

Tesis de Posgrado

Autoinmunidad humoral en la enfermedad de Chagas crónica : anticuerpos contra las proteínas ribosomales P.

Levitus, Gabriela Laura

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:

Levitus, Gabriela Laura. (1991). Autoinmunidad humoral en la enfermedad de Chagas crónica : anticuerpos contra las proteínas ribosomales P.. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2414_Levitus.pdf

Cita tipo Chicago:

Levitus, Gabriela Laura. "Autoinmunidad humoral en la enfermedad de Chagas crónica : anticuerpos contra las proteínas ribosomales P.". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2414_Levitus.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**AUTOINMUNIDAD HUMORAL EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS
CRONICA: ANTICUERPOS CONTRA LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P.**

GABRIELA LAURA LEVITUS

Tesis para optar por el
título de Doctor en
Ciencias Biológicas

Director: Dr. Mariano Jorge Levin

1991

Instituto de Investigaciones en
Ingeniería Genética y Biología Molecular
(INGEBI-CONICET)

*A mis padres, por el
amor y la dedicación
con que me educaron.*

"Lo conocido es finito, lo desconocido infinito; desde el punto de vista intelectual estamos en una pequeña isla en medio de un océano ilimitable de inexplicabilidad. Nuestra tarea en cada generación es recuperar algo más de tierra."

T. H. Huxley, 1887.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Mariano J. Levin por haberme dado la oportunidad de iniciar mi carrera científica bajo su dirección. Por el estímulo y el apoyo constantes, pero sobre todo, por haber confiado siempre en mí y en mi trabajo, y haberme dado la libertad de elegir y de crecer.

Al Dr. Héctor N. Torres por haberme permitido desarrollar mi trabajo de tesis en el INGEBI. Por el apoyo y el interés permanentes.

A la Dra. Mireille Honteberye-Joskowicz de la Unité d'Immunoparasitologie del Instituto Pasteur, por haberme permitido realizar muchas experiencias de esta tesis en su laboratorio. Por el cariño, la dedicación y la ayuda que siempre me brindó.

Al Dr. Hernando del Portillo del Departamento de Parasitología de la Universidad de Sao Paulo, por haberme abierto las puertas de su laboratorio para la realización de los últimos experimentos de esta tesis. Por enriquecer mi trabajo con su experiencia y su criterio científico.

A la Dra. Eloísa Bonfa del Servicio de Reumatología del Hospital de Clínicas de Sao Paulo, con quien realicé algunas experiencias incluídas en esta tesis. Por su invaluable aporte en la discusión.

A mis queridos amigos Patricia Levy-Yeyati, Sonia Lafon y Alejandro Schijman por los innumerables momentos compartidos, dentro y fuera del laboratorio. Por haber estado siempre cerca. Por el cariño, la comprensión, el abrigo y la ayuda de todos los días.

A los Dres. Pablo Chiale, Dalia Schejtman y Mauricio Rosenbaum del Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía, por la meticulosa labor realizada en la caracterización clínica de los pacientes incluidos en este estudio. Por las críticas y los aportes fundamentales que guiaron constantemente mi trabajo.

A quienes colaboraron directamente en la realización de algunas experiencias de esta tesis: Pascale Liegeard (Unité d'Immunoparasitologie del Instituto Pasteur), Antonio Cardinalli (Servicio de Inmunología del Hospital de Clínicas, Buenos Aires), Alejandro Katzin (Departamento de Parasitología de la Universidad de Sao Paulo) y Enrique Mesri (INGEBI).

A los Dres. Marc Regenmortel (Laboratoire d'Immunochemie, Institut de Biologie Moleculaire et Cellulaire, Strasbourg) y Claude Leclerc (Departament d'Immunologie, Institut Pasteur), por sus contribuciones a través de críticas y sugerencias en las experiencias con péptidos sintéticos.

Al Dr. Jorge Tezón del IBYME por la ayuda que me brindó durante la primera etapa de mi trabajo.

Al Dr. Alberto Kohnblitt, mi consejero de estudios, a quien le debo, sobre todo, el haberme "contagiado" el amor por la docencia. A la Dra. Mirta Flawiá, por su constante preocupación y estímulo. A los Dres. Alejandro Mentaberry, María Teresa Iñón, Gerardo Glikin y Alejandro Paladini por la ayuda que siempre me brindaron.

Al grupo "Chagas": Dan Kaplan, Martín Vásquez, Liz Kaler y Nelson Dusseti, por el aliento y el compañerismo cotidianos.

A mis compañeros del INGEBI por todos los momentos compartidos. Por el afecto y la ayuda que me brindaron durante estos años: Mercedes Goin, Leo Erijman, Jorge Muschietti, Andrés Muro, Daniel Altschuler, Ricardo Attar, Guillermo Taccioli, Pablo Rabinowicz, Betina Orman, Fernando Bravo, Omar Coso, Malala Gómez, Graciela Bianchini, Rita Ulloa, Facundo Batista, Viviana Bernath, Gustavo Pesce, Nora Paños, Erich Grotewold, Javier Cáceres, Horacio Martinetto, Rosana Celnik, Liliana Haim y Clara Rubinstein.

A la "turma" del Departamento de Parasitología de la Universidad de Sao Paulo, quienes me ayudaron y acompañaron durante mi estadía en Brasil: Mario Bressan (gracias por las clases Word4!), María José Menezes, Cecilia Brito, Otto Frisch, Melissa Porto Pimentel, Ana María Camargo, Frederic Martens, Paula Dietrich, Osvaldo, Luiz Nunes, Marcelo Briones, Celia García. A Ana María Stolf, además, por los parásitos. A Momtchilo Russo por su amistad, el estímulo y las largas discusiones sobre la inmunopatología chagásica.

A Adriana Urman, por su invaluable ayuda en el manejo del Word Processor y la impresión de esta tesis. Por los miles favores recibidos y por las charlas y buenos momentos que compartimos durante estos años.

A Norberto Malarini, por la calidad del trabajo gráfico, su ayuda y buena predisposición. Por su simpatía y amistad. A Marcelo Lamamí por el excelente trabajo fotográfico.

A María Julia Alvarez, Norberto Contreras y Leonor Acevedo por el apoyo técnico.

APOYO INSTITUCIONAL:

- * Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- * Convenio de Cooperación INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale, Francia)-CONICET.
- * UNDP-Banco Mundial-Organización Mundial de la Salud, Programa Especial de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR).
- * Programa Regional de Biotecnología para Latinoamérica y el Caribe (UNDP-UNESCO).
- * Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT)-Plan Nacional de Biotecnología (PNB).

TRABAJOS PUBLICADOS DURANTE EL PERIODO DE TESIS:

Levitus, G., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Van Regenmortel, M.H.V. & Levin, M.J. 1991. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clin. Exp. Immunol.* 85 (en prensa).

Levin, M.J., Rossi, R., Levitus, G., Mesri, E., Bonnefoy, S., Kerner, N. & Hontebeyrie-Joskowicz, M. 1990. The cloned C-terminal region of a *Trypanosoma cruzi* P ribosomal protein harbors two antigenic determinants. *Immunol. Lett.* 28: 69-74.

Mesri, E., Levitus, G., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Diguiero, G., Van Regenmortel, M.H.V. & Levin, M.J. 1990. Major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinant in Chagas' heart disease shares homology with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1219-1224.

Schejtman, D., Levitus, G., Chiale, P., Levin, M.J., Elizari, M.V. & Rosenbaum, M. 1990. Determinantes antigénicos diferenciales de *T. cruzi* en pacientes chagásicos crónicos con o sin cardiomiopatía. Premio Pedro Cossio. Sociedad Argentina de Cardiología.

Levin, M.J., Levitus, G., Kerner, N., Lafon S., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Filkenstein, C., Chiale, P., Schejtman, D. & Hontebeyrie-Joskowicz, M. 1990. Autoantibodies in Chagas' heart disease: possible markers of severe Chagas' heart complaint. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85: 539-543.

Levin, M.J., Mesri, E., Benarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Chiale, P., Ruiz, A.M., Kahn, A., Rosenbaum, M., Torres, H.N. & Segura, E.L. 1989. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41: 530-538.

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO:

aa.....	aminoácido(s)
aprox.....	aproximadamente
Ap.....	apéndice
BSA.....	seroalbúmina bovina
cc.....	corriente constante
C-terminales....	carboxi-terminales
dil.....	dilución/diluido(s)
DO.....	densidad óptica
DTT.....	ditiotreitól
EDTA.....	ácido etilendiaminotetracético
fig.....	figura(s)
g.....	aceleración de la gravedad
h.....	hora(s)
IPTG.....	isopropil-B-D-tiogalactopiranosido
kDa.....	kilodaltons
mA.....	miliamperes
mat. y mét.....	materiales y métodos
min.....	minuto(s)
NP-40.....	Nonidet P-40 (octilfenoxi-polietoxietanol)
OPD.....	ortofenilendiamina
PM.....	peso molecular
PMSF.....	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA.....	persulfato de amonio
rev.....	revisión
SDS.....	laurilsulfato de sodio
seg.....	segundo(s)
TEMED.....	N, N, N', N'-tetrametilenodiamina
ufp.....	unidades formadoras de placas de lisis
V.....	volts
vol.....	volúmen(es)

INDICE GENERAL

Pág.

1) INTRODUCCION

1.1)	Breve historia de la enfermedad de Chagas.....	1
1.2)	Epidemiología.....	2
1.3)	El parásito y su ciclo de vida.....	3
1.4)	Mecanismos de transmisión.....	4
1.4.1)	Transmisión por el vector.....	4
1.4.2)	Transmisión congénita.....	4
1.4.3)	Transmisión por transfusiones de sangre.....	4
1.4.4)	Transmisión accidental en el laboratorio.....	5
1.5)	Fase aguda.....	5
1.6)	Fase crónica.....	6
1.7)	Patogénesis de la cardiopatía chagásica.....	7
1.7.1)	Toxinas de <i>T. cruzi</i>	7
1.7.2)	Teoría neurogénica.....	8
1.7.3)	Autoinmunidad en la Enfermedad de Chagas crónica.....	8
1.7.3.1)	Autoinmunidad celular.....	9
1.7.3.2)	Autoinmunidad humoral.....	10
1.8)	Origen de los autoanticuerpos en la Enfermedad de Chagas crónica.....	13
1.8.1)	Activación policlonal B.....	13
1.8.2)	Liberación de antígenos propios por ruptura celular.....	14
1.8.3)	Mecanismos dirigidos por el antígeno (anticuerpos an- ti-idiotipo y mimetismo molecular).....	15
1.9)	Antígenos de <i>T. cruzi</i>	16
1.10)	Proteínas ribosomales P.....	18
1.11)	Otros autoantígenos intracelulares descritos en enferme- dades autoinmunes.....	20
1.12)	Objetivos de la tesis.....	21

2) MATERIALES Y METODOS

2.1) Composición y medios frecuentemente empleados en el texto.....	24
2.2) Bacterias y fagos.....	24
2.2.1) Cepas bacterianas.....	24
2.2.2) Fagos.....	26
2.3) Sueros.....	27
2.3.1) Sueros de pacientes chagásicos.....	27
2.3.2) Otros sueros humanos.....	29
2.3.3) Obtención del suero policlonal anti-JL5 en conejo.....	30
2.4) Preparación de extractos totales de <i>T. cruzi</i>	31
2.4.1) Antígeno total de tripomastigotes.....	31
2.4.2) Antígeno total de epimastigotes.....	31
2.5) Preparación de extractos totales de diferentes tejidos de mamífero.....	32
2.5.1) A partir de células HeLa (extracto nuclear).....	32
2.5.2) A partir de otros tejidos.....	32
2.6) Preparación de ribosomas.....	33
2.6.1) A partir de células HeLa.....	33
2.6.2) A partir de parásitos.....	33
2.7) Inmunofluorescencia indirecta sobre células HEp2 y tripomastigotes.....	34
2.7.1) Inmunofluorescencia indirecta sobre células HEp2.....	34
2.7.2) Inmunofluorescencia indirecta sobre tripomastigotes.....	34
2.8) Detección de autoanticuerpos por contrainmuno-electroforesis.....	35
2.9) Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida...	36
2.9.1) Electroforesis unidimensional.....	36
2.9.2) Electroforesis bidimensional.....	39
2.9.2.1) Primera dimensión.....	40
2.9.2.2) Segunda dimensión.....	41
2.10) Electrotransferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa.....	41
2.11) Detección de proteínas con anticuerpos.....	42

2.12) Lisogenización de <i>E. coli</i> Y1089 con fagos λ gt11.....	44
2.13) Inducción de la expresión de las proteínas de fusión.....	45
2.14) Preparación de extractos totales a partir de cultivos de bacterias lisógenas.....	46
2.15) Preparación de lisado de <i>E. coli</i> lisógena para λ gt11 salvaje.....	46
2.16) Purificación de las proteínas de fusión.....	47
2.17) Inmunopurificación de anticuerpos anti-proteínas de fusión.....	48
2.18) Reactividad de los sueros con los fagos recombinantes....	49
2.18.1) Preparación de las bacterias para la infección.....	49
2.18.2) Crecimiento, inducción de los fagos recombinantes e inmovilización de las proteínas sobre filtros de nitrocelulosa.....	49
2.19) Experiencias de ELISA.....	50
2.19.1) ELISA con péptidos sintéticos.....	50
2.19.1.1) Reactividad de los diferentes sueros con los péptidos sintéticos.....	51
2.19.1.2) Experiencias de inhibición.....	53
2.19.2) Determinación del título anti- <i>T. cruzi</i> total de los diferentes sueros.....	53
2.19.3) Determinación del perfil isotípico de las respuestas anti-R13 y anti- <i>T. cruzi</i> de los pacientes.....	54
2.19.3.1) Control de la especificidad de los anticuerpos monoclonales empleados.....	54
2.19.3.2) Determinación de la distribución de subclases de anticuerpos (IgG) anti-R13 y anti- <i>T. cruzi</i> en sueros chagásicos y lúpicos.....	55
2.19.4) Reactividad de los sueros con las proteínas de fusión.....	55
2.19.4.1) Reactividad de los sueros con las proteínas recombinantes JL5, A1 y T31.....	55
2.19.4.2) Reactividad de los sueros con la proteína recombinante P2 humana.....	57
2.19.5) Detección de autoanticuerpos.....	57

3) RESULTADOS

3.1) Reactividad de los sueros chagásicos crónicos con diferentes tejidos de mamífero (modelos heterólogos).....	59
3.1.1) Western blot con tejidos de corazón de perro.....	59
3.1.2) Western blot con tejidos de ratón.....	59
3.2) Detección de autoanticuerpos en pacientes chagásicos por técnicas de diagnóstico de enfermedades autoinmunes..	62
3.2.1) Detección de autoanticuerpos por ELISA.....	63
3.2.2) Detección de autoanticuerpos por Western blot.....	65
3.2.3) Detección de autoanticuerpos por contrainmuno-electroforesis e inmunofluorescencia indirecta.....	69
3.3) Identificación de las proteínas ribosomales P de <i>T. cruzi</i> empleando anticuerpos humanos.....	70
3.4) Identificación de las proteínas ribosomales P de <i>T. cruzi</i> con un suero policlonal anti-JL5 de conejo.....	72
3.5) Reacción cruzada de los anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados a partir de sueros chagásicos con las proteínas ribosomales P humanas.....	74
3.5.1) Experiencias de Western blot.....	77
3.5.2) Experiencias de ELISA.....	80
3.6) Reacción cruzada con proteínas ribosomales P de <i>Leishmania sp.</i>	80
3.7) Análisis de las actividades anti-R13 y anti- <i>T. cruzi</i> presentadas por diferentes sueros humanos.....	83
3.8) Asociación entre los niveles de anticuerpos anti-R13 presentes en los sueros chagásicos y las diferentes formas clínicas de la enfermedad.....	85
3.9) Distribución de subclases de IgG para las respuestas anti-R13 y anti- <i>T. cruzi</i> en pacientes chagásicos crónicos.....	87
3.10) Caracterización de la respuesta anti-JL5 del suero policlonal preparado en conejo: ausencia de anticuerpos anti-R13.....	90

3.11) Caracterización de la respuesta anti-JL5 en la infección chagásica.....	92
3.11.1) Comparación entre las reactividades de los sueros chagásicos crónicos contra las proteínas de fusión JL5 y A1 por ELISA.....	94
3.11.2) Inhibición de la reactividad anti-JL5 de los sueros chagásicos por la proteína de fusión A1 y el péptido R13.....	97
3.11.3) Comparación entre los niveles de anticuerpos anti-R13 y anti-R18 medidos por ELISA.....	97
3.11.4) Reactividad diferencial presentada por los sueros chagásicos con los péptidos R13, I6 y R7.....	102
3.12) Reacción cruzada de los sueros chagásicos con las proteínas ribosomales P de <i>A. salina</i>	104
3.13) Reacción cruzada de los sueros chagásicos con el péptido sintético H13.....	106
4) DISCUSION.....	108
5) CONCLUSIONES.....	121
6) BIBLIOGRAFIA.....	123
7) APENDICE I (tablas)	
8) APENDICE II (secuencia de JL5)	

1 . INTRODUCCION

"...julgamos tratar-se de uma trypanozomíase humana, molestia ocasionada pelo *Trypanosoma cruzi*, cujo transmissor é o *Conorrhinus sanguisuga*..."

Carlos Chagas, 1909

1.1) BREVE HISTORIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS:

En 1909, durante una campaña antimalárica realizada en Minas Gerais, Carlos Chagas descubrió un gran número de insectos hematófagos domiciliarios infectados por un tripanosoma desconocido hasta ese momento, al que denominó *Schizotrypanum cruzi* en honor a su maestro, el Dr Oswaldo Cruz. Más tarde, la detección del parásito en la sangre de niños con cuadros febriles y de animales domésticos, junto con estudios experimentales efectuados por él y sus colegas en Río de Janeiro, lo llevaron a postular la existencia de una nueva enfermedad, la "tripanosomiasis humana" (Chagas, 1909). En 1911 informó su hallazgo a la Academia Nacional de Medicina (Río de Janeiro) con una pormenorizada descripción de las fases aguda y crónica de la enfermedad, así como de sus formas clínicas.

Si bien el descubrimiento de Chagas tuvo una rápida repercusión, no fue comprendido en toda su magnitud por sus contemporáneos. Kraus (1915), quien durante su estadía en el norte argentino no había encontrado individuos con signos de la enfermedad en áreas con vinchucas infectadas, cuestionó violentamente el descubrimiento de Chagas. Este rechazó dicha observación, pero los ataques y las dudas continuaron, al punto que fue catalogado como "un hombre que busca en la selva enfermedades que no existen"

(citado por Koberle, 1968). Debido a esta controversia, luego de 1920 y durante más de diez años, la enfermedad fue simplemente olvidada.

Su redescubrimiento se debe a la labor de Salvador Mazza y sus colegas en nuestro país. En 1934, año de la muerte de Chagas, Mazza informó la existencia de varios casos agudos en el norte argentino. Aunque fue criticado por "descubrir enfermedades nuevas en lugar de tratar las ya existentes", tanto él como sus colegas continuaron con sus investigaciones, registrando, antes de 1944, más de mil casos agudos de la enfermedad (Koberle, 1968). A partir de los trabajos de este grupo, los cuales ratificaron la importancia de la enfermedad de Chagas como un problema de salud pública, se intensificaron los estudios a lo largo de nuestro continente: Días y Laranja en Brasil, Tállice en Uruguay, Neghme en Chile, Pifano y Torrealba en Venezuela, Renjifo, Groot y Uribe Piedrahita en Colombia, Montalbán y León en Ecuador, Romero de León en Guatemala y Torrico en Bolivia (Romaña, 1963).

1.2) EPIDEMIOLOGIA:

La enfermedad de Chagas es una parasitosis de importancia epidemiológica restringida al continente americano. Su distribución geográfica coincide con la de los insectos transmisores de hábitos domiciliarios y abarca, prácticamente, toda América Central y América del Sur (Romaña, 1963). Sin embargo, la incidencia de la enfermedad presenta grandes diferencias regionales, siendo más afectadas las áreas rurales donde las condiciones de vivienda e higiene son más precarias (Abreu Salgado y Pellegrino, 1968). Por otra parte, las migraciones desde regiones rurales a centros industriales facilita el avance de la endemia hacia áreas indemnes (Zeledón y Rabinovich, 1981).

Datos estadísticos recientes indican la existencia de 20 millones de individuos infectados en toda América Latina, elevándose a 60 mil el número de muertes por año debidas a la enfermedad (Walsh, 1988).

1.3) EL PARASITO Y SU CICLO DE VIDA:

El *Tripanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es un protozoario perteneciente al orden *Kinetoplastida*, familia *Tripanosomatidae* (Hoare, 1964). Su ciclo de vida, inicialmente descrito por Chagas (1909), comprende la alternancia de dos huéspedes: un mamífero y un insecto hematófago que representa al huésped intermediario o vector.

El *T. cruzi* parasita el tubo digestivo de más de 80 especies de triatomíneos, siendo *Triatoma infestans* ("vinchuca") el principal vector en nuestro país (Mazza, 1943). La infección del insecto se produce durante su ingesta, a través de la succión de las formas tripomastigotas presentes en la sangre del huésped mamífero. Estas pasan a la región posterior del intestino donde se transforman en epimastigotes cortos, que luego de sucesivas divisiones dan lugar a los epimastigotes, responsables del mantenimiento de la infección en el huésped invertebrado. Finalmente, algunos alcanzan el recto y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, los cuales son eliminados con las heces del insecto y depositados sobre la piel o mucosas del mamífero.

Un gran número de mamíferos puede ser infectado por *T. cruzi*, incluyendