

Tesis de Posgrado

Obtención y caracterización de antígenos protectores de Trypanosoma Cruzi contra la enfermedad de Chagas

Búa, Jacqueline Elena

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:

Búa, Jacqueline Elena. (1991). Obtención y caracterización de antígenos protectores de Trypanosoma Cruzi contra la enfermedad de Chagas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2393_Bua.pdf

Cita tipo Chicago:

Búa, Jacqueline Elena. "Obtención y caracterización de antígenos protectores de Trypanosoma Cruzi contra la enfermedad de Chagas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2393_Bua.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Obtención y Caracterización de
Antígenos Protectores de
Trypanosoma cruzi
contra la Enfermedad de Chagas**

Jacqueline Elena Búa

Directora de Tesis: Dra. Elsa Leonor Segura

**Trabajo realizado en el Instituto Nacional de Diagnóstico e
Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén"**

**Tesis presentada para optar por el título de
Doctora en Ciencias Biológicas.**

1991

*Tesis.
2393
y 2*

A mis padres, Manuel y Myriam,
quienes desde su esfuerzo posibilitaron mis estudios.

A Roberto,
quien desde su amor alentó y apoyó mi trabajo.

Agradezco especialmente a la Dra. Elsa L. Segura, directora de esta tesis, por haberme iniciado en la investigación científica.

Me apoyó permanentemente, brindándome su propia experiencia y una sólida formación profesional.

Mi gratitud infinita por su ejemplo de esfuerzo y tenacidad hacia el logro de cada objetivo.

Síntesis de la labor desarrollada:

La fracción flagelar de epimastigotes de la cepa Tulahuén de *Trypanosoma cruzi* es una subfracción celular heterogénea, conteniendo flagelos y membranas del parásito.

En modelos experimentales murinos, la inmunización con fracción flagelar liofilizada y *Bordetella pertussis* como adyuvante, protege de la infección por *T. cruzi* en términos de mortalidad y de esterilidad parasitémica ya que un 60% de los ratones desafiados no presentan parasitemia detectable.

En este trabajo se presenta la caracterización de componentes antigénicos del estadio epimastigote obtenidos por purificación a partir de un anticuerpo monoclonal anti-fracción flagelar. Dicho anticuerpo monoclonal, FCH-F8-4 (AcMo 4), mostró una interesante actividad biológica contra el *Trypanosoma cruzi*, ya que evidenció la capacidad de lisis tripomastigotes sanguíneos por medio del complemento y de neutralización *in vitro* de la infectividad de tripomastigotes.

El AcMo 4 reconoce seis proteínas por "immunoblotting" en epimastigotes y dos proteínas en tripomastigotes.

A partir del homogenato total de epimastigotes se purificaron los componentes antigénicos reconocidos por el AcMo 4. Las proteínas aisladas correspondieron al patrón previamente observado para el extracto de epimastigotes original. Cuando se ensayó la capacidad inmunoprotectiva *in vivo* de estos antígenos purificados, con *Bordetella pertussis* como adyuvante, se observó que estas proteínas del *T. cruzi* mantienen las propiedades inmunoprotectoras de la fracción flagelar en cuanto a sobrevivencia de los animales desafiados y el bajo porcentaje de ratones que presentan parasitemia.

Utilizando el AcMo 4 se seleccionaron clones en una biblioteca de ADN copia de epimastigotes de *T. cruzi*, construida en el vector de expresión λ gt11. Con uno de los clones de ADN recombinante obtenidos λ (FCH-F8-4)₁, con un inserto de 150 pares de bases, se ensayó su hibridización al ARNm de epimastigotes.

Los estudios realizados mediante la hibridización del clon λ (FCH-F8-4)₁ con el ADN del parásito sugirió que esta información genética estaría repetida en el genoma haploide de *T. cruzi* en un número bajo de copias.

El análisis de este clon respecto de su hibridización con diferentes clones y cepas del parásito reveló que este gen se halla ampliamente presente en *T. cruzi*, siendo el patrón de esta hibridización conservado para los aislados y clones estudiados.

A partir de la secuencia de bases del ADN del clon λ (FCH-F8-4)₁ y deducida la secuencia de aminoácidos, se sintetizó en fase sólida un péptido de 19

aa: SP4 (PAFLGCSSRFSGSFSGVPE). Este péptido inhibió la reactividad de sueros de ratones inmunizados con fracción flagelar, en ensayos de ELISA, utilizando epimastigotes como antígeno.

Los ratones inmunizados con el péptido SP4 libre o acoplado a KLH como proteína transportadora, adyuvado siempre con *Bordetella pertussis*, mostraron una respuesta inmune humoral y celular contra el *T. cruzi*, demostrada por anticuerpos y reacciones cutáneas de hipersensibilidad retardada específicos. Estos resultados indicaron que la conformación del epitope presente en el péptido sintético representa aquella que se encuentra en el parásito y que a pesar de su pequeño tamaño, el péptido fue capaz de evocar una respuesta inmune, aún inoculado en su forma libre.

Un estudio por computación a partir de la secuencia primaria de aminoácidos, siguiendo un algoritmo previamente descrito, arrojó que el péptido SP4 tiene una estructura anfipática de alfa-hélice que podría representar sitios de reconocimiento para los linfocitos T colaboradores.

Otros clones de ADN recombinante, obtenidos de la misma genoteca de ADN copia de la cepa Tulahuén, fueron obtenidos con el AcMo 4 y con sueros de conejo anti-péptido sintético SP4. Dichos clones fueron analizados en cuanto a la secuencia de bases de su ADN, observándose diferencias en algunas bases y aminoácidos que codifican. Se describen aquí dos secuencias de ADN con homología parcial reconocidas por el AcMo 4 y un suero policlonal anti-péptido sintético; pudiendo estas secuencias representar dos copias diferentes dentro del gen que codifica para este antígeno.

Los análisis efectuados por hibridización de los diferentes clones de ADN recombinante con el ADN genómico del parásito, sugiere que habría un único gen que codifica para la síntesis de los péptidos que reconoce el AcMo 4 en el genoma del *Trypanosoma cruzi*.

INDICE

Dedicatorias.

Agradecimiento.

Síntesis de la labor desarrollada.

1 INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes Históricos y Epidemiología de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2 El parásito: <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.2.1 Generalidades y Ubicación Sistemática	3
1.2.2 Estructura	4
1.2.3 Metabolismo	5
1.2.4 Estadíos	6
1.2.5 Ciclo de vida	7
1.2.6 Mecanismos o vías de infección	9
1.2.7 Penetración del <i>Trypanosoma cruzi</i> en los tejidos del huésped	11
1.3 Enfermedad de Chagas	13
1.3.1 Fase aguda de la enfermedad	13
1.3.2 Fase latente	14
1.3.3 Enfermedad crónica	14
1.4 Respuesta inmune a la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.5 Antígenos del <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.5.1 Antígenos de superficie	18
1.5.2 Antígenos y cepas del <i>T. cruzi</i>	22
1.5.3 Antígenos circulantes	23
1.5.4 Antígenos para el diagnóstico de la infección por <i>T. cruzi</i>	25
1.5.5 Antígenos relacionados con la agresión en el huésped	25
1.5.6 Antígenos e inmunoprotección experimental	27
1.5.6.1 Antígenos inmunoprotectores provenientes del fraccionamiento subcelular	28
1.6 Caracterización de genes que codifican para antígenos de <i>T. cruzi</i>	30
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo general de este trabajo	33
2.2 Objetivos parciales de este trabajo	33
3 MATERIAL Y METODOS	34
3.1 Parásitos	34
3.2 Fraccionamiento subcelular	35
3.3 Adjuvante	35
3.4 Anticuerpos monoclonales	35
3.5 Purificación de anticuerpos monoclonales	36
3.6 Caracterización de los anticuerpos monoclonales	36
3.7 Caracterización de los antígenos reconocidos por el	

anticuerpo monoclonal FCH-FB-4 (AcMo 4)	37
3.7.1 Separación electroforética de proteínas	37
3.7.2. Análisis inmunoenzimático de proteínas electrotransferidas a nitrato de celulosa	38
3.8 Purificación de antígenos por inmunoadinidad	39
3.9 Ensayos de inmunoprotección en animales de experimentación:	39
3.10 Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)	40
3.11 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	40
3.12 Obtención de ARN de epimastigotes:	41
3.13 Construcción de una genoteca de expresión de ADN copia de <i>T. cruzi</i>	41
3.14. Detección de clones de bacteriófagos que expresan antígenos de <i>T. cruzi</i>	42
3.14.1 Detección de clones con anticuerpos monoclonales.....	42
3.14.2 Determinación simultánea de la actividad de b-galactosidasa y reactividad con anticuerpos policlonales específicos.....	42
3.15 Preparación y análisis de proteínas fusionadas a β - galactosidasa en <i>Escherichia coli</i>	43
3.16 Purificación de las proteínas de fusión	44
3.17 Caracterización de los clones de ADN copia obtenidos	44
3.17.1 Secuenciación de bases del ADN	45
3.17.2 Determinación del número de copias de λ (FCH- FB-4) ₁ en el genoma de <i>T. cruzi</i>	45
3.18 Hibridización del ADN copia con el ARN de epimastigotes	46
3.19 Hibridización del ADN copia con el ADN de epimastigotes de diversas cepas y clones de <i>T. cruzi</i>	46
3.20 Síntesis del péptido SP4, acoplamiento a KLH e inmunización de animales	47
3.21 Inhibición de la reactividad de sueros anti-fracción flagelar sobre antígenos de <i>T. cruzi</i> por el péptido sintético SP4	48
3.22 Reacción de hipersensibilidad retardada a antígenos del <i>T. cruzi</i>	48
3.23 Análisis de la secuencia primaria de aminoácidos del péptido sintético SP4	48
3.24 Amplificación de insertos de ADN por la enzima polimerasa (PCR)	49
4 RESULTADOS	50
5 DISCUSION	73
6 CONCLUSIONES	85
7 BIBLIOGRAFIA	86
Abreviaturas empleadas	112
Otros agradecimientos	113

1 INTRODUCCION:

1.1 Antecedentes Históricos y Epidemiología de la infección por

***Trypanosoma cruzi*:**

El *Trypanosoma cruzi* fue descubierto en Minas Gerais, Brasil en el año 1909 por Carlos Chagas y es el agente etiológico de la Tripanosomiasis Americana (58). Chagas observó la forma epimastigote del parásito en el intestino del triatomino *Postrangylus megistus*, denominándolo *Schizotrypanum cruzi*. También observó la presencia de triatominos hematófagos en viviendas humildes, y encontró al *Trypanosoma cruzi* en la sangre de algunos pobladores (59), relacionando estos hechos con los síntomas de una enfermedad que por entonces era desconocida y que se conoce hoy como Enfermedad de Chagas.

El descubrimiento de esta tripanosomiasis presenta la particularidad de que tanto el parásito como el vector fueron descritos antes que la propia enfermedad y más aún, que pasaron varios años antes que su magnitud como problema sanitario se hiciera evidente.

La infección es transmitida por insectos hematófagos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. El parásito es transmitido por más de ochenta especies de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Postrangylus* entre otros (297). En nuestro país el insecto vector es *Triatoma infestans* (163), conocido popularmente como "vinchuca". La transmisión del *T. cruzi* por el vector se lleva a cabo en el ciclo doméstico en el que participan como fuente parasitaria el hombre y los mamíferos domésticos. Existe un ciclo silvestre de transmisión en el que el hombre llega a participar accidentalmente, en las frecuentes incursiones de devastación de los bosques (204). La posibilidad de infección natural con el parásito se encuentra en vinculación directa con las condiciones socio-económicas de los pobladores (31), ya que la precariedad de sus viviendas permite el alojamiento de los insectos entre la paja de los techos o en las grietas de las paredes de adobe.

La distribución de la infección corresponde a la distribución de los triatomíneos que ocupan gran parte de América, con localización domiciliaria desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta la provincia argentina de Río Negro (49). La enfermedad de Chagas afecta a los habitantes de 15 países del continente americano. En 1989 la Organización Mundial de la Salud (278) estimó que alrededor de 90 millones de personas viven en la zona endémica, expuestas a contraer la infección, de las cuales por lo menos 18 millones se encuentran infectados. En algunos valles de Bolivia se ha detectado una prevalencia local de infección de más del 70 % (278).

En la Argentina, diversos estudios serológicos permiten estimar la existencia de dos millones de personas infectadas, en un área que abarca dos tercios de la superficie del país (52). La prevalencia de la infección en ciudadanos de 18 años era del 10 % en 1960, el 5.3 % en 1981, el 5 % en 1982 (250) y el 3.1 % en 1987 (52). La reducción en un 70 % de la prevalencia de la infección con *T. cruzi* desde los años 60 dan la pauta de la efectividad de los programas de control que se vienen realizando en el país desde 1962, desinsectizando viviendas y controlando la sangre a transfundir.

1.2 El parásito:

1.2.1 Generalidades y Ubicación Sistemática:

El *Trypanosoma cruzi* es un protozoo parásito. Es miembro de la familia Trypanosomatidae, que presenta un flagelo, que emerge de una invaginación llamada bolsillo flagelar y un cinetoplasto único. El género *Trypanosoma* comprende dos secciones Salivaria, con desarrollo en la porción anterior del vector, transmitidos por inoculación y Stercoraria, con desarrollo en la porción posterior y propagación a través de las heces, a excepción de *T. rangeli*.

El *Trypanosoma cruzi* se ubica sistemáticamente en:

Phylum: Protozoa (Goldfuss, 1818)
Subphylum: Sarcostigophora (Honigberg y Balamuth, 1963)
Superclase: Mastigophora (Dresing, 1866)
Clase: Zoomastigophora (Calkins, 1909)
Orden: Kinetoplastida (Honigberg, 1963)
Suborden: Trypanosomatina (Kent, 1880)
Familia: Trypanosomatidae (Doflein, 1901)
Género: Trypanosoma (Gruby, 1843)
Sección: Stercoraria
Subgénero: Schyzotrypanum (Chagas, 1909)
Especie: cruzi (58)

1.2.2 Estructura del *Trypanosoma cruzi*:

Este parásito es un organismo diploide, genéticamente polimórfico, presentando una estructura clonal que manifiesta ausencia de sexualidad (276). La membrana plasmática tiene un espesor de 8 a 10 nm de estructura típica bilaminar. Por debajo de la membrana se encuentra un armazón de microtúbulos.

El núcleo es el típico de un organismo eucariote, con por lo menos 10 unidades cromosómicas (261). El ácido desoxirribonucleico (ADN) nuclear es lineal (214). El tamaño del genoma fue descrito como $1.2 \cdot 10^9$ (146) o $3.5 \cdot 10^7$ pares de nucleótidos (54), pero estudios posteriores se inclinan más por el último dato (134). La mayoría de los genes se encuentran representados con una baja frecuencia: 30 a 40 copias por célula (146). El *T. cruzi* tiene por lo menos 18 cromosomas de un tamaño entre 550 y 1500 kilobases con algunos cromosomas menores, en el clon DM28c. La localización cromosómica de diferentes genes es variable en las diferentes cepas estudiadas, lo que confirma la gran plasticidad del genoma de este parásito. Pero dicha variabilidad es intraespecífica ya que éste parásito no presenta variaciones en su estructura cromosómica a lo largo de su ciclo de vida (23).

En todas sus formas, el parásito tiene una única mitocondria y como parte diferenciada de ésta se encuentra el cinetoplasto, que contiene el ADN mitocondrial. Dicho ADN constituye aproximadamente el 20 % del ADN total celular (71) y está constituido por unos 20.000 a 30.000 minicírculos, heterogéneos en cuanto a su secuencia de bases (73). El ADN cinetoplástico presenta también maxicírculos que se encuentran presentes en un bajo número de copias, con información genética correspondiente a varias proteínas mitocondriales (35). Este ADN se encuentra rodeado por una doble membrana de origen mitocondrial, demostrada por la presencia de crestas mitocondriales en la membrana interna (38).

El aparato de movimiento (mastigón) está constituido por el flagelo y el cuerpo basal (cinetosoma). Esta estructura cilíndrica está formada por nueve tripletes de microtúbulos y se proyecta sobre el bolsillo flagelar. Tiene una parte

netamente citoplasmática y otra zona de transición hacia el flagelo, ambas separadas por un septum (73).

El flagelo está compuesto por un axonema central y una vaina externa, continuación de la membrana celular. El axonema contiene 9 pares de microtúbulos periféricos y dos pares centrales. El flagelo presenta una banda estriada compuesta por varios filamentos paralelos y oblicuos a los microtúbulos. El estiramiento de la membrana plasmática por el movimiento flagelar le confiere el aspecto de una membrana ondulante.

Este parásito posee además un retículo endoplasmático rugoso bien desarrollado y el aparato de Golgi entre el núcleo y el cinetosoma. El citoplasma contiene muchos ribosomas con coeficientes de sedimentación (46 S y 35 S) muy diferentes de los de las células mamíferos (269). Los glicosomas son organelas que contienen entre otras, la mayoría de las enzimas de la glucólisis (182).

1.2.3 Metabolismo del *Trypanosoma cruzi*:

El *Trypanosoma cruzi* no almacena polisacáridos. Degrada la glucosa en anaerobiosis y en aerobiosis, produciendo en ambos casos dióxido de carbono, L-alanina, acetato y succinato (55). La mayor parte de la glucosa es metabolizada por la vía glucolítica y el ciclo de Krebs es funcional (30).

Los caminos biosintéticos de N-glicosilación en *T. cruzi* involucran intermediarios de dolicol-oligosacáridos (190). El *T. cruzi* es capaz de incorporar ácido neuramínico en sus macromoléculas pero no puede sintetizar los azúcares a partir de sus propios precursores (231). La neuraminidasa que expresa sobre su superficie celular le permite tomar los azúcares del medio e incorporarlos a sus glicoconjugados (197).

Los lípidos constituyen el 20 % del peso seco de los parásitos. Los ácidos grasos están generalmente no saturados y los puede consumir de fuente exógena. El colesterol es el esteroide principal (44, 102).

Este parásito no sintetiza el anillo de la purina, por lo que debe tomar del medio las bases libres y los nucleósidos (102).

Las proteínas constituyen aproximadamente el 50 % del peso seco del *T. cruzi* (285). Necesita aminoácidos en el medio para su crecimiento, o proteínas de las cuales pueda obtenerlos (24).

1.2.4 Estadíos del *Trypanosoma cruzi*:

El *Trypanosoma cruzi* presenta a lo largo de su ciclo de vida varios estadíos fácilmente identificables por microscopía óptica. Estas formas difieren esencialmente en la morfología celular, en la posición del flagelo respecto del núcleo y la región por la cual emerge el flagelo del bolsillo flagelar (107, 108). Las tres formas principales de desarrollo del parásito se han descrito como amastigote, epimastigote y tripomastigote.

Amastigote: También llamado esferomastigote por su forma redondeada (38). Es el estadío de menor tamaño (5 μm) y presenta un flagelo muy corto (1 μm) que no emerge a la superficie celular. El cinetoplasto se encuentra cercano al núcleo y presenta la apariencia de una doble capa de fibrillas (73).

Epimastigote: Presenta una forma alargada que mide entre 20 y 40 μm de longitud, posee una corta membrana ondulante y emerge desde la región lateral anterior un flagelo libre. El cinetoplasto se halla localizado anteriormente al núcleo. El núcleo del epimastigote, al igual que el del amastigote es redondeado y mide aprox. 2.5 μm .

Tripomastigote: Es una forma alargada no multiplicativa a diferencia de los anteriores. Presenta el cinetoplasto por detrás del núcleo y un flagelo que acompaña a toda la membrana ondulante en el sentido anteroposterior del organismo. El núcleo tiene una organización estructural similar al de las formas descritas anteriormente, pero es más alargado y de localización central en la célula (73).

1.2.5 Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*:

El *T. cruzi* es un protozoo parásito digenético que alterna dos huéspedes en su ciclo de vida: un insecto hematófago y un mamífero.

En el huésped invertebrado:

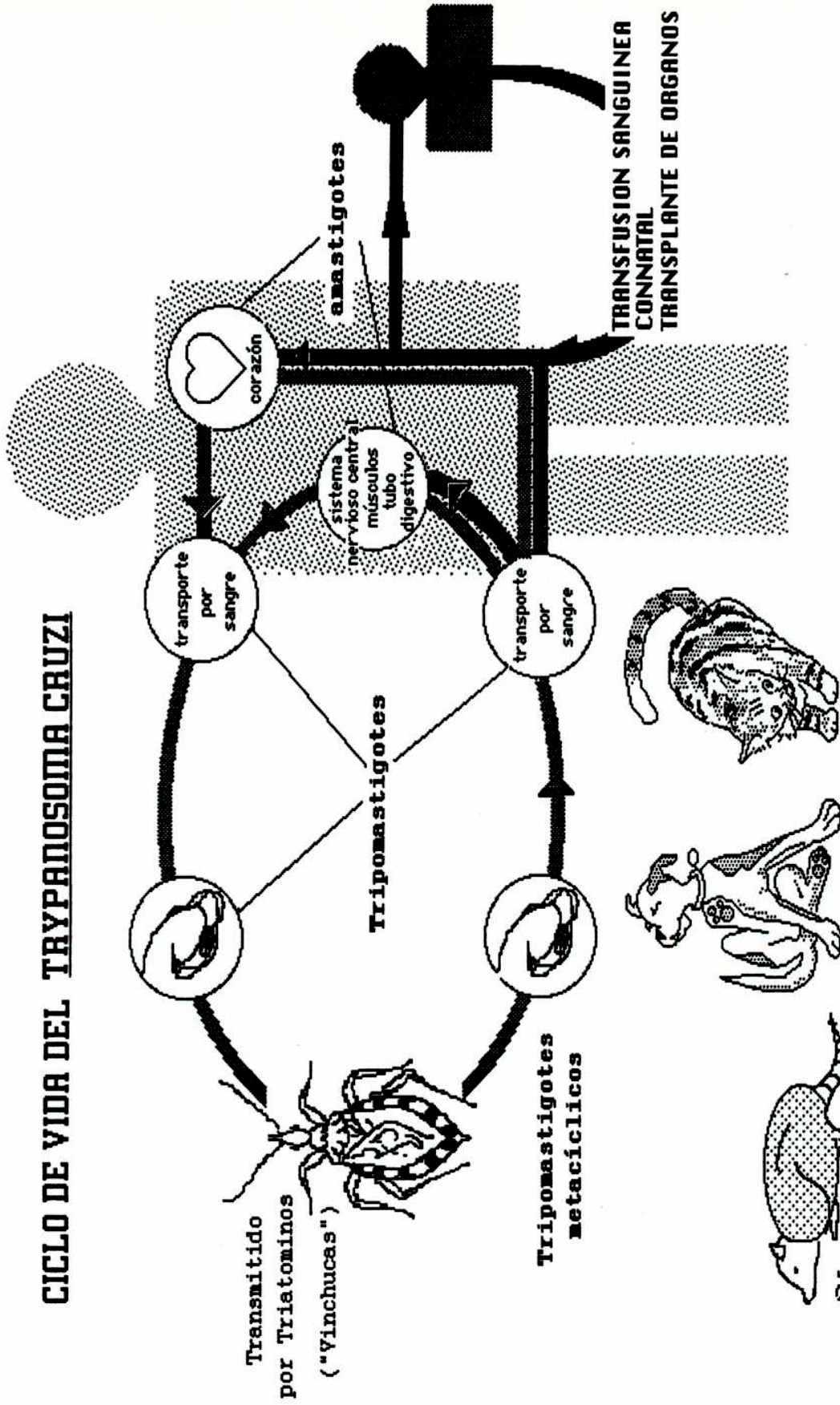
La infección del insecto con el *T. cruzi* tiene lugar cuando éste se alimenta con la sangre de un huésped mamífero infectado. La forma sanguínea del parásito, tripomastigote, ingresa así en el insecto y sufre una serie de transformaciones fisiológicas y morfológicas en el tubo digestivo del insecto dando lugar a la forma amastigote. Este se multiplica durante un corto período transformándose luego en epimastigote, forma replicativa del parásito. En la ampolla rectal del insecto la mayoría de estos epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos que son eliminados con las heces, al mismo tiempo que los epimastigotes no diferenciados (8).

En el huésped mamífero:

Diversos órdenes de mamíferos, incluyendo al hombre, son susceptibles a una infección por *T. cruzi*. Este parásito ha sido detectado en comadrejas, edentados, murciélagos, carnívoros, conejos, roedores y primates, reservorios en el ciclo silvestre; en gatos y perros entre los animales domésticos y en conejos, ratas, ratones, cerdos y cabras entre los animales domiciliados. No se han encontrado aves ni anfibios infectados (198). En la Argentina no se han encontrado cabras infectadas, aún en los corrales con presencia de *T. infestans* (224).

Los tripomastigotes metacíclicos infectan al huésped por algunas de las vías que se detallarán (ver 1.2.6) Los parásitos penetran en las células del vertebrado, transformándose en amastigotes libres en el citoplasma. Son la forma multiplicativa del parásito, responsable del mantenimiento de la infección en el mamífero. En

CICLO DE VIDA DEL TRYPANOSOMA CRUZI



experimentos in vitro se ha visto que una célula huésped puede ser infectada por uno o varios parásitos. Una vez que los tripomastigotes penetraron en la célula huésped, retienen su movilidad por un corto lapso para luego adquirir una forma más redondeada y acortar considerablemente su flagelo (73).

Los amastigotes intracelulares sufren una transformación no sincrónica a tripomastigotes, por lo que en una célula infectada es factible encontrar todos los estadios de transición desde el amastigote hasta el tripomastigote (73). Cuando se produce la ruptura de la célula huésped los parásitos liberados pueden infectar a otras células o fluir en el torrente sanguíneo. En la forma natural de transmisión, el ciclo de vida se completa cuando el vector invertebrado, durante su alimentación, succiona la sangre con formas sanguíneas circulantes del parásito.

1.2.6 Mecanismos o vías de infección:

La infección por *T. cruzi* puede adquirirse por diversas vías de transmisión, según se detallan a continuación:

Transmisión vectorial:

Es la forma natural de infección. Existen 16 especies de triatomíneos que son relevantes en la transmisión del *T. cruzi* en el ciclo silvestre. En el ciclo domiciliario, de mayor importancia, los triatomíneos que transmiten la enfermedad de Chagas tienen un hábitat que comprende el domicilio y el peridomicilio. La transmisión ocurre cuando los insectos se alimentan de la sangre de los habitantes de la vivienda o de sus animales domésticos. El vector defeca durante y después de la ingesta de sangre, y los parásitos que se alojan en el intestino de los insectos infectados, pasan a través de la piel y las mucosas a los tejidos del huésped mamífero. La respuesta mecánica de rascarse ante la picadura favorece el ingreso del *T. cruzi* al organismo (288). La principal medida de control es el tratamiento de las viviendas con insecticidas (63). Estos tratamientos deben ser muy frecuentes

para ser efectivos en el tiempo. Además esta metodología es especialmente eficiente cuando la propia comunidad o sus líderes participan en la vigilancia de la transmisión (193). La importante y continua presión de la reinfestación domiciliar por triatominos, obliga a un permanente cuidado, para el cual tanto la organización sanitaria como los pobladores deben actuar con continuidad y contigüidad geográfica (193, 63).

Transmisión no vectorial:

Por transfusiones sanguíneas:

La transfusión de sangre es la segunda vía en importancia para contraer la infección por *T. cruzi* (57) aún en la actualidad, a pesar que son obligatorios los controles serológicos de la sangre a transfundir. En áreas de gran endemicidad no siempre es posible descartar la sangre que presenta anticuerpos anti-*T. cruzi*, por lo que se acepta el agregado de violeta de genciana dado el gran poder tripanocida asignado a este compuesto (181). Este efecto se ve aumentado en presencia de luz y cofactores como ascorbato (77) y su acción tóxica sería ejercida principalmente sobre la mitocondria (90). A pesar del conocimiento desarrollado para el control de los bancos de sangre, el problema continúa siendo la implementación de las medidas necesarias para abolir la transmisión por esta vía.

Por vía transplacentaria o connatal:

La transmisión de la enfermedad de Chagas en forma congénita ya era sospechada en 1911 por Carlos Chagas, y ha sido ampliamente demostrada (28). La incidencia de infección chagásica por esta vía se ha estimado entre el 3 y el 5 % de los hijos de madres infectadas (155). Cabe aclarar que la incidencia del Chagas congénito es proporcional al grado de endemicidad de las zonas estudiadas ya que para Córdoba se ha informado un 2,3 % (237) y para la provincia de Buenos Aires un

0,5 % de incidencia (26). En 1986 se estudiaron alrededor de 3000 mujeres embarazadas enviadas al Instituto Fatale Chabén para su diagnóstico serológico. Alrededor de 700 pacientes resultaron positivas, y de ellas, 7 niños presentaron parasitemia al nacer, lo que representa el 1 % de los hijos de madre chagásica, fuera de la zona endémica (Elsa L. Segura, comunicación personal). Se ha comprobado que no hay transmisión de *T. cruzi* a través de la leche de madres infectadas, incluyendo a aquellas que presentan parasitemia (29).

Otras formas de transmisión:

Una forma de contaminación, aunque no muy frecuente, es la infección accidental durante el trabajo en el laboratorio. No hay estadísticas precisas debido a que por lo general estos casos no se documentan; pero a partir de los casos conocidos, puede inferirse que la manera más habitual de infección es por inoculación accidental con agujas contaminadas. Estos casos son actualmente controlables por la administración de drogas tripanocidas inmediatamente después del accidente, que debido al corto período de tratamiento es muy bien tolerado y no presenta efectos colaterales (41).

Los trasplantes de órganos infectados son una forma de transmisión posible, ya que individuos transplantados renales, de donadores crónicos para la enfermedad de Chagas desarrollaron una infección aguda (62).

1.2.7 Penetración del *Trypanosoma cruzi* en los tejidos del huésped:

Cuando el parásito ingresa al organismo vertebrado, en el caso de la transmisión vectorial, debe superar primero la barrera cutánea, y luego enfrentará a los macrófagos y polimorfonucleares, células efectoras no específicas. Cualquier célula, fagocítica o no, puede ser infectada por los tripomastigotes (270) y debido a la dispersión que el torrente sanguíneo le ofrece, pueden alcanzar variados tipos celulares. Se ha documentado la tendencia del parásito a invadir fundamentalmente

las fibras musculares lisas, estriadas y cardíacas, además del sistema retículo-endotelial y células gliales (264, 271).

De acuerdo al tropismo parasitario en su invasión celular, se ha intentado clasificar a las cepas de parásitos en miotrópicas o reticulotrópicas; pero la selectividad por uno u otro tipo celular podría variar durante el transcurso de la infección (165).

Cuando el *T. cruzi* enfrenta al sistema retículo-endotelial puede invadir a los macrófagos, o dejarse fagocitar por ellos (176) (129). Los epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos son captados por el macrófago con mayor facilidad que los tripomastigotes circulantes (5) siendo los epimastigotes destruidos luego de esta interacción, mientras que los tripomastigotes se multiplican en él (40). Los parásitos que escapan a dicha destrucción pueden transformarse en amastigotes (176). De todos modos, los macrófagos pueden cumplir su función específica de presentación antigénica a los linfocitos, sensibilizando al organismo para una posterior respuesta inmune específica contra el parásito. Los linfocitos T también pueden ser infectados por tripomastigotes de *T. cruzi* (283).

