los anticuerpos anti-P en Chagas conviene remitirse al capítulo 1.3.2.3. de la Introducción donde se discuten los probables

mecanismos iniciadores de la autoinmunidad, los que se esquematizan en la parte superior de la Figura 3 del mismo capítulo.

Considerando la antigenicidad de JL5 en la infección chágasica y la reactividad inmunológica cruzada entre los epítopes homólogos del extremo C-terminal de la proteína P de *T. cruzi* y del huésped, la causa mas probable del origen de los anti-P en Chagas sería el mimetismo molecular. El sistema inmune del huésped reconocería al epítoto C-terminal de JL5 como extraño, y los anticuerpos producidos reaccionarían contra el epítoto del huésped.

La presencia en JL5 de un epítoto específico de la infección chagásica generaría una respuesta inmune que termina reaccionando con el epítoto C-terminal de JL5 (R-13), homólogo al del huésped, hacia el cual el sistema inmune sería en principio tolerante. Otra alternativa para explicar la ruptura de la tolerancia hacia el epítoto definido por R-13 sería la presencia de un epítoto T

(reconocido por L_{Tn}) en la zona N-terminal de JL5 (rica en ala), o en la región N-terminal de proteína P de *T. cruzi* (P-JL5, Schijman *et al.*, 1990). La correlación significativa entre los títulos anti-JL5 y anti-R13 tiende a sustentar estas hipótesis. Finalmente, sin considerar los sueros que no reaccionan con R-13 (sueros H10 y H11 Tabla X), se obtiene cierta correlación entre los títulos anti-R-13 y anti- *Trypanosoma cruzi*, lo que sugiere que la reactividad anti-parásito juega un rol en el origen de los autoanticuerpos anti-P de Chagas.

Los auto-anticuerpos anti-P no se han podido detectar en otras enfermedades parasitarias, por ejemplo en malaria (Bonfa *et al.*, 1987), si bien, el *Plasmodium falciparum* tiene proteínas ribosomales P que reaccionan con los anticuerpos anti-P de sueros lúpicos (Francoeur *et al.*, 1984).

Las evidencias tienden a demostrar el papel del mimetismo molecular en el origen de los anticuerpos anti-P en la enfermedad de Chagas, sin embargo existen otros mecanismos que podrían favorecer la su inducción ver figura 3 y 1.2.3.2.3). En en el modelo murino de la enfermedad se comprobó una desregulación del sistema inmune en la etapa aguda, con proliferación policlonal B y T que perdura hasta los estadios crónicos de la enfermedad (D'Imperio Lima *et al.*, 1985, 1986). La mayor parte de las células plasmáticas producidas durante esta estimulación policlonal son autorreactivas (Minoprio *et al.*, 1989b) (Ver 1.2.3.2.3.); además se demostró que la estimulación policlonal es capaz de inducir *in-vitro* e *in-vivo* la producción de numerosos autoanticuerpos con una especificidad comparable a la observada en pacientes lúpicos (Dziarski, 1988).

Otras modificaciones que ocurren durante la infección chagásica (ver Fig 3 y 1.2.3.2.3.) favorecerían la estimulación antigénica específica por reactividad inmunológica cruzada entre epitopes P.

Así, la expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase II en la superficie de los miocitos durante la infección (Cabeza-Meckert *et al.*, 1990) podría facilitar el reconocimiento inmunológico de las proteínas P del huésped. Los linfocitos anti-P que podrían activarse serían estimulados crónicamente por la exposición de proteínas P debida a ruptura de parásitos y de células propias. Apoyando esta idea, en cooperación con el grupo del Dr. Laguens (Catedra de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP) se demostró la existencia de un número mayor de células productoras de anticuerpos anti-R-13 en los infiltrados inflamatorios del miocardio de ratones infectados crónicos, comparado con el encontrado en los bazo de los mismos ratones. Este resultado indicaría una mayor estimulación antigénica por parte de los epítopes P en las cercanías de las lesiones inflamatorias.

4.3.3. Autoanticuerpos anti-P e inmunopatología.

Los autoanticuerpos anti-P en la enfermedad de Chagas son los primeros comunes a una enfermedad autoinmune (LES) y la enfermedad de Chagas que se han caracterizado. Autoanticuerpos contra antígenos intracelulares se producen en algunas infecciones parasitarias, bacterianas o virales (Shoenfeld *et al.* 1988, Argov *et al.*, 1989) y son marcadores característicos de enfermedades autoinmunes (Tan *et al.*, 1988, Wittingham *et al.*, 1988). Los anticuerpos contra la proteínas P ribosomales son específicos de LES (Elkon *et al.*, 1984). Se encuentran asociados a patologías del SNC como la psicosis lúpica, y a patologías musculares (Bonfa y Elkon 1986, Bonfa *et al.*, 1987b). En un estudio prospectivo de cuatro pacientes con psicosis lúpica se verificó un incremento selectivo del título anti-P concomitante con el comienzo de los episodios psicóticos. Los títulos anti-P volvieron a valores basales una vez superado el episodio. En pacientes lúpicos anti-P seropositivos sin psicosis el nivel anti-P se mantuvo invariable incluso durante la manifestación de otras patologías lúpicas

(Bonfa *et al.*, 1987b). Además, los anti-P se detectaron en el líquido céfalorraquídeo de pacientes lúpicos con episodios psicóticos (Golombek *et al.*, 1986) y pudo verificarse la inhibición de la síntesis proteica en células microinyectadas con anticuerpos anti-P. No obstante estas evidencias, el rol patogénico de estos autoanticuerpos en esta patología es motivo de controversias. Los anticuerpos anti-P podrían estar involucrados en la ruptura de la barrera hematoencefálica, o en la producción anticuerpos anti-idiotípicos que reaccionen con la superficie celular (Bonfa *et al.* 1987b). Otros autoanticuerpos de LES, los anti-Ro y anti-La están asociados al bloqueo cardíaco congénito de neonatos con madres lúpicas; se postula que estos podrían ser transferidos transplacentariamente por la madre y causar la destrucción del sistema de conducción del corazón neonato (Buyon *et al.* 1989).

Resulta difícil adjudicar un rol patogénico a los anti-P en la enfermedad de Chagas; sin embargo, se ha informado que autoanticuerpos contra antígenos intracelulares reaccionan con componentes de la superficie celular (anti-ADN, Jacob *et al.*, 1986). Otro ejemplo es el de los autoanticuerpos contra proteínas intracelulares de corazón que reaccionan contra la superficie de los cardiocitos modificando su permeabilidad, efecto altamente patogénico (Schulteiss *et al.*, 1988). Especulativamente se podría proponer que los anti-P de Chagas podrían reaccionar con la superficie de cardiocitos o que anticuerpos antiidiotipo anti-P reconozcan algún antígeno de superficie, como se ha comprobado en la inducción experimental de auto-anticuerpos anti-receptor de acetilcolina (Cleveland *et al.*, 1983). Es de hacer notar que la respuesta antiidiotípica celular y humoral en Chagas estaría asociada a la cardiopatía (ver 1.3.3.4).

Dejando la especulación, existen evidencias que relacionan la respuesta hacia antígenos ribosomales y la patología chagásica. Ratones y conejos inmunizados con fracciones ribosomales de *T.*

cruzi desarrollaron patologías similares a las observadas en ratones infectados crónicos, con infiltrados inflamatorios en el miocardio (ver 1.3.3.) (Ruiz *et al.*, 1985, Teixeira y Santos Buch, 1975). En esta dirección adquieren relevancia los resultados que indican la existencia de un alto número de células secretoras de anticuerpos anti-R-13 en lesiones cardíacas de ratones infectados crónicos (ver mas arriba). Estos anticuerpos podrían participar o coadyuvar en la producción de lesiones inflamatorias a través de alguno de los mecanismos patológicos mediados por autoanticuerpos descritos para la enfermedad de Chagas (1.2.3.2, Laguens *et al.*, 1988; Molina *et al.*, 1986).

Considerando las evidencias sobre el origen autoinmune de la enfermedad de Chagas llama la atención que los títulos anti-R-13 sean mayores en los pacientes con enfermedad cardíaca de Chagas. Esto sustenta la hipótesis sobre la relación de los desórdenes autoinmunes con la cardiopatía chagásica. El estudio del origen de los anticuerpos anti-P en Chagas, donde el agente etiológico y el estímulo antigenico serían conocidos, puede aportar evidencias que sirvan para elucidar el origen de los anticuerpos anti-P en el Lupus eritematoso sistémico (Bonfa *et al.*, 1987, Elkon *et al.*, 1988, Tan *et al.*, 1988, Magsaam *et al.*, 1989).

5. CONCLUSIONES

Conclusiones

- 1)-En el presente trabajo de Tesis se ha presentado una estrategia de clonado de expresión en λ gt11 de antígenos de *Trypanosoma cruzi* que ha resultado útil tanto para la identificación de antígenos como para el estudio de diferencias serológicas entre las distintas formas clínicas de la enfermedad cardíaca de Chagas.
- 2)-El estudio de la reactividad de los antígenos recombinantes con sueros de pacientes chagásicos clínicamente caracterizados ha permitido clasificar a los antígenos en dos grupos: a) Los que reaccionan con los sueros de todos los infectados, JL7 y JL8 (clones diagnósticos de infección) b) Aquellos que reaccionan prevalentemente con el suero de pacientes con enfermedad cardíaca de Chagas (antígenos codificados por el ADNc de JL5, JL9, JL52, JL43 y JL1).
- 3)-Los resultados obtenidos con un reducido grupo de pacientes mostraron una correlación entre altos títulos anti-JL5 y la cardiopatía chagásica; sugiriendo que esta reactividad serológica podría resultar de potencial utilidad en el diagnóstico y/o pronóstico de la cardiopatía Chagásica.
- 4)-Para dosar la reactividad serológica de los clones se han desarrollado dos técnicas, una técnica semicuantitativa que utiliza los antígenos producidos por los fagos recombinantes transferidos a nitrocelulosa; y una técnica de ELISA totalmente cuantitativa y compatible con la tecnología disponible en laboratorios de análisis clínicos de rutina.

Conclusiones

- 5)-Los antígenos JL7 y JL8 están compuestos por secuencias repetitivas de aminoácidos, están altamente conservados entre distintas cepas de *T. cruzi* y reaccionan con sueros de individuos infectados de todas las regiones de América estudiadas. Como no son reconocidos por individuos infectados con *Leishmania sp.* son buenos candidatos para elaborar un test diagnóstico de la infección chagásica crónica.
- 6)-El antígeno codificado por el ADNc de JL9, que reacciona sólo con algunos sueros ECChc, está compuesto por repeticiones de 38 aminoácidos y es homólogo a una proteína de *Trypanosoma brucei* asociada a microtúbulos.
- 7)-El ADNc del clon JL5 codifica para los 35 aminoácidos carboxilo-terminales de una proteína ribosomal P de *T. cruzi*. Los 13 residuos Carboxilo-terminales de JL5 son homólogos al epitope definido por los autoanticuerpos anti-P de Lupus eritematoso sistémico (LES).
- 8)-El mapeo antigénico de JL5 con sueros de LES y Chagas, utilizando péptidos sintéticos C-terminales de JL5, demostró la existencia de dos epitopes: a-Un epitope lineal contenido en los 13 residuos C-terminales de JL5 que define la especificidad de anticuerpos anti-P comun a Lupus y Chagas; se comprobó además que los títulos de anticuerpos anti-P definidos por R-13 están significativamente incrementados en ECCh. b- Un epitope conformacional, específico de la infección por *T. cruzi*. Estos hallazgos han permitido iniciar el estudio de los anticuerpos anti-P en la enfermedad de Chagas.

Conclusiones

- 9)-La reactividad cruzada de los anticuerpos anti-P de LES con la proteína P de *T. cruzi*, y la homología entre los epitopes del parásito y del huesped sugiere que el origen de los anticuerpos anti-P (anti-R-13) en Chagas seria a través de un mecanismo de mimetismo molecular.

- 10)-Considerando que los anticuerpos anti-P en LES, una enfermedad autoinmune tipo, son marcadores de patología y las evidencias existentes acerca del rol de la autoinmunidad en la patogénesis de la cardiopatía Chagásica; la prevalencia de altos títulos anti-R-13 en ECChc sustenta la hipótesis sobre la relación de los desórdenes autoinmunes con la cardiopatía chagásica.

6. BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

- Acosta AM, Sadigurski M, Santos Buch CA. (1983) Anti-striated muscle antibody activity produced by *Trypanosoma cruzi*
- Acosta AM, Santos-Buch CA. (1985). Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation* 71:1255-1261.
- Affranchino JL, Ibañez CF, Luquetti AO, Rassi A, Reyes MB, Macina RA, Aslund L, Petterson U, Frasc ACC. (1988) Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 34: 221-228.
- Alcina A, Hargreaves AJ, Avila J, Fresno M. (1986) A *Trypanosoma cruzi* monoclonal antibody that recognizes a superficial tubulin-like antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139:1176-1183.
- Alvarez M, Cerisola JA, Rohweder R. (1968) Test de inmunofluorescencia para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. Parasitol.* 23:4-9.
- Amons, R., Pluijns, W. & Moller, W. (1979) The primary structure of ribosomal protein eL12/eL12-P from *Artemia salina* 80S ribosomes. *FEBS Lett.* 104, 85-89.
- Amons, R., Pluijns, W., Kriek, J. & Möller, W. (1982) The primary structure of ribosomal protein eL12'/eL12'-P from *Artemia salina* 80S ribosomes. *FEBS Lett.* 146, 143-147.
- Andrade ZA. (1983) Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. *In* : *Cytopathology of parasitic disease*. Ciba Found Symp. 99:214-233.
- Andrade ZA. (1985) A patologia da doença de Chagas no homem. *Ann. Soc. belge Med. trop.* (Supl 1) 65:15-30
- Andrade ZA, Andrade SG. (1980) A patologia da doença de Chagas experimental no cão. *Mem. Inst. Oswaldo cruz.* 75:77-95
- Araujo FG. (1982) Detection of circulating antigens of *Trypanosoma cruzi* by enzyme immunoassay. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 76:25-36.
- Araujo FG, Heilman B, Tighe L. (1984) Antigens of *Trypanosoma cruzi* detected by different classes and subclasses of antibodies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78:672-677.
- Araujo FG. (1985) *Trypanosoma cruzi*: expression of antigens on the membrane surface of parasitized cells. *J. Immunol.* 135:4149-4154.

Bibliografía

- Argov S, Jaffe CL, Krupp, Slor H, Shoenfeld Y. (1989) Autoantibody production by patients infected with *Leishmania*. Clin. Exp. Immunol. 76:190-197.
- Ashall F, Yip-Chuck DAM, Luquetti AA, Miles MA. (1988) Radiolabeled total parasite DNA probe specifically detects *Trypanosoma cruzi* in mammalian blood. J. Clin. Microbiol. 26:576-578.
- Avila JL, Rojas M, Rieber M. (1984) Antibodies to laminin in American cutaneous leishmaniasis. Infect. Immun. 43:402-406.
- Avila JL, Rojas M, Towbin H. (1988) Serological reactivity against galactosyl- $\alpha(1-3)$ galactose in sera from patients with several kinetoplastida infections. J. Clin. Microbiol. 26:126-132.
- Avila JL, Rojas M, Galili U. (1989) Immunogenic Gal1 α 13Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic american *Trypanosoma* and *Leishmania*. J. Immunol. 142: 2828-2834.
- Aviv H, Leder P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligo-thymidilic acid cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. 69:1408-1412..
- Ben Younnes-Chennoufi A, Hontebeyrie Joskowicz M, Tricottet V, Eisen H, Reynes M, Siad G. (1988) Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82:
- Bonfa E, Elkon KB. (1986) Clinical and serological associations of the antiribosomal P protein antibody. Arthritis Rheum. 29, 981-985.
- Bonfa E, Llovet R, Scheinberg M, De Souza JM, Elkon KB. (1987a). Comparison between autoantibodies in malaria and leprosy with lupus. Clin. Exp. Immunol. 70:529-537.
- Bonfa E, Golombek SJ, Kaufman LD, Skelly S, Weissbach H, Brot N, Elkon KB. (1987b) Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. N. Eng. J. Med. 617:265-271.
- Borda E, Pascual J, Cossio P, de la Vega M, Arana RM, and Sterin-Borda L. (1984) A circulating IgG in Chagas' disease which binds to β -adrenoreceptors and modulate their activity. Clin. Exp. Immunol. 57:679-686.
- Borst P. (1986) Discontinuous transcription and antigenic variation in Trypanosomes. Ann. Rev. Biochem. 55:701-732.

Bibliografía

- Bracco MME, Sterin-Borda L, Fink S, Finiasz M, Borda E. (1984) Stimulatory effect of lymphocytes from Chagas' patients on spontaneously beating rat atria. *Clin. Exp. Immunol.* 55:405-
- Brener Z. (1973). The biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.* 27:347-383.
- Brener Z. (1985) Relacoes parásita hospedeiro na doença de Chagas: mecanismo de infeccao e doença. *Ann. Soc. belge Med. Trop.* 65:9-13.
- Brener Z. (1987) Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82 (Supl I):205-213.
- Brener Z, Ramirez JC. (1985). Modelo crónico da doença de Chagas experimental *in* Cardiopatia Chagásica. Cancado JR and Chuster M. eds. *Fund. Carlos Chagas* (Belo Horizonte, MG, Brasil) pp 23-28.
- Bréniere SF, Carrasco R, Revollo S, Aparicio G, Desjeux P, Tibayrenc M. (1989) Chagas' disease in Bolivia: Clinical and epidemiological features and zymodeme variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41:521-529.
- Briand JP, S Muller, and MHV Van Regenmortel. (1985) Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J. Immun. Meth.* 78:59-69.
- Buyon JP, Ben-Chetrit B, Karp S, Roubey RAS, Pompeo L, Reeves WH, Tan EM, Winchester R. (1989). Acquired congenital heart block: Pattern of maternal antibody response to biochemically defined antigens of the SSA/Ro-SSB/La system in neonatal lupus. *J. Clin. Invest.* 84:627-634.
- Cabeza-Meckert P, Hontebeyrie-Joskowicz M, Levin MJ, Laguens RP. (1990) *Trypanosoma cruzi*: Aberrant expression of class II major histocompatibility complex molecules in skeletal muscle fibers of chronically infected mice. Enviado para su publicación.
- Cabral HRA. (1969) Los mecanismos patogénicos del daño tisular en la enfermedad de Chagas. *Rev. Fac. Cienc. Med. Univ. Nac. Córdoba.* 27:287-309.
- Camargo ME. (1966) Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 8:227-234.
- Cancado JR. (1985) Tratamento específico. Cancado JR and Chuster M. eds. *Fund. Carlos Chagas* (Belo Horizonte, MG, Brasil) pp 325-355.

Bibliografía

- Castro C, Hernández R, Castañeda H. (1981) Trypanosoma cruzi ribosomal RNA: Internal break in the large molecular mass species and number of genes. Mol. Biochem. Parasitol. 2, 219-233.
- Cerisola JA, Alvarez M, de Martini GJW, Bonacci. (1971) La reacción de hemaglutinación cualitativa para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bioquímica Clínica 5:94-99.
- Cerisola JA, Rosebaum MB. (1958) La reacción de fijación de complemento para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. I. Técnica. Prensa Med. Arg. 45: 1551-1557
- Cerisola JA, Rabinovich A, Alvarez M, di Corletto CH, Pruneda J. (1972). Enfermedad de Chagas y transfusion de sangre. Bol. Of. Sanit. Panam. 73:203-221.
- Chagas C. (1909). Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, N. Gen. N. sp., o agente etiológico de nova entidade morbida no homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1:159-218.
- Chambo JG, Cabeza Meckert P, Laguens RP. (1989) Enumeración de células productoras de anticuerpos anti-miocardio y anti-*T. cruzi* en el corazón y bazo de ratones con enfermedad de Chagas crónica. Reunión Anual S.A.P. pp10.
- Chiale P, Pezybilzki J, Laino R, Halpern S, Sanchez R, Gabrieli A, Elizari M, Rosebaum MB. (1982a). Electrocardiographic changes evoked by Ajmaline in chronic Chagas' disease without manifest myocarditis. Am. J. Cardiol. 49: 14-19.
- Chiale P, Halpern MS, Nau GJ, Przybylski J, Tambussi AM, Lazzari, JO, Elizari MV, Rosenbaum MB. (1982b) Malignant ventricular arrhythmias in chronic chagasic myocarditis. PACE 5:162-172.
- Chiale P, Rosebaum MB. (1987) Clinical and Pharmacological Characterization and Treatment of Potentially Malignant Arrhythmias of Chronic Chagasic Cardiomyopathy. In: E.M. Vaughan Williams and T.J. Campbell, eds. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin: Springer Verlag, 1989:601-620.
- Cicarelli RMB, Lopes JD. (1989) Characterization of a protein from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes that cleaves non-immune IgG bound through its Fab fragment. J. Immunol. 142:1685-1690.
- Clarke JL, Miles MA. (1989) Immunoselection of cDNA clones encoding diagnostic antigens: A *Trypanosoma cruzi* specific antigen contains a 7 aminoacid tandem repeat. J. Cell. Biochem. Supl 13E:100.

Bibliografía

- Cleveland WL, Wasserman NH, Sarajangan R, Penn AS, Erlanger BF (1983) Monoclonal antibodies to the acetylcholine receptor by a normally functioning auto-anti-idiotypic mechanism. *Nature* 305:56-57.
- Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomas N, Barbosa HS, Mirelles MNL, Goldemberg S. (1988) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83:123-133.
- Cossio P, Bustuabad O, Paternó E, Iotti R, Casanova MB, Podestá MR, Bolomo N, Arana RM, Pasqualini CD. (1984) Experimental myocarditis induced in Swiss mice by homologous heart immunization resembles chronic experimental Chagas' heart disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 33:165-175.
- Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Krentzer E, Candiolo B, Arana RM. (1974) Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* 49:13-21.
- Cossio PM, Laguens RP, Kreutzer E, Diez C, Segal A, Arana RM. (1977) Chagasic cardiopathy: Immunopathologic and morfologic studies in myocardial biopsies. *Am. J. Pathol.* 86: 533-540
- D'A Gusmão RA, Rezende JM, Rassi A, Gam AA, Neva FA. (1982) Antibody levels to *Trypanosoma cruzi* in infected patients with and without evidence of Chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31:452-458.
- D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A, Kipnis T, Eisen H. (1985) Very large and isotypically atypical polyclonal antibody production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Immunol.* 15: 201-.
- D'Imperio Lima, M.R., H. Eisen, P. Minoprio, M. Joskowicz, and A. Coutinho. (1986). Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas disease. *J. Immunol.* 137:353-356.
- De Arruda M, Colli W, Zingales B. (1989) Terminal β -D-galactofuranosyl epitopes recognized by antibodies that inhibit *Trypanosoma cruzi* internalization into mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 182:413-421.
- De Lisi C, Berzofsky JA. (1985) T-cell antigenic sites tend to be amphipatic structures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:7048-7052
- De Titto EH. (1982) Regulación de la respuesta inmune en Enfermedad de Chagas. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, F.C.E. y N.

Bibliografía

- De Titto EH, Braun M, Lazzari JO, Segura EL. Cell-mediated reactivity against human and *Trypanosoma cruzi* antigens according to clinical status in Chagas' disease patients. *Immunol. Lett.* 1985; 9:249-254
- Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Arana RM, Cossio PM. (1976) Asociación entre cardiopatía y serología positiva para tripanosomiasis americana en en área de la argentina endémica para enfermedad de Chagas. *Medicina* 36:299-233.
- Dragon EA, Sias SR, Kato EA, Gabe JD. (1987) The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. *Mol. Cell. Biol.* 7:1271-1275.
- Dyrberg T, Oldstone MBA. (1986) Peptides as probes to study molecular mimicry and virus induced autoimmunity. *Current Topics Microbiol. Immunol.* 130:25-37.
- Dziarski R. Autoimmunity: polyclonal activation or antigen induction?. *Immunol. Today.* 1988; 9:340-342.
- Elkon K, Bonfa E, Llovet R, Danho W, Weissbach H, Brot N. (1988) Properties of the ribosomal P2 protein autoantigen are similar to those of foreign protein antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:5186-5189.
- Elkon KB, Parnassa AP, Foster CL. (1985) Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. *J. Exp. Med.* 162, 459-471.
- Elkon KB, Skelly S, Parnassa AP, Moller W, Danho W, Weissbach H, Brot N. (1986) Identification and chemical synthesis of a ribosomal protein antigenic determinant in systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:7419-7423.
- Engman DM, Sias SR, Gabe JD, Donelson JE, Dragon EA. (1989) Comparison of *HSP70* genes from two strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37:285-288.
- Ferguson MAJ, Allen AK, Snary D. (1983) Studies on the structure of a fosfoglycoprotein from the parasite protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 213:313-319.
- Francoeur AM, Peebles CL, Heckman KJ, Lee JC, Tan EM. (1985) Identification of ribosomal protein autoantigens. *J. Immunol.* 135:2378-2384.
- Fujinami RS, Oldstone MBA. (1985) Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230:1043-1045.

Bibliografía

- Gattas CR, Lima MT, Nóbrega AF, Barcinski MA, Dos Reis GA. (1988) Do self reactive T cells expands in *Trypanosoma cruzi*-immune hosts? *Infect. Immun.* 56:1402-1405.
- Gazzinelli RT, Galvão LMC, Cardoso JE, Cancado JR, Krettli AU, Brenner Z, Gazzinelli G. (1988 a) Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-laminin antibodies in Chagasic patients after specific treatment. 26:1795-1800.
- Gazzinelli RT, Morato MJF, Nunes RMB, Cancado JR, Brenner Z, Gazzinelli G. (1988 b) Idiotype stimulation of lymphocytes from *Trypanosoma cruzi* infected patients. *J. Immunol.* 140: 3167-3172.
- Gazzinelli RT, Leme VMC, Cancado JR, Gazzinelli G, Scharfstein J. (1988 c) Identification of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T-cells and immune sera from chagasic patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Supl I)* 83:272-279
- Golombek SJ, Graus F, Elkon KB. (1986) Autoantibodies in the cerebrospinal fluid of patients with systemic lupus erithematosus. *Arthritis Rheum.* 29:1090-1097.
- Gonzales A, Lerner TJ, Huecas M, Sosa-Pineda B, Nogueira N, Lizardi PM. (1985) Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucl. Ac. Res.* 13:-
- Grogl M, Kuhn R. (1984) Identification of antigens of culture forms of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* recognized by sera from patients with chronic Chagas disease. *J. Parasitol.* 70:822-824.
- Gubler U, Hoffman JB. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269.
- Gruber A, Zingales B. 1989. Cloning and characterization of two genes of *Trypanosoma cruzi* coding for antigens which contains tandem aminoacid repeats. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84 (supl II):52.
- Harell-Bellan A, Joskowicz M, Fradelizi D, Eisen H. (1983) Modification of T-cell proliferation and IL-2 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 3466-3469.
- Hall R, Hyde JE, Goman M, Simmons DL, Hope IA, Mackay M, Scaife J, Merkli B, Richle R, Stoker J. (1984) Major surface antigen gene of a human malaria parasite cloned and expressed in bacteria. *Nature* 311:379-382.

Bibliografía

- Hoff R, Boyer MH. (1985) Immunology of Chagas' disease In Immunology and pathogenesis of trypanosomiasis. Tizard I. ed. CRC Press. Boca Ratón Fla. pp185-199.
- Hoft DF, Kim KS, Otsu K, Moser D, Yost WJ, Blumin JH, Donelson JE, Kirchhoff LV. (1989) *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. Infect. Immun. 57:1959-1967.
- Hontebeyrie-Joskowicz M, Said G, Milon G, Marchal G, Eisen H. (1987) L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas disease. Eur. J. Immunol. 17:1027-1033.
- Hudson L, Britten V. (1985) Immune response to South American trypanosomiasis and its relationship to Chagas' disease. Br. Med. Bull. 41:175-180.
- Hudson L, Hindmarsh PJ. (1985) The relationship between autoimmunity and Chagas disease: causal or coincidental? Current Topics Microbiol. Immunol. 117:167-177.
- Hudson L. (1983) Immunopathogenesis of experimental Chagas' disease in mice: damage to the autonomic nervous system. Ciba Found. Symp. 99:234-251.
- Huynh TV, Young RA, Davis RW. Constructing and Screening cDNA Libraries in λ gt10 and λ gt11. In: D.M. Glover ed. DNA cloning techniques: a practical approach. Oxford: IRL Press, 1985:49-78.
- Ibañez CF, Affranchino JL, Macina RA, Reyes MB, Leguizamon S, Camargo ME, Aslund L, Pettersson U, Frasch ACC. (1988) Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. Mol. Biochem. Parasitol 30, 27-34.
- Israelski D, Sadler R, Araujo FG. (1989) Antibody response and antigen recognition in human infection with *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39:445-455.
- Itoh T. (1981) Primary structure of an acidic ribosomal protein YPA1 from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 671, 16-24.
- Jacob L, Lety MA, Bach JF, Louvard D. (1986) Human systemic lupus erithematosus sera contain antibodies against cell surface protein(s) that share(s) epitope(s) with DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 6970-6974.
- Jaffé R, Jaffé WG, Kosma C. (1959) Experimentelle Herzveränderungen durch organespezifische Auto-antikörper. Frankf. Ztschr. Path. 70:235-345.

Bibliografía

- Jaffé R, Dominguez A, Kosma C, Gavaller B. (1961) Bemerkungen zur Pathogenese der Chagas Krankheit. Ztschr. Tropenmed. Parasitol. 21: 137-146.
- Joiner K, Hieny S, Kirchhoff LV, Sher A. (1985) gp72, the 72 kilodalton glycoprotein, is the membrane acceptor site for C3 on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. J. Exp. Med. 161:1196-1212.
- Joskowicz, M. 1985. Maladie de Chagas et autoimmunité. Med. Sci. (Paris) 1:412-418.
- Kemp DJ, Coppel RL, Anders RF. (1987) Repetitive proteins and genes of malaria. Ann. Rev. Microbiol. 41:181-208.
- Khoury EL, Ritacco V, Cossio PM, Laguens RP, Szarfman A, Diez C, Arana RM. (1979) Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). Clin. Exp. Immunol. 36:8-15.
- Khoury EL, Diez C, Cossio PM, Arana RM. (1983). Heterophil nature of EVI antibody in *Trypanosoma cruzi* infection. Clin. Immunol. Immunopathol. 27:283-288..
- Kipnis TL, David JD, Alper JD, Sher A, Díaz da Silva W. (1981) Enzymatic treatment transforms tripomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. Proc. natl. Acad. Sci. 78: 602-605.
- Kipnis TL, Krettli AU, Diaz da Silva W. (1985) Transformation of tripomastigote bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into activators of the alternative complement pathway by immune IgG fragments. Scand. J. Immunol. 22:217-226.
- Kirchhoff LV, Kim KS, Engman DM, Donelson JE. (1988) Ubiquitin genes in Trypanosomatidae. J. Biol. Chem. 263:12698-12704.
- Kierszbaum, F. 1986. Autoimmunity in Chagas' disease. J. Parasit. 72:201-211.
- Kierszbaum F, Howard JG. (1976) Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infections: the importance of antibodies and antibody forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. J. Immunol. 116: 1208-
- Kierzsebaum F, Pienkowski MM. (1979) Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. Infect. Immun. 24: 117-xx
- Köberle F. (1968) Chagas' disease and Chagas syndrome: The pathology of American Trypanosomiasis. Adv. Parasitol. 6:63-116.

Bibliografía

- Kornblihtt AR, Vibe-Pedersen K, Baralle FE. (1984) Human fibronectin: Cell specific alternative m-RNA splicing generates polypeptide chains differing in the number of internal repeats. *Nucleic Acid Res.* 12:5853-5868.
- Kosma C. (1962) Ueber der Nachweis spezifischer Hertz autoantikörper bei der Chagas-Myokarditis. *Ztschr. Tropenmed. u. Parasitol.* 13:175-180.
- Krettli AU, Brener Z. (1982) Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* 128:2009-2012.
- Krettli AU, Eisen H. (1980) Escape mechanisms of *Trypanosoma cruzi* from the host immune system in Seminaire INSERM: Relations Hôte-Parasite dans les infections parasitaires naturelles et experimentales. Seillac, France.
- Kyte J, Doolittle RF. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-681.
- Lafaille JJ, Lins J, Krieger MA, Souto-Pradrón T, de Souza W, Goldemberg S. (1989) Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35:127-136.
- Laguens RP, Cabeza-Meckert P, Chambo J. 1988. Antiheart Antibody Dependent Cytotoxicity in the Sera of Mice Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 56:993-997.
- Laguens RP, Cabeza-Meckert P, Gelpi RJ. (1981) Enfermedad de Chagas crónica en el ratón. I. Modificaciones electrocardiográficas y morfológicas. *Medicina (Buenos Aires)* 41:35-39.
- Laguens RP, Cabeza-Meckert P, Chambo G, Gelpi RJ. (1981) Enfermedad de Chagas crónica en el ratón. II. Transferencia de la enfermedad cardíaca por medio de células inmunocompetentes. *Medicina (Buenos Aires)* 41:40-43.
- Laguens RP, Cossio PM, Diez C, Segal A, Vazquez C, Kreutzer E, Khoury EL, Arana RM. (1975) Immunopathologic and morfologic studies of skeletal muscle in Chagas' disease. *Am J. Pathol.* 80: 153-160.
- Lederkremer RM, Alves MJM, Fonseca GC, Colli W. (1976) Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. Isolation, purification and carbohydrate composition. *Biochim. Biophys. Acta* 444:85-96.

Bibliografía

- Lederkremer RM, Tanaka CT, Alves MJM, Colli W. (1977) Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. Amide ester-linked fatty acids. Eur. J. Biochem. 74:263-267.
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical examination. Biochemistry 16:4743-.
- Lemesre JL, Afchain D, Orozco O, Loyens M, Breniere FS, Desjeux P, Carlier Y, Martin U, Nogueira-Queiroz, Le Ray D, Capron A. (1986) Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas' disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *Trypanosoma cruzi*-specific monoclonal antibody. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35:86-93.
- Levin MJ, Mesri EA, Benarous R, Levitus G, Schijman A, Levy-Yeyati P, Chiaie P, Ruiz A, Kahn A, Rosebaum M, Torres HN, Segura EL. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in Chronic Chagas heart disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989; 41:530-538.
- Levin MJ, Daegelen D, Meienhofer MC, Dreyfus JC, Kahn A. (1982) Two different species of m-RNAs specify synthesis of M and M pyruvatekinase subunits. Biochim. Biophys. Acta 669. 77-83, 1982.
- Liljas, A., Thirup, S. & Matheson, A.T.(1986) Evolutionary Aspects of Ribosome-Factor Interactions. Chemica Scripta, 26B, 109-119.
- Lima-Martins MVC, Sanchez GA, Krettli AU, Brener Z. (1985) Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. Parasite Immunol. 7:367-376.
- Lin A, Wittman-Liebold B, McNally J, Wool IG. 1982. The primary structure of the acidic phosphoprotein P2 from rat liver 60 S ribosomal subunits. J. Biol. Chem. 257:9189-9197.
- Lopez AF, Ribeiro dos Santos R, Sanderson CJ. (1983) Antibody dependent cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi* antigen-coated mouse cell lines by eosinophils and neutrophils. Parasite Immunol. 5:77-84.
- Magariños Torres C. (1930) Patogenia de la miocarditis crónica en la enfermedad de Chagas. Soc. Argen. Patol. Reg. Norte Quinta Reun. 2:902.
- Magariños Torres C. (1941) Sobre a anatomia patológica da doença de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 36:391-404.

Bibliografia

- Magsaam J, Gharavi AE, Parnassa AP, Weissbach H, Brot N, Elkon KB. (1989) Quantification of lupus anti-ribosome P antibodies using a recombinant P2 fusion protein and determination of the predicted amino acid sequence of the autoantigen in patient's mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.* 76:165-171.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (1982) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Martins MS, Hudson L, Krettli AU, Cancado JR, Brener Z. (1985) Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 61:343-350.
- McCormick TS, Rowland EC. (1989) *Trypanosoma cruzi*: Cross-reactive anti-heart autoantibodies produced during infection in man. *Exp. Parasitol.* 69:393-401.
- Mendonca Previato L, Gorin PAJ, Braga AF, Scharfstein J, Previato JO. (1983). Chemical structure and antigenic aspects of complexes obtained from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry* 22:4980-4987.
- Messing J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods. Enzimol.* 101:120.
- Miles MA, Cibulskis RE. (1986) The heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*. Zimodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today* 2:94-97.
- Minoprio PM, Coutinho A, Joskowicz M, D'Imperio Lima MR, Eisen H. (1986) Polyclonal lymphocyte response to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and -cell responses.
- Minoprio P, Eisen H, Joskowicz M, Pereira P, Coutinho A. (1987) Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti L3T4 antibodies. *J. Immunol.* 139:545-550.
- Minoprio P, Andrade L, Lembezat MP, Ozaki LS, Coutinho A. (1989a) Indiscriminate representation of VH-gene families in murine B lymphocyte responses to *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 142:
- Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coutinho A. (1989b) Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* 28:553-561.
- Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. (1989c) Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol. Rev.* 112:183-207.

Bibliografía

- Molina HA, Milei J, Storino R. (1984) Chronic Chagas myocardopathy. Demonstration of in vivo bound immunoglobulins in heart structures by the immunoperoxidase technique. *Cardiology* 71:297-306.
- Morel CM, Deane MP, Goncalves AM. (1986) The complexity of *Trypanosoma cruzi* revealed by schizodeme analysis. *Parasitol. Today* 2: 97-101.
- Muller S, Couppez M, Briand JP, Gordon J, Sautière P, Van Regenmortel MHV. (1985) Antigenic structure of histone H2B. *Biochim. Biophys. Acta.* 827:235-246.
- Nicholson GC, Dawkins RL, McDonald BL, Weatherall JD. (1977) A classification of anti-heart antibodies between heart-specific and heterophil antibodies. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 7: 349-363.
- Nickell SP, Boyer MH. (1986) *Trypanosoma cruzi*: protective immunization of susceptible strains of mice prone to autoimmunity. *Exp. Parasitol.* 62:450-452.
- Nickell SP, Gebremichael A, Hoff R, Boyer MH. (1987) Isolation and functional characterization of murine T cell lines and clones specific for the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 138:614-621.
- Nickell SP, Hoff R, Boyer MH. (1985) Susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in autoimmune strains of mice. *Parasite Immunol.* 7:377-386.
- Nogueira N, Chaplan S, Reesink M, Tydings J, Cohn ZA. (1981a) *Trypanosoma cruzi*: induction of microbicidal activity in human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* 128:2142-2146
- Nogueira N, Chaplan S, Tydings JD, Unkeless J, Cohn Z. (1981b) *Trypanosoma cruzi* Surface antigens of blood and culture forms. *J. Exp. Med.* 153:629-639.
- Nogueira N, Unkeless J, Cohn Z. (1982) Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:1259-1263.
- Nogueira N. (1986) American trypanosomiasis: Antigens and host-parasite interactions. *En Parasite Antigens. Toward new strategies for vaccines.* TW Pearson ed. Marcel Dekker inc. New York. pp91-110.
- Norris KA, Harth G, So M. (1989) Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infect. Immun.* 57:2372-2377.

Bibliografia

- Ouaissi MA, Cornette J, Afchain D, Capron A, Gras-Masse H, Tartar A. (1986) *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science* 234:603-607.
- Ouaissi MA. (1988) Role of the RGD sequence in parasite adhesion to host cells. *Parasitol. Today* 4:169-173.
- Paranhos GS, Cotrin PC, Rassi A, Wanderley J, Camargo ME, Silveira JF. (1989) Molecular cloning of a *T. cruzi* gene encoding an antigen recognized by acute and chronic chagasic sera. *Parasite. Immunol.*
- Peralta JM, Ginefra P, Diaz JCP, Magalhaes JSM, Szarfman A. (1981) Autoantibodies and chronic Chagas' heart disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75:568-569.
- Perrin LH, Simitsek P, Srivastava I. (1988) Development of malaria vaccines. *Trop. Geogr. Med. (Supl)* 40:6-15.
- Peterson DS, Wrightsman RA, Manning JE. (1986) Cloning of a major surface-antigen gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat. *Nature* 322:566-568.
- Peterson DS, Fouts DL, Manning JE. 1989. The 85-Kd surface antigen of *Trypanosoma cruzi* is telomeric and a member of a multigene family. *EMBO J.* 8: 3911-3916.
- Petry K, Eisen H. (1989) Chagas disease: A model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol. Today.* 5:111-116.
- Picard JY, Benarous R, Guerrier D, Josso N, Kahn A. (1986) Cloning and expression of cDNA for anti-Mullerian hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5464-5468.
- Pinto Díaz JC. (1985). História natural in *Cardiopatia Chagásica*. Cancado JR and Chuster M. eds. *Fund. Carlos Chagas* (Belo Horizonte, MG, Brasil) pp 106.
- Rangel-Aldao R, Comach G, Mendoza A. (1987) *In vitro* translation of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by human sera. *J. Parasit.* 73:855-857.
- Reyes MB, Lorca M, Muñoz P, Frasch ACC. (1990). Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2846-2850.
- Ribeiro dos Santos R, Hudson L. (1980) *Trypanosoma cruzi*: immunological consequences of parasite modification of hosts cells. *Clin. Expl. Immunol.* 49:36-41.

Bibliografia

- Ribeiro dos Santos R, Rossi MA. (1985) *Inmunopatologia in Cardiopatia Chagásica*. Cancado JR and Chuster M. eds. Fund. Carlos Chagas (Belo Horizonte, MG, Brasil) pp 10-22.
- Rich BE, Steitz JA. (1987) Human acidic ribosomal proteins P0, P1 and P2: Analysis of cDNA clones, *in vitro* synthesis and assembly. *Mol. Cell. Biol.* 7:4065-4074.
- Rose NR. (1989) Pathogenic mechanisms in autoimmune diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 53:S7-S16.
- Rose NR, Herskowitz A, Neumann DA, Neu N. (1988) Autoimmune myocarditis: a paradigm of post-infection autoimmune disease. *Immunol. Today* 9:117-120.
- Rosebaum MB. Chagasic myocardopathy. *Progr. Cardiovasc. Dis.* 1964: 7:199-225
- Rowland EC, Spears KR, Mc Cormick T. (1988) Relationship of parasite specific antibodies and heart autoantibodies in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Supl I)* 83:367
- Ruiz AM, Esteva M, Cabeza Meckert P, Laguens RP, Segura EL. (1985) Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 42: 299-309.
- Russo M, Starobinas N, Minoprio P, Coutinho A, Hontebeyrie Joskowicz M. (1988) Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi*-infected mice after inactivation of helper T-cells. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol* 139:225-236
- Said G, Joskowicz M, Antunes Barreira A, Eisen H. (1985) Neuropathy in Chagas' disease. *Ann. Neurol.* 18: 676-683.
- Sadigursky M, Acosta AM, Santos Buch CA. (1982). Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *Trypanosoma cruzi* clone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31:934-941.
- Sadigursky M, Von Kreuter BF, Santos Buch CA. (1988) Development of chagasic autoimmune myocarditis associated with anti-idiotipe reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Supl I)* 83:363-366.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Santos Buch CA, Teixeira ARL. (1974) The immunology of experimental Chagas' disease III. Rejection of allogeneic heart cells *in vitro*. *J. Exp. Med.* 140:38-53.

Bibliografía

- Santos Buch CA, Acosta AM. (1985) Pathology of Chagas' disease *In* Immunology and pathogenesis of Trypanosomiasis. Tizard I. ed. CRC Press. Boca Ratón Fla. pp145-183..
- Santos-Buch CA, Acosta AM, Zweerink HJ, Sadigursky M, Andersen OF, Von Kreuter BF, Brodskyn CI, Sadigursky C, Cody RJ. (1985) Primary muscle disease: Definition of a 25 kD polypeptide myopathic specific Chagas antigen. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1985; 37: 334-350.
- Segura EL, Bua J, Rosenstein de Campanini A, Subías E, Esteva M, Moreno M, Ruiz AM. (1986) Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*: complement-mediated lytic activity against trypomastigotes and passive immunoprotection to mice. *Immunol. Lett.* 13:165-171.
- Scharfstein J, Martins Rodriguez M, Andrade Alves C, de Souza W, Previato JO, Mendonca-Previato L. (1983) *Trypanosoma cruzi*: Description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. *J. Immunol.* 131, 972-976.
- Scharfstein J, Schechter M, Senna M, Peralta JM, Mendonca-Previato L, Miles MA. (1986) *Trypanosoma cruzi*: Characterization and isolation of a 57/51,000 m.w. surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J. Immunol.* 137, 1336-1341.
- Schmuñis G, Gonzales Cappa SM, Traversa OC, Janofsky JF. (1971) The effect of immunodepression due to neonatal thymectomy on infections with *Trypanosoma cruzi* in mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 89-94.
- Schmuñis G. (1987) Autoimmunity in Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82, Suppl 1, 287-310.
- Schneider A, Hemphill A, Wyler T, Seebeck T. (1988) Large microtubule-associated protein of *Trypanosoma brucei* has tandemly repeated, near identical sequences. *Science* 241:459-462.
- Schofield CJ. (1985) Population dynamics and control of *Triatoma infestans*. *Ann, Soc. belge Med. Trop. (Supl I)* 65:149-164.
- Scott MT, Snary D. (1979) Protective immunization of mice using cell surface glycoprotein. *Nature* 282:73-74.
- Segura EL, Bua J, Rosenstein de Campanini A, Subias E, Esteva M, Moreno M, Ruiz AM. (1986) Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*: Complement-mediated lytic activity against tripomastigotes and passive immunoprotection in mice. *Immunol. Lett* 13:165-171.

Bibliografía

- Sher A, Snary D. (1982) Specific inhibition of the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* by a monoclonal antibody. *Nature* 300:639-640.
- Shoenfeld Y, Isenberg DA. (1988) Mycobacteria and autoimmunity. *Immunol. Today* 9:178-182.
- Silva JC, Pirmez C, Morgado M, Galvão-Castro B. (1985) Immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* infection: correlation of immune complexes and other serological features with muscle lesions during the infection. *Parasite Immunol.* 7:457-466.
- Snary D, Hudson L. (1979) *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins: identification of a major glycoprotein. *FEBS Lett.* 100:166-170.
- Snary D, Ferguson MAJ, Scott MT, Allen AK. (1981) Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3:346-356.
- Snary D, Flint JE, Wood JN, Scott MT, Chapman MD, Dodd J, Jessei TM, Miles MA. (1983) A monoclonal antibody with specificity for *Trypanosoma cruzi*, central and peripheral neurones and glia.
- Snary D. (1985). Biochemistry of surface antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Br. Med. Bull.* 41:144-148
- Snedecor GW, Cochran WG. (1980) in *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Ames. pp200-207
- Southern EM. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 98:503-
- Souto Padrón T, Reyes MB, Leguizamón S, Campetella O, Frasch ACC, De Zouza W. (1989) *Trypanosoma cruzi* antigens which are antigenic during human infection are located to defined regions of the parasite. *Eur. J. Cell. Biol.* 90:
- Stahl HD, Coppel RL, Brown GV, Saint R, Lingelbach, K, Cowman AF, Anders RF, Kemp DJ. Differential antibody screening of cloned *Plasmodium falciparum* sequences expressed in *Escherichia coli*: procedure for isolation of defined antigens and analysis of human antisera. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984; 81: 2456-2461.
- Sterin-Borda L, Cantore M, Pascual J, Borda E, Cossio P, Arana R, Passeron S. (1986) Chagasic IgG binds and interacts with cardiac beta adrenoreceptor-coupled adenylate cyclase system. *Int. J. Immunopharmacol.* 8: 581-

Bibliografia

- Stolf AMS, Umezawa ES, Zingales B. (1988) Radio-blotting: an alternative approach to immunoprecipitation for the analysis of immunoglobulins reactive to parasite surface antigens. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Supl I) 83:134.
- Szarfman A, Luquetti A, Rassi A, Rezende JM, Schmuñis GA. (1981) Tissue-reacting immunoglobulins in patients with different clinical forms of Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30:43-46.
- Szarfman A, Terranova VP, Renard SL, Foidart JM, Lima FM, Scheinman JI, Martin GR. (1982) Antibodies to laminin in Chagas' disease. J. Exp. Med. 155:1161-1171.
- Takehara HA, Perini A, Silva MA, Mota I. (1981) *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in mouse. Exp. Parasitol. 52:137-146.
- Takehara HA, Da Silva AMM, Brodskin CI, Mota I. (1990) A comparative study of anti *Trypanosoma cruzi* serum obtained in acute and chronic phase of infection in mice. Immunol. Lett. 23:81-86.
- Takle GB, Young A, Snary D, Hudson L, Nichols SC. (1989) Cloning and expression of a trypomastigote-specific 85 kilodalton surface antigen gene from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 37:57-64.
- Tan EM, Chan EKL, Sullivan KF, Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): Diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. Clin. Immunol. Immunopathol. 1988; 47:121-141.
- TDR. Ninth program report. (1988). Tropical diseases: Progress in International research, 1987-1988. WHO ed. (Geneva), pp 79.
- TDR. (1990) Defined recombinant peptides for diagnosis of Chagas' disease and blood screening. TDR news. 32:4-4.
- Teixeira ARL, Teixeira ML, Santos Buch CA. (1975) The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. Am. J. Pathol. 80:163-180.
- Teixeira ARL, Santos Buch CA. (1974) The immunology of experimental Chagas disease. I. Preparation of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral antibody response to these antigens. J. Immunol. 113:859-868
- Teixeira ARL, Teixeira G, Macedo V, Prata A. (1978) *Trypanosoma cruzi*-sensitized T-lymphocyte mediated ⁵¹Cr release from human heart cells in Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27:1097-1107.

Bibliografia

- Teixeira ARL, Martins Santana M. (1989) *Trypanosoma cruzi*: endocytosis and degradation of specific antibodies by parasite forms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:165-170.
- Teixeira MMG, Yoshida N. (1986) Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18:271-282.
- Tejada-Valenzuela C, Castro F. (1958) Miocarditis crónica en Guatemala. *Rev. Col. Med. Guatemala.* 9:124-.
- Towbin, H., Ramjoué, H-P, Kuster, H., Liverani, D. & Gordon, J. (1982) Monoclonal antibodies against eucaryotic ribosomes. *J. Biol. Chem.* 257, 12709-12715.
- Towbin H, Rosenfelder G, Wieslander J, Avila JL, Rojas M, Szarfman A, Esser K, Nowack H, Timpl R. (1987) Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl(α 1-3)-galactose epitopes. *J. Exp. Med.* 166:419-432.
- Van Meirvenne N, Le Ray D. Diagnosis of African and American Trypanosomiasis. *Br. Med. Bull.* 1985 41:156-161
- Van Regenmortel MHV. (1986) Which structural features determine protein antigenicity? *Trends Biochem Sci.* 11:36-39.
- Van Regenmortel. M.H.V., and G. Daney de Marcillac. 1988. An assessment of prediction methods for locating continuous epitopes in proteins. *Immunol. Lett.* 17:95-108.
- Van Regenmortel MHV, Briand JP, Muller S, Plaue S. (1988) Synthetic polypeptides as antigens: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier, Amsterdam
- Van Regenmortel MHV. (1989) Structural and functional approaches to the study of protein antigenicity. *Immunol. Today* 10:266-272.
- Van Vooris, W.C., and H. Eisen. 1989. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. Exp. Med.* 169:641-652.
- Velge P, Ouaisi A, Kusnierz JP, Capron A. (1989) Infection des lymphocytes T par *Trypanosoma cruzi*, rôle possible du CD3 et du HLA-DR. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 309:93-99
- Von Kreuter BF, Sadigursky M, Santos Buch CA. (1988) Complementary surface epitopes, myotropic adhesion and active grip in *Trypanosoma cruzi*-host cell recognition. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30:197-308.

- Von Kreuter BF, Santos Buch CA. (1989) Modulation of *Trypanosoma cruzi* adhesion to host muscle cell membranes by ligands of muscarinic cholinergic and beta adrenergic receptors. Mol. biochem. Parasitol. 36:41-50.
- Whittingham S, Mc. Neilage LJ. (1988) Antinuclear antibodies as molecular and diagnostic probes. Moll. Cell. Probes. 2:169-179.
- Wood JN, Hudson L, Jessel TM, Yamamoto MA. (1982) A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurons and *Trypanosoma cruzi* parasites Nature 296:34-38.
- Yoshida N. (1986) *Trypanosoma cruzi*: recognition of trypomastigote surface antigens by lytic antisera from mice resistant to acute infection. Exp. Parasitol. 61:184-191.
- Yoshida N, Mortara RA, Araguth M, Gonzales JC, Russo M. (1989) Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 57:1663-1667.
- Young RA, Davis RW. (1983) Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc. Natl. Acad. Sci. 80:1194-1198.
- Zingales B, Andrews NW, Kuwajima VY, Colli W. (1982) Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. Mol. Biochem. Parasitol. 6:111-124.
- Zingales B, Katzin AM, De Arruda MV, Colli W. (1985) Correlation of tunicamycin-sensitive surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* with parasite interiorization into mammalian cells. Mol. Biochem. Parasitol. 16:21-34.

Autor:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Enrique Alfredo Mesri", written in a cursive style with a horizontal line underneath.

ENRIQUE ALFREDO MESRI

Director:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Mariano Jorge Levin", written in a cursive style with a horizontal line underneath.

Dr. MARIANO JORGE LEVIN