1.3 Enfermedad de Chagas:

La infección con el *T. cruzi* es frecuentemente inaparente y cuando los individuos infectados muestran sintomatología, no está asociada a un signo específico. En la enfermedad de Chagas se distinguen tres fases: una fase aguda, una fase crónica asintomática, conocida también como período de latencia y una fase crónica sintomática.

1.3.1 Fase aguda de la enfermedad:

El hecho que la primoinfección parasitaria genere un cuadro de fase aguda de la enfermedad, se observa sólo en un 5 % de las personas infectadas mientras que el 95 % restante no presenta sintomatología específica detectable (155).

En algunos casos la puerta de entrada del parásito se expresa en una lesión cutánea nodular denominada "chagoma de inoculación", especialmente característica cuando el parásito penetra por vía conjuntival originando una lesión en ambos párpados, conocida como complejo oftalmo-ganglionar o "signo de Romaña" (216, 162).

Luego de un período corto de incubación post-infección, los pacientes pueden manifestar signos o síntomas tales como: fiebre, adenopatías, astenia, anorexia, dolores musculares, cefaleas, edemas, hepato-esplenomegalia, entre otros, y a menudo diarreas y vómitos en lactantes. En los niños también son importantes los compromisos cardíacos y la meningoencefalitis (155).

Durante 60 - 90 días post-infección transcurre la etapa aguda de la infección, evolucionando silenciosamente hacia un período de latencia.

1.3.2 Fase latente:

En esta fase, la aparición de los síntomas es gradual, la parasitemia es sólo detectable por métodos indirectos, y se acompañan con altos títulos de anticuerpos séricos (56). La enfermedad de Chagas tiene lenta evolución en la mayoría de los casos y con el correr del tiempo, aproximadamente 15 años (278), un 30 % de los individuos infectados se ven afectados bajo diferentes síndromes que involucran a diversos órganos (217).

1.3.3 Enfermedad crónica:

Durante esta etapa se evidencian las alteraciones características de la enfermedad de Chagas que comprometen al corazón y al tubo digestivo. Se ha propuesto que la mayor prevalencia de patología en la enfermedad crónica se presenta en aquellos pacientes que habían evidenciado manifestaciones clínicas en la fase aguda de su enfermedad (203).

Las formas clínicas que se observan en el continente americano muestran una variabilidad en sentido geográfico; un ejemplo lo constituye el predominio de la patología cardíaca en el sur del Brasil, Uruguay, Argentina y Chile y el predominio de la patología visceral en Bolivia y en el centro y norte del Brasil.

La cardiopatía en la enfermedad de Chagas se manifiesta con trastornos en el sistema de conducción, áreas de fibrosis e infiltrados mononucleares que originan un electrocardiograma anormal. Se han observado alteraciones como bloqueos intraventriculares, bradicardia sinusal y extrasístoles ventriculares. El corazón por lo general se encuentra agrandado.

Las lesiones en el tubo digestivo serían originadas por una destrucción neuronal del sistema nervioso autónomo, que induciría a la formación de megavísceras como megaesófago o megacolon.

La muerte de un paciente con enfermedad de Chagas puede ocurrir por insuficiencia cardíaca o tromboembolismo pulmonar (218, 53, 11, 211, 100).

1.4 Respuesta inmune a la infección por *Trypanosoma cruzi*:

El *T. cruzi* infecta al huésped vertebrado e induce una vigorosa respuesta inmune caracterizada por la presencia de anticuerpos específicos e inmunidad mediada por células (40).

La posibilidad de que la infección devenga en enfermedad depende de factores aún desconocidos de la relación huésped-parásito. Por otra parte, la variabilidad de la patología en diversas zonas del continente puede correlacionarse con la heterogeneidad de las poblaciones parasitarias por un lado, siendo en el huésped de importancia los componentes genéticos de los individuos, las condiciones ambientales, nutricionales y de regulación de la respuesta inmune de los mismos.

La participación de la respuesta inmune, en todas sus manifestaciones, tienen un rol significativo en la resistencia a la infección por el parásito. Los pacientes chagásicos inmunosuprimidos, ya sea por una infección por HIV o por tratamiento luego de un trasplante de órganos, activan una fase aguda caracterizada por alta parasitemia (72). Esto implica que la respuesta inmune controla la parasitemia pero ya sea por la eficiencia de la evasión del *T. cruzi* a esta respuesta o por la ineficacia de la misma, que un número remanente de parásitos persiste en el organismo e instalan la cronicidad de la infección.

La fase aguda de la infección presenta dos estadíos inmunológicos sucesivos: una respuesta policlonal temprana de las células T y B (173), seguida de una inmunosupresión (69). Esta etapa se caracteriza en el modelo murino por la falta de respuesta al parásito y a otros antígenos heterólogos y falta de respuesta proliferativa a antígenos del parásito y a mitógenos de las células T y B (69, 128, 219). En la fase latente y crónica la respuesta inmune se normaliza.

El *T. cruzi* induce la producción de altos títulos de anticuerpos, especialmente en la fase aguda temprana de la enfermedad, cuando es bien evidente la existencia de parásitos en sangre. Estos anticuerpos son principalmente del tipo IgM y hacen su aparición a los 3-4 días post infección. La IgG se encuentra en su máxima expresión a los 10-15 días post-infección. Más tardíamente cuando la parasitemia disminuye,

se encuentran aún presentes los anticuerpos específicos (IgG e IgA) que persistirán en las fases latente y crónica posteriores (281), a menos que el individuo reciba tratamiento específico (Graciela Mouso, comunicación personal).

La detección de inmunoglobulinas específicas anti-*T. cruzi* se utiliza como criterio de diagnóstico de la infección por el parásito (56). La forma directa de diagnóstico es la detección del flagelado en sangre, pero este hecho no es muy frecuente, especialmente en los pacientes crónicos. Se puede reconocer la instalación de una fase aguda o crónica de la enfermedad de acuerdo a los niveles de IgG o IgM detectados en los sueros de pacientes (95).

El polimorfismo de la respuesta inmune humoral ha quedado evidenciado con la variedad de determinantes antigénicos que son reconocidos y por la diversidad de funciones que se han asignado a las inmunoglobulinas anti-*T. cruzi*. Hay una mayor incidencia de la infección en ausencia de anticuerpos contra el parásito, por ejemplo, la depleción de anticuerpos en modelos experimentales aumenta la susceptibilidad a la infección por el parásito (124) y la transferencia pasiva de sueros inmunes, en general, han logrado proteger a animales contra un desafío con dosis letales del parásito (136, 127).

Se han descrito anticuerpos generados por una activa infección por *T. cruzi* que se unen a parásitos vivos, promueven la fagocitosis del parásito por los macrófagos, citotoxicidad dependiente de anticuerpos y producen una lisis mediada por complemento (138,139). Estos anticuerpos líticos se relacionaron con la resistencia inmunológica al *T. cruzi* (43).

Algunas cepas del parásito inducen anticuerpos neutralizantes que inactivan la infectividad de los tripomastigotes (96) y una infección por *T. cruzi* también puede generar anticuerpos citofílicos (141) y citotóxicos (126).

La infección por *T. cruzi* también genera una inmunidad mediada por células (IMC) que opera en la resistencia contra el parásito.

El estudio de la respuesta proliferativa de células de pacientes chagásicos frente a diferentes antígenos del *T. cruzi* demostró que un alto porcentaje de enfermos tienen respuesta de IMC (279, 74). Los linfocitos T sensibilizados contra

T. cruzi producen al ser reestimulados por el antígeno específico una serie de factores solubles llamados linfoquinas con variados efectos. Uno de ellos, el factor inhibidor de la migración leucocitaria, ha sido evidenciado in vitro en pacientes chagásicos (192). En el control de la infección, es de relevancia el incremento del efecto tripanocida de los macrófagos activados por linfoquinas, interferón γ (122) y el factor de necrosis de tumores (TNF) (287). Las células fagocíticas se activan durante la etapa aguda de la infección generando especies reactivas del oxígeno (51). Otros mecanismos de resistencia al *T. cruzi* están representados por la citotoxicidad mediada por células, ejercida por linfocitos T citotóxicos (39), la citotoxicidad mediada por anticuerpos, que se activa por contacto con la célula blanco recubierta por anticuerpos, demostrada tanto en epimastigotes (1) como en tripomastigotes (125) y la actividad "natural killer" (NK) mediada por linfocitos NK sobre células blanco en replicación (105). La respuesta policlonal también incluye el incremento de la producción de interleuquinas e interferón (272).

El sistema complemento, además de ejercer su capacidad lítica sobre el parásito, al operar en conjunción con los anticuerpos específicos, participa activamente en la fagocitosis de los organismos por células mono y polinucleares (92) pero se ha observado que el papel de la vía clásica del complemento no es fundamental en los mecanismos de resistencia al *T. cruzi* (70).

La resistencia a la infección por el *T. cruzi* experimental puede ser conferida por medio de la transferencia de células esplénicas en general (208, 241) y por linfocitos T helper L3T4 y linfocitos citotóxicos Lyt2.2 de animales crónicos (220).

Los estudios in vivo, realizados en animales genéticamente atímicos (127), timectomizados, (48) o tratados con sueros anti-timocitos (215), revelaron la agudización de la infección y mostraron que dosis de parásitos no letales en animales inmunocompetentes, son letales para animales timodeficientes (249). De lo anteriormente expuesto se desprende que la inmunidad humoral y mediada por células participan activamente en la defensa del organismo infectado por *T. cruzi*.

En el daño tisular que experimenta el individuo infectado en la etapa aguda parece involucrada la acción del parásito, pero el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad de Chagas aún no es claro, existiendo una fuerte tendencia a explicarlo por fenómenos inmunológicos. Es un hecho la presencia de antígenos comunes del *T. cruzi* y del huésped (ver 1.5.5) y la presencia de anticuerpos dirigidos contra componentes propios en los enfermos chagásicos (75, 91).

1.5 Antígenos del *Trypanosoma cruzi*:

El ciclo de vida del *T. cruzi* es complejo e involucra la circulación de parásitos entre mamíferos, vectores invertebrados y el hombre. Los diferentes medios en que se desarrolla el parásito determinan diversas presiones de selección que se manifiestan en una gran heterogeneidad que también se evidencia en la constitución antigénica y funcional de su membrana celular (17,206,177,93,291) aunque también poseen antígenos compartidos (256). Ninguno de los estadios del *T. cruzi* presenta antígenos fuertemente inmunodominantes hecho que ocurre en otros parásitos como por ejemplo, *Plasmodium* (296) y a diferencia de otros tripanosomátidos (36), *T. cruzi* no presenta mecanismos de variación antigénica (256).

Debido a que este parásito comparte un número de antígenos con otros tripanosomátidos (3) ha sido esencial la identificación y caracterización de los antígenos específicos del mismo para los estudios relacionados con el serodiagnóstico, la inmunoprofilaxis y la patogénesis.

1.5.1 Antígenos de superficie:

Considerando que la superficie del parásito es la primera y principal área de contacto con el huésped, ha despertado especial interés el estudio de las proteínas y glicoproteínas de la membrana celular del *T. cruzi* y los mecanismos involucrados en la respuesta inmune a las mismas. La diversidad antigénica a nivel intraespecífico es

importante cuando se considera la superficie parasitaria, no observándose esta variación en los patrones de proteínas intervinientes en el metabolismo (164).

La membrana celular del parásito fue analizada por diferentes métodos observándose diferentes patrones de proteínas para cada estadio del *T. cruzi* (17, 257, 178, 298, 12, 93, 161, 164).

La mayoría de los antígenos de superficie estudiados son glico-conjugados. Los estudios con lectinas demuestran la existencia de diferencias cuali y cuantitativas en los hidratos de carbono expuestos sobre la superficie celular en los distintos estadios evolutivos del parásito (195, 118). Los epimastigotes y tripomastigotes de cultivo de *T. cruzi* se aglutinan en presencia de concanavalina A (Con A) sugiriendo la presencia de residuos de alfa-D-mano o glucopiranososa expuestos en la superficie celular (9). Se aisló un complejo macromolecular rico en glico-conjugados denominado lipopéptido fosfoglicano, aparentemente asociado a la membrana de los epimastigotes formando parte del receptor de Con A (147, 148). También este parásito es aglutinado por medio de la aglutinina de germen de trigo, que reconoce al ácido siálico y a la N-acetil-glucosamina, requiriéndose diferentes concentraciones para aglutinar a epimastigotes y tripomastigotes (195).

La infectividad de los tripomastigotes de *T. cruzi* se incrementa cuando se los incuba con sialoglicoproteínas (205) proponiéndose que tal efecto se debería al proceso de transferencia del ácido siálico a los glicolípidos (299).

Se ha descrito una glicoproteína (GP) de 90 kDa presente en la superficie de todos los estadios del parásito (255) que está constituida en un 19 % por carbohidratos (86). En los tripomastigotes metacíclicos la GP90 se sintetiza como un precursor de 75 kDa que corresponde a la porción proteica e inmediatamente después es N-glicosilada (293).

Snary y col. (257) han descrito otra glicoproteína de la superficie de los epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos, de 72 kDa que se encuentra glicosilada en un 49 % y en un 10 % fosforilada. A pesar de que el huésped vertebrado experimenta un contacto muy limitado con los tripomastigotes metacíclicos

infectantes, los sueros de pacientes con infección aguda presentan altos títulos de anticuerpos anti-GP72 (258, 104).

La GP72 se encuentra presente en muchas cepas y clones ensayados (130,131), pero se ha observado que los niveles de esta GP72 y su glicosilación (86) difieren en las diversas cepas de *T. cruzi* (60) y que su expresión se relaciona con las diferencias asociadas a zimodemas (170), cuando se trata de identificar epitopes relacionados a carbohidratos (235).

Otros estudios se llevaron a cabo con un anticuerpo monoclonal (AcMo) demostraron la inhibición de la transformación de epimastigotes a tripomastigotes sugiriendo que esta glicoproteína tendría un papel biológico importante en la diferenciación del parásito dentro del intestino medio del insecto (253), mediando la interacción con lectinas de la membrana de las células intestinales (196), posibilitando la retención de la forma epimastigotes, su multiplicación y la infección constante en el tracto digestivo del vector (259).

Nogueira y col. (177) describieron contemporáneamente con Snary, una proteína de 75 kDa también específica para los estadíos que se desarrollan en el insecto, sugiriéndose que ambas podrían ser una misma proteína (260). Un estudio posterior mostró que son dos proteínas diferentes que comigran en geles de 7.5 % de acrilamida con perfiles diferentes de proteólisis (236).

Los epimastigotes son rápidamente lisados en sueros normales (LSNH) por medio de la activación del camino alternativo del sistema complemento (175). El análisis de las moléculas del epimastigotes demostró que la GP72 es el sitio receptor en la membrana del factor C3 del sistema complemento (113). Los tripomastigotes, en cambio, son resistentes a la LSNH. Los mecanismos que median esta resistencia estarían relacionados con factores que intervienen en la función de la C3 convertasa en las vías clásica y alternativa del complemento, asociados a componentes del parásito desde 87 a 155 kDa de peso molecular (114). Se ha observado que el tripomastigote libera al medio una GP de 87-93 kDa, $pI=5.5$, inmunoprecipitada por sueros de pacientes crónicos (115).

Los estudios sobre la interacción parásito-célula hospedera implicaron a moléculas como el colágeno y la fibronectina en la adherencia parasitaria. Los receptores del *T. cruzi* para estos componentes se definieron con un PM de 80-85 kDa (186) y de 58/68 kDa (282). La glicoproteína de superficie de 58/68 kDa en su forma no reducida/reducida respectivamente, fue aislada de tripomastigotes de cultivo, e inhibió la unión con la C3 convertasa de la vía alternativa del complemento humano (87). Este hecho podría contribuir como un mecanismo adicional en el escape que evidencian los tripomastigotes a la lisis mediada por complemento del suero humano normal. Por otra parte los amastigotes tienen una proteína de superficie que se une al complejo C5b-9 del sistema complemento e impide su inserción en la membrana celular, escapando así de la lisis mediada por complemento (112).

Recientemente se ha descrito una glicoproteína de 83 kDa como responsable de la unión del tripomastigote de cultivo a mioblastos de corazón de rata (153) o a células Vero (37).

Se han identificado tres polipéptidos de superficie de PM 85 kDa con $pI = 5,0$; 5,5 y 6,3-7,5 (12) A esta última glicoproteína se la denominó Tc85. La penetración de tripomastigotes de cultivo y metacíclicos a células de mamíferos fue parcialmente o casi totalmente inhibida por anticuerpos monoclonales anti-Tc85 (10, 2) pero una mayor inhibición se observó en la penetración de tripomastigotes metacíclicos (2). La porción hidrocarbonada de esta molécula contiene ácido siálico (67) pero se desconoce si es el ácido siálico que una neuraminidasa de *T. cruzi* remueve in vitro de la superficie de las células de mamíferos (152) y su posible relación con los mecanismos de interiorización celular que se le atribuyen a la Tc85. Otra proteína de 85 kDa se aisló de los tripomastigotes de cultivo y se la identificó como el receptor para la fibronectina, involucrada en la interacción parásito-célula. El sitio de reconocimiento para el pegado de los parásitos está restringido a la secuencia de aminoácidos arg-gly-asp-ser de la fibronectina. La inoculación de este péptido acoplado a toxoide tetánico inhibió la penetración de *T. cruzi* a fibroblastos y protegió parcialmente a animales contra una infección (184, 185, 186, 187, 188). No se ha aclarado aún si esta glicoproteína de 85 kDa es la misma que la Tc85,

aunque no es improbable ante la similitud descrita en relación a su intervención en los procesos de adsorción y penetración en células de mamíferos.

Una glicoproteína de 25 kDa se encuentra presente en la superficie de todas las formas y en diferentes cepas del parásito (232). Esta GP25 no se sintetiza como tal sino que proviene de un precursor de 57 kDa (233). Otro antígeno de 25 kDa se describió en la superficie interna de la membrana plasmática de todos los estadios del *T. cruzi* desestimándose que tenga relación con la GP25 ni que provenga de un polipéptido mayor (266). Se han aislado anticuerpos anti-GP25 por afinidad, de sueros de pacientes chagásicos que mostraron un 70 % de lisis mediada por complemento sobre tripomastigotes metacíclicos (169).

Aunque se han descrito numerosas proteínas de la superficie celular del *T. cruzi* es difícil comparar y conciliar los datos publicados por las variaciones inherentes a las diferentes cepas y clones estudiados, condiciones de crecimiento y los métodos de caracterización antigénica.

1.5.2 Antígenos y cepas del *T. cruzi*:

Una idea de la heterogeneidad antigénica en el *T. cruzi* se desprende de la posibilidad de obtener clones de parásitos antigénicamente diferentes a partir de una cepa (33, 206). Dicha heterogeneidad ha sido mencionada como causa de diferentes manifestaciones clínicas y efectividad terapéutica en la enfermedad de Chagas (42). El efecto antiparasitario no es el mismo en todos los aislados y la patología de la enfermedad de Chagas difiere según el área geográfica en donde se contrajo la infección (42, 171).

Se ha propuesto que la heterogeneidad antigénica de los parásitos juega un importante papel en los fenómenos anteriormente descritos. El mapeo antigénico de la superficie de los tripomastigotes metacíclicos de varias cepas de *T. cruzi* detectó una marcada diferencia intraespecífica, encontrándose una proteína de 100 kDa como principal antígeno de la cepa G siendo casi imperceptible en las cepas Y y CL (291), además no todas las cepas contienen los mismos niveles de una GP90 de

tripomastigotes metacíclicos y exponen de manera desigual algunos de sus epitopes (275). La Tc85 también exhibe diferencias en su pl en las cepas Y y YuYu (2).

Otro ejemplo de heterogeneidad intraespecífica lo confirma la expresión de una proteína de 90 kDa en tripomastigotes de cultivo de las cepas Y, Perú y Esmeraldo y su ausencia en las cepas CL y Silvio X/10 (290). Tampoco se ha hallado ARNm de tripomastigotes de las cepas CL o Silvio X-10 que codifique para la proteína de 90 kDa (27).

Estos datos acentúan la importancia de la caracterización antigénica de las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de diferentes regiones del continente cuando se encara un estudio que aporte a la clínica o la inmunoprofilaxis en la Enfermedad de Chagas. Una dificultad en el estudio de diferentes marcadores en distintas cepas de *T. cruzi* se relaciona con las condiciones en que se mantienen los cultivos de parásitos en los diferentes laboratorios por la posibilidad de presentar sobrecrecimiento de alguna subpoblación o cambios genéticos (42).

1.5.3 Antígenos circulantes:

La infección por *T. cruzi*, al igual que otras parasitosis, origina antígenos circulantes en forma de inmunocomplejos. La presencia de antígenos circulando en el plasma fue originalmente descrita en ratones infectados (254) y fue posteriormente confirmada en animales de experimentación (98, 32, 19) y en pacientes con enfermedad aguda y crónica (32, 18, 158, 117, 7). Entre los antígenos circulantes caracterizados se han descrito polisacáridos inmunogénicos (98, 99, 160).

Un hecho interesante es la expresión de una glicoproteína de 70–84 kDa llamada Ssp4, el antígeno más importante del amastigote (14) que es liberado al medio circundante a medida que se transforma en epimastigote. Esta Ssp4 está asociada a la superficie del parásito por un GPI (glicosil–fosfatidil–inositol) tal como la proteína VSG de *T. brucei* y se libera al medio por la acción de la fosfolipasa C (15).

Los tripomastigotes de cultivo también liberan al medio circundante un antígeno llamado SAPA (shed acute phase antigen) localizado en el bolsillo flagelar (263) que es reconocido por sueros de pacientes con enfermedad de Chagas aguda y de recién nacidos infectados (4, 210). En el suero de pacientes agudos y crónicos se pudo detectar un polipéptido de 85 kDa (189)

La presencia de antígenos de *T. cruzi* en la orina de los vertebrados fue originalmente descrita por Bongertz (132) en animales con infección aguda y posteriormente en la orina de niños con enfermedad aguda o congénita (65). Mediante la captación de antígenos urinarios por miscelas de nitrocelulosa y posterior aglutinación, o una inmunoprecipitación con un AcMo, se pudo ampliar el diagnóstico parasitológico a pacientes crónicos (119, 120).

Los antígenos secretados en orina fueron caracterizados como dos glicoproteínas: una de 80 kDa, $pI= 6-6,5$ y otra de 55 kDa, $pI= 6,5-7$ (89). Diferentes sueros anti-*T. cruzi* reconocieron un antígeno urinario de 80 kDa obtenido de perros con infección aguda (66).

Se ha intentado relacionar la presencia de antígenos circulantes con la capacidad, tanto de los tripomastigotes como de los amastigotes, de movilizar hacia un polo de la célula los anticuerpos fijados a sus antígenos de superficie, ("capping") (238, 97). También una fosfolipasa se encuentra involucrada en la liberación de algunos antígenos (15).

Se especula que estos antígenos liberados al medio circundante podrían adsorberse a células de mamíferos (212). Pero no se encuentra aún esclarecido si los antígenos liberados al torrente sanguíneo o los hallados en la orina cumplen alguna función específica en la patogénesis de la enfermedad de Chagas.

1.5.4 Antígenos para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*:

En determinadas áreas endémicas coexisten las infecciones por *T. cruzi*, *T. rangeli* y *Leishmania spp.* Estos flagelados poseen determinantes antigénicos que cruzan entre sí, por lo que la especificidad en el inmunodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas representa un desafío muy particular.

La conveniencia de utilizar AcMo específicos para el diagnóstico diferencial de *T. cruzi* con otros parásitos ha sido encarada por algunos investigadores (20, 64, 149), así como también ensayos con proteínas aisladas como la GP90 (234, 81), o el componente 5 de *T. cruzi* (3) con un AcMo anti-GP72 (183, 149), la GP25 (232), el antígeno Ssp4 de amastigotes (16), un antígeno de 25 kDa (266, 267) y el antígeno recombinante SAPA (4, 210).

Para las zonas en donde el diagnóstico específico para la Enfermedad de Chagas sea dificultoso, se propuso una prueba alternativa que consiste en la detección por inmunoprecipitación de la GP90 y GP72 para los sueros positivos confirmando así la infección por *T. cruzi* (132).

Los intentos de producir reactivos con alta especificidad y sensibilidad han permitido diagnosticar inequívocamente la enfermedad de Chagas siendo algunos de ellos utilizados actualmente como sistema de diagnóstico.

1.5.5 Antígenos relacionados con la agresión en el huésped:

El *T. cruzi* posee determinantes antigénicos compartidos con el sistema nervioso y el tejido muscular de los vertebrados, de modo que se ha especulado sobre la inducción de mecanismos inmunes dirigidos contra antígenos propios en el huésped y su vinculación con la patología de la enfermedad de Chagas.

Algunos mecanismos generadores de patología involucran la destrucción neuronal tanto en el corazón como en el sistema digestivo (142). Es posible que este mecanismo se inicie in vivo cuando un nido de parásitos que rompe la célula huésped

libera antígenos capaces de asociarse a las membranas de las células vecinas tornándolas inmunogénicas (213).

No solamente se asocian antígenos del parásito a las células de mamífero sino que el *T. cruzi* puede incorporar antígenos de las células hospederas (61).

El fraccionamiento subcelular del *T. cruzi* permitió caracterizar el perfil antigénico de los diferentes componentes del parásito y relacionarlos con mecanismos de agresión en la relación parásito-huésped. La disrupción del parásito por presión-descompresión (245) permitió separar la fracción Microsomal, (Mc: pellet de 105.000 g), que posee componentes capaces de inducir una miocarditis (224) comparable a la encontrada en la enfermedad de Chagas crónica (145). También se ha inducido miocarditis al inmunizar animales de experimentación con un pellet de una centrifugación realizada a 100.000 g de una mezcla de amastigotes y tripomastigotes de cultivo (273, 274). Estos experimentos muestran que existen en el *T. cruzi* macromoléculas capaces de inducir efectos patogénicos en ausencia de infección parasitaria.

En pacientes con cardiopatía se han demostrado anticuerpos contra antígenos presentes en la fracción microsomal (76).

La existencia de antígenos comunes entre el *T. cruzi* y algunos tejidos de mamífero ha sido ampliamente evidenciada. Por ejemplo, un AcMo anti-*T. dionisii* y *T. vespertilionis* reconoce a *T. cruzi* y a células del sistema nervioso central (201), un AcMo anti-ganglio dorsal de rata reconoce a *T. cruzi* (289) y un AcMo anti-*T. cruzi* reacciona con una tubulina de cerebro (6). Otras evidencias son: la reactividad cruzada de un determinante antigénico de *T. cruzi* con el retículo sarcoplasmático del músculo (228), la de una proteína de 160 kDa del parásito que cruza con una de 48 kDa de tejido nervioso de mamífero (280) y la reactividad encontrada de sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico con un epítopo de la proteína ribosomal P de *T. cruzi* y la proteína P humana (151). Los anticuerpos anti-hsp 70 de *T. cruzi* no reconocen a la hsp 70 humana a pesar de una similitud del 73 % de aminoácidos comunes para ambas proteínas (85).

La presencia de anticuerpos contra un polipéptido de 25 kDa (230) o contra proteínas de 25 kDa y de 39 kDa (151) en sueros de pacientes con cardiopatía chagásica severa y no en individuos seropositivos asintomáticos, alientan la utilización de estos antígenos como marcadores de patología.

Toda esta información no ha aclarado aún la relación existente entre los antígenos comunes del *T. cruzi* con los tejidos de mamíferos y las posibles reacciones de autoinmunidad. Tampoco hay demasiada luz sobre la responsabilidad de las reacciones autoinmunes en la patología de la Enfermedad de Chagas.

1.5.6 Antígenos e inmunoprotección experimental:

Se han realizado intentos para producir una respuesta inmune protectora contra la enfermedad de Chagas, utilizando parásitos vivos atenuados o no proliferativos, muertos intactos, flagelados análogos, homogeneizados, fracciones subcelulares y proteínas purificadas con diversos resultados (40).

La existencia de reacciones cruzada entre los antígenos del *T. cruzi* y del huésped y las lesiones observadas en los tejidos de los huéspedes infectados sugieren la imposibilidad de utilizar como inmunógenos preparaciones antigénicas complejas y mucho menos parásitos enteros, vivos atenuados o muertos debido a que podrían incluir aquellos componentes responsables de la agresión observada en ausencia de infección (274, 225).

Son numerosas las proteínas del parásito, incluyendo las GP25, GP72 y GP90 que evocan una respuesta humoral en huéspedes inmunizados o infectados (207, 101).

Los ratones inmunizados con la GP72 fueron protegidos contra un desafío con tripomastigotes metacíclicos pero no contra un desafío con tripomastigotes sanguíneos (257). Esta observación es un indicio importante de que los tripomastigotes metacíclicos son vulnerables a los mecanismos del sistema inmune del ratón en el período entre la infección y la penetración del parásito en los tejidos del huésped (260).

La GP90 indujo protección y mayores niveles de reacción de hipersensibilidad retardada al utilizarse con saponina como adjuvante (243), pero no produjo blanqueo de la parasitemia luego de un desafío con parásitos, ni en ratones ni en monos (244). Esta proteína no cruza con tejidos de mamífero (242) y su inmunogenicidad se destruye por tratamiento con formaldehído (21).

Un intento de inducir inmunoprotección experimental con tripomastigotes irradiados (no infecciosos) indujo la formación de anticuerpos contra un péptido de 100 kDa y en menor grado contra dos péptidos mayores de 200 kDa. En cambio la inmunización con epimastigotes irradiados indujo sólo anticuerpos contra un péptido de 57 kDa sin producir protección (300). La protección conferida a ratones mediante la inoculación de tripomastigotes de cultivo muertos por merthiolate estaría asociada a tres polipéptidos entre 70 y 100 kDa (292). La inmunización con tripomastigotes de cultivo inactivados con 8-methoxypsoralen, indujo anticuerpos anti-GP85 y la ausencia de parasitemia en los animales desafiados (13).

Los anticuerpos que producen actividad lítica mediada por complemento e inmunofluorescencia in vivo se definieron como asociados a la resistencia inmunológica contra el parásito (138). Estos anticuerpos reconocen preferentemente una molécula de 160 kDa, que sólo se halla en tripomastigotes sanguíneos, de cultivo y metacíclicos (161, 180).

1.5.6.1 Antígenos inmunoprotectores provenientes del fraccionamiento subcelular:

Ante la imposibilidad de utilizar parásitos enteros como inmunógenos, en nuestro laboratorio se ha trabajado con fracciones subcelulares del *T. cruzi* para obtener inmunógenos purificados y definidos que podrían proteger ante un desafío, sin efectos de agresión tisular.

En 1968 González Cappa y col. utilizaron epimastigotes de la cepa Tulahuén rotos por presión-descompresión para experimentos de inmunoprotección en ratones. Demostraron que variando la presión utilizada durante la ruptura de los

parásitos era posible obtener preparaciones con diferente grado de protección. Las altas presiones, además de aumentar la desnaturalización antigénica, abolían la actividad protectora (95, 246). En 1977 Segura y col. trabajaron con fracciones del parásito preparadas a 140 kg/cm². Mediante un fraccionamiento por centrifugación diferencial y posterior purificación por gradiente de densidad, se obtuvo una fracción enriquecida en flagelos y membranas llamada fracción flagelar que produjo una importante protección ante el desafío con formas infectantes del parásito (247, 226).

Esta fracción flagelar tiene un complejo perfil molecular, conteniendo todas las glicoproteínas y enzimas de la superficie del parásito y ha mostrado en modelos experimentales las mejores propiedades inmunoprotectoras contra el desafío con formas sanguíneas. No se ha observado en estos animales indicio de alguna alteración patológica por la inoculación de este inmunógeno (225). La liofilización preserva estas propiedades y evita el riesgo hipotético de contaminación con formas infectivas del parásito (226).

Se ha intentado potenciar la capacidad inmunoprotectora de la fracción flagelar con diversos adyuvantes como *Corynebacterium parvum*, muramil dipéptido, adyuvante incompleto de Freund, saponina, BCG y *Bordetella pertussis* (Bp) (223). En términos de parasitemia y sobrevida, el mejor efecto fue encontrado con fracción flagelar adyuvada con Bp, ya que la parasitemia disminuyó en un 90 % en los animales que la presentaron (menor al 40 %) sobre los controles no inmunizados, mientras que la sobrevida fue del 100 % en los animales desafiados (226).

La administración de fracción flagelar-Bp resultó en un incremento de la producción de anticuerpos dirigidos contra el parásito aún antes del desafío del ratón. Además, los animales protegidos presentaron respuestas de hipersensibilidad retardada, respuesta linfoproliferativa in vitro contra antígenos de *T. cruzi* y mitógenos policlonales antes y durante la etapa aguda producida después del desafío, en la cual los ratones no protegidos están inmunosuprimidos (219, 252).

1.6 Caracterización de genes que codifican para antígenos de *Trypanosoma cruzi* :

La tecnología de recombinación de ADN *in vitro* ha permitido conocer aún más detalladamente los antígenos de organismos tan complejos como los parásitos. A partir del ADN genómico o complementario insertado en vectores de expresión apropiados, ha sido posible producir en otros organismos procariontes como *Escherichia coli*, por ejemplo, las proteínas que estos genes codifican. El bacteriófago λ gt11 (294, 295) que ha probado ser un buen vector de expresión, ha sido utilizado por muchos grupos de investigadores para detectar productos expresados como proteínas de fusión, con anticuerpos mono o policlonales (revisado en 47). Con este y otros vectores se han decodificado algunos de los componentes antigénicos que se expresan en diferentes estadios del parásito.

Es un hecho ya demostrado que los genes que codifican para antígenos en el *T. cruzi* presentan repeticiones de ciertas secuencias (199, 111, 144).

El gen que codifica para una proteína de tripomastigotes de 85 y 76 kDa, presenta en su secuencia 27 pares de bases repetidos en tándem (cabeza-cola) (199). Se ha descrito el clonado de varios polipéptidos de 85 kDa que mostraron estar organizados en familias de genes (268, 200). Estas familias constan de numerosos miembros originados probablemente por duplicación génica, pero que presentan mutaciones puntuales, deleciones e inserciones (200). Algunos genes se encuentran en posición telomérica (200, 116) que podría indicar una expresión más activa, como en el caso de la VSG de *T. brucei*, en que genes situados en posiciones intracromosomales no son expresados (78). En estas tres familias de genes no hay una homología significativa en su secuencia de bases del ADN, pero una región de 32 pb se comparten en tres clones que codifican para proteínas de 85 kDa (199, 116) y un clon de una proteína de 160 kDa ubicada en el flagelo (280).

Un polipéptido de 85 kDa aparentemente distinto de los anteriores y presente en todas las formas del parásito, fue obtenido a partir de un clon de ADN copia de *T. cruzi*, cuyo gen presenta una organización en grupo, de 6 a 10 copias alineadas (82).

Otras proteínas con unidades repetitivas de aminoácidos (de 5 a 68 aa) fueron aisladas con sueros de pacientes chagásicos y fueron reconocidas por el 83 % de los sueros de diferentes regiones del continente (11).

La secuencia de nucleótidos correspondientes a una proteína hsp70 presenta un tetrapéptido en 12 copias alineadas (209). Una proteína de 225 kDa, ubicada en el citoplasma (CRA) muestra en la secuencia de su ADN 23 copias de 43 pares de bases repetidos (144).

Algunas de las proteínas estudiadas por técnicas de recombinación de ADN se encuentran asociadas al flagelo del *T. cruzi*: una proteína de más de 300 kDa llamada FRA, Flagellar repetitive antigen (144), otra de 24 kDa, que puede unirse al Ca⁺⁺, participando probablemente en la movilidad del mismo (83) y una proteína de 160 kDa, (280) que presenta reacción cruzada con una proteína de 48 kDa de tejido nervioso de mamífero (280).

En muchos de los clones de ADN aislados que presentaron secuencias repetitivas, cuando se han analizado otras cepas y clones para dichos genes, se ha encontrado polimorfismo referido al número de repeticiones (109, 156, 140).

También ha sido aislado un gen de copia única asociado a una proteína de 175 kDa ubicada en el kinetoplasto, probablemente manteniendo la estructura del mismo. El gen, llamado KAP, tiene 4 bloques de 9 aminoácidos repetidos (94).

La presencia de genes que codifican para repeticiones de péptidos también ha sido descrita para los tripanosomas africanos (239), *Leishmania major* (286) y en los parásitos del género *Plasmodium* (123). Se ha propuesto que las proteínas que contienen repeticiones de péptidos podrían causar una sobreestimulación de las células B y de este modo interferir con la maduración normal de una respuesta humoral efectiva, evadiendo así el parásito, un blanqueo inmunológico por parte del huésped (123, 109). Aún esta hipótesis no ha sido confirmada por lo que las secuencias repetitivas podrían tener algún otro sentido en los parásitos.

La obtención de proteínas recombinantes expresadas en bacterias han sido útiles para el diagnóstico diferencial de pacientes con cardiomiopatía (151) o el diagnóstico de recién nacidos congénitamente infectados (210).

Estos análisis sobre los aspectos moleculares, traerán aparejados sin duda el esclarecimiento de otros aspectos estructurales y funcionales de las proteínas del *T. cruzi*.

2 OBJETIVOS:

2.1 Objetivo general de este trabajo:

La obtención y la caracterización de antígenos de *Trypanosoma cruzi* provenientes de una fracción subcelular del parásito con capacidad inmunoprotectora: la fracción flagelar, el análisis de la potencialidad de estos antígenos como inmunógenos y la producción de los mismos en un sistema libre de parásitos para obtener antígenos químicamente definidos que podrían impedir la transmisión de la enfermedad de Chagas.

2.2 Objetivos parciales de este trabajo:

- I) La caracterización de un anticuerpo monoclonal contra la fracción flagelar de *T. cruzi* en cuanto a su actividad biológica contra el parásito.
- II) La caracterización de los componentes antigénicos del *T. cruzi* reconocidos por dicho anticuerpo monoclonal.
- III) La obtención de dichos antígenos por purificación con el anticuerpo monoclonal, a partir de un homogeneizado del estadio epimastigote del parásito.
- IV) El estudio de las proteínas antigénicas purificadas en cuanto a la capacidad de conferir inmunoprotección en animales de experimentación contra una infección por el *T. cruzi*.
- V) La detección y el aislamiento de los componentes genéticos que codifican la síntesis de estos antígenos en el parásito.
- VI) El análisis y caracterización de los fragmentos de ADN aislados.
- VII) La producción y purificación de estos antígenos por medio de un sistema de expresión en procariones.
- VIII) La obtención de un péptido producido por síntesis química conteniendo la secuencia aminoacídica reconocida por el anticuerpo monoclonal.
- IX) El estudio de la respuesta inmune inducida por el péptido sintético en animales de experimentación.

3 MATERIAL Y METODOS:

3.1 Parásitos:

La cepa Tulahuén, stock 2 de *Trypanosoma cruzi* (248) fue utilizada en este trabajo. Los epimastigotes se cultivaron durante 7 días a 28 °C en un medio monofásico axénico (J.C. Engel, comunicación personal) conteniendo 5 g/l de extracto de hígado (Inorp); 4 g/l de extracto de corazón (Inorp); 3 g/l de extracto de carne (Inorp); 3 g/l de extracto de levadura (Difco); 9 g/l de Triptosa (Difco); 4 g/l de Dextrosa (Mallinckrodt, EEUU); 10g/l de Na₂HPO₄; 4 g/l de KCl; 4 g/l de NaCl; 0.02 g/l de Hemina (Sigma, EEUU).

Los tripomastigotes provenientes de cultivos de células de mamífero fueron obtenidos a partir de células BESM. Brevemente, se inoculó con tripomastigotes una monocapa de células BESM. Los tripomastigotes remanentes se lavaron con medio RPMI 1640 (Gibco, EEUU) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (Gen, Argentina). Los tripomastigotes se cosecharon de los sobrenadantes de las células lisadas (80).

Los tripomastigotes sanguíneos se mantuvieron por pasajes seriados en ratones (248) y los parásitos utilizados en los experimentos de lisis y de neutralización, se obtuvieron de ratones irradiados luego del quinto día post-infección (138).

Los tripomastigotes metacíclicos fueron obtenidos de las heces de *Triatoma infestans*, previamente alimentadas de ratones infectados.

Los epimastigotes de las cepas Y, de los clones Sylvio X-10/1, Miranda/75, M/76, M/78, M/80, M/84 y CAI/70, y los promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana* se obtuvieron de cultivo axénico en el medio BHT (Brain-Heart-Tryptose) suplementado con suero fetal bovino al 10 % v/v a 26 °C cosechados en su fase exponencial de crecimiento (50).

3.2 Fraccionamiento subcelular:

La fracción flagelar fue preparada a partir de epimastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*. La disrupción fue llevada a cabo por presión-descompresión en un fraccionador de células Sorvall-Ribi Modelo Rf-1 (Ivan Sorvall Inc, Norwalk, CT, EEUU). El homogenato total de epimastigotes (HT) se centrifugó a 1000 xg durante 15 min. a 4°C. El sedimento se sembró sobre un gradiente discontinuo de sacarosa y se centrifugó a 90.000 xg durante 60 min. La fracción flagelar se ubica en la banda superior, sobre la zona correspondiente a 1,58 M de sacarosa (247). Luego de la cosecha, la muestra se dializó exhaustivamente contra KCl 5 mM y se congeló a -70 °C. Previamente a los ensayos de inmunización, la fracción flagelar fue liofilizada.

3.3 Adjuvante:

La fracción flagelar, antígenos purificados y sintéticos fueron inoculados en ratones BALB/c utilizando como adjuvante a *Bordetella pertussis* en una cantidad de $1.25 \cdot 10^9$ bacterias por dosis. La cepa de *B. pertussis* utilizada es la 10536, obtenida por cultivo, inactivada, procesada y controlada, como para ser incorporada en la vacuna triple que se administra normalmente en la población, gentilmente cedida por la Dra. Mirtha Lescano del Instituto Malbrán, Buenos Aires.

3.4 Anticuerpos monoclonales:

Para obtener anticuerpos monoclonales (AcMo) (133) anti-fracción flagelar, se inmunizaron ratones machos de la cepa BALB/c de 21 días de edad con dos dosis semanales de dicha fracción por vía intraperitoneal, adjuvada con *B. pertussis* (ver 3.3). La tercer dosis se administró una semana después, sin adjuvante. Cada ratón recibió en total 200 µg de fracción flagelar. La fusión celular fue realizada tres días después de la última dosis, como se ha descrito (251). Brevemente, se fusionaron $3 \cdot 10^6$ células de bazo de dichos ratones con $3 \cdot 10^7$ células de mieloma P3-

X63–Ag8 6.5.3 (121) en presencia de polietilenglicol 4000. Los sobrenadantes de los hibridomas resultantes se ensayeron por pruebas de ELISA-Peroxidasa (ver 3.10) e inmunofluorescencia indirecta (ver 3.11) para probar la presencia de anticuerpos específicos. Los hibridomas positivos se clonaron por dilución limitante. Se obtuvieron fluidos ascíticos por inyección de las células híbridas en ratones BALB/c previamente inyectados con Pristane (Aldrich, EEUU) (110). Los fluidos ascíticos se utilizaron para purificar las inmunoglobulinas específicas anti-fracción flagelar.

3.5 Purificación de anticuerpos monoclonales:

La purificación de los anticuerpos se realizó por cromatografía de afinidad. Un volumen de fluido ascítico se diluyó al medio con Tris–HCl 1M, NaCl 0.15 M, pH 8.0, se filtró por membranas Millipore (EEUU) de 0.45 µm y se sembró en una columna de Proteína A Sepharosa 4B (Sigma, EEUU). La columna fue lavada exhaustivamente con la solución anterior, hasta que la medición por densidad óptica a 280 nm de la solución excluida, fue menor que 0.01. Se eluyó el anticuerpo con ácido acético 0.1 M conteniendo 0.15 M de NaCl. Luego de una diálisis contra solución salina fosfatada (PBS) la pureza del anticuerpo se determinó por SDS–PAGE al 10 % (143) (ver 3.7.1).

La cuantificación de la proteína eluida se realizó por técnicas colorimétricas (154) utilizando albúmina de suero bovino como standard y midiendo el color resultante en un espectrofotómetro a 700 nm. En todos los experimentos en que se utilizaron AcMo anti–*T. cruzi* se utilizó como control negativo un AcMo no relacionado anti–virus sincicial respiratorio (anti–RSV) gentilmente cedido por la Dra. Mercedes Weissenbacher de la Facultad de Medicina, U.B.A.

3.6 Caracterización de los anticuerpos monoclonales:

La actividad biológica de los AcMo se determinó por medio de los ensayos de lisis de tripomastigotes mediada por complemento (LMC) y de neutralización de la

infectividad de tripomastigotes in vivo. Para estos experimentos los tripomastigotes se obtuvieron como se indicó en 3.1.

En el caso de la LMC se incubaron en un volumen de 0.4 ml: 2.5×10^6 parásitos con 200 μ g de anticuerpo purificado anti-*T. cruzi* o anti-VRS como control negativo, durante 30 min. a 37°C. Luego de los lavados y resuspensión en BSA al 1 % p/v, se mezclaron volúmenes iguales de parásitos y de suero humano normal (SHN) ó de SHNi (previamente inactivado), durante 60 min. a 37°C. El porcentaje de lisis mediada por el sistema complemento se determinó como

$$\frac{100 - \text{N}^{\circ} \text{ de parásitos incubados con SHN}}{\text{N}^{\circ} \text{ de parásitos incubados con SHNi}} \times 100$$

En los experimentos de neutralización, los parásitos se incubaron con diferentes cantidades de AcMo (anti-*T. cruzi* o anti-VRS como control) durante 60 min. a 37 °C y se inocularon 500 parásitos/ratón (BALB/c) por vía i.p. La sobrevida de los animales y la parasitemia por observación directa y se estudiaron hasta el día 40 post-infección.

3.7 Caracterización de los antígenos reconocidos por el anticuerpo monoclonal FCH-F8-4 (AcMo 4):

3.7.1 Separación electroforética de proteínas:

Los diferentes antígenos a analizar fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida (143). El gel de separación tuvo una composición del 10 % p/v de acrilamida, 0.27 % p/v de metilen-bis-acrilamida, 0.1 % p/v de SDS en tampón Tris-HCl 0.36 M, pH 8.8. El gel de concentración fue del 5 % p/v de acrilamida, 0.13 % p/v de metilen-bis-acrilamida, 0.1 % p/v de SDS en tampón Tris-HCl 0.12 M, pH 6.8. La polimerización se realizó mediante N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina (TEMED, Sigma, EEUU) como iniciador y persulfato de sodio (Mallinckrod, EEUU) como catalizador. La cantidad de antígeno sembrada en los geles

fue de 100 µg de homogeneizado de epimastigotes y 20 µg de proteínas purificadas (Ag 4 o proteínas recombinantes expresadas en bacterias) Las proteínas a separar se trataron dos min. a 95°C en 0.7 % p/v de SDS, 1 % v/v de 2-mercaptoetanol, 1 % p/v de azul de bromofenol, como indicador en Tris-HCl 0.12 M, pH 6.8. Los minigeles de 9 x 9 cm fueron corridos a 80 V durante dos horas a T amb. en Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1 % p/v, pH 7.2. Los geles fueron teñidos en 0.5 % p/v de Coomassie Blue G-250 (Sigma, EEUU) en 45 % v/v de metanol y 10 % v/v de ácido acético y desteñidos en el mismo solvente.

3.7.2.- Análisis inmunoenzimático de proteínas electrotransferidas a nitrato de celulosa ("immunoblotting"):

El homogenato total de epimastigotes, tripomastigotes y proteínas recombinantes fueron electrotransferidas a membranas de nitrato de celulosa (NC) en solución Tris 25 mM, glicina 192 mM y 20 % v/v de metanol (277) en una cuba de transferencia (Bio Rad, EEUU) a 40 V durante toda la noche a 4°C. La tinción de proteínas se realizó con negro amido 0.1 % p/v en 45 % v/v de metanol y 10 % v/v de ácido acético. Las tiras de NC para inmunodetección se lavaron en solución Tris-HCL 0.05 M (pH 7.2) conteniendo NaCl 0.15 M (TBS) durante 10 min. y se bloquearon en TBS conteniendo leche descremada en polvo al 3 % p/v, glicina al 2 % p/v, azida sódica al 0.05 % p/v y PMSF 1 mM (TBS-M), durante una hora a T. amb. Las tiras de NC bloqueadas se incubaron en: AcMo 4 purificado (50 µg/ml) o sueros de ratones inmunizados, diluidos en TBS-M durante una hora a T. amb. Los lavados se efectuaron con TBS conteniendo 0.01 % v/v de Tween 20 (Sigma, EEUU) (TBS-T) 3 veces, durante 10 min. Finalmente como segundo anticuerpo se usó una anti-inmunoglobulina de ratón acoplada a la enzima peroxidasa (Biosys, Francia) o a fosfatasa alcalina (Bio Rad, EEUU) diluidas en TBS-M. Luego de los lavados en TBS-T, las tiras se transfirieron al sustrato adecuado para el desarrollo del color: Diaminobencidina 5 µg/ml en una solución de citrato 0.028 M, fosfato de sodio monoácido 0.05 M, pH 5, para la enzima peroxidasa. Para la enzima fosfatasa alcalina el sustrato fue Nitro

Blue Tetrazolium (NBT) 0.3 mg/ml y Bromo-Cloro-Indolil Fosfato (BCIP) 0.15 mg/ml en tampón NaHCO₃ 0.1 M, MgCl₂ 1 mM, pH 9.8. Una vez alcanzado el nivel de coloración deseado la reacción se detuvo sumergiendo la NC en agua destilada.

3.8 Purificación de antígenos por inmunoadinidad:

El AcMo 4 purificado se acopló a Sepharosa 4B activada con Bromuro de Cianógeno siguiendo el protocolo del fabricante (Pharmacia, Suecia). La purificación antigénica se realizó a partir de homogeneizado de epimastigotes en presencia de inhibidores de enzimas proteolíticas: TLCK 1 mM y PMSF 1 mM (Sigma, EEUU). La elución del antígeno específico se realizó, mediante un cambio drástico de pH, con glicina-HCl 0.2 M pH 2.8. La fracción antigénica purificada se caracterizó por SDS-PAGE al 10 % (ver 3.7.1) y posterior "immunoblotting" (ver 3.7.2), conservándose congelada a -70 °C hasta su liofilización y uso en ensayos de inmunoprotección.

3.9 Ensayos de inmunoprotección en animales de experimentación:

Los inmunógenos fueron suministrados a ratones machos de la cepa BALB/c de 21 días por vía intraperitoneal.

La inmunización con el antígeno purificado por el AcMo 4 se realizó con el siguiente esquema: se administraron 3 dosis quincenales de 100 µg de antígeno puro, cada una, con *Bardetella pertussis* como adyuvante (ver 3.3). Un grupo de ratones como control, fue inoculado sólo con el adyuvante y otro grupo adicional fue inoculado sólo con 100 µg de BSA.

Los animales fueron desafiados con 1000 tripomastigotes metacíclicos por ratón. El recuento de las parasitemias, que se efectuó por observación directa al microscopio y la sobrevida, se estudiaron hasta el día 40 post-infección. Se tomaron muestras del suero de estos animales luego de la segunda dosis para determinar la presencia de anticuerpos específicos por técnicas inmunoenzimáticas (ver 3.10).

3.10 Enzayos inmunoenzimáticos (ELISA):

Los antígenos (homogenato total de epimastigotes o péptido SP4) se pegaron a placas de poliestireno de 96 orificios en un tampón carbonato 0.05 M, pH 9.6 durante toda la noche a 4 °C. Las placas fueron bloqueadas con PBS conteniendo 5 % p/v de leche en polvo descremada. Como control de pegado inespecífico se utilizaron orificios bloqueados solamente con leche. La dilución de los sueros se realizó en PBS-leche al 1 % p/v en forma seriada en un factor de dos. La incubación se realizó durante una hora a T. amb. Luego de los lavados con PBS-Tween al 0.05 % v/v se incubó con el segundo anticuerpo: anti-IgG de ratón acoplada a fosfatasa alcalina (Bio Rad, EEUU) en PBS-leche al 1 % p/v. El revelado se realizó con p-nitrofenil fosfato en una solución de 1 mg/ml de dietanolamina (22), como sustrato de la fosfatasa alcalina. Se comparó la reactividad de los sueros de ratones respecto de los controles en un lector de ELISA (Microplate Reader 700, Dynatech, EEUU) a 410 nm.

3.11 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) :

Se utilizaron epimastigotes o tripomastigotes formolados fijados con glutaraldehído al 0.1 % v/v en portaobjetos con múltiples orificios. Luego de la incubación con sobrenadante de hibridomas puros o con suero de ratón anti-SP4 diluido 1/100 y de los tres lavados con PBS, se incubaron con anti-IgG de ratón conjugada a isotiocianato de fluoresceína (Biosys, Francia) en la dilución adecuada. La observación de la inmunofluorescencia se realizó en un microscopio con luz ultravioleta por epi-iluminación. Como controles de la reacción se utilizaron sobrenadantes de un hibridoma no relacionado (ver 3.5) o suero de ratones normales y crónicamente infectados.

3.12 Obtención de ARN de epimastigotes:

Los epimastigotes de *T. cruzi* se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos y se lavaron tres veces con sacarosa 0.5 M, 5 mM KCL. El ARN total fue preparado por el método de extracción con hidróxido de guanidina 7 M (150) homogeneizando en una Sorvall Omni-Mixer, (Dupont, EEUU). Se centrifugó a través de CsCl 5.7 M en 10 mM EDTA, pH 8.0 a 35.000 rpm en un rotor Beckman SW40, durante toda la noche a 20°C. El ARN se resuspendió en 0.3 M de acetato de sodio y se precipitó con etanol. El ARN con poly [dA] terminal fue aislado por cromatografía de afinidad en oligo [dT] celulosa (BRL, EEUU) (202).

3.13 Construcción de una genoteca de expresión de ADN copia de *T. cruzi*:

Se construyó una genoteca de ADN copia en el vector de expresión λ gt11 (151) de acuerdo al método descrito por Young (294, 295) con las modificaciones posteriormente propuestas (202). Brevemente, a partir de 5 μ g de ARN mensajero purificado, se sintetizó el ADN complementario utilizando aquél como templado, 1.5 μ g de oligo dT como primer, 1 mM de los cuatro dNTP, 100 U RNAsin y 50 U de la enzima transcriptasa reversa. El híbrido ADN-ARN se trató con 2 U de ARNasa H. La ADN polimerasa de *E. coli*, 25 U, reemplazó la cadena de ARN. Los ADN copia bicatenarios fueron tratados con 40 U de la enzima Eco RI metilasa y se unieron a los extremos del ADN tratado por la enzima T4 ligasa, los fragmentos conteniendo la secuencia de corte de la enzima Eco RI. El ADN de *T. cruzi* y el vector bacteriófago λ gt11 fueron digeridos con la enzima EcoRI 10 U/ μ g y la ligación correspondiente se efectuó por medio de la enzima T4 ligasa. Los ADN recombinantes así obtenidos se empaquetaron *in vitro* con los extractos apropiados del vector Packagene (Promega, EEUU) y con los virus bacteriófagos resultantes se infectaron bacterias *Escherichia coli* Y 1090 deficiente en proteasas (294).

3.14. Detección de clones de bacteriófagos que expresan antígenos de *Trypanosoma cruzi*:

3.14.1 Detección de clones con anticuerpos monoclonales.

Los clones de λ gt11 recombinantes fueron detectados por radio-inmunoensayos sobre placas de fagos crecidos sobre un césped de bacterias *E. coli* Y1090 (294). Los fagos fueron crecidos a 42 °C durante 3 horas. Las proteínas se transfirieron a membranas de NC que previamente fueron embebidas en 10 mM isopropil-b- β -tio-galactopiranósido (IPTG). El primer filtro fue transferido durante 2 horas y su réplica fue efectuada incubando otro filtro durante 3 horas a 37 °C. Los filtros se lavaron en solución TBS durante 10 min. y se bloquearon con TBS-M (ver 3.7.2), durante una hora a temperatura ambiente. Los filtros se incubaron en: AcMo 4 purificado (50 μ g/ml) en TBS-M durante toda la noche, se lavaron con TBS-T (ver 3.7.2.) 3 veces durante 10 min. Como segundo anticuerpo se utilizó suero anti-igG de ratón marcado con 125 I con una actividad específica de 2×10^6 cpm/ μ g, utilizando 10^6 cpm por filtro durante una hora. Luego de 3 lavados se autorradiografiaron con films X Omat AR de Kodak y un intensificador. Las playas de lisis que fueron detectadas por autorradiografía fueron nuevamente sometidas al mismo procedimiento. Los clones sucesivamente purificados por plaqueo y detección por anticuerpos, fueron mantenidos en stocks de alto título en medio SM: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0.1M NaCl, 10 mM MgSO₄ y 0.01 % p/v gelatina (157) a 4 °C. La pureza y presencia de un inserto de ADN en los clones detectados se determinó mediante el crecimiento de los mismos en presencia de IPTG como inductor y X-gal como sustrato de la β -galactosidasa (157).

3.14.2 Determinación simultánea de la actividad de β -galactosidasa y reactividad con anticuerpos policlonales específicos.

Se obtuvieron clones de λ gt11 recombinantes detectados por un suero de conejo anti-péptido sintético SP4. En la últimas etapas de purificación de los

clones se procedió como sigue: una vez crecidos los fagos en presencia de IPTG y X-gal como sustrato de la β -galactosidasa (157) se transfirieron las placas de lisis a un filtro de NC como se explica arriba. El pigmento azul (bromo-cloro-indolil) producto de la acción enzimática de la β -galactosidasa se transfirió también a la NC y resistió las incubaciones con anticuerpos y lavados. El revelado se realizó por incubación con suero de conejo anti-péptido sintético SP4, en una dilución 1: 1000 y como segundo anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina (Bio Rad) (45). NBT y BCIP se utilizaron para el desarrollo del color (ver 3.7.2). La presencia de placas de lisis sin aureola azul y reactivas para la reacción con el anticuerpo, determinó la pureza y presencia de un inserto de ADN en los bacteriófagos aislados.

3.15 Preparación y análisis de proteínas fusionadas a β -galactosidasa en *Escherichia coli*.

Los bacteriófagos recombinantes fueron utilizados a una multiplicidad de infección de 5 para infectar bacterias *E.coli* Y1089 (294), las colonias bacterianas fueron crecidas a 32 °C y testeadas en cuanto a su capacidad de crecer a 42 °C. Las bacterias lisogénicas se cultivaron a 32 °C en medio LB con ampicilina (50 μ g/ml) (157) hasta una densidad óptica de 0.5 a 600 nm y se transfirieron bruscamente a 45 °C; a esta temperatura se incubó durante 25 min. La producción de la proteína de fusión fue inducida con IPTG 10 mM durante una o dos horas a 38°C. Las células se cosecharon a 25 °C (5000 g) y se resuspendieron en Tris-HCL 0.1M, EDTA 10mM y PMSF 1 mM, pH 8, se congelaron en nitrógeno líquido y se sonicaron. Las proteínas de *E.coli* se sometieron a un inmunoblotting para ser reveladas con el AcMo 4. Se utilizó β -galactosidasa purificada (Sigma EEUU) como indicador de peso molecular y fue teñida con negro amido (ver 3.7.2).

3.16 Purificación de las proteínas de fusión:

Los extractos crudos de bacterias lisogenizadas inducidas para la producción de proteínas de fusión fueron tratadas con ADNasa (10 µg/ml) para reducir su viscosidad. El extracto se sometió a una centrifugación a 10.000 g durante 10 min. y el sobrenadante se le agregó tres volúmenes de solución saturada de sulfato de amonio. El precipitado se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y el precipitado se resuspendió en el mínimo volumen de Tris 50 mM, pH 7.2. Se dializó exhaustivamente contra la misma solución y se sometió a una corrida en gel preparativo de poliacrilamida al 7,5 % (143). Luego de la coloración para proteínas en los márgenes del gel, se cortó la banda correspondiente a la proteína de fusión. Esta porción del gel se electro-eluyó en un aparato Bio-Trap (Schleicher & Schuell, Alemania). La proteína eluída se cuantificó por métodos colorimétricos (154).

3.17 Caracterización de los clones de ADN copia obtenidos:

La amplificación de los bacteriófagos recombinantes purificados se llevó a cabo incubando 5.000 a 10.000 fagos en *E. coli*, hasta crecimiento confluyente en placas de 9 cm de diámetro. Se agregó a la placa SM (ver 3.14.1), se agitó durante dos horas y el lavado se centrifugó. Al sobrenadante se le agregó cloroformo en una concentración final del 3 %. La extracción del ADN de los bacteriófagos recombinantes fue llevada a cabo por métodos convencionales (157). Brevemente, los virus fueron tratados en 20 mM de EDTA, 50 µg/ml de Proteínasa K y 0.5 % p/v de SDS. El ADN se extrajo con fenol, cloroformo y se dializó contra Tris 10 mM, EDTA 1 mM. Luego de la digestión con la enzima de restricción Eco RI (Pharmacia, Suecia) el inserto de ADN copia fue subclonado en el vector pUC19 (2B4) y en M13 mp18 (179) utilizando la T4 ADN ligasa. Las bacterias *E. coli* DH5α (103) y JM109 (167) fueron transformadas y se obtuvo el ADN de los plásmidos por lisis alcalina (157) El tamaño del inserto fue determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5 % p/v

luego de la digestión con la enzima EcoRI y se visualizó por tinción con bromuro de etidio.

3.17.1 Secuenciación de bases del ADN:

El análisis de la secuencia de bases del ADN se efectuó siguiendo el método de terminación de cadenas por dideoxinucleótidos (229) en los clones de ADN copia subclonados en el fago M13mp18 o pUC19. Las enzimas utilizadas fueron transcriptasa reversa, DNA polimerasa (fragmento Klenow) con un kit de secuenciación (Bio Rad, EEUU) o Sequenase (USB, EEUU) según instrucciones de los fabricantes con algunas modificaciones (34). Los nucleótidos radiomarcados utilizados fueron dATP α P³² o dATP α S³⁵ (Amersham, Inglaterra).

3.17.2 Determinación del número de copias de λ (FCH-F8-4)₁ en el genoma de *T. cruzi*:

Diferentes cantidades de ADN total de epimastigotes de la cepa Tulahuén Stock 2 (4.6 , 9.2 y 18.4 μ g) y del vector pUC 19 que acarrea el fragmento de λ (FCH-F8-4)₁ (1, 0.5 y 0.25 ng) fueron desnaturalizadas durante 5 min. a 95 °C y aplicadas sobre membranas de nylon (Zeta Probe, Bio Rad) en un aparato de "dot blot" (Bio Rad, EEUU). La sonda fue radiomarcada por "extensión por primer" (157) con dATP-P³². Brevemente se utilizaron los insertos subclonados en M13 o pUC19, los iniciadores de la secuencia: "primers" (Bio Rad. EEUU), 4 mM de Spermidina, 1 mM de DTT, 6 mM de dNTP y la enzima ADN polimerasa. La sonda marcada (10⁵ cpm/ng), se cortó con la enzima de restricción Eco RI y el fragmento se aisló por electroelución de un gel de poliacrilamida al 5 % p/v (Bio Trap, Schleicher & Schuell, Alemania). Las membranas fueron prehibridizadas en 5 x SSC, 5x de solución Denhardt (157), 50 % v/v de formamida, 50 mM de fosfato de sodio, 1 mg/ml ADN de esperma de salmón durante al menos 1 hora a 42°C. La hibridización se llevó a cabo en 5 x SSC, 50 % v/v de formamida, 10 x solución Denhardt, 20 mM de fosfato de sodio, 10 % de dextran

sulfato y la sonda marcada desnaturalizada por calor. Los lavados se efectuaron en 2 x SSC, 30 min. a T amb.; 2x SSC, 0.1 % p/v SDS, 30 min. a T amb. y finalmente en 0.1 x SSC, 0.1 % p/v SDS, 30 min. a 65 °C. Luego de los lavados la membrana se expuso a películas radiográficas.

3.18 Hibridización del ADN copia con el ARN de epimastigotes:

Se transfirió ARN total de *T. cruzi* a filtros Gene Screen Plus (New England Nuclear) luego de someter al ARN a una electroforesis en agarosa al 0.7 % p/v, 2 % v/v de formaldehído. Las tiras con ARN se incubaron con cadenas de ADN complementarias marcadas (en el vector bacteriófago M13) como se detalló en 3.17.2. La hibridización se realizó en 60 % v/v de formamida, 10 x de solución Denhardt, 1 % p/v de SDS, 1 M de NaCl con las sondas (complementarias) desnaturalizadas por calor. La hibridización inespecífica de las sondas con el ARN ribosomal de *T. cruzi* (54) permitió utilizar estos ARN como marcadores de peso molecular, antes de efectuar los lavados en condiciones más estrictas para eliminar las uniones inespecíficas.

3.19 Hibridización del ADN copia con el ADN de epimastigotes de diversas cepas y clones de *T. cruzi*.

Se obtuvo ADN de epimastigotes de las cepas Y y Tul2; de los clones Sylvio X-10/1, Miranda/75, M/76, M/78, M/80, M/84 y CAI/70, y de los promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana*. Se corrió 20 µg de ADN de cada clon o cepa cortado por las enzimas Pvu II y Hind III, en cada canal de una electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v. Se transfirió el ADN (262) depurinizado en HCl 0.25 M, desnaturalizado en NaOH 0.5 M, NaCl 1 M y neutralizado en Tris 1 M, pH 8.0. La membrana de nylon (Zeta Probe, Bio Rad, EEUU) con el ADN de los parásitos se incubó con el inserto del clon λ(FCH-F8-4), suclonado en el vector pUC19, marcado por el

método de extensión por primer con dATP-P³² (ver 3.17.2). La prehibridización, hibridización, lavados y exposición se realizó según (3.17.2). Como standard de peso molecular se utilizó fragmentos del plásmido pBR328 digerido con EcoRI, Bgl I y HinfI.

3.20 Síntesis del péptido SP4, acoplamiento a KLH e inmunización de animales:

El péptido que corresponde a la totalidad de aminoácidos de la secuencia del clon de ADN copia de λ (FCH-F8-4)₁= SP4, fue sintetizado en fase sólida (166) en un sintetizador de péptidos automático (Applied Biosystems 430 A, EEUU). La síntesis del péptido SP4 se llevó a cabo en el Centro Biomédico de Uppsala, Suecia, gracias a la colaboración de Ake Engstrom del Dept. de Inmunología. Luego de la desprotección con Fluoruro de Hidrógeno (type I, Peptide Institute Inc., Japón) la pureza fue examinada por cromatografía de alta presión en fase reversa (Pharmacia, Suecia) y por espectrometría de masas (Bio Ion Nordic AB, Suecia) (265). El péptido sintético fue acoplado a KLH (Keyhole Limpet Hemocyanine, Calbiochem, EEUU) por medio de glutaraldehído. Igual cantidad de péptido y KLH fueron disueltos en PBS a una concentración de 2 mg/ml y mezclados con glutaraldehído hasta una concentración final de 5 mM. La mezcla se dejó interactuar durante toda la noche a temperatura ambiente, en agitación, siendo posteriormente dializada contra agua destilada.

La inmunización de ratones BALB/c con el péptido sintético SP4 se realizó con cinco dosis semanales de 50 μ g de SP4 en su forma libre/ratón/dosis con *B. pertussis* como adyuvante (ver 3.3). Otro grupo de ratones fue inoculado con SP4 acoplado a KLH (ver 3.20), con Bp. Un grupo control se inoculó con cinco dosis de KLH con Bp y otro grupo adicional fue inoculado sólo adyuvante.

La Inmunización de conejos con el péptido SP4 se realizó en 3 dosis de 200 μ g de SP4 en su forma libre, adyuvado con *B. pertussis*.

3.21 Inhibición de la reactividad de sueros anti-fracción flagelar sobre antígenos de *T. cruzi* por el péptido sintético SP4:

Los sueros de ratón anti-fracción flagelar fueron diluidos en PBS-leche 1 % p/v e incubados con el inhibidor (BSA como control negativo, homogenato total de epimastigotes como control positivo o péptido sintético SP4) durante 1 hora en una placa de 96 orificios previamente bloqueada como se indicó en 3.10. Estas incubaciones fueron transferidas a placas previamente cubiertas con extractos de epimastigotes como antígeno. La técnica de ELISA se desarrolló como se ha descrito en 3.10.

3.22 Reacción de hipersensibilidad retardada a antígenos del *Trypanosoma cruzi*.

A los ratones inmunizados con el péptido sintético SP4, acoplados o no a KLH con Bp como adjuvante (ver 3.9) se les inoculó por vía intradérmica en la almohadilla plantar 50 µg de homogenato total de epimastigotes en una pata posterior y solución salina como control negativo en la pata contralateral. La reacción cutánea fue medida con un micrometro (L.S. Starret Co., EEUU) 48 horas luego de la inoculación. Los resultados se expresan como un índice de induración o de estimulación igual al espesor de la pata inoculada con antígeno contra el espesor de la inoculada con solución salina.

3.23 Análisis de la secuencia primaria de aminoácidos de SP4:

Se ha evaluado un algoritmo que permite una predicción por comparación entre segmentos anfipáticos de un péptido con la localización de sitios específicos de reconocimiento de las células T. Este algoritmo se basa en el estudio de bloques de 7 o 11 residuos (aa) y el cálculo de los índices anfipáticos (159). El programa de análisis de predicción de sitios antigénicos T, fue escrito FORTRAN 77 y corrido en

un equipo MICROVAX II/780 bajo el sistema operativo VMS, gracias a la colaboración de Silvia Bruschini.

3.24 Amplificación de insertos de ADN por la enzima polimerasa (PCR):

Varios de los clones de ADN copia obtenidos con un suero de conejo anti - péptido SP4 fueron purificados (ver 3.14.2). La amplificación de los insertos se efectuó con 10 μ l de la suspensión de bacteriófago recombinante (10^8 fagos/ml) y 2 μ l de tampón de lisis: 0.25 M Tris pH 9.0, 0.5 M KCl, 0.1 % Tween 20); se hirvió la muestra durante 5 min. y se mantuvo en hielo. Se agregaron 5 pmoles de "primers" o iniciadores de λ gt11 en ambos sentidos de síntesis (Clontech, EEUU), 2,5 U de enzima Ampli *Taq* ADN polimerasa (Perkin Elmer Cetus , EEUU), 20 μ M dNTP y la reacción se llevó a cabo en 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂ y 0.01 % de gelatina. Los 35 ciclos de amplificación se efectuaron en las siguientes condiciones: 94 $^{\circ}$ C 2 min.; 65 $^{\circ}$ C 3 min.; 75 $^{\circ}$ C 3 min. en un "DNA Thermal cycler" , Perkin Elmer Cetus, EEUU.

4 RESULTADOS:

Con el propósito de analizar los componentes de la fracción flagelar de epimastigotes de *T. cruzi*, se han producido anticuerpos monoclonales. En una fusión se obtuvieron 19 hibridomas positivos por técnicas de ELISA-peroxidasa e inmunofluorescencia indirecta sobre el parásito. De los hibridomas clonados por dilución limitante, se obtuvo un clon secretor del AcMo FCH-F8-4 (AcMo 4), cuyo isotipo es una IgG3 (dato no mostrado). Este anticuerpo no reconoce ningún componente en el parásito *Leishmania mexicana mexicana* en ensayos de ELISA-peroxidasa e "immunoblotting". Un AcMo anti-virus respiratorio sincicial (AcMo anti-VRS) fue utilizado como control negativo en todos los experimentos. EL AcMo 4 y el control negativo fueron purificados por cromatografía de afinidad a partir de fluidos ascíticos producidos en ratones BALB/c.

La caracterización del AcMo 4 mediante técnicas que involucran una actividad biológica sobre el parásito, incluyó el estudio de la capacidad de neutralización de la infectividad de tripomastigotes sanguíneos en ratones de la cepa BALB/c y la actividad lítica in vitro sobre tripomastigotes provenientes de cultivo de células.

En tres experimentos diferentes de neutralización, la sobrevivencia de los ratones que fueron inoculados con parásitos previamente incubados con el AcMo 4, superó entre un 40 y un 80 % a la sobrevivencia que mostraron los ratones controles con el AcMo anti-VRS. También se encontraron diferencias respecto de los controles, con referencia a la mortalidad, observándose un retraso en la aparición de la misma en los animales que recibieron parásitos incubados con el AcMo 4. En la Tabla 1 se observa que la neutralización de la infectividad de los tripomastigotes fue más efectiva cuando se utilizó una cantidad de anticuerpo mayor de 300 µg en las preincubaciones.

Tabla 1 : Neutralización de la infectividad en ratones BALB/c y lisis mediada por complemento sobre tripomastigotes por el anticuerpo monoclonal FCH-F8-4

Anticuerpo	% de sobrevivencia después de la inoculación de parásitos + anticuerpos (día de prepatencia \pm DE)						% de lisis mediada por complemento \pm DE (b)
	(a) 150 μ g	200 μ g	300 μ g	400 μ g	600 μ g	Dilución 1:50	
AcMo anti-YRS	0 (21.4 \pm 5.8)	0 (19.2 \pm 3.4)	20 (17.6 \pm 0.8)	20 (17.3 \pm 3.0)	20 (21.5 \pm 2.5)	-	6.3 \pm 10.9
AcMo FCH-F8-4	60 (27.0 \pm 3.5)	60 (29.5 \pm 5.5)	60 (27.5 \pm 6.0)	100 -	80 (38.0 \pm 1.2)	-	60.8 \pm 17.1
Suero de ratón crónico						80 (27.8 \pm 2.6)	70.0 \pm 8.6

(a) Cantidad total de anticuerpo preincubado con 500 tripomastigotes e inoculados vía i.p. por ratón.
 (b) 2.5 x 10E6 parásitos se incubaron con 200 μ g de AcMo o suero de ratón crónico. Luego de la incubación con suero humano normal inactivado o no, se calculó el porcentaje de lisis.

La actividad lítica de este anticuerpo sobre tripomastigotes provenientes de cultivo celular, por medio de complemento, se demostró en seis diferentes experimentos. El rango de porcentaje de lisis varió entre el 40 y 80 % (60.8 ± 17.5 %), mientras que los controles con el AcMo anti-VRS no superaron el 20 % (6.3 ± 10.9) (Tabla 1).

La caracterización de los antígenos que son reconocidos por el AcMo 4 por inmunofluorescencia indirecta, mostró que este anticuerpo se une a la superficie de los tripomastigotes y epimastigotes (dato no mostrado en este manuscrito). Este dato fue corroborado por el Dr. Wanderley de Souza en experimentos con microscopía electrónica en que el AcMo 4 se une al endosoma y la membrana del flagelo (comunicación personal). Cuando se analizó la actividad de este anticuerpo monoclonal mediante la técnica de "immunoblotting", se observó el reconocimiento de varias bandas proteicas con peso molecular entre 50 y 150 kDa en epimastigotes (Fig. 1A □), mientras que sólo fueron reconocidas dos proteínas, una de 15 y otra de 48 kDa en tripomastigotes (Fig. 1A ■).

Utilizando el AcMo 4 como inmuoadsorbente, se purificaron por cromatografía de afinidad los antígenos que este anticuerpo reconoce (Ag4) en el estadio epimastigote. El rendimiento de la purificación resultó aproximadamente del 1 % de proteína purificada sobre las proteínas que componen el homogenato total del parásito. Los antígenos purificados fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), electrotransferidos a nitrato de celulosa y teñidos con colorantes para proteínas, como resultado, se visualizaron varias bandas (Fig. 1B ●). Cuando por "immunoblotting" se reveló una tira de NC con el AcMo 4, todas estas moléculas fueron reconocidas, coincidiendo con el patrón de reactividad que presenta el AcMo 4 sobre preparaciones de epimastigotes (Fig. 1B ○).

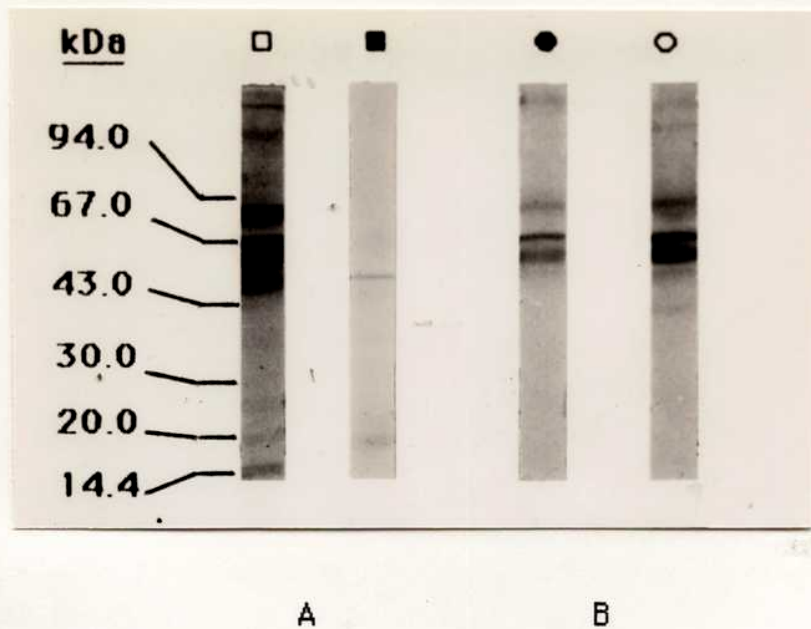


Figura Nº1: Reactividad del AcMo 4 sobre epimastigotes (□), tripomastigotes (■) y antígenos inmunopurificados (●). Tinción con Negro Amido de las proteínas purificadas por afinidad con el AcMo 4 (○).

Los antígenos purificados por afinidad con el AcMo 4 (Ag 4) fueron ensayados en experimentos de inmunoprotección en ratones BALB/c utilizando *B. pertussis* como adyuvante. La actividad, como inmunógeno, de estos componentes antigénicos fue comparada con los resultados obtenidos en ratones inmunizados sólo con adyuvante. Los animales inmunizados con el Ag 4 fueron protegidos contra el desafío con 1000 tripomastigotes sanguíneos, en términos de sobrevivencia y parasitemia. La sobrevivencia de los ratones inmunizados con el Ag4 fue del ciento por ciento en los dos experimentos realizados (Tabla 2), mientras que los controles sobrevivieron en un 50 al 60 %. En cuanto a la infección de los ratones inmunizados con el Ag 4 y desafiados, un 60 % se mantuvo sin parasitemia detectable hasta el día 40 post-infección. Los valores de la parasitemia observados para el 40 % de ratones que se infectaron, oscilaron en el 10 % respecto de los controles no inmunizados (Tabla 2).

Tabla 2 : Sobrevida y parasitemia de ratones inmunizados con el antígeno purificado por afinidad con el AcMo 4 y desafiados por una infección por T.cruzi

Nro.de exp.	Inmunógeno	% de sobrevida después del desafío				% de ratones infectados	Parasitemia (b) Parásitos/ml x 10 E6 ± DE (día)
		10(a)	20(a)	30(a)	40(a)		
1	Bp	100	60	60	60	100	1.35±0.21 (22)
	BSA	100	60	60	60	100	1.52±0.32 (22)
	Bp+Ag 4	100	100	100	100	40	0.11±0.10 (23) (c)
2	Bp	100	70	60	55	100	0.95±0.22 (25)
	BSA	100	60	50	50	100	1.24±0.50 (24)
	Bp+Ag 4	100	100	100	100	40	0.15±0.08 (25) (d)

(a) Días post infección

(b) Datos en el pico de parasitemia

(c) y (d) Diferencia estadísticamente significativa con los ratones inmunizados con Bp o BSA, P < 0.001, t de Student

Los sueros de los ratones inmunizados con el Ag 4 se ensayaron, luego de la segunda dosis, en cuanto a la presencia de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* por ensayos de ELISA y de inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre tripomastigotes. La reactividad de cinco sueros de ratones ensayados tuvo un rango de 0.2 a 0.65 en ELISA a una dilución de 1:1600 (Fig. 2A), mientras que en IFI los títulos observados estuvieron en un rango de 1:8 a 1:32 (Fig. 2B).

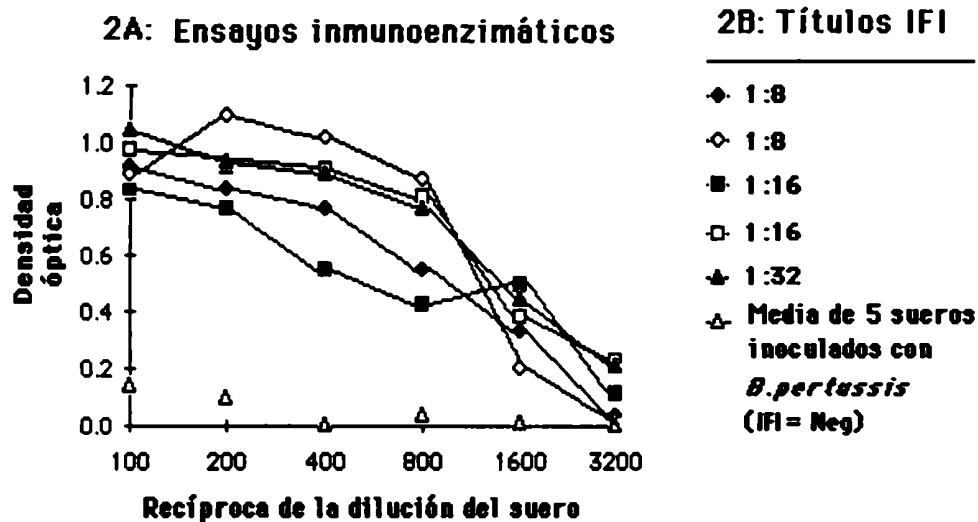


Figura Nº 2 : Reactividad de los sueros de ratones inmunizados con Ag 4 adjuvado con *B. pertussis*.

Para analizar y caracterizar la/s porción/es de ADN que codifican para estos antígenos en el *T. cruzi*, se trabajó con una genoteca de ADN complementario, realizada en el vector de expresión λ gt11, a partir de ARN mensajero de epimastigotes de la cepa Tulahuén (stock 2). Con el AcMo 4, se detectaron las proteínas recombinantes (fusionadas a β -galactosidasa) producidas por los virus bacteriófagos λ gt11 en las bacterias huéspedes adecuadas. Aproximadamente 100.000 placas de bacteriófagos se ensayaron por radioinmunoensayo para la

detección del epítipo que reconoce el AcMo 4. Se obtuvieron dos placas positivas: $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$ y $\lambda(\text{FCH-F8-4})_2$ (Fig. 3A). Estos clones de bacteriófagos fueron crecidos en presencia de IPTG y de X-gal como sustrato para comprobar la inactividad de la enzima β -galactosidasa, lo que probó la presencia de un inserto en dicho gen, o dicho de otro modo, que ambos clones eran recombinantes. En ensayos posteriores la purificación de clones anti-péptido sintético SP4 se efectuó en forma simultánea la determinación de la actividad de la enzima β -galactosidasa y unión del anticuerpo específico al clon recombinante (Fig. 3B).

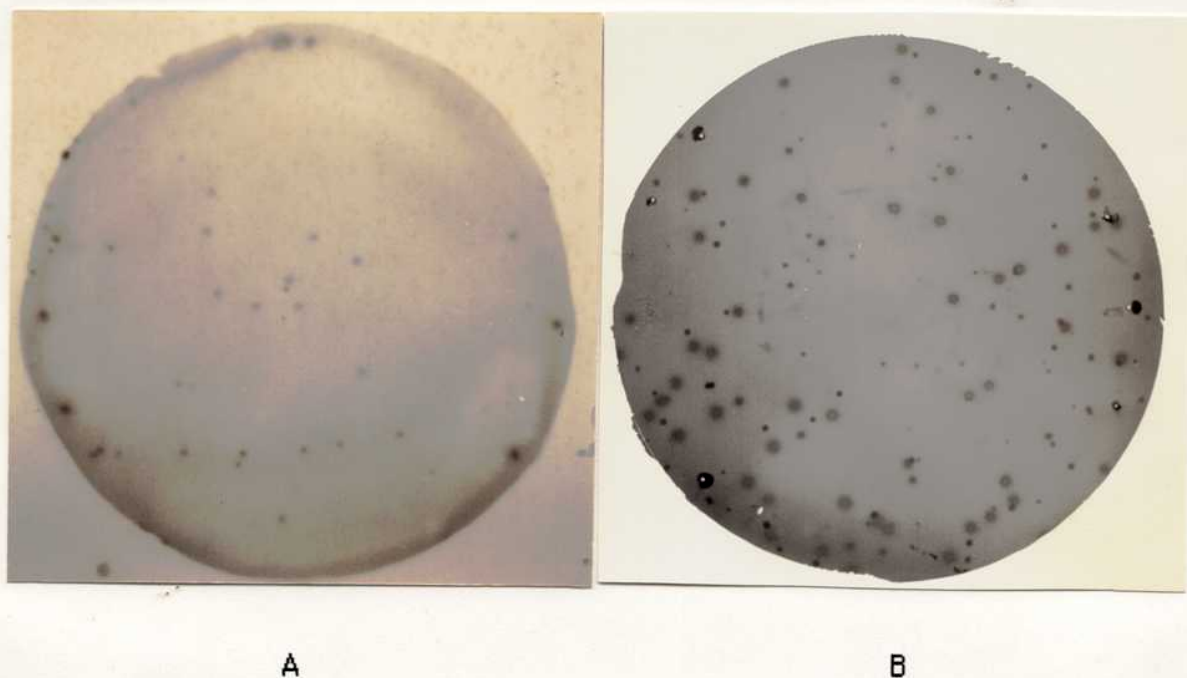


Figura Nº 3: Filtros de Nitrocelulosa de una genoteca de ADNc de *T. cruzi* plaqueada sobre bacterias *E. coli*.
A: Autorradiografía de un filtro en el tercer paso de purificación, incubado con AcMo 4 y anti-IgG de ratón radiomarcada. Se observan las playas de lisis positivas y negativas para la reacción con el anticuerpo.
B: Filtro de NC plaqueado en presencia de X-Gal e IPTG, revelado con suero de conejo anti-péptido sintético SP4 y anti-IgG de conejo marcada con fosfatasa alcalina. Cabeza de flecha: placa positiva por detección inmunológica y negativa para la actividad de la β -gal. Flecha: placa de lisis positiva por el test de X-gal, demostrando la actividad de la enzima β -galactosidasa y que el clon no contiene inserto.

La proteína híbrida codificada por el clon $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$ fusionada a la enzima β -galactosidasa fue producida al inducir cultivos de *E. coli* cepa Y1089 lisogenizadas por el bacteriófago recombinante $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$. Esta proteína de fusión fue reconocida por el AcMo 4 por ensayos de "immunoblotting" (Fig. 4B), exhibiendo un peso molecular de 118 kDa. La proteína recombinante fue también reconocida por un suero policlonal anti-péptido sintético y por sueros de ratones crónicos mientras que sueros de ratones normales no la reconocen. La β -galactosidasa expresada por bacterias *E. coli* lisogenizadas con un bacteriófago $\lambda\text{gt}11$ de tipo salvaje, no fue reconocida por el AcMo 4 (Fig. 4A) ni por ninguno de sueros anteriores (datos no mostrados).

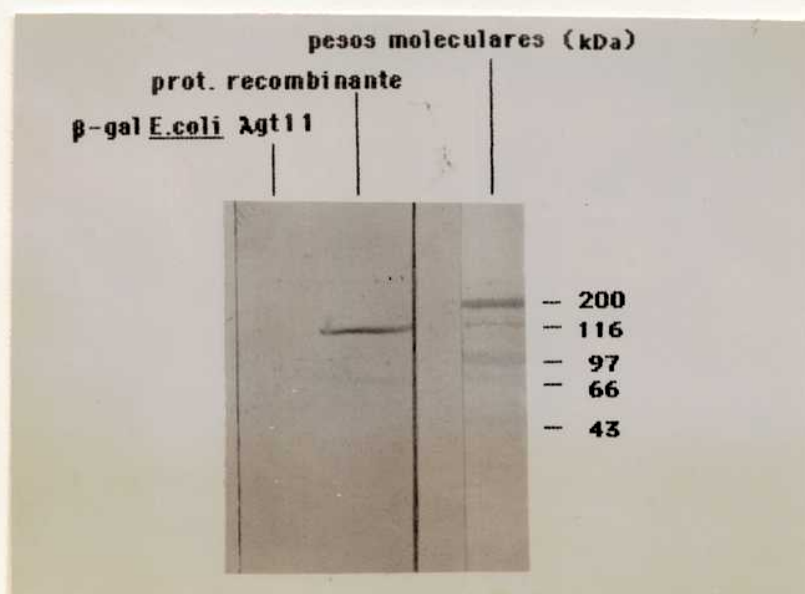


Figura Nº 4: "Immunoblotting" de las proteínas inducidas en la bacteria *E. coli*. A: Enzima β -gal inducida en la bacteria lisogenizada por el fago $\lambda\text{gt}11$ salvaje, no reconocida por el AcMo 4. B: Reconocimiento por el AcMo 4 de la proteína recombinante codificada por el clon $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$ fusionada a la enzima β -galactosidasa.

El inserto del clon $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$ mostró un tamaño de 150 pares de bases y en el clon $\lambda(\text{FCH-F8-4})_2$ el tamaño fue de 220 pb en geles de poliacrilamida al 5 % (datos no mostrados). Estos insertos fueron subclonados en el bacteriófago M13 y en el plásmido pUC19 y utilizarlos como sonda para hibridización a ADN o a ARN y como templado para analizar su secuencia de bases.

El inserto del clon $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$, hibridizó con una única banda de ARN mensajero de 5.0 kilobases (Fig. 5A), y como se hibridizaron ambas cadenas complementarias al ARN total de epimastigotes, fue posible conocer el marco de lectura para la traducción de proteínas, ya que la cadena simple de ADN que no hibridizó con el ARNm (Fig. 5B) es la codante.

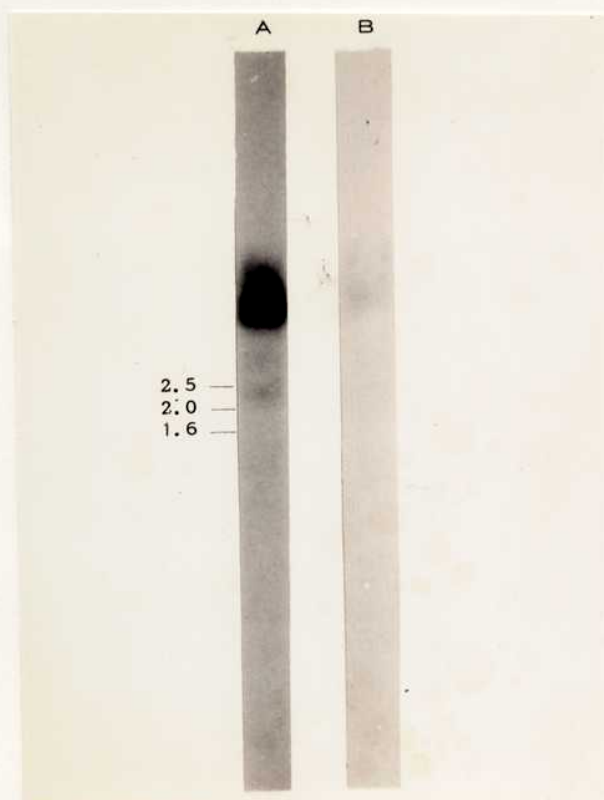


Figura Nº 5: El ARN de epimastigotes fue sometido a electroforesis y transferencia a membranas de nylon. Se hibridizaron tiras individuales con sondas de ADN de simple cadena y complementarias radiomarcadas. A: banda de ARNm de 5.0 Kb reconocida por la cadena no codante. B: ausencia de hibridización con la cadena codante.

Para estimar la cantidad de veces, en forma aproximada, en que se encuentra la información del clon $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$ codificada en el genoma del parásito, se hibridaron comparativamente cantidades conocidas de ADN de epimastigotes de la cepa Tulahuén y cantidades conocidas del ADN del inserto de $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$ con este mismo inserto radiomarcado. La comparación de las señales de hibridación por la autorradiografía demostró que este inserto se encuentra repetido en una baja frecuencia en el genoma haploide del parásito. Si consideramos al genoma haploide de *T. cruzi* de $1.25 \cdot 10^8$ (146) y que la señal de la hibridación de 9,2 μg de ADN del parásito corresponde a la de 1.0 ng de plásmido pUC19 que contiene el inserto (Fig. 6), el cálculo aproximado del número de copias del inserto $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$ sería aproximadamente de 5 en el genoma haploide de *T. cruzi*. Si tomáramos en cuenta $3.5 \cdot 10^7$ pares de bases como tamaño del genoma (54) la correspondencia sería ahora de 1.3 μg de ADN de *T. cruzi* por cada 0.1 ng de inserto clonado en pUC19 y alrededor de 14, las veces en que estaría representado este inserto en el genoma haploide del parásito.

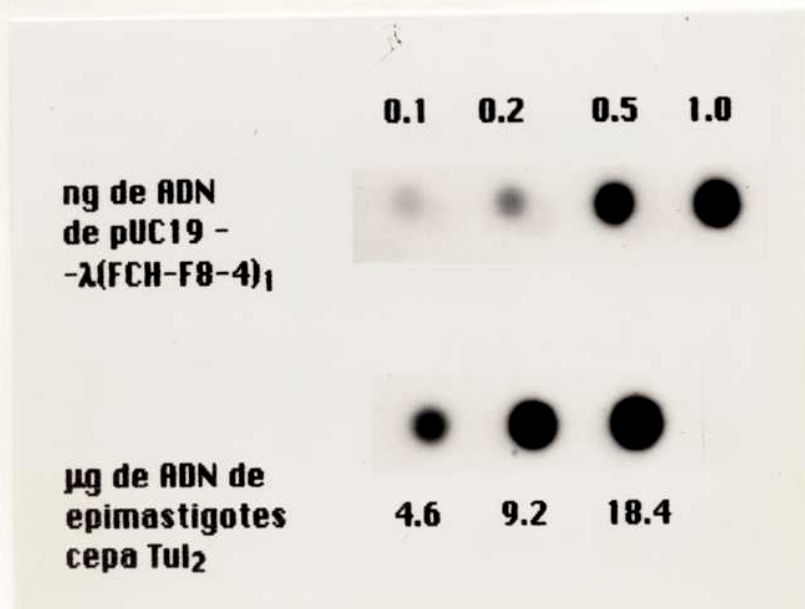


Figura Nº 6: Determinación aproximada del número de veces en que se encuentra representado el inserto del clon $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$ en el genoma haploide de *T. cruzi*. Las cantidades señaladas de ADN total de epimastigotes y de inserto clonado en el plásmido pUC19 fueron hibridizadas con el mismo inserto radiomarcado (ver 3.17.2).

El inserto de $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$ radiomarcado y utilizado como sonda hibridizó también con el ADN de diversos clones y cepas de *T. cruzi*. Cuando el ADN total de epimastigotes de la cepa Tulahuén se cortó con la enzima de restricción Eco RI, fue reconocida una única banda de ADN de 8 kb (dato no mostrado). Cuando el ADN de las cepas Tul₂, Y y el de los clones CA 1/70, Sylvio X-10/1, Miranda /75, M/76, M/78, M/80 y M/84 fue cortado por las enzimas Pvu II y Hind III, la banda de ADN reconocidas en todos los aislados y clones fue de alrededor de 5 kb (Fig. 7). Este inserto no mostró ninguna hibridización con el ADN de *Leishmania m. mexicana*. En los clones CA1/70 Miranda/75 y Sylvio X-10/1 la hibridización observada es menor y como se sembró idéntica cantidad de ADN de cada aislado, podría decirse que en estos clones este gen se encuentra representado con un menor número de copias que las que presenta nuestra cepa de estudio original Tulahuén (Fig. 7).

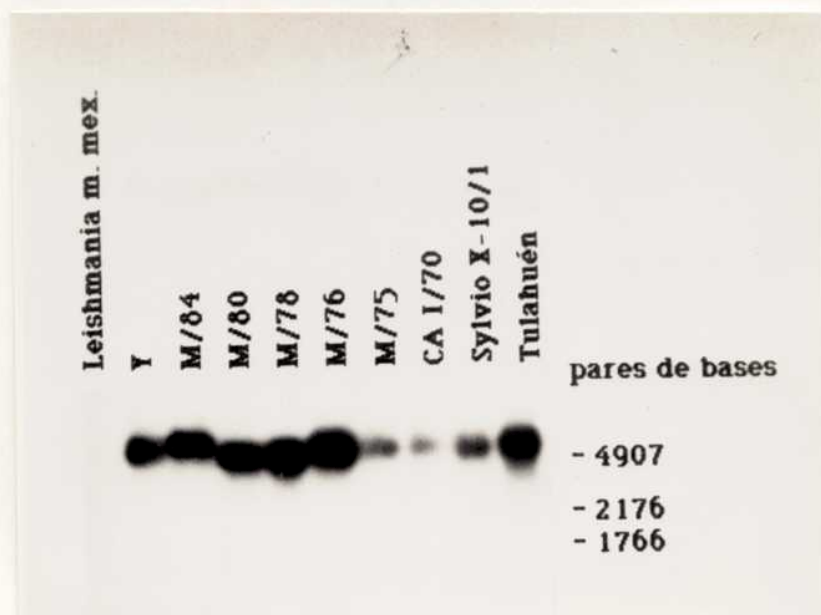


Figura Nº 7: 20 μg de ADN de las cepas y los clones arriba mencionados fueron cortados con las enzimas Pvu II y Hind III, migrados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y transferidos a membranas de nylon. El inserto de $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$ fue marcado por extensión por primer (ver 3.17.2) y utilizado como sonda para la hibridización (3.19).

La secuencia de bases del ADN determinada como codante para el clon λ (FCH-F8-4)₁, presentó un codón de stop de la síntesis proteica. Esto implica que el epítopo reconocido por el AcMo 4 se encuentra localizado en las cercanías del extremo carboxilo de la proteína para la cual este clon de ADN codifica. Este pequeño inserto no presentó unidades de repetición internas, en su secuencia aminoacídica, ni sitios de N-glicosilación al no contener la secuencia asp-X-thr/ser (Fig. 8).

CCT	GCC	TTC	CTT	66A	TGT	AGT	AGC	CGT	TTC
P	R	F	L	G	G	S	S	R	F

TCA	GGC	TCC	TTC	TCC	GGG	GTC	GAG	CCC	TAA
S	G	S	F	S	G	V	E	P	*

CCCTCCGTTACCCGTTGTCACCATGCTGGCCAAGACCCAG
 CCGTCGAAAGTTGATAGGGCAGAAATTTGAATGAGGAATT

Figura Nº 8: Secuencia del clon λ (FCH-F8-4)₁. El asterisco marca el codón de stop de la síntesis proteica. El recuadro marca el péptido codificado por esta secuencia de bases. Las letras simbolizan los aminoácidos: P= prolina; A= alanina; F= fenilalanina; L= leucina; G= glicina; S= serina; R= arginina; Y= valina y E= ácido glutámico.

El péptido correspondiente a la totalidad de la secuencia de nucleótidos del clon de ADN copia de λ (FCH-F8-4)₁: SP4 (Fig. 8) fue sintetizado en fase sólida. El análisis cromatográfico por columnas de HPLC del péptido sintético mostró un pico dominante. La espectrometría de masa permitió identificar un componente principal con una masa acorde con el peso molecular de SP4 = 1932 (Fig. 9). El perfil obtenido es bueno para un péptido que contiene cisteína, pues generalmente estos péptidos muestran varios picos en espectrometría de masas, por los diferentes productos de oxidación de la cisteína.

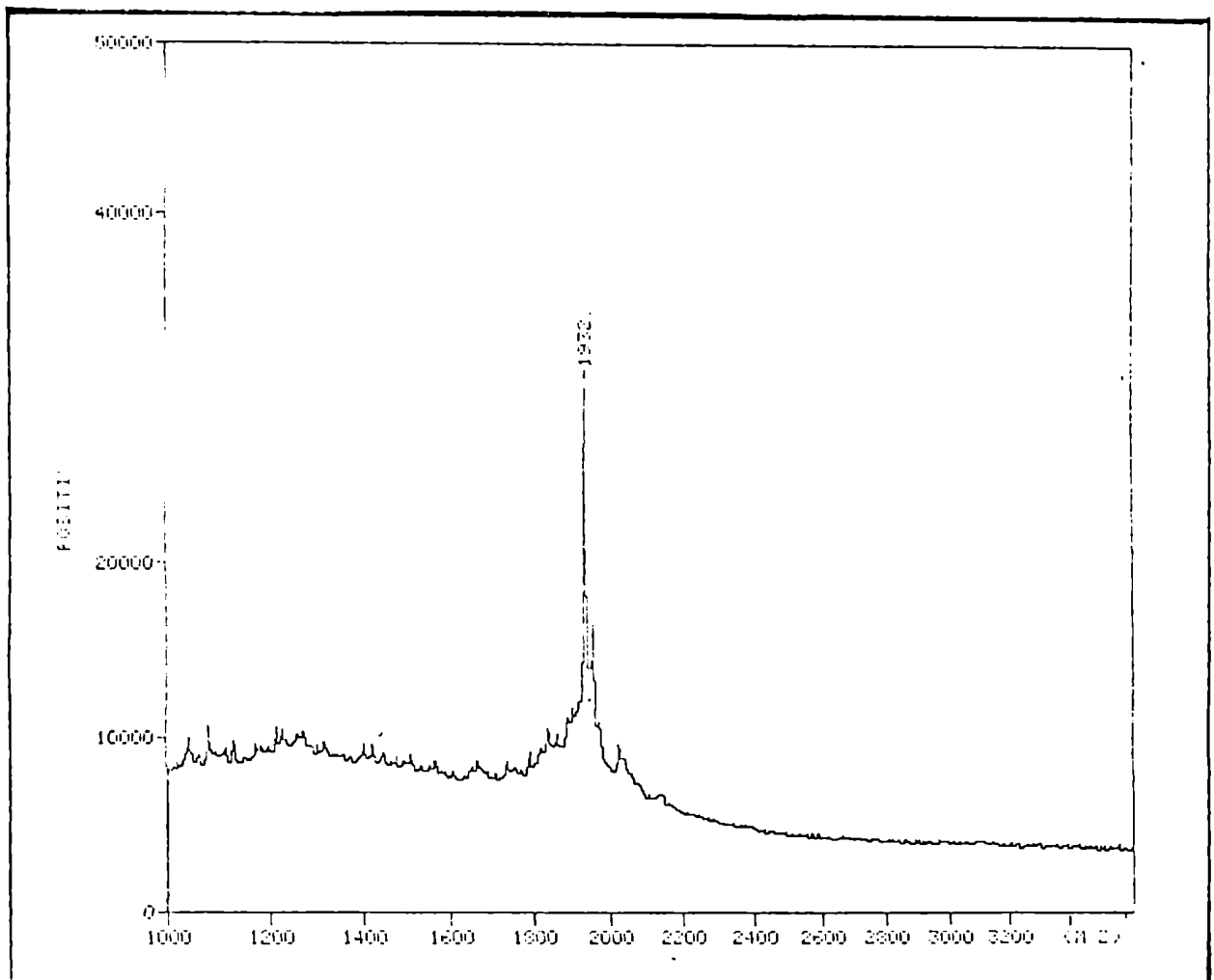


Figura Nº 9: Análisis del péptido sintético SP4 por espectrometría de masas, realizado por Å. Engstrom, en el Dpto. de Inmunología del Centro Biomédico, Uppsala, Suecia. El único pico central muestra la pureza del péptido y una masa acorde a la de SP4.

El péptido sintético SP4 mostró tener capacidad de inhibición de la reactividad de sueros de ratón anti-fracción flagelar de *T. cruzi* sobre el homogenato total de epimastigotes. Se ensayaron 10 sueros y el porcentaje de inhibición debido al péptido, varió dentro de un rango del 13 al 52 % de la reactividad, en una dilución de 1:160 (v/v) (Fig. 10).

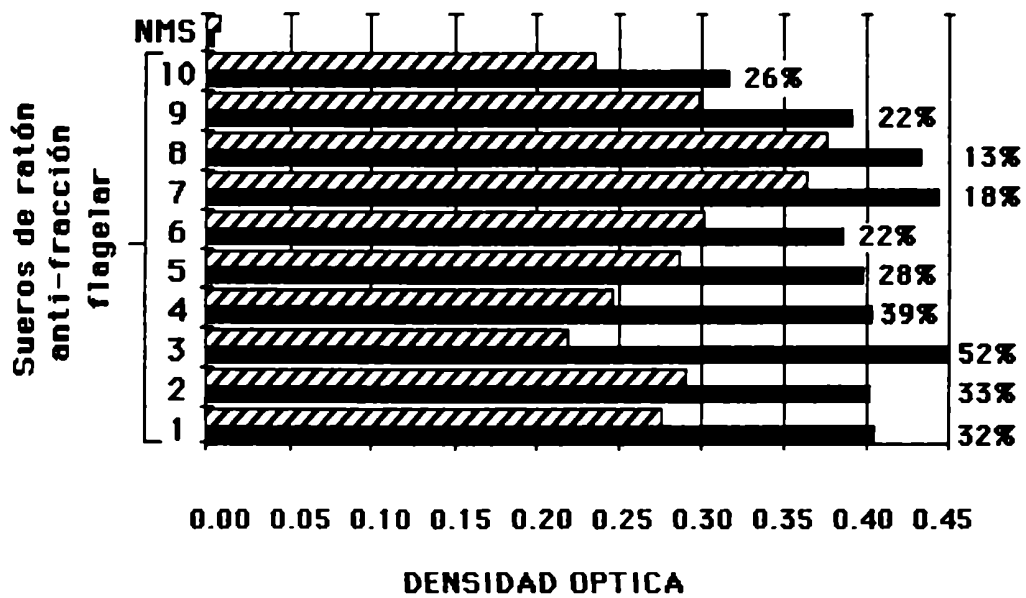


Figura Nº 10: Inhibición de la reactividad de sueros de ratones anti- fracción flagelar sobre el homogenato total de epimastigotes (HT) debido a la presencia del péptido sintético SP4: Se ensayaron 10 sueros de ratón anti-fracción flagelar diluídos 1:80 e incubados con el mismo volumen de inhibidor: péptido SP4, 20 µg/ml (▨) o con el control, BSA 20 µg/ml (■). Luego de una hora de incubación se transfirieron los sueros a una placa previamente cubierta con HT (ver 3.21), donde se desarrolló la reacción de ELISA (ver 3.10). Las barras rayadas representan la inhibición por el péptido sintético SP4 de la reactividad de cada suero frente al HT como antígeno. Los valores de inhibición están tomados en relación con la reactividad del mismo suero inhibido con BSA (barras negras) como control. NMS= Suero de ratón normal.

Con el péptido SP4 en su forma libre o acoplado por medio del glutaraldehido a la proteína transportadora KLH, se inmunizaron ratones de la cepa BALB/c utilizando *Bordetella pertussis* como adjuvante. Los sueros de estos ratones inmunizados mostraron una reactividad específica contra el péptido SP4 y también contra epimastigotes de *T. cruzi* cuando se los ensayó por técnicas inmunoenzimáticas. La reactividad contra el SP4 se tradujo en una densidad óptica (DO) de 0.6 ± 0.15 para una dilución de 1 :160 en los ratones inmunizados con SP4-Bp. La reactividad de los sueros de los animales inmunizados con SP4-KLH-Bp mostró a la misma dilución una DO de 0.5 ± 0.1 . (Fig. 11). La densidad óptica de los sueros anti-fracción flagelar contra el SP4 fue de 0.3 ± 0.05 a una dilución 1/160 (dato no mostrado).

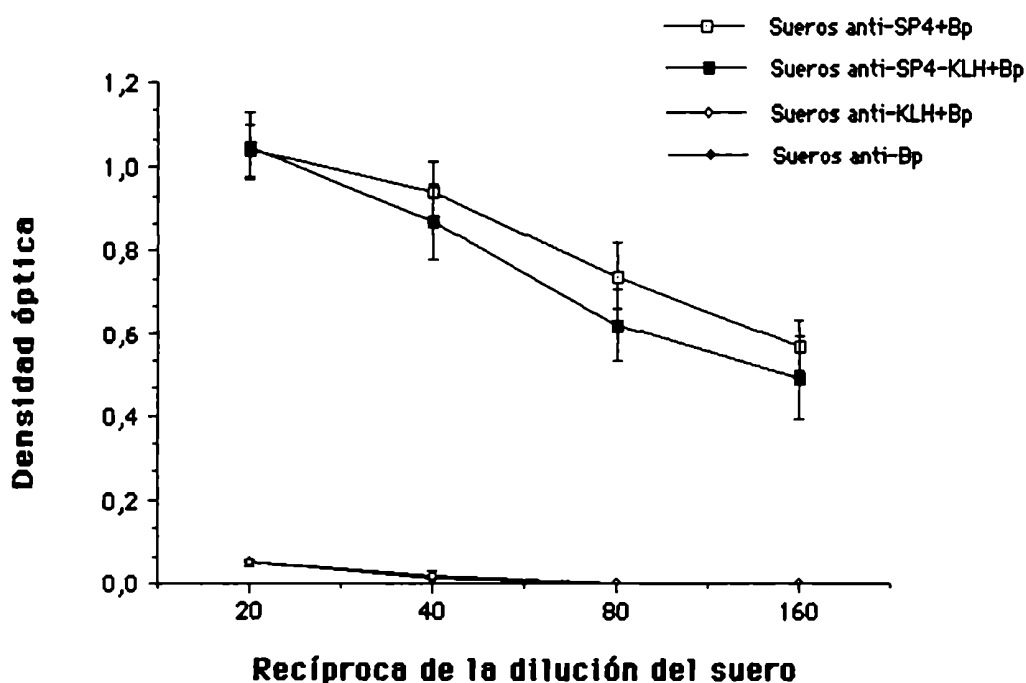


Figura Nº 11: ELISA: Reactividad de los sueros de ratones inmunizados con el péptido SP4, utilizando el mismo péptido como antígeno.

Cuando se analizó la reactividad de los mismos sueros pero utilizando esta vez como antígeno el homogenato total de epimastigotes (HT), se obtuvieron los valores de 0.25 +/- 0.1 en una dilución 1:160 para el grupo inmunizado con SP4 - Bp y 0.25 +/- 0.05 para el grupo SP4-KLH-Bp (Fig. 12). Los sueros anti-fracción flagelar reaccionaron contra el HT con una densidad óptica mayor de 1.8 cuando se los ensayó a una dilución 1/160 (dato no mostrado).

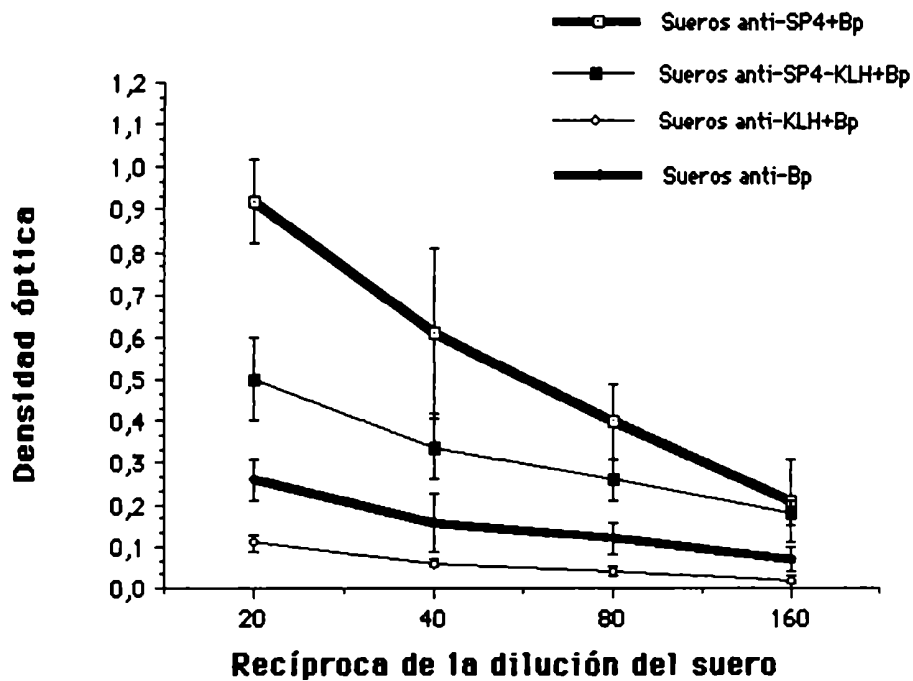


Figura Nº 12: ELISA: Reactividad de los sueros de ratones inmunizados con el péptido SP4, utilizando un homogenato total de epimastigote como antígeno.

Los sueros de ratones inmunizados con el péptido sintético SP4 en su forma libre o acoplado a KLH, reconocieron en ensayos de "immunoblotting" exactamente las mismas bandas proteicas que el AcMo 4 sobre homogeneizados de epimastigotes (Fig. 13). Cuando los mismos sueros fueron ensayados por inmunofluorescencia indirecta se observó un reconocimiento de la superficie de los epimastigotes (dato que no se muestra en este manuscrito).

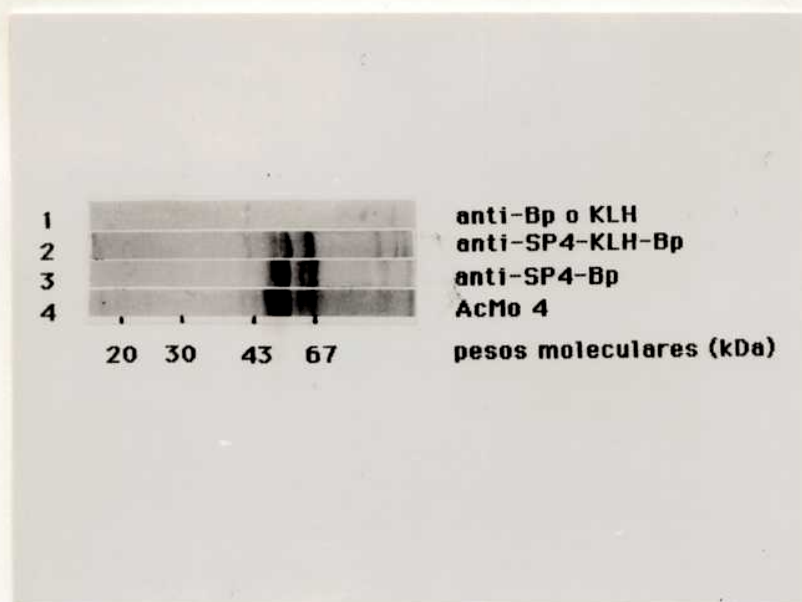


Figura Nº 13: "Immunoblotting" mostrando la reactividad de los sueros de ratones inmunizados con *B. pertussis* (Bp) o KHL-Bp (1), péptido SP4 acoplado a KLH (2), péptido SP4 en su forma libre (3) sobre tiras de nitrato de celulosa en las que se transfirió homogeneizado total de epimastigotes. En 4 se muestra la reactividad del AcMo 4 sobre los mismos antígenos.

Para investigar si la inmunidad mediada por células juega un rol en la respuesta inmune hacia el SP4, a los animales inmunizados con el péptido sintético se les inoculó homogenato total de epimastigotes en la almohadilla plantar. Estos ratones mostraron hipersensibilidad retardada a la inoculación del parásito por vía intradérmica, como lo muestra comparativamente los índices de induración graficados (Fig. 14) para los animales inmunizados con SP4-Bp: 1.35 ± 0.1 , o con SP4-KLH-Bp: 1.2 ± 0.08 ; comparados con los controles que expresan los siguientes índices para los grupos inmunizados sólo con KLH-Bp o Bp: 1.04 ± 0.03 . Cabe aclarar que los ratones crónicos para la infección con *T. cruzi* presentan índices de 1.57 ± 0.07 y en los inmunizados con fracción flagelar se observa un índice de 1.75 ± 0.09 (Fig. 14).

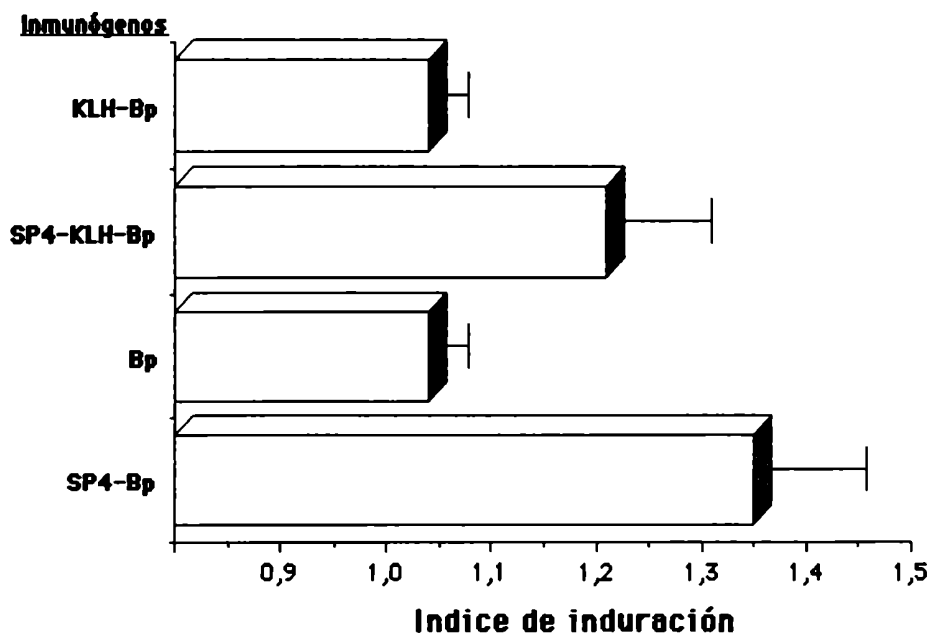


Figura Nº 14: Los animales inmunizados con péptido SP4 libre o ecoplado a KLH, con *B. pertussis* como adjuvante fueron inoculados con 50 µg de homogenato total de epimastigotes (HT) en una pata posterior. En la pata contralateral se inoculó solución salina (SS) como control negativo. La reacción cutánea fue medida con un micrometro a las 48 horas. El índice de induración se midió como: espesor de la pata inoculada con HT/ espesor de la pata inoculada con SS.

El péptido SP4 se estudió por un programa de computación a partir de su secuencia primaria de aminoácidos, siguiendo el algoritmo descrito en material y métodos. Los resultados de este estudio indicaron que este péptido tiene cuatro bloques de 11 aminoácidos cada uno, que comprenderían los segmentos: 5-15, 6-16, 7-17 y 8-18 del péptido compuesto por 19 aa (Fig. 15). Estos cuatro bloques presentan una estructura anfipática en alfa - hélice, con ángulos que no exceden un rango de los 90° a 110°. Con un 75 % de probabilidad (que es la sensibilidad del algoritmo) esto cuatro bloques de aminoácidos podrían representar un sitio de reconocimiento antigénico para las células T.

Bloque de 11 aminoácidos	Angulo Θ (theta)
1-11	165
2-12	105
3-13	100
4-14	175
5-15	90
6-16	95
7-17	100
8-18	110
9-19	175

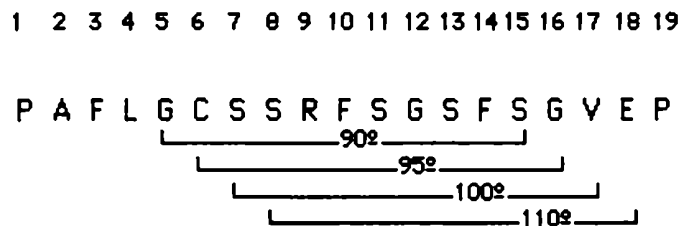


Figura Nº 15: Esquema del péptido sintético SP4 mostrando los cuatro segmentos de 11 aminoácidos que presentan estructura anfipática, que podrían representar sitios de reconocimiento para células T colaboradoras.

Para obtener mayor información acerca de la organización de los componentes genéticos que codifican para el antígeno 4 del *T. cruzi* se analizaron otros clones de ADN copia obtenidos de la misma genoteca de epimastigotes de la cepa Tul 2. Con un suero de conejo inmunizado con el péptido SP4 se aislaron 21 clones de ADN recombinante positivos y 8 de ellos fueron purificados. Los insertos fueron amplificados por la enzima Ampli Taq ADN polimerasa (PCR). Los insertos amplificados fueron analizados por "Southern blot" (3.19) utilizando como sonda el clon $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$. En la Fig. 16 se observa que los clones S₂, S₄, S₉ y S₁₄ presentan el mismo tamaño y es de aproximadamente 110 pares de bases (pb). Los insertos de los clones S₁ y S₁₆ tienen 120 pb. El inserto del clon S₁₅, 130 pb y el del S₈ 200pb.

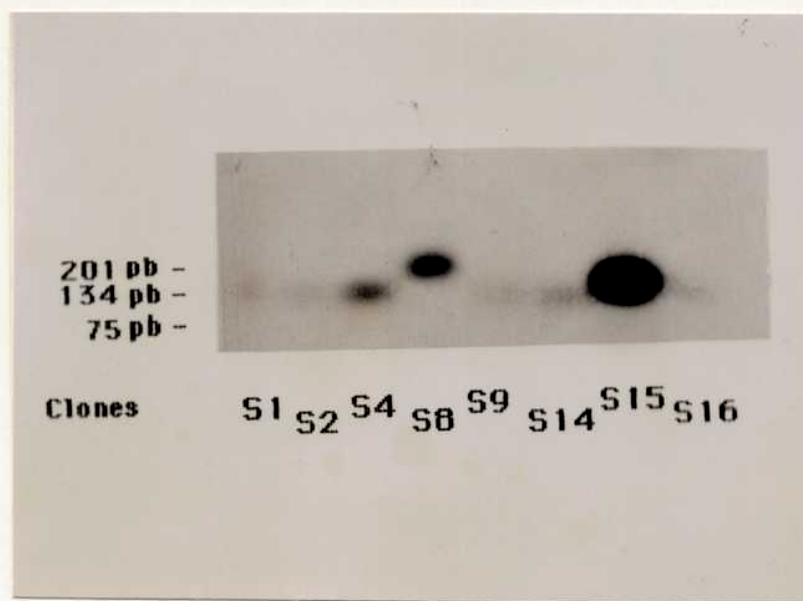


Figura Nº 16: Autorradiografía de un "Southern blot" de los clones obtenidos de una genoteca de ADN copia, aislados con suero anti-SP4 y amplificados por la técnica de PCR. El inserto del clon $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$ se utilizó como sonda radiomarcada. Los clones estudiados fueron S₁, S₂, S₄, S₈, S₉, S₁₄, S₁₅ y S₁₆.

Clon

```

S8      ----GCT----C--G-A--A--G--G--TA-----C-----A A--A-----*
        A   L   R   S   G           Y           L           I           *

λ(FCH-F8-4)2  ----GCT----C--G-A--A--G--G--TA-----C-----A A--A-----*
        A   L   R   S   G           Y           L           I           *

λ(FCH-F8-4)1  CCT   GCC TTC CTT GGA TGT AGT AGC CGT TTC TCA GGC TCC TTC TCC GGG GTC GAG CCC TAA
péptido SP4   P   A   F   L   G   C   S   S   R   F   S   G   S   F   S   G   Y   E   P   *

S15      TGC   ----CT-----A-----S
        C

```

Figura Nº 17: Secuencia de bases y aminoácidos de los clones detectados con el ActMo 4: λ(FCH-F8-4)₁, λ(FCH-F8-4)₂ y de los clones detectados con un suero de conejo inmunizado con el péptido sintético SP4. Los guiones representan la misma base o aminoácido respecto del clon λ(FCH-F8-4)₁ o el péptido SP4. El asterisco representa un codón de stop de la síntesis proteica.

Los clones seleccionados para un posterior análisis fueron S₈ y S₁₅, por ser los que exhibieron un mayor tamaño y comparten alguna secuencia de bases con el clon $\lambda(\text{FCH-F}\delta\text{-4})_1$, ya que hibridizaron más intensamente que los otros clones.

Al analizar las secuencias de bases de los clones aislados con el AcMo 4: $\lambda(\text{FCH-F}\delta\text{-4})_1$ y $\lambda(\text{FCH-F}\delta\text{-4})_2$ se encontró una homología significativa con los clones S₁₅ y S₈, aislados con suero anti-SP4, respectivamente (Fig. 17).

Una particularidad de estos cuatro clones es que el extremo 5' de cada inserto coincide en la misma región del fragmento de ADN que codifica para la síntesis del Ag 4 exhibiendo diferencias entre sí en cuanto a la longitud de información contenida ubicada posterior al codón de "stop" de la síntesis proteica (dato no mostrado). Por otra parte, los clones $\lambda(\text{FCH-F}\delta\text{-4})_1$ y S₁₅ muestran una alta homología aún en la secuencia posterior al codón de "stop"; la diferencia entre ellos está dada por los 150 y 130 pares de bases que poseen uno y otro clon respectivamente. Lo mismo fue observado para los clones $\lambda(\text{FCH-F}\delta\text{-4})_2$ y S₈ cuyos tamaños son 220 y 200 pares de bases respectivamente (Fig. 18).

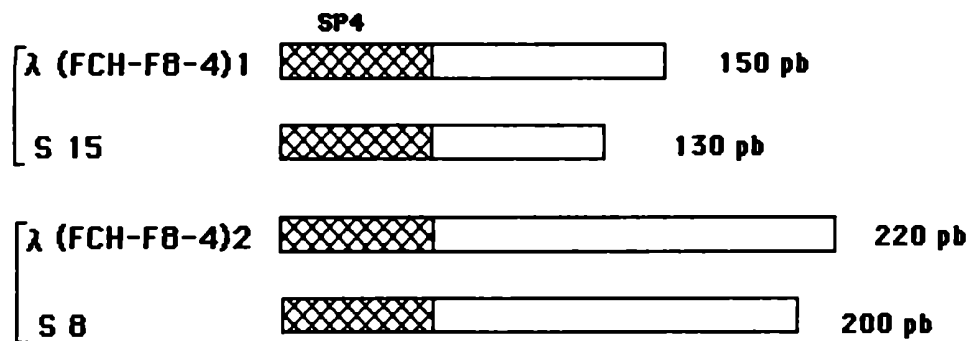


Figura Nº 18: Esquema de los clones de ADN copia aislados con el AcMo 4 = $\lambda(\text{FCH-F}\delta\text{-4})_n$ y con suero anti-péptido sintético SP4 = S_n.

El tamaño está dado en pb = pares de bases. En cuadrilado se denota la región que codifica para síntesis de proteínas.

En experimentos de "Southern blot" con el ADN genómico de epimastigotes de Tu12, digerido con varias enzimas de restricción, e hibridizado con los clones λ (FCH-F8-4)₁, λ (FCH-F8-4)₂, S15 y S8, se observa que estos clones reconocen el mismo perfil para las diferentes digestiones enzimáticas (Fig. 19). El reconocimiento de un único fragmento de estos clones en el ADN digerido con diferentes enzimas que no cortan los insertos en estudio, sugiere la presencia de un único gen que codifica para el antígeno 4 en el genoma de *T. cruzi*. En el caso de los clones λ (FCH-F8-4)₂ y S8 reconocen una banda de igual tamaño en todas las digestiones, que coincide con un peso molecular de 1.5 Kb.

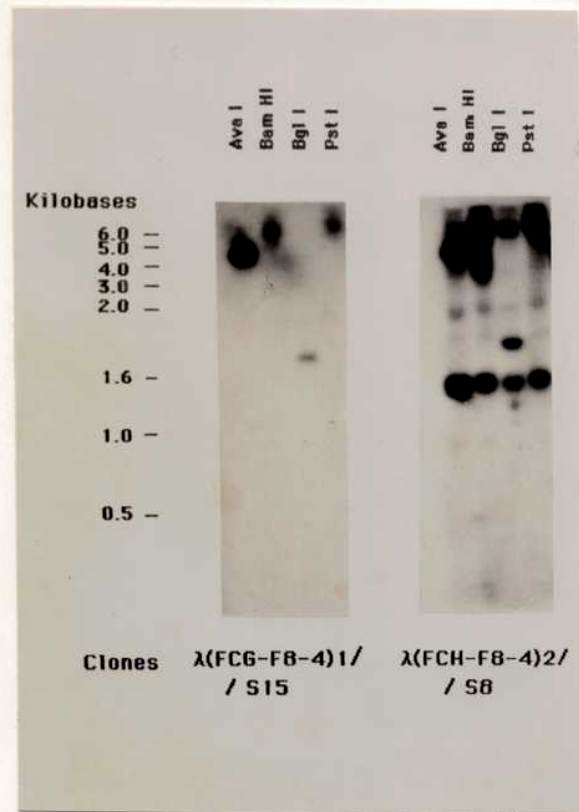


Figura Nº 19: Autorradiografía de los "Southern blot" del ADN genómico de epimastigotes digerido con las enzimas de restricción Ava I, Bam HI, Bgl I, y Pst I. Los insertos de los clones λ (FCH-F8-4)₁, λ (FCH-F8-4)₂, S15 y S8 fueron marcados y utilizados como sondas para la hibridización.

5 DISCUSION:

La fracción flagelar es una fracción subcelular de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* que fue capaz de conferir protección a los animales inmunizados, contra un desafío de formas infectantes. Los componentes de esta fracción subcelular no han producido por sí mismos, lesiones de tejidos en los animales inmunizados como fueron observadas cuando se inmunizó con otras fracciones como microsomal. (247, 225). La protección lograda con una fracción proveniente de epimastigotes en animales de experimentación desafiados con tripomastigotes indica también que este inmunógeno contiene antígenos que el epimastigote comparte con los tripomastigotes. Coincidentemente, los componentes antigénicos que reconoce el AcMo 4 se encuentran representados en ambas formas del parásito.

Con el objetivo de analizar los componentes y la obtención de antígenos definidos de la fracción flagelar se han producido anticuerpos monoclonales (AcMo) contra la fracción flagelar. De los AcMo obtenidos el anticuerpo FCH-F8-4 (AcMo 4) fue seleccionado por su actividad biológica sobre el parásito, traducida en la lisis de tripomastigotes de cultivo por medio del complemento humano y la capacidad de neutralizar la infectividad de los tripomastigotes.

La actividad lítica mediada por complemento ha sido descrita como una propiedad exclusiva de anticuerpos presentes en ratones infectados crónicos (138) y no de anticuerpos provenientes de ratones inmunizados con antígenos del parásito. Basándose en estos resultados, se ha sugerido la dificultad de obtener una vacuna con antígenos purificados como inmunógeno (43). Sin embargo, los resultados presentados aquí con el AcMo 4, así como los obtenidos con un AcMo proveniente de la inmunización con tripomastigotes metacíclicos muertos por calor o mertiolate (291), muestran que los anticuerpos provenientes de animales inmunizados también pueden presentar propiedades líticas mediada por complemento humano sobre tripomastigotes.

La reactividad por "Inmunoblotting" del AcMo 4 con seis moléculas de epimastigotes indica que este anticuerpo reconoce un epítopo muy representado en varias proteínas del parásito, siendo quizás algunas de ellas, proteínas intracelulares o precursores de proteínas de superficie. Este mismo epítopo también está presente en dos proteínas de tripomastigotes. El reconocimiento de proteínas de superficie de tripomastigotes fue confirmado por inmunofluorescencia indirecta, neutralización de estas formas infectantes en ratones y la actividad lítica mediada por complemento.

Otro AcMo, FCH-F8-1, proveniente de la misma fusión (251) demostró tener capacidad de lisar tripomastigotes en presencia de complemento y confirió protección pasiva por transferencia a ratones (251), de modo que en la fracción flagelar existen varios antígenos involucrados en los mecanismos de protección contra el parásito.

La familia de AcMo descrita por nuestro laboratorio ha sido seleccionada a partir de su actividad biológica contra el parásito. Este trabajo se efectuó en función de las propiedades protectoras de los antígenos para con el hospedador, por lo que los antígenos que los AcMo reconocen, fueron purificados y posteriormente caracterizados.

Se han producido diversos AcMo contra el *T. cruzi* y fueron útiles herramientas para la identificación de las diferencias intraespecíficas en el parásito (131), para el desarrollo de reactivos para el diagnóstico (183, 267), pero solamente en un caso se ha inmunopurificado una glicoproteína de 72 kDa con propósitos de inmunoprotección (257), a pesar que los antígenos de la superficie del *T. cruzi* han sido estudiados extensivamente.

En este trabajo, los componentes antigénicos del parásito reconocidos por el AcMo 4 fueron purificados por cromatografía de afinidad, utilizando al AcMo como ligando, con un rendimiento aceptable. En estas purificaciones se obtuvieron la totalidad de las moléculas reconocidas por el AcMo cuando se las ensayó por

"immunoblotting". La tinción por azul de Coomassie de los antígenos separados por geles de poliacrilamida muestran un menor número de bandas teñidas debido probablemente a la menor sensibilidad de esta tinción respecto del revelado por el anticuerpo específico sobre la nitrocelulosa.

Otros estudios con el antígeno 4 purificado, tendientes a evaluar la capacidad de este antígeno para el diagnóstico de la enfermedad, revelaron que los sueros de pacientes con Leishmaniasis no reconocieron al Ag4 en ensayos de ELISA (227). El AcMo 4 tampoco reaccionó con *Leishmania mexicana mexicana* en ensayos de ELISA e "immunoblotting", por lo que podemos afirmar que el Ag 4 no está presente en el género *Leishmania*.

Con los antígenos purificados se inmunizaron ratones BALB/c acompañados de *Bordetella pertussis* como adjuvante. Estos experimentos se efectuaron para investigar si estos antígenos purificados mantenían las propiedades protectoras demostradas para la fracción flagelar (con 200 µg de fracción flagelar/ratón/dosis adjuvada con Bp). Los resultados obtenidos mostraron que los ratones inmunizados con el Ag 4 purificado, fueron protegidos contra un desafío con formas metacíclicas de *T. cruzi*, en términos de sobrevida y parasitemia. El hecho de que sólo el 40% de los animales inmunizados y desafiados haya presentado parasitemia detectable por microscopía y que la sobrevida haya sido del ciento por ciento de los mismos, demuestra la correlación existente entre la protección obtenida con los antígenos purificados por el AcMo 4 y con los de la fracción subcelular original, a pesar que en la inmunización con el Ag 4 purificado se utilizó 100 µg/ratón/dosis.

Los resultados presentados aquí demostraron la factibilidad de obtener antígenos con propiedades protectoras a partir de este AcMo con resultados satisfactorios. Las características inmunoprotectoras de otras moléculas del *T. cruzi* han sido analizadas. Por ejemplo la inmunización con la glicoproteína de 72 kDa no mostró una protección adecuada, otra glicoproteína de 90 kDa, presente en las tres formas del parásito fue purificada y utilizada en ensayos de inmunoprotección

con buenos resultados al usar esquemas de desafío agudo pero dependiendo del uso de saponina como adyuvante (255). También en este caso se demostró un importante papel de los mecanismos de inmunidad celular como parte activa en la protección (243). Por otra parte, el AcMo 4 derivado de una inmunización con la fracción flagelar, responde al epitope del Ag4, que parece corresponder a uno de los componentes que confieren a la fracción flagelar sus propiedades protectivas.

Además de obtener antígenos nativos, se planteó la posibilidad de una búsqueda y análisis del/de los fragmento/s de ADN del parásito que se encuentren involucrados en la codificación de los polipéptidos que contienen el epitope reconocido por el AcMo 4.

A partir de una genoteca de expresión del estadio epimastigote, en el vector λ gt11 se aislaron dos clones de ADN recombinante por inmunodetección con el AcMo4. El aislamiento de clones de ADN expresados en bacterias con un AcMo tiene la ventaja de evitar la gran inespecificidad que presenta el trabajo con sueros hiperinmunes sobre un césped de *E. coli*. Además el epitope que reconoce el AcMo 4 es proteico y continuo, esto último implica que no está definido por la interacción de dos péptidos, por lo que la búsqueda de los fragmentos de ADN expresados con el AcMo 4 fue satisfactoria. Solamente dos clones fueron identificados con el AcMo 4: λ (FCH-F8-4)₁ y λ (FCH-F8-4)₂. Otros 21 clones recombinantes fueron aislados con un suero de conejo inmunizado con el péptido sintético SP4, lo que implica que el aislamiento de clones recombinantes con AcMo presenta una menor eficiencia respecto del aislamiento con anticuerpos policlonales, ya que los fragmentos expresados deben exhibir el plegamiento acorde para exponer el epitope que reconoce el anticuerpo dentro de la proteína fusionada a la enzima β -galactosidasa. La mayoría de los clones de ADN aislados de parásitos fueron detectados con anticuerpos policlonales.

Otros fragmentos de ADN que codifican para diversos antígenos del *T. cruzi* han sido caracterizados por técnicas de ADN recombinante. Para su detección y aislamiento, se utilizaron anticuerpos policlonales, ya sea sueros de pacientes con enfermedad de Chagas (82, 111, 151, 144) o inmunosueros de conejo (199, 144). Además algunas proteínas presentes en el flagelo del parásito han sido recientemente clonadas, como una proteína de más de 300 kDa llamada "Flagellar repetitive antigen" (144), otra de 24 kDa, que puede unirse al Ca^{++} (83) y una proteína de 160 kDa (280) que presenta reacción cruzada con el tejido nervioso de mamífero (280). Las secuencias presentadas son diferentes de las informadas en este trabajo para los clones del Ag4 de la cepa Tulahuén.

El haber hallado una proteína recombinante expresada por *E. coli*, de un peso molecular similar al de la β -galactosidasa, 116-117 kDa, no concordó con las expectativas del tamaño de proteína que debía codificar el clon λ (FCH-F8-4)₁ con un inserto de 150 pares de bases. De tener un marco abierto de lectura, el péptido codificado debería ser de alrededor de 6 kDa y la proteína de fusión de 122 kDa. La secuencia de este inserto debía necesariamente incluir un codón de "stop" de la síntesis de proteínas y codificar para el extremo 3' terminal de al menos uno de los péptidos que codifican para el antígeno 4.

El inserto del clon λ (FCH-F8-4)₁ radiomarcado y utilizado como sonda, reconoció un único ARN mensajero de 5.0 kilobases en epimastigotes. Si bien no se analizó la unión de esta sonda al ARN de tripomastigotes, no hay dudas de su presencia, dado que se ha encontrado en este estadio expresión de componentes antigénicos reconocidos por el AcMo 4. El tamaño de este ARNm permite traducir una proteína de 185-200 kDa. El péptido de mayor tamaño reconocido por el AcMo 4 en epimastigotes procesados por SDS-PAGE en presencia de 2 Mercaptoetanol es de 150 kDa, por lo que es posible que estos péptidos puedan ser traducidos a partir de un ARN mensajero de 5.0 Kb.

La hibridización del inserto de λ (FCH-F8-4)₁ con el ADN de todas las cepas y clones de *T. cruzi* ensayadas indicó una uniformidad en cuanto fue reconocido un único fragmento de ADN de aproximadamente 5 kilobases. Otros genes que fueron estudiados en este parásito resultaron polimórficos cuando se estudiaron diferentes cepas y clones, frecuentemente asociado al número de repeticiones de secuencias (109, 156, 140). Los clones CAI/70, Miranda/75 y Sylvio X-10/1 mostraron una menor intensidad en la hibridización, quizás asociada con una menor cantidad de ADN que codifica para el Ag4 en estos clones. La hibridización del inserto λ (FCH-F8-4)₁ coincidió con los resultados encontrados por "immunoblotting" efectuados sobre epimastigotes de los clones Miranda/75 y Sylvio X-10/1 ya que de las seis proteínas reconocidas por el AcMo 4 en epimastigotes de la cepa Tul₂, sólo una, correspondiente a la de menor peso molecular, es reconocida por este anticuerpo en estos dos clones (dato no mostrado). El perfil encontrado para los diferentes clones y cepas del parásito estudiados sugiere que existe una conservación intraespecífica para el gen que codifica para el Ag 4 en las cepas y clones de *T. cruzi* estudiadas. Otro trabajo realizado en nuestro laboratorio demostró que el antígeno 4 se encuentra presente en 28 clones y cepas estudiados (Cristina Rivas, comunicación personal).

Cuando se analizó por comparación de las señales de hibridización, el número de veces que el inserto del clon λ (FCH-F8-4)₁ está representado en el parásito, se encontró que se repite con baja frecuencia en el genoma haploide de *T. cruzi*. El número de copias aproximado del inserto λ (FCH-F8-4)₁ sería entre 5 y 14 en el genoma haploide del parásito, encontrándose encuadrado en la mayoría de los genes del *T. cruzi*, en los que según observaciones de Lanar y col., el 51% del ADN se encuentra representados en un bajo número de copias y el 23% del ADN en genes de copia única. Sólo el 9 % del ADN tiene componentes altamente repetitivos, de unos varios miles de copias (146).

La secuencia de bases del clon λ (FCH-F8-4)₁ permitió la deducción, a partir del conocimiento de cuál es la cadena codante, de la secuencia de aminoácidos (aa)

que éste fragmento de ADN codifica. La presencia de un codón de "stop" de la síntesis de proteínas señala que este inserto representa la porción carboxilo terminal del Ag 4 o el extremo 3' del fragmento de ADN que codifica para el Ag4. El epítopo que reconoce el AcMo 4 es continuo, como lo sugiere su detección sobre proteínas desnaturalizadas, es proteico dado que fue detectado en proteínas expresadas en bacterias, organismos que carecen de mecanismos de glicosilación y se localiza en la porción carboxilo terminal del Ag 4.

Este AcMo se une a la superficie del parásito, cuando se ensayó su capacidad de unión mediante inmunofluorescencia visualizada por microscopía óptica así como también en ensayos realizados por microscopía electrónica (Dr. W. de Souza, comunicación personal). Como el epítopo que reconoce este anticuerpo se encuentra en las inmediaciones del extremo carboxilo terminal, esta proteína de superficie no estaría anclada a un glicosil-fosfatidil-inositol, ya que este proceso involucra la remoción de los 20 últimos aminoácidos adyacentes a dicho extremo (68).

El conocimiento de la secuencia del clon λ (FCH-F8-4)₁ derivó en la síntesis de un péptido de 19 aminoácidos: **SP4**. Cuando la secuencia aminoacídica del péptido SP4 fue comparada con la base de datos de proteínas NBRF provista por GCG Wisconsin (194) no se encontraron homologías significativas con otras proteínas. Las homologías mínimas encontradas obedecen al pequeño tamaño de este péptido y a que entre los 19 aa que lo conforman, 11 son serina, leucina, alanina y glicina, que son los de mayor frecuencia de aparición en las secuencias proteicas conocidas (79).

De los clones aislados de la genoteca de ADN complementarios con suero de conejo anti-SP4: $\lambda(\alpha\text{SP4})_n$, o más simplificado: S_n , se analizó la secuencia de bases del ADN de los dos clones mayores: S_8 y S_{15} . La secuencia de los dos clones obtenidos con el suero anti-SP4 muestra que los anticuerpos policlonales del conejo reconocieron la misma porción de ADN codificada que la reconocida por el AcMo 4.

Los clones S_{15} y $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$ presentan en sus secuencias gran similitud, ocurriendo lo mismo para el par de clones S_8 y $\lambda(\text{FCH-F8-4})_2$.

El hecho que los mismos clones hayan sido aislados, independientemente de si se utilice el AcMo o un suero policlonal anti-SP4 confirmó que el péptido sintético posee una conformación similar a la que exhibe esta secuencia de aa en el antígeno nativo en el parásito. Por otra parte, el haber hallado dos especies de clones diferentes hace pensar en la existencia de duplicación de la información genética del parásito, que además presentan mutaciones puntuales, deleciones o inserciones. El haber amplificado los insertos S_n , puede haber también introducido errores de copia de la polimerasa de *T. aquaticus*.

Todos los clones de ADN complementario aislados, presentaron en su secuencia de bases un codón de stop de la síntesis proteica. Esto confirmó que el epítopo que reconoce el AcMo4 se encuentra en las cercanías del extremo carboxilo terminal del Ag 4.

Las secuencias de bases que conforman los segmentos de ADN copia aislados para el AcMo 4, no muestran repeticiones internas de aminoácidos, debido probablemente a su pequeño tamaño. La comparación entre las secuencias de $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1 / S_{15}$ y $\lambda(\text{FCH-F8-4})_2 / S_8$ sugieren que hay modificaciones entre unos y otros, pero para estudiar si corresponden a genes diferentes, se analizaron estos insertos por hibridización al ADN genómico del parásito, digerido por diferentes enzimas de restricción. La observación de un perfil de hibridización similar para los diferentes insertos sugiere la presencia de un único gen que codificaría para este antígeno 4 en el parásito. No se ha hallado para este gen en estudio, evidencias de genes múltiples, como se ha descrito para los antígenos de 85 kDa (200, 268, 116). La evidencia por técnicas de "immunoblotting" de la reacción de 6 péptidos de epimastigotes y 2 de tripomastigotes con el AcMo 4 sugiere, en base a estos estudios, que serían productos de maduración a partir de una proteína precursora. Esta implicancia aguarda una comprobación experimental.

Por otra parte, la hibridización de los clones S_8 y $\lambda(\text{FCH-F8-4})_2$ con una banda de ADN de alrededor de 1.5 kb, en todas las digestiones, sería debida a la

porción de ADN de estos clones que excede del tamaño de los clones S₁₅ y λ (FCH-FB-4)₁. De corresponder esta banda al ADN kinetoplástico, se deberá encarar un estudio tendiente a dilucidar por qué un antígeno codificado por un ADN nuclear, contiene una información codificada después del codón de stop de la proteína, contenida en un ADN mitocondrial. La obtención de fragmentos mayores de ADN o el gen completo responsable de la síntesis del Ag4 en el *T. cruzi* aclarará la organización de estos antígenos en el parásito.

Las seis proteínas reconocidas por el AcMo 4 son glicoproteínas con un punto isoeléctrico entre 4.3 y 4.95 (D. Velazco, A.M. Ruiz y E.L. Segura, manuscrito enviado para su publicación). Es de esperar que la expresión de clones de mayor tamaño que codifiquen para éste antígeno, clonados en sistemas de expresión en eucariotes, resultarían sin duda en una optimización en la calidad de estos inmunógenos.

El péptido sintético SP4 tuvo la capacidad de inhibir parcialmente la reactividad de sueros de ratón anti-fracción flagelar de *T. cruzi* sobre el homogenato total de epimastigotes. Esto implica necesariamente que hay otros péptidos del antígeno 4 que participan en la respuesta inmune en el ratón que podrían estar también involucrados en la inmunoprotección que presenta el antígeno nativo. El reconocimiento del péptido SP4 por sueros de ratones anti-fracción flagelar fue un primer indicio de la existencia de una configuración espacial similar entre el epítipo reconocido por el AcMo 4 en el péptido sintético y en el Ag 4 nativo, expresado por el parásito.

El nivel de anticuerpos inducido contra un péptido sintético generalmente es bajo por lo que en la mayoría de los estudios realizados, los péptidos han sido acoplados a una proteína transportadora, como por ejemplo KLH, que ofrece epítipes específicos para células T y un sustrato para una presentación polimórfica del péptido (88). Debido a que SP4, es un péptido pequeño, se supuso que no podría

inducir per sé una respuesta inmune y se lo acopló a KLH para aumentar su inmunogenicidad.

Al inmunizar ratones con SP4 se detectaron anticuerpos que reaccionaron con el péptido sintético, con el homogenato total de epimastigotes (HT) y con la superficie del tripomastigote visualizado por inmunofluorescencia. Estos resultados confirmaron que la conformación del epítopo presente en el péptido sintético es similar a la que se encuentra en el Ag 4 sobre la superficie del *T. cruzi*.

Además de producir una respuesta inmune humoral, los resultados presentados aquí mostraron que este péptido puede inducir una respuesta celular del tipo de hipersensibilidad retardada (DTH) hacia antígenos del parásito, aún administrado en su forma libre con *B. pertussis* como adjuvante y que acoplado a KLH no mejora ambas respuestas. No siempre se ve beneficiada la inmunogenicidad de un péptido por el acoplamiento a KLH o a alguna otra proteína transportadora ya que se podría inducir una presentación del mismo de modo incontrolado dependiendo de las configuraciones que adopte péptido al adherirse a la proteína (222).

La DTH evocada por SP4 evidenció una respuesta de inmunidad celular frente a antígenos del parásito. Se ha encontrado una correlación muy estrecha entre los sitios antigénicos reconocidos por células T colaboradoras y las regiones de las proteínas que permiten una conformación en alfa-hélice particularmente hélices que presenten estructuras anfipáticas; el hecho de que una porción de la molécula sea hidrofílica le permitiría ser reconocida por las células T y la hidrofóbica podría interactuar con la célula presentadora. Al analizar la secuencia aminoacídica del péptido SP4 por un programa de computación en el que se detectan segmentos de estructura alfa-helicoidal y anfipáticos, se observó que existen cuatro segmentos consecutivos de 11 aminoácidos cada uno y comprenden desde el 5^{to} hasta el 18^{vo} aminoácido de los 19 que componen el péptido SP4. Este segmento podría representar, con un 75% de sensibilidad, un sitio antigénico inmunodominante para células T colaboradoras y ser responsable de la inmunidad T encontrada en las reacciones cutáneas positivas que los ratones inmunizados con SP4 evidenciaron.

Resta de todos modos, comprobar experimentalmente esta predicción realizada por un programa de computación.

Los linfocitos T tienden a reconocer un número muy limitado de sitios antigénicos inmunodominantes sobre un antígeno proteico. Por lo tanto un diseño efectivo de fragmentos sintéticos o recombinantes que sirvan como vacunas estarán mejor diseñados si incluyen algún sitio que pudiera ser identificado como inmunodominante para la células T "helper", debido a que la inmunidad T es necesaria para asegurar una respuesta secundaria o anamnésica cuando el huésped es desafiado con el patógeno entero.

En nuestro laboratorio se demostró que la inmunización con la fracción flagelar y *B. pertussis* induce mecanismos celulares críticamente involucrados en la protección de los ratones ante un desafío por *T. cruzi* (219).

Las propiedades inmunogénicas de otros péptidos provenientes de genes clonados de *T. cruzi* no han sido hasta ahora comunicadas, posiblemente sea porque no han sido probadas aún o por que fueron aislados para otros propósitos diferentes.

En general los parásitos contienen mezclas complejas de hasta 10.000 proteínas, de las cuales quizás, sólo un pequeño número producen inmunidad protectora en el huésped. No está muy claro aún cuáles son las proteínas del *T. cruzi* que se encuentran más involucradas en la respuesta inmune del huésped. La o las moléculas a ser incorporadas en una futura vacuna contra la enfermedad de Chagas deberían idealmente probar su eficacia en el blanqueo de la parasitemia y de no ser así disminuir drásticamente la invasión del parásito en el humano, deberían ofrecer inocuidad para con los tejidos del huésped, y ser bien definidos bioquímica e inmunológicamente. Parte de estos requisitos fueron encontrados con el Ag 4 presentado en este trabajo ya que 4 de cada 10 animales resultaron aparasitémicos y 6 de cada 10 animales desafiados mostraron una muy baja parasitemia respecto de

los controles no inmunizados. Por otra parte el Ag 4 proviene de la fracción flagelar que su inoculación per sé, no produce una respuesta inmunoagresiva.

En aquellas enfermedades en donde la patología es predominante, las vacunas moleculares son más apropiadas que la mezcla de antígenos u organismos atenuados. Aún no existen vacunas contra un parásito humano, pero en veterinaria hay dos vacunas eficaces con organismos atenuados, de *Babesia bovis* y *Ancylostoma caninum* (174). Se han probado vacunas sintéticas, con éxito o no, para otras patologías (240, 172) e inclusive en parasitología humana (106,191,25).

La complejidad de la enfermedad de Chagas nos ha indicado la tendencia desarrollar inmunógenos puros y definidos a partir de algunas de estas fuentes: del parásito, por inmunopurificación de los antígenos, a través de técnicas de recombinación de ADN, en un sistema libre se parásitos, permitiendo su expresión en un sistema vector-huésped apropiado, o a partir de la secuencia de ácidos nucleicos y posterior síntesis química de los antígenos. En nuestra trabajo, el empleo de estos métodos se ha basado en estudios previos sobre el desarrollo de modelos experimentales de la enfermedad de Chagas aguda y crónica y la caracterización de la patología inducida por diferentes antígenos.

La aproximación a los aspectos moleculares del parásito ha abierto un camino racional para disponer de mayor información sobre moléculas antigénicamente relevantes en el *T. cruzi*, sobre las cuales se ha aportado en este trabajo. La reunión de estos conocimientos con el de los procesos operativos en los mecanismos defensivos e inmunopatológicos y sobre su regulación, será indispensable para enfrentar el desafío que plantea el desarrollo de una futura vacuna contra la Enfermedad de Chagas.

6 CONCLUSIONES:

- 1) El anticuerpo monoclonal FCH-F8-4 anti-fracción flagelar (AcMo 4) tiene actividad biológica sobre el *Trypanosoma cruzi* evidenciada por la capacidad de lisis tripomastigotes sanguíneos por medio del complemento y de neutralizar la infectividad de los tripomastigotes.
- 2) Este anticuerpo reconoce por "immunoblotting" seis proteínas entre 50 y 150 kDa en epimastigotes y dos proteínas de 15 y 48 kDa en tripomastigotes.
- 3) Los antígenos inmunopurificados del AcMo 4 a): protegen contra la infección por tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* b): producen una respuesta inmune con reacciones de hipersensibilidad retardada específica.
- 4) Un fragmento de ADN copia de *T. cruzi*, de 150 pares de bases, aislado con el AcMo 4 al ser expresado en bacterias hibridiza con un ARN mensajero en epimastigotes de 5.0 kilobases.
- 5) Un único gen codifica para el antígeno 4, ampliamente representado y conservado en los clones y cepos de *T. cruzi* estudiados. En el genoma haploide de nuestra cepa de estudio Tulahuén 2, la información del clon de ADN $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1$ se encuentra representada en un número de 5 a 14 veces.
- 6) El péptido codificado por el clon $\lambda(\text{FCH-F8-4})_1 = \text{SP4}$ de 19n aa evocó en ratones una respuesta inmune humoral y celular contra el *T. cruzi*, demostrada por anticuerpos y reacciones cutáneas de hipersensibilidad retardada específicos aún inoculado en su forma libre con *B. pertussis* como adyuvante.
- 7) El epitope reconocido por el AcMo 4, presente en el péptido sintético SP4 y en el antígeno nativo del parásito, es proteico y continuo, localizado en la región carboxilo terminal del antígeno 4.
- 8) Otros clones de ADN recombinante obtenidos con el AcMo 4 y con un suero anti-SP4 muestran dos especies diferentes de información genética, cuyas secuencias de ADN presentan una homología parcial en cuanto a la secuencia de bases de su ADN, representando dos copias diferentes dentro del gen que codifica para el antígeno que hemos descrito en este trabajo.

7 BIBLIOGRAFIA:

- 1) Abrahamson, I.A. & W. Dias da Silva (1977) Antibody dependent cell mediated cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. Parasitology 75: 317-323
- 2) Abuin, G., W. Colli, W. de Souza & M.J. Alves (1989) A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. Mol. Biochem. Parasitol. 35: 229-237
- 3) Afchain, D., D. Le Ray, J. Fruit & A. Capron (1979) Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* forms: identification of a specific component. J. Parasitol. 65: 507-514
- 4) Affranchino, J.L., C.F. Ibañez, A.O. Luquetti, A. Rassi, M.B. Reyes, R.A. Macina, L. Åslund, U. Pettersson & A.C.C. Frasch (1989) Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute fase of Chagas' disease. Mol. Biochem. Parasitol. 34: 221-228
- 5) Alcántara, A. & Z. Brener (1978) The *in vivo* interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. Acta Tropica 35: 209-219
- 6) Alcina, A., A.J. Hargreaves, J. Avila & M. Fresno (1986) A *Trypanosoma cruzi* monoclonal antibody that recognizes a superficial tubulin-like antigen. Biochem. Biophys. Res. Comm. 139: 1176-1183
- 7) Alonso, J.M., S. Pividori & C. Guilleron (1986) Antígenos circulantes de *Trypanosoma cruzi* en chagásicos de área endémica. Medicina (Buenos Aires) 46: 69-72
- 8) Alverenga, N.J. (1977) Evolução do *Trypanosoma cruzi* no trato digestivo de *Triatoma infestans*. Tesis 55p Univ. Fed. Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.
- 9) Alves, M.J.M. y W. Colli (1975) Glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*: Parcial purification by gel chromatography. FEBS Lett. 52: 188-190
- 10) Alves, M.J.M., G. Abuin, V.Y. Kuwajima & W. Colli (1986) Partial inhibition of trypomastigotes entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 21: 75-82
- 11) Andrade Z.A. & S.G. Andrade (1979) Patología. En *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Brener, Z. e Andrade Z. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, Brasil. pp 199-248

- 12) Andrews, N.W., A.M. Katzin & W. Colli (1984) Mapping of surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* by two dimensional electroforesis. A correlation with the cell invasion capacity. Eur. J. Biochem. 140: 599-604
- 13) Andrews, N.W., M.J.M. Alves, R.I. Schumacher & W. Colli (1985) *Trypanosoma cruzi*: Protection in mice immunized with 8-methoxypsoralen-inactivated trypomastigotes. Exp. Parasitol. 60: 255-262
- 14) Andrews, N.W., K.S. Kong, E.S. Roffins & V. Nussenzweig (1987) Stage specific surface antigen expressed during the morphogenesis of vertebrate forms *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 64: 474-484
- 15) Andrews, N.W., E.S. Roffins, V. Ley, K.S. Hong & V. Nussenzweig (1988) Developmentally regulated Phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi* J. Exp. Med. 167: 300-314
- 16) Andrews, N.W., M. Einstein & V. Nussenzweig (1989) Presence of antibodies to the major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes in sera from chagasic patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40: 46-49
- 17) Araujo, F.G. & J.S. Remington (1981) Characterization of stages and strains of *Trypanosoma cruzi* by analysis of cell membrane components. J. Immunol. 127: 855-859
- 18) Araujo, F.G., E. Chiari & J.C.P. Dias (1981) Demonstration of *Trypanosoma cruzi* antigen in serum from patients with Chagas' Disease. Lancet i: 246-249
- 19) Araujo, F.G. (1982) Detection of circulating antigens of *Trypanosoma cruzi* by enzyme immunoassay. Ann. Trop. Med. Parasitol. 76: 25-36
- 20) Araujo, F.G., S.D. Sharma, V. Tsai, P. Cox & J.S. Remington (1982) Monoclonal antibodies to stages of *Trypanosoma cruzi*: Characterization and use for antigen detection. Infect. Immun. 37: 344-349
- 21) Araujo, F.G. & L. Tighe (1984) Antigens of *Trypanosoma cruzi*: Evidence that the 90 kDa protective glycoprotein antigen is expressed in blood-form trypomastigotes and may not be functional in dead epimastigotes. J. Parasitol. 70: 185-187
- 22) Avrameas, S. & T. Ternynck (1969) The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbent. Immunochemistry 6: 53-66
- 23) Aymerich S. & S. Goldenberg (1989) The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm 28c: comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids. Exp. Parasitol. 69: 107-115

- 24) Azevedo H.P. de & I. Roitman (1977) Growth of the Y strains of *Trypanosoma cruzi* in an HX25 - modified defined medium. *J. Parasitol.* 63: 485
- 25) Balloul, J.M., J.M. Grzych, C. Dissous, D. Boulanger, J. Fontaine, A. Capron, P. Sondemeyer, M.P. Kieng, A. Vidal & J.P. Lecocq (1988) Synthetic Vaccines in Schistosomiasis: Glycan and protein protective epitopes. "Vaccines 88. New Chemical and Genetic Approaches to Vaccination. Prevention of AIDS and Other Viral, Bacterial, and Parasitic Diseases" (Ginsberg, H. et al., Ed.) pp 53-60. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. New York.
- 26) Barousse, A.P., M.O. Eposto, S. Mandel & F. Souza Martínez (1978) Enfermedad de Chagas congénita en área no endémica. *Medicina (Buenos Aires)* 38: 611-615
- 27) Beard, C.A., R.A. Wrightsman & J.E. Manning (1988) Stage and strain specific expression of the tandemly repeated 90 kDa surface antigen gene family in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 28: 227-234
- 28) Bittencourt A.L. (1976) Congenital Chagas' disease. *Am. J. Dis. Child.* 130: 97-103
- 29) Bittencourt A.L., M. Sadigursky, A.A. Da Silva, C.A. Menezco, M.M. Marianetti, S.C. Guerra & I. Sherlock (1988) Evaluation of Chagas' disease transmission through breast-feeding. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83: 37-39
- 30) Boiso, J.F. & A.O.M. Stoppani (1973) The mechanism of acetate and pyruvate oxidation of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* 20: 675-678
- 31) Bonet, A.H., J.A. Cichero, E. Kushnir, J.C. Grand & E.L. Segura (1968) Estudio epidemiológico sobre la enfermedad de Chagas-Mazza en comunidades rurales de la Pcia. de Córdoba. *La Semana Médica* 133: 581-614
- 32) Bongertz, V., K. Hungerer & B. Galvao Castro (1981) *Trypanosoma cruzi* circulating antigens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 76: 71-82
- 33) Bongertz, V. & J.A. Dvorak (1983) *Trypanosoma cruzi*: antigenic analysis of cloned stocks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 716-722
- 34) Bontempi, J. & J. Búa (1989) Sequencing Nucleic Acids. En Course on Purification and Characterization of zooparasite antigens. A Laboratory Manual. Editado por el Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. M. Fatala Chabén" Buenos Aires. pp116-138
- 35) Borst, P., F. Fase Fowler, J.H.J. Hoeijmakers, A.C.C. Frasch (1980) Variation in maxicircle and minicircle sequences in kinetoplastids DNA from different *Trypanosoma brucei* strains. *Biochem. Biophys. Acta* 610: 197

- 36) Borst, P. & G.A.M. Cross. (1982) Molecular basis for Trypanosome antigenic variation. *Cell* 29: 291–303
- 37) Boschetti, M.A., M.M. Piras, D. Henríquez & R. Piras (1987) The interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24: 175–184
- 38) Brack, C. (1968) Elektronmikroskopische untersuchungen zum lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*. Unter besonderes berucksichtigung der entwicklungsformen im ubertrager *Rhodnius prolixus*. *Acta Tropica* 25: 289–356
- 39) Braun, M., M.L. Satz & E.H. de Titto (1982) Inmunogenética. En *Inmunología e Inmunoquímica*. Margni. R.A., Ed. (Ed. Panamericana, Buenos Aires) pp 148–172
- 40) Brener, Z. (1980) Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Advances In Parasitology* 18: 247–292.
- 41) Brener, Z. (1984) Genes and Antigens of parasites. A Laboratory Manual, Ed. Dr. C.M. Morel Fundação Oswaldo. Cruz, Río de Janeiro.
- 42) Brener, Z. (1985) General review of *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18: 1–8
- 43) Brener, Z. (1986) Why vaccines do not work in Chagas' disease. *Parasitol. Today* 2: 196–197.
- 44) Bronia, D.I.H., E.E. Montamat, E.E. Aeberhard & E.L. Segura (1978) Fosfolípidos y otros componentes lipídicos del *Trypanosoma cruzi*. Estudio comparativo en cepas Tulahuén, E.S. y Brasil. *Medicina (Bs. As.)* 38: 155–258
- 45) Búa, J. & E. Bontempi (1989) Screening of a λ gt11 cDNA library with antibody probes. En *Course on Purification and Characterization of zooparasite antigens. A Laboratory Manual*. Editado por el Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la enfermedad de Chagas "Dr. M. Fátala Chabén" Buenos Aires. pp 101–115
- 46) Búa, J., E. Bontempi, M. Levin, A. Orn, D. Velasco, M. Moreno, P. Levi-Yeyati, Å. Engstrom, E.L. Segura & A. M. Ruiz. (1991) *Trypanosoma cruzi*: Cellular and Antibody response against the parasite in mice immunized with a 19 amino acid synthetic peptide. *Exp. Parasitol.* 72: 54–62
- 47) Búa, J., E. Bontempi, A.M. Ruiz & E.L. Segura. (1990) Antígenos del *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Arg. Microbiol.* 22: 47–66

- 48) Burgess, D.E. & W.L. Hanson (1979) Adaptive transfer of protection against *Trypanosoma cruzi* with lymphocytes and macrophages. *Infect. Immun.* 25: 838-843.
- 49) Burkholder, J.E., T.C. Allison & V.P. Kelly (1980) *Trypanosoma cruzi* (Chagas) (Protozoa: Kinetoplastida) in invertebrate, reservoir and human hosts of the lower Rio Grande Valley of Texas. *J. Parasitol.* 66: 305-311
- 50) Camargo, E.P. (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 6: 93-100
- 51) Cardoni, R.L. , M.E. Rottenberg & E.L. Segura (1990) Increased production of reactive oxygen species by spleen cells from mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Cell Immunol.* 128: 11-21
- 52) Carlomagno, M.A., E. Cura, A.C. Pérez & E.L. Segura (1989) Informe sobre Chagas. *Ciencia Hoy. Revista de divulgación científica de la Asociación Ciencia Hoy.* Vol 1(2): 37-44.
- 53) Castagnino, H.E., J.A. Cicco, M. Fauth & A.C. Thompson (1978) Miocardiopatía embolígena en la Enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)* 38: 35-39
- 54) Castro, C., R. Hernández & M. Castañeda (1981) *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA; internal break in the large-molecular-mass species and number of genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2: 219-233
- 55) Cazzulo, J.J., S. Arauzo, B.M. Franke de Cazzulo, J.J.B. Cannata (1988) On the production of glycerol and L-alanine during the aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FEMS Microbiol. Lett.* 51: 187-192
- 56) Cerisola, J.A., M. Alvarez & A.M. de Rissio (1970) Inmunodiagnóstico da doença de Chagas. Evolução serológica de pacientes com Doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 12: 403-411
- 57) Cerisola, J.A. , A. Rabinovich, M. Alvarez, C.H. di Colletto & J. Pruneda (1972) Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 73: 203-221
- 58) Chagas, C. (1909) Nova Trypanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1: 159-218
- 59) Chagas, C. (1911) Nova entidade mórbida do homem. Rezumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 3: 219-275
- 60) Chapman , M.D., D. Snary & M.A. Miles (1984) Quantitative differences in the expression of a 72 molecular weight cell surface glycoprotein (GP72) in

- 61) Chess, Q., A.M. Acosta, J.K. Sethi & C.A. Santos-Buch (1983) Reversible acquisition of a host cell surface membrane antigen by *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 40: 299–302
- 62) Chocair, P.R., E. Sabbaga, V. Amado Neto, M. Shuroma & G.M. Goes (1981) Transplante de rim, nova modalidade de transmissao da Doença de Chagas. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo 23: 280–282
- 63) Cichero, J. (1982) Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. Sociedad Argentina de Parasitología. Buenos Aires. pp 371–378
- 64) Constantine, N.T. & R.L. Antony (1983) Antigenic differentiation of the kinetoplastids *Leishmania braziliensis* and *Trypanosoma cruzi* by means of monoclonal antibodies. J. Protozool. 30: 346–350
- 65) Corral, R.S., H. Freilij, A. Montemayor & S. Grinstein (1984) *Trypanosoma cruzi* antigens in urine from patients with Chagas' disease. IRCS Med. Sci. 12: 1034–1035
- 66) Corral, R.S., A. Orn, H.L. Freilij, T. Bergman & S. Grinstein (1989): Purification and Characterization of an 80 kDa *Trypanosoma cruzi* urinary antigen. J. Clin. Microbiol. 27: 145–151
- 67) Couto A.S., A.M. Katzin, W. Colli & R.M. de Lederkremer (1987) Sialic acid in a complex oligosaccharide chain of the Tc-85 surface glycoprotein from the trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 26: 145–154
- 68) Cross G.A.M. (1987) Eukariotic protein modifications and membrane attachment via phosphatidylinositol. Cell 48: 179–181
- 69) Cunningham, D.S., R.E. Kuhn & E.C. Rowland (1978) Suppression of humoral responses during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Infect. Immun. 22: 155–160
- 70) Dalmaso, A.F. & J.E. Jarvinen (1980) Experimental Chagas' disease in complement deficient mice and guinea pigs. Infect. Immun. 28: 434–440
- 71) Delain, E. (1972) L'acide desoxyribonucleique du kinetoplasta de *Trypanosoma cruzi*. Organisation moleculaire et effects de certains trypanocides. These de Doctorat en Sciences Naturelles. Univ. Paris VI–Paris.
- 72) Del Castillo, M., G. Mendoza, J. Oviedo, R.P. Perez Bianco, A.E. Anselmo & M. Silva (1990) AIDS and Chagas' disease with central nervous system tumor-like lesion.

- 73) De Souza, W. (1984) Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. Int. Rev. Cytology 86: 197-283
- 74) de Titto, E.H., E.L. Segura & M. Braun (1983) Cell immunity in Chagas' disease patients. Lymphoproliferative response to subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. Immunol. Letters. 6:161-167
- 75) de Titto, M. Braun, M. Moreno, P.M. Cossio, R.M. Arana & E.L. Segura (1983) Correlación entre respuesta inmune celular y humoral contra antígenos cardíacos en un grupo de enfermos chagásicos crónicos. Medicina (Buenos Aires) 43: 859
- 76) de Titto, E.H., M. Moreno, M. Braun & E.L. Segura (1987) Chagas' Disease: humoral response to subcellular fraction of *Trypanosoma cruzi* in symptomatic and asymptomatic patients. Trop. Med. Parasit. 38: 163-166
- 77) Docampo, R., S.N.J. Moreno & F.S. Cruz (1988) Enhancement of the cytotoxicity of cristal violet against *Trypanosoma cruzi* in the blood by ascorbate. Mol. Biochem. Parasitol. 27: 241-248
- 78) Donelson, J. (1988) The Biology of Parasitism. In Englund, P.T. and A. Sher (Edt). Alan R. Liss, New York, pp 371-400
- 79) Doolittle, R.F. (1981) Science , 214: 149-159
- 80) Doyle, P.S., J.A. Dvorak, & J.C. Engel (1984) *Trypanosoma cruzi*: quantitation and analysis of the infectivity of cloned stocks. J. Protozool. 31: 280-283
- 81) Dragon, E.A., V.M. Brothers, R.A. Wrightsman & J. Manning (1985) A Mr 90.000 surface polypeptide of *Trypanosoma cruzi* as a candidate for a Chagas' disease diagnostic antigen. Mol. Biochem. Parasitol. 16: 213-229
- 82) Dragon, E.A., S.R. Sias, E.A. Kato, & J.D. Gabe (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
- 83) Engman, D.M., K.H. Krause, J.H. Blumin, K.S. Kim, L.V. Kirchoff & J.E. Donelson (1989) A novel flagellar Ca - binding protein in Trypanosomes. J. Biol. Chem. 264: 18627-18631
- 84) Engman D.M., L.V. Kirchoff & J.E. Donelson (1989) Molecular cloning of mtp70, a mitochondrial member of the hsp70 family. Mol. Cell. Biol. 9 : 5163-5168
- 85) Engman, D.M., E.A. Dragon & J.E. Donelson (1990) Human humoral immunity to hsp70 during *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol. 144: 3987-3991

- 86) Ferguson, M.A.J., A.K. Allen & D. Snary (1982) The detection of phosphonolipids in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. J. Biochem. 207: 171–174
- 87) Fisher, E., M.A. Ouaiissi, P. Volpe, J. Cornette & M.D. Kazatchkine (1989) Glycoprotein 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. Immunology 65: 299–303
- 88) Francis, M.J., C.M. Fry, D.J. Rowlands, J.L. Bitte, R.A. Houghten, R.A. Lerner & F. Brown (1987) Immunology 61: 1–6
- 89) Freilij, H.L., R.S. Corral, A.M. Katzin & S. Grinstein (1987) Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas' disease. J. Clin. Microbiol. 25: 133–137
- 90) Gadelha, F.R., S.N.J. Moreno, W. De Souza, F.S. Cruz & R. Docampo (1989) The mitochondrion of *Trypanosoma cruzi* is a target of crystal violet toxicity. Mol. Biochem. Parasitol. 34: 117–126
- 91) Gazzinelli R., L.M. Galvao, J.C. Dias, G. Gazzinelli & Z. Brener (1988) Anti-laminin and specific antibodies in acute Chagas disease. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82: 574–576
- 92) Goldstein, I.M. & G. Weissman (1979) Non-phagocytic stimulation of human polymorphonuclear leukocytes: role of the plasma membrane. Sem. Hematol. 16: 175–187
- 93) Gonzalez, N.S., D.D. Sanchez, A.C. Frasch, & I. Algranati (1984). Surface proteins in different isolates of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Mol. Cell. Biochem. 63: 157–164
- 94) González A., J.L. Rosales, V. Ley & C. Díaz (1990) Cloning and characterization of a gene coding for a protein (KAP) associated with the kinetoplast of epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 40: 233–243
- 95) González Cappa, S.M., G.A. Schmuñis, O.C. Traversa, J.F. Yanovsky & A.S. Parodi (1968) Complement-fixation tests, skin tests and experimental immunization with antigens of *Trypanosoma cruzi* prepared under pressure. Am. J. Trop. Med. Hyg. 17: 709–715
- 96) González Cappa, S.M., A.M. Katzin, S. Lajmanovich (1979) *Trypanosoma cruzi*: actividad de inmunosueros de ratón sobre el estadio epimastigote. Medicina (Buenos Aires) 39: 187–192
- 97) González Cappa, S.M., J. Kloetzel, A.M. Katzin & R. Ribeiro do Santos (1980) *Trypanosoma cruzi*: activity of immune sera on surface antigens. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 22: 275–280

- 98) Gottlieb, M. (1977) A carbohydrate-containing antigen from *Trypanosoma cruzi* and its detection in the circulation of infected mice. *J. Immunol.* 119: 465-470
- 99) Gottlieb, M. (1978) *Trypanosoma cruzi*: Identification of a cell surface polysaccharide. *Exp. Parasitol.* 45: 200-207
- 100) Granzotti J.A., G.M. Rocha, J.R.G. Arevalo & F. Ferriolli Filho (1985) Cardiopatia chagastica em crianças. Relato de dois casos. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 27: 341-345
- 101) Grögl, M. & R.E. Kuhn (1985) Identification of antigens of *Trypanosoma cruzi* which induce antibodies during experimental Chagas' disease. *J. Parasitol.* 71: 183-191
- 102) Gutteridge, W.E. & G.W. Rogerson (1979) Biochemical aspects of the biology of *Trypanosoma cruzi*. En *Biology of the Kinetoplastida*. Vol 2: 619-642. Ed. por W.H.R. Lumsden & D.A. Evans. Academic Press, London.
- 103) Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids *J. Mol. Biol.* 166: 557-580
- 104) Harth, G., C.G. Haidaris & M. So (1989) Purification and Characterization of stage-specific glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33: 143-150
- 105) Hatcher F.M. & R.E. Kuhn (1982) Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. *Science* 218: 295-297
- 106) Herrington, D.A., D.F. Clyde, G. Losonsky, M. Contesia, J.R. Murphy, J. Davis, S. Bagar, A.M. Felix, E.P. Heimer, D. Gillessen, E. Nardin, R.S. Nussenzweig, V. Nussenzweig, M.R. Hollingdale & M.M. Levine (1987) Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature* 328: 257-259
- 107) Hoare, C.A. (1966a) The classification of mammalian trypanosomes. *Erg. Mikrobiol.* 39: 43
- 108) Hoare, C.A. & F.G. Wallace (1966b) Developmental stages of trypanosomatid flagellates, a new terminology. *Nature* 212: 1385-1389
- 109) Hoft, D.F., K.S. Kim, K. Otsu, D.R. Moser, W.J. Yost, J.H. Blumin, J.E. Donelson & L.V. Kirchoff (1989) *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect. Immun.* 57: 1959-1967
- 110) Hoogenraad, N.J. & C.J. Wraight (1986) The effect of pristane on ascites tumor

formation and monoclonal antibody production. Meth. in Enzymology 121: 375-381

- 111) Ibañez, C.F., J.L. Affranchino, R.A. Macina, M.B. Reyes, S. Leguizamón, M.E. Camargo, L. Åslund, Ulf Petterson & A.C.C. Frash (1988) Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequences motifs. Mol. Biochem. Parasitol. 30: 27-34
- 112) Iida K., M.B. Whitlow & V. Nussenzweig (1989) Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* escape destruction by the terminal complement components. J. Exp. Med. 169 : 881-891
- 113) Joiner, K., S. Hieny, L.V. Kirchoff & A. Sher (1985) GP72, the 72 kilodalton glycoprotein is the membrane acceptor site for C3 on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. J. Exp. Med. 161: 1196-1212
- 114) Joiner, K., M.T. Rimoldi, T. Kipnis, W.D. Da Silva, C.H. Hammer & A. Sher (1987) Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* produce molecules which accelerate the decay of complement C3 convertases. Complement 4: 175
- 115) Joiner, K., W. Dias da Silva, M.T. Rimoldi, C.H. Hammer, A.Sher & T.L. Kipnis (1988) Biochemical characterization of factor by trypomastigote of *Trypanosoma cruzi* which accelerates the decay of complement C3 convertases. J. Biol. Chem. 15: 11327-11335
- 116) Kahn, S., W.C. Van Voorhis & H. Eisen (1990) The major 85-kD surface antigen of the mammalian form of is encoded by a large heterogeneous family of simultaneously expressed genes. J. Exp. Med. 172: 589-597
- 117) Kahn, T., R. Corral, H. Freilij & S. Grinstein (1983) Detection of circulating immune complexes, antigens and antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay in human *Trypanosoma cruzi* infection. IRCS Med. Sci. Libr. Compend. 11: 670-671
- 118) Katzin, A.M. & W. Colli (1983) Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi*: an N-acetyl-D-glucosamine containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. Biochem. Biophys Acta 727: 403-411
- 119) Katzin, A.M., A. Marcipar, H. Freilij, R. Corral, J.F. Yanovsky (1989) Rapid determination of *Trypanosoma cruzi* urinary antigens in human chronic Chagas' disease by agglutination test. Exp. Parasitol. 68: 208-215
- 120) Katzin, A., M.J. Alves, G. Abuin & W. Colli (1989) Antigenuria in chronic chagasic patients detected by a monoclonal antibody raised against *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 83: 341-343
- 121) Kearney, J.F., A. Radbruch, B. Liesegang & K. Rajewsky (1979) A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits

- the construction of antibody-secreting hybrid cells lines. *J. Immunol.* 123:1548-1550
- 122) Kelly, J.M. The role of interferon in parasitic protozoan infections. *Parasitol. Today* 2: 173-174
- 123) Kemp, D.J., R.L. Coppel, H.D. Stahl, A.E. Bianco, L.M. Corcoran, P. Mc Intyre, C.J. Langford, J.M. Favaloro, P.E. Crewther, G.V. Brown, G.F. Mitchell, J.G. Culvenor & R.F. Anders (1986) Genes for antigens of *Plasmodium falciparum* *Parasitology* 91: 83-108
- 124) Kierszenbaum F. & J.G. Howard (1976) Mechanisms of resistance against *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J. Immunol.* 116: 1208-1211
- 125) Kierszenbaum, F. (1979) Antibody-dependent killing of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* by human peripheral blood leukocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 965-968
- 126) Kierszenbaum, F. & Hayes M.M. (1980) Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Requirements for cellular destruction of circulating forms of *Trypanosoma cruzi* in human and murine in vitro systems. *Immunology* 40: 61-66
- 127) Kierszenbaum, F. (1980) Protection of congenitally athymic mice against *Trypanosoma cruzi* by passive antibody transfer. *J. Parasitol.* 66: 673-675
- 128) Kierszenbaum, F., D.B. Budko (1982) *Trypanosoma cruzi*: Deficient lymphocyte reactivity during acute Chagas' disease in the absence of suppressor T cells. *Parasite Immunol.* 4: 441-451
- 129) Kipnis, T.L., V.L.G. Calich and W. Dias da Silva (1979) Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. *Parasitology* 78: 89-98
- 130) Kirchoff, L.V., J.C. Engel, J.A. Dvorak & A. Sher (1984) Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* differ in their expression of a surface antigen identified by a monoclonal antibody. *Mol. Biochem. Parasitol.* 11: 81-89
- 131) Kirchoff, L.V., S. Hieny, G.M. Shiver, D. Snary & A. Sher (1984) Cryptic epitope explains the failure of a monoclonal antibody to bind to certain isolates of *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 133: 2731-2735
- 132) Kirchoff, L.V., A.A. Gam, R. d'A Gusmao, R.S. Goldsmith, J.M. Rezende & A. Rassi (1987) Increased specificity of serodiagnosis of Chagas' disease by

- detection of antibody to the 72 and 90 kilodalton glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. J. Infec. Dis. 155: 561-564
- 133) Kohler, G. & C. Milstein (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature (London) 256: 495-497
- 134) Kooy R.F., F. Ashall, M. Van der Ploeg & J.P. Overdulve (1989) On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 36: 73-76
- 135) Kornblihtt, A.R., K. Vibe-Pedersen & F.E. Baralle (1984) Human fibronectin: Cell specific alternative m-RNA slicing generates polypeptides chains differing in the number of internal repeats. Nucl. Acid Res. 12: 5853 - 5868
- 136) Krettli, A.U. & Z. Brener (1976) Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol. 116: 755-760
- 137) Krettli, A.U., P. Weisz Carrington & R.S. Nussenzweig (1979) Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement mediated lysis. Clin. Exp. Immunol. 37: 416
- 138) Krettli, A. & Z. Brener (1982) Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. J. Immunol. 128: 2009-2012
- 139) Krettli, A. (1987) Effect of protective and non protective antibodies in the phagocytosis rate of *Trypanosoma cruzi* blood form by mouse peritoneal macrophages. Parasite Immunol. 9: 21-30
- 140) Krieger M.A., J.M. Salles, E. Almeida, J. Linss, M.C. Bonaldo & S. Goldenberg (1990) Expression and polymorphism of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a cytoplasmic repetitive antigen. Exp. Parasitol. 70: 247-254
- 141) Kuhn, R.E. & G.W. Cassida (1981) Cytophilic antibodies in experimental Chagas' disease. J. Parasitol. 67: 807-812
- 142) Köberle (1974) Pathogenesis of Chagas disease in: Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease. Ciba Foundation 20: 137-152
- 143) Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- 144) Lafaille, J.J., J. Linss, M.A. Krieger, T. Souto-Pradrón, W. de Souza & S. Goldenberg (1989) Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. Mol. Biochem. Parasitol. 35: 127-136

- 145) Laguens, R.P., P. Cabeza Meckert, M.A. Basombrío, G.I. Chambó, P.M. Cossio, R.M. Arana & R. Gelpi (1980) Infección crónica del ratón con *Trypanosoma cruzi*: modelo experimental de enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)* 40: 33-39
- 146) Lanar, D.E., L.S. Levy & J.E. Manning (1981) Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3: 327-341
- 147) Lederkremer, R.M., M.J.M. Alves, G.C. Fonseca & W. Colli (1976) A Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* (epimastigota). *Biochim. Biophys. Acta* 444: 85-96
- 148) Lederkremer, R.M., D.L. Casal, M.J.M. Alves & W.Colli (1980) Evidence for the presence of D-galactofuranose in the lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* 116: 25-29
- 149) Lemesre, J.L., D. Afchain, O. Orozco, M. Loyens, F.S. Breniere, P. Desjeux, Y. Carlier, U. Martin, J.A. Nogueira-Queiroz, D. Le Ray & A. Capron (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
- 150) Levin, M.J., D. Daegelen, M.C. Meienhofer, J.C. Dreyfus & A. Kahn (1982). Two different species of m-RNA specify synthesis of M and M pyruvatekinase subunits. *Biochem. Biophys. Acta* 66: 77-83
- 151) Levin, M.J., E. Mesri, R. Benarous, G. Levitus, A. Schijman, P. Levy-Yeyati, P.A. Chiale, A.M. Ruiz, A. Kahn, M.B. Rosebaum, H.N. Torres & E.L. Segura (1989) Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41: 530-538
- 152) Libbi, P., J. Alroy & M.F.A. Pereira (1986) A neuraminidase from *Trypanosoma cruzi* removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 77:127-135
- 153) Lima, M.F. & F. Villalta (1989) *Trypanosoma cruzi* trypomastigote clones differentially express a parasite cell adhesion molecule. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33: 159-170
- 154) Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Fan & R.J. Randale (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- 155) Lugones, H.S., O.S. Ledesma, F.A. Peralta, A.E.A. Marteleur, P. Vozza, S.Z. Falendy & G. Barbieri (1979) Enfermedad de Chagas. *Anales Nestlé* 132: 124-135
- 156) Macina, R.A., J.L. Afranchino, G.D. Pollevick, E.E. Jazin & A.C.C. Frasch (1989) Variable number of repeats units in genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. *FEBS Lett.* 257: 365-368

- 157) Maniatis, T., E.F. Fritsch & J. Sambrook, (1982). Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 158) Marcipar, A., S. Barnes, E. Lentwojt & G. Broun (1982) Immunoenzymatic determination of antibody-bound soluble antigens of *Trypanosoma cruzi*. App. Biochem. Biotech. 7: 459-462
- 159) Margalit H., J.L. Spouge, J.L. Cornette, K.B. Cease, C. Delisi & J.A. Berzofsky (1987) Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. J. Immunol. 138: 2213-2229
- 160) Martin, U.O., D. Afchain, M. Loyens, C. Maidana & A. Capron (1989) *Trypanosoma cruzi*: circulating polysaccharide factors excreted in vitro and in vivo. Medicina (Buenos Aires) 49: 33-36
- 161) Martins, M.S., L. Hudson, A. Krettli, R. Cançado & Z. Brener (1985) Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. Clin. Exp. Immunol. 61: 343-350
- 162) Mazza, S. & R. López Mansilla (1940) Forma aguda cutáneo oftalmoganglionar de enfermedad de Chagas comprobada en el Departamento Pocito (San Juan) Publicaciones MEPRA 43: 57-58
- 163) Mazza, S. (1943). Comprobaciones de *Triatoma platensis*, *Eutriatoma oswaldoi*, *Psatrogylus seai* y *Psamolestes coreades* en la provincia de Santiago del Estero, todas ellas sin infestación por *Trypanosoma cruzi*. Otros datos sobre infestación esquizotripanósica natural silvestre de *Triatoma infestans*. Prensa Médica Argentina, 30: 1583-1590
- 164) Mc Daniel, J.P., R.J. Howard & J.A. Dvorak (1986) Identification and analysis of epimastigotes surface and metabolic proteins in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 19: 183-194
- 165) Melo R.C. & Z. Brener (1978) Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. J. Parasitol. 64: 475-482
- 166) Merrifield, R.B. (1963) Solid phase peptides synthesis: I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-2154
- 167) Messing, J., R. Crea & P.H. Seeburg (1981) A system for shotgun DNA sequencing. Nuc. Acids Res. 9: 2871-2887
- 168) Messing, J. & J. Vieira (1982) A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. Gene 19: 269 - 276

- 169) Milani, SR; L.R. Travassos (1988) Anti-alpha-galactosyl antibodies in chagasic patients. Possible biological significance. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21: 1275-1286
- 170) Miles, M.A., P.J. Toye, S.C. Oswaldo, & D.G. Godfrey (1977) The identification of isoenzyme patterns of two distinct strain groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71: 217-221
- 171) Miles, M.A., R.A. Cedillos, M.M. Povoá, A.A. De Souza, A. Prata & V. Macedo (1981) Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet* i: 1338-1340
- 172) Milich, D., A. Mc Lachlan, J.L. Hughes, A. Moriarty & G.B. Thornton, (1988) Multivalent hepatitis-B virus synthetic vaccines. " Vaccines 88. New Chemical and Genetic Approaches to Vaccination. Prevention of AIDS and Other Viral, Bacterial, and Parasitic Diseases" (Ginsberg, H. et al. Ed.) pp 13-18. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 173) Minoprio, P.M., H. Eisen, L. Forni, M.R. D' Imperio Lima, M. Joskowicz & A. Coutinho (1986) Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T and B cell responses. *Scans. J. Immunol.* 24: 661-668
- 174) Mitchell, G.F. (1988) The way ahead for vaccines and vaccination. *Vaccine* 6: 200-205
- 175) Nogueira, N., C. Bianco & Z. Cohn (1975) Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 142: 224-229
- 176) Nogueira, N. & Z. Cohn (1976) *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.* 143: 1402-1420
- 177) Nogueira, N., S. Chaplan, J.D. Tydings, J. Unkeless & Z. Cohn (1981) *Trypanosoma cruzi* surface antigens of blood and culture forms. *J. Exp. Med.* 153: 629-639
- 178) Nogueira, N., J. Unkeless & Z. Cohn (1982) Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79. 1259-1263
- 179) Norrander, J., T. Kempe & J. Messing (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxy nucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26: 101-106
- 180) Norris, K.A., G. Harth & M. So (1989) Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicit antibodies. *Infect. Immun.* 57: 2372-2377

- 181) Nussenzweig, V., R. Soontag, A. Biancalana, J.L.P. Freitas, V. Amato Neto & J. Kloetzel (1953) Ação de corantes trifenil metânicos sobre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro". Emprego de violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue. Hospital (Rio de Janeiro) 44: 731-744
- 182) Opperdoes, F.R. (1987) Compartmentation of carbohydrate metabolism in Trypanosomes. Am. Rev. Microbiol. 41: 127-151
- 183) Orozco, O., D. Afchain, C. Dissous, C. Rodríguez, G. Ovlaque, J.L. Lemesre, M. Loyens & A. Capron (1984) Different monoclonal antibodies against the component 5 specific for *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33: 560-568
- 184) Ouaisi, M.A., D. Afchain, A. Capron & J.A. Grimaud (1984) Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. Nature 308: 380-382
- 185) Ouaisi, M.A., J. Cornette & A. Capron (1985) *Trypanosoma cruzi*: Modulation of parasite-cell interaction by plasma fibronectin. Eur. J. Immunol. 15: 1096-1101
- 186) Ouaisi, M.A., J. Cornette & A. Capron (1986) Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. Biochem. Parasitol. 19: 201-211
- 187) Ouaisi, M.A., J. Cornette, D. Afchain, A. Capron, H. Gras-Masse & A. Tartar (1986) *Trypanosoma cruzi*. Infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. Science 234: 603-607
- 188) Ouasssi, M.A., J.P. Kusnierz, H. Gras-Masse, H. Drobecq, P. Velge, J. Cornette, A. Capron & A. Tartar (1986) Fluorescence-activated cell-sorting analysis of fibronectin peptides binding to *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. J. Protozool. 35: 111-114
- 189) Ouaisi, M.A., A. Taibi, J. Cornette, P. Velge, B. Marty, M. Loyens, M. Esteva, F.S. Rizvi & A. Capron (1990) Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. Parasitology 100: 115-124
- 190) Parodi, A.J. & L.A. Quesada-Allue (1982) Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi*, I. Characterization of dolichol-bound monosaccharides and oligosaccharides synthesized in vivo. J. Biol. Chem. 257: 7637-7640
- 191) Patarroyo, M.E., P. Romero, M.L. Torres, P. Clavijo, A. Moreno, A. Martínez, R. Rodríguez, F. Guzman & E. Cabezas (1987) Induction of protective immunity

against experimental infection with malaria using synthetic peptides.
Nature 328: 629 - 632

- 192) Patrucco, A., J.A. Cerisola, M. Michel, P. Chiale, M. Alvarez & E.L. Segura (1978) Flagellar antigens and the leukocyte migration-inhibition test in Chagas' patients. Trans. Roy. Trop. Med. Hyg. 72: 425-426
- 193) Paulone I., R. Chuit, A. Pérez, C. Winivesky-Colli & E.L. Segura (1988) Field research on an epidemiological surveillance alternative of Chagas' disease transmission. The primary health care (PHC) strategy in rural areas. Rev. Arg. Microbiol. 20: 103-105
- 194) Pearson, W.R. & D.J. Lipman (1988) Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448
- 195) Pereira, M.E.A., M.A. Loures, F. Villalta & A.F.B. Andrade (1980) Lectin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi*: developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigotes cells. J. Exp. Med. 152: 1375-1392
- 196) Pereira, M.E.A., A.F.B. Andrade & J.M.C. Ribeiro (1981) Lectins of distinct specificity in *Rhodnius Prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. Science 211: 597-600
- 197) Pereira, M.E.A. (1983) A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. Science 219: 1444-1446
- 198) Pereira Barreto, M. (1985). Reservorios del *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Factores biológicos y ecológicos en la Enfermedad de Chagas. Ed. R.U. Carvallo Tomo II: 275-288
- 199) Peterson, D.S., R.A. Wrightsman & J.E. Manning (1986) Cloning of a major surface-antigen gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat. Nature 322: 566-568
- 200) Peterson, D.S., D.L. Fouts & J.E. Manning (1989) The 85-kd surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi* is telomeric and a member of a multigene family. EMBO J. 8: 3911-3916
- 201) Petry, K., P. Voisin & T. Baltz (1987) Complex lipids as common antigens to *Trypanosoma cruzi*, *T. dionisii*, *T. vespertilionis* and nervous tissue (astrocytes, neurons). Acta Tropica 44: 381-386
- 202) Picard, J.Y., R. Benarous, D. Guerrier, N. Josso & A. Kahon (1986). Cloning and expression of cDNA for anti-Müllerian hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5464-5468

- 203) Pinto Díaz, J.C. (1982) Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982. Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.
- 204) Pinto Díaz, J.C. (1987) Epidemiology of Chagas' disease in Brazil. Chagas' disease vector, Ed. R.R. Brenner y A.M.M. Stoka, C.R.C. Press Inc., Boca Ratón, Florida, USA, 1: 57-64
- 205) Piras, M.M., D. Henríquez & R. Piras (1987) The effect of fetuin and other sialoglycoproteins on the in vitro penetration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes into fibroblastic cells. Mol. Biochem. Parasitol. 22: 135-143
- 206) Plata, F., F. García Pons & H. Eisen (1984) Antigenic polymorphism of *Trypanosoma cruzi*: clonal analysis of trypomastigote surface antigens. J. Immunol. 14: 392-399
- 207) Rangel Aldao, R., G. Comach, O. Allende, E. Cayana, V. Delgado, R. Piras, M. Piras, D. Henríquez & S. Negri (1986) *Trypanosoma cruzi* polypeptide markers of epimastigotes and trypomastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 20: 25-32
- 208) Reed, S.G. (1980) Adoptive transfer of resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection with T-lymphocytes enriched spleen cells. Infect. Immun. 28: 404-410
- 209) Requena, J.M., M.C. López, A. Jiménez Ruiz, J.C. de la Torre & C. Alonso (1988) A head to tail tandem organization of hsp 70 in *Trypanosoma cruzi* Nucl. Acid Res. 16: 1393-1406
- 210) Reyes M.B., M. Lorca, P. Muñoz & A.C.C. Frasch (1990) Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 2846-2850
- 211) Rezende, J.M. (1974) The digestive tract in Chagas' disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79: 97
- 212) Ribeiro do Santos, R., & L. Hudson (1980) *Trypanosoma cruzi*: Binding of parasite antigens to mammalian cells membranes. Parasite Immunology 2: 1-10
- 213) Ribeiro do Santos, R. & L. Hudson (1980) Immunological consequences of parasite modifications of host cells. Clin. Exp. Immunol. 40: 36-41
- 214) Riou, G.F. & R. Pautrizel (1969) Nuclear and kinetoplast DNA from Trypanosomes. J. Protozool. 16: 509-513
- 215) Roberson, E.L., W.L. Hanson & W.L. Chapman Jr. (1973) *Trypanosoma cruzi*:

effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. *Exp. Parasitol.* 34: 168-180

- 216) Romoño, C. (1935) Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral (hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad) *Public. MEPR* 22: 16-28
- 217) Rosembaum, M.B. & J.A. Cerisola (1961) Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en la República Argentina. *Hospital* 60: 75-124
- 218) Rosembaum, M.B. (1964) Chagasic myocardiopathy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 7: 199-225
- 219) Rottenberg, M.E., R.L. Cardoni, E. de Titto, M. Moreno & E.L. Segura (1988) *Trypanosoma cruzi*: Immune response en mice immunized with parasite antigens. *Exp. Parasitol.* 65: 101-108
- 220) Rottenberg, M., R.L. Cardoni, & E.L. Segura (1990) Involvement of L3T4+, Lyt2.2+ T cell subsets and non-T cells in the resistance of mice against *Trypanosoma cruzi* infection. *Int. J. Parasitol.* 20: 397- 400
- 221) Rowlands, D.J. (1986) Vaccines - the synthetic antigen approach. *Biotechnology: Potentials and limitations*, ed. S. Silaver. Dahlem Konferenzen 1986 Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer - Verlag, pp 139-154
- 222) Rowlands, D.J. (1989) Enhancement of the immunogenicity of peptide vaccines. *Biochem. Soc. Trans.* 17: 945-947
- 223) Ruiz, A.M. (1983) Antígenos de la Fracción Flagelar de *Trypanosoma cruzi* e Inmunoprotección experimental. Tesis Doctoral en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- 224) Ruiz, A.M., C. Winivesky-Colli, R. Gurtler, J. Lazzari, M.A. Bujas & E.L. Segura (1985) Infección por *Trypanosoma cruzi* en humanos, perros y cobras en áreas rurales de la Pcia. de Córdoba. *Medicina (Buenos Aires)* 45: 539-546
- 225) Ruiz, A.M., M. Esteva, P. Cabeza Meckert, R.P. Laguens & E.L. Segura (1985) Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 42: 299
- 226) Ruiz, A.M., M. Esteva, A. Riarte, E. Subías & E.L. Segura (1986) Immunoprotection of mice against *Trypanosoma cruzi* with a lyophilized flagellar fraction of the parasite plus adjuvant. *Immunol Letters.* 12: 1-4

- 227) Ruiz, A.M., D. Velasco & E.L. Segura (1990) Detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en sueros, en un ensayo inmunoenzimático, mediante el uso de antígenos definidos. Actas del III Congreso Argentino de Protozoología y Reunión sobre Enfermedad de Chagas, 1990, R. II 25.
- 228) Sadigursky, M., A.M. Acosta & C.A. Santos Busch (1982) Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *Trypanosoma cruzi* clone. Amer. Trop. Med. Hyg. 31: 934-941
- 229) Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467
- 230) Santos-Busch, C.A., A.M. Acosta, H.J. Zweerink, M. Sadigursky, D.F. Andersen, B.F. von Kreuter, C.I. Brodskyn, C. Sadigursky & R.J. Cody (1985) Primary Muscle Disease: Definition of a 25 kDa polypeptide myopathic specific Chagas' antigen. Clin. Immunol. Immunopathol. 37: 334-350
- 231) Schauer, R., G. Reuter, H. Muhlfordt, A.F.B. Andrade & M.E.A. Pereira (1983) The occurrence of N-acetyl and N - Glycoloylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 364: 1053-1057
- 232) Scharfstein, J., M.M. Rodríguez, C.A. Alves, W. De Souza, J.O. Previato & L. Mendonça-Previato (1983) *Trypanosoma cruzi*: description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. J. Immunol. 131: 972-976
- 233) Scharfstein, J., M. Schechter, M. Senna, J.M. Peralta, L. Mendonça-Previato & M.M. Miles (1986) *Trypanosoma cruzi*: Characterization and isolation of a 57/51000 m.w. surface glycoproteins expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. J. Immunol. 137: 1336-1341
- 234) Schechter, M., J.E. Flint, A. Voller, F. Guhl, C.J. Markinkelle & M.A. Miles (1983) Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas' disease). Lancet II: 939-941
- 235) Schechter, M., A.F. Stevens, A.O. Luquetti, D. Snary, A.K. Allen & M.A. Miles (1986) Prevalence of antibodies to 72 kDa glycoprotein (GP72) in patients with Chagas' disease and further evidence for zymodeme associated expression of GP72 carbohydrates epitopes. Infect. Immun. 53: 547-552
- 236) Schechter, M. & N. Nogueira (1988) Variations induced by different methodologies in *Trypanosoma cruzi* surface antigen profiles. Mol. Biochem. Parasitol. 29: 37-46
- 237) Schmuñis, G.A., & A. Szarfman (1977) La enfermedad de Chagas congénita. Medicina (Buenos Aires), 37: 47-53

- 238) Schmuñis, G.A., A. Szarfman, W. de Souza, & T. Langembach (1980) *Trypanosoma cruzi*: Antibody-induced mobility of surface antigens. Exp. Parasitol. 50: 90-102
- 239) Schneider, A., A. Hemphil, T. Wyler & T. Seebeck (1988) Large microtubule-associated protein of *Trypanosoma brucei* has tandemly repeated near-identical sequences. Science 241: 459-462
- 240) Schnerrson, R., J.B. Robbins, C. Chu, A. Sutton, W. Vann, J.C. Vickers, W.T. London, B. Curfman, M.C. Hardegree, J. Shiloach & S.C. Rastogi (1984) Serum antibody responses of juvenile and infant Rhesus monkeys injected with *Haemophilus influenzae* type b and Pneumococcus type 6A capsular polysaccharide-protein conjugates. Infect. Immun. 45: 582-591
- 241) Scott M.T. (1981) The nature of immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in mice recovered from acute infection. Parasite Immunol. 3: 209-218
- 242) Scott, M.T., L. Moyes & J.N. Wood (1982). Lack of identity between the 90 K protective glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* and hybridoma (CE5)-defined *Trypanosoma cruzi* antigen which cross reacts with mammalian neurones. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76: 698-700
- 243) Scott, M.T., G. Bahr, F. Moddaber, D. Afchain & L. Chedid (1984) Adjuvant requirements for protective immunization of mice using a *Trypanosoma cruzi* 90 K cell surface glycoprotein. Int. Archs Allergy Appl. Immun. 74: 373-377
- 244) Scott, M.T., R.A. Neal & N.C. Woods (1985) Immunization of marmosets with *Trypanosoma cruzi* cell surface glycoprotein (GP90). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 79: 451-454
- 245) Segura, E.L., E. Cura, I. Paulone, C. Vasquez, J.A. Cerisola (1974) Antigenic make-up of subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool. 21: 571-574
- 246) Segura, E.L., I. Paulone, J.A. Cerisola & S.M. González Cappa (1976). Experimental Chagas' disease: Protective activity in relation with subcellular fractions of the parasite. J. Parasitol. 62: 131-133
- 247) Segura, E.L., C. Vazquez, A. Bronzina, J.M. Campos, J.A. Cerisola & S.M. Gonzalez Cappa (1977) Antigens of the subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*: II Flagellar and membrane fraction. J. Protozool. 24: 540-543
- 248) Segura E.L., E. Subías, E. Esteva, M. Cabeza Meckert, P. Bronzina and R.P. Laguens. (1980) Característica de infectividad de tres poblaciones de cultivo de *Trypanosoma cruzi*. Medicina (Buenos Aires) 40: 97-102

- 249) Segura E.L., M. Esteva, C. Quintans, L.S. Montoro, M.C. Weissenbacher (1981) Infección con *Trypanosoma cruzi* en ratones congénitamente atímicos. *Medicina (Buenos Aires)* 41: 328-332
- 250) Segura, E.L., A.C. Pérez, J.F. Yanovsky, J. Andrade, G.J.W. de Martini (1985) Decrease prevalence of infection by *Trypanosoma cruzi* in young men from Argentina. *Bull. Panam. Health. Organiz.* 19: 252-264
- 251) Segura, E.L., J. Búa, A. Rosenstein de Campanini, E. Subías, M. Esteva, M. Moreno, & Ruiz, A.M. (1986) Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*: Complement-mediated lytic activity against trypomastigotes and passive immunoprotection in mice. *Immunol Letters* 13: 165-171
- 252) Segura, E.L., R. Cardoni, J. Búa, M.E. Rottenberg, E.J. Bontempi, M.I. Esteva, M.A. Carlomagno, E.H. de Titto & A.M. Ruiz (1989) Bases Moleculares e Inmunológicas para el desarrollo de una vacuna contra la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)* 49: 203-209
- 253) Sher, A. & D. Snary (1982) Specific inhibition of the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* by a monoclonal antibody. *Nature* 300: 639-640
- 254) Sicqueira A.F., F. Ferrioli Filho & J. Carneiro (1966) Um antígeno solúvel presente no soro de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 8: 148
- 255) Snary, D., & L. Hudson (1979) *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins: identification of one major glycoprotein. *FEBS Lett.* 100: 166-170
- 256) Snary, D. (1980) *Trypanosoma cruzi*: antigenic invariance of the cell surface glycoprotein. *Exp. Parasitol.* 49: 68-77
- 257) Snary, D., M.A.J. Ferguson, M.T. Scott & A.K. Allen (1981) Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3: 1-14
- 258) Snary, D. (1983) Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 126-129
- 259) Snary, D., M.A.J. Ferguson, A.K. Allen & A. Sher (1984) Structure and function of a cell surface glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Biology of Host-Parasite Interactions* Alan. R. Liss, Inc. pp 239-247
- 260) Snary, D. (1985) The cell surface of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 117: 75-92

- 261) Solari, A.J. (1960) The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. *Chromosoma* 78: 239-255
- 262) Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517
- 263) Souto-Padron, T., M.B. Reyes, S. Leguizamon, O.E. Campetella, A.C.C. Frasch & W. de Souza (1989) *Trypanosoma cruzi* proteins which are antigenic during human infections are located in defined regions of the parasite. *Eur. J. Cell. Biol.* 50: 272-278
- 264) Stewart, G.L., V. Holmes, S. Gianini (1982) *Sarcocystis, Trypanosoma, Toxoplasma, Brugia, Ancylostoma* and *Trichinella* spp: a review of intracellular parasites of striated muscle. *Exp. Parasitol.* 53: 406-477
- 265) Sundqvist, B. & R.D. Macfarlane (1985) 252CF-plasma desorption mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 4: 421
- 266) Tachibana, H., L.T. Montenegro, K. Kurihara, K. Nagakura, Y. Kaneda & N. Komatsu (1986) Localization of the *Trypanosoma cruzi*-specific Mr 25.000 antigen by immune electron microscopy using monoclonal antibodies. *Z. Parasitenkd* 72: 701-707
- 267) Tachibana, H., K. Nagakura & Y. Kaneda (1988) Serodiagnosis of Chagas' disease using monoclonal antibody against *Trypanosoma cruzi*-specific Mr 25.000 antigen. *Parasitol. Res.* 74: 409-414
- 268) Takle G.B., A. Young, D. Snary, L. Hudson, S.C. Nicholls (1989) Cloning and expression of a trypomastigote-specific 85-kilodalton surface antigen gene from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37: 57-64
- 269) Tanowitz, H.B., M. Wittner, M. Sveda, R. Soeiro (1975) Studies on ribosomal RNA of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 61: 1065-1069
- 270) Tanowitz, H.B., M. Wittner, Y. Kress & B.R. Bloom (1975) Studies of in vivo infection by *Trypanosoma cruzi*. Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L-cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 25-33
- 271) Tanowitz, H.B., C. Brosman, D. Guastamachio, G. Baron, C. Raventos Suarez, M. Bornstein & M. Wittner (1982) Infection of organotypic cultures of spinal cord and dorsal root ganglia with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 1090-1097
- 272) Tarleton R. L. & R.E. Kuhn (1984) Restoration of in vitro immune responses of spleen cells from mice infected with *Trypanosoma cruzi* by supernatants containing interleukin 2. *J. Immunol.* 133: 1570 - 1575

- 273) Teixeira, A.R.L. & C.A. Santos Buch (1974) The immunology of experimental Chagas' disease. I. Preparation of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral antibody response to these antigens. J. Immunol. 113: 859-869
- 274) Teixeira, A.R.L., M.L. Texeira & C.A. Santos-Buch (1975) The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbit similar to those of chronic Chagas' disease in man. Am. J. Pathol. 80: 163-180
- 275) Teixeira M.M.G. & N. Yoshida (1986) Stage specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. Mol. Biochem. Parasitol. 18: 271-282
- 276) Tibayrenc, M. & F.J. Ayala (1987) *Trypanosoma cruzi* populations: more clonal than sexual. Parasitol. Today 3: 189-190
- 277) Towbin H, T. Stachelin & J. Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 4350-4354
- 278) Tropical Diseases (1989) Progress in International Research, 1987-1988. Ninth Programme Report. TDR, UNDP/WORD/BANK/WHO.
- 279) Tschudi, E.I., D.F. Anziano & A.P. Dalmaso (1972) Lymphocyte transformation in Chagas' disease. Infec. Immun. 6: 905-908
- 280) Van Voorhts, W.C. & H. Eisen (1989) FI-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. J. Exp. Med. 169: 641-652
- 281) Vattuone, I.J.H., A. Szarfman & S.M. Gonzalez Cappa (1973) Antibody response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic Chagas' infections (Chagas' disease) Am. J. Trop. Med. Hyg. 76: 45-47
- 282) Velge, P., M.A. Ouasssi, J. Cornette, D. Afchain & A. Capron (1988) Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* collagen - binding proteins: possible role on cell-parasite interaction. Parasitology 97: 255-268
- 283) Velge, P., A. Ouasssi, J.P. Kusniers & A. Capron (1989) Infection of T lymphocytes by *Trypanosoma cruzi*. Possible role of CD3 and HLA-DR antigens. C.R. Acad. Sci. Paris 309: 93-99
- 284) Vieira J. & J. Messing (1982) The pUC plasmids, an M13mp7 - derived system for insertion mutagénesis and sequencing with universal primers. Gene 19: 259
- 285) Von Brand, T.H. (1979) Biochemistry and Physiology of Endoparasites. Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

- 286) Wallis, A. E. & W.R. Mc Master (1987) Identification of *Leishmania* genes encoding proteins containing tandemly repeated peptides. J. Exp. Med. 166: 1814-1824
- 287) Wirth, J.J. & F. Kierszenbaum (1988) Recombinant tumor necrosis factor enhances macrophage destruction of a pathogenic parasite (*Trypanosoma cruzi*) by human neutrophils. J. Immunol. 141: 286-291
- 288) Wood, S.F. (1951) Importance of feeding and defecation times of insect vectors in transmission of Chagas' disease. J. Econ. Entomol. 44: 52-54
- 289) Wood, J.N., L. Hudson, T.M. Jessel & M. Yamamoto (1982) A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi*. Nature 296: 34-38
- 290) Wrightsman, R.A., W. Leon & J.E. Manning (1986) Variation in antigenic determinants specific to the infective stage of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 53: 235-239
- 291) Yoshida, N. (1983) Surface Antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 40: 836-839
- 292) Yoshida, N., M.M.G. Texeira, C.B. Christo & C.A. Sbravate (1984) Resistance of mice immunized with killed culture trypomastigotes against infection by insect-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 26: 329-333
- 293) Yoshida, N., S.A. Blanco, M.F. Araguth, M. Russo & J. González (1990) The stage specific 90 kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 39: 39-46
- 294) Young, R.A. & R.W. Davis (1983) Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 1194-1198
- 295) Young, R.A. & R.W. Davies (1983) Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. Science 222: 778-782
- 296) Zavala, F., A.H. Cochrane, E.H. Nardin, R.S. Nussenzweig & V. Nussenzweig (1983) Circumsporozoite proteins of malaria parasites contain a single immunodominant region with two or more identical epitopes. J. Exp. Med. 157: 1947-1957
- 297) Zeledón, R. (1972) Los vectores de la enfermedad de Chagas en América. Simp. Internac. sobre Enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Oficina (Panamericana de la Salud) UNDP/World bank/WHO pp 327
- 298) Zingales, B., N.W. Andrews, U.Y. Kuwajima & W. Colli (1982) Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi* possible correlation with the

interiorization process in mammalian cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6: 111-124

- 299) Zingales, B., C. Carniol, R.M. de Lederkremer & W. Colli (1987) Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 26: 135-144
- 300) Zweerink, H.J., H.D. Weston, O.F. Andersen, S.S. Garber & E.C. Hayes (1984) Immunity against infection with *Trypanosoma cruzi* in mice correlates with presence of antibodies against three trypomastigote polypeptides. *Infect. Immun.* 46: 826-830

Abreviaturas empleadas:

AcMo.....	Anticuerpo monoclonal.
AcMo 4	Anticuerpo monoclonal FCH-F8-4
Ag 4	Antígenos reconocidos por el AcMo 4.
ADN.....	Acido desoxirribonucleico.
ARN.....	Acido ribonucleico.
ARNm.....	Acido ribonucleico mensajero.
pb.....	Pares de bases.
Bp.....	<i>Bordetella pertussis</i> .
BSA.....	Seroalbúmina bovina.
Con A.....	Concanavalina A.
cpm.....	cuentas por minuto.
DTH.....	Hipersensibilidad de tipo Retardada.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA.....	Acido etilén-diamino-tetra-acético.
E	Epimastigotes.
HT.....	Homogeneizado total de epimastigotes.
Ig.....	Inmunoglobulina.
IMC.....	Inmunidad mediada por células.
i.p.	Vía intraperitoneal.
IPTG.....	Isopropil-D-tio-galactopiranosido.
F.....	Fracción flagelar.
GP.....	Glicoproteína.
GPI.....	Glicosil fosfatidil inositol.
kDa.....	Kilodalton.
KLH.....	Keyhole Limpet Hemocianina.
LMC.....	Lisis Mediada por Complemento.
LSNH	Lisis Mediada por Suero Humano Normal.
min.	Minutos
NC.....	Nitrocelulosa.
PBS.....	Solución salina fosfatada.
pl.....	Punto isoeléctrico.
PM.....	Peso molecular.
PMSF.....	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
SDS-PAGE...	Electroforesis en gel de poli-acrilamida en presencia de SDS.
SHN.....	Suero humano normal.
TBS	Solución Tris-salina.
TLCK.....	Tosil-lisil-cloro-metil-cetona.
T.....	Tripomastigotes.
T amb.	Temperatura ambiente
Tul.....	cepa Tulahuén.
U	Unidades.
VSG	glicoproteína variable de la superficie de <i>T. brucei</i> .
X-Gal.....	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido.

Quiero expresar además mi agradecimiento a:

Andrés M. Ruiz, por su guía, discusión y constante apoyo en la realización de este trabajo. Le agradezco también su introducción en el mundo de la Macintosh.

Esteban Bontempi y Betina Porcel, por el tiempo compartido en el laboratorio, el aprendizaje y la lucha con los experimentos de Biología Molecular.

Mónica Esteva, Titi Subías y Mirtha Moreno, por su colaboración con los experimentos de inmunoprotección y caracterización de anticuerpos.

Daniel Velasco, por su colaboración en los experimentos de inmunoquímica y mi constante superación en el Arkanoid™.

Ada Campanini y Elsa Velázquez, por el apoyo recibido del laboratorio de cultivo celular.

Mariano Levín, Patricia Levy-Yeyati y Enrique Mesri, por el entrenamiento recibido de su laboratorio del Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI).

Cristina Rivas, por su colaboración en el cultivo de los parásitos.

Anders Orn, del Dpto. de Inmunología del Instituto Karolinska de Estocolmo, a Ulf Pettersson y Lena Åslund, del Dpto. de Genética Médica de Uppsala y a Ake Engstrom, del Dpto. de Inmunología del mismo Instituto, por su estímulo y las facilidades ofrecidas en sus respectivos laboratorios.

Carlos del Prado, por la elaboración del material fotográfico.

Silvia Bruschini, por su apoyo en computación.

A todos mis compañeros del "Instituto Fatała Chebén", por el clima de trabajo distendido y cordial, especialmente a Laura Fichera, Estela Cura, Rut Slimovich, Mónica Esteva, Daniel Salomón por los cálidos cafés compartidos. A Ernesto de Titto, además, por tratar de enseñarme a escribir en Español.

Al apoyo financiero que posibilitó este trabajo, recibido de:

- El Programa de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud.
- La Agencia Sueca de Cooperación con los Países en Desarrollo.
- La Secretaría de Ciencia y Técnica, Programa Nacional de Enfermedades Endémicas.
- Al Ministerio de Salud y Acción Social, del cual espero concrete mi designación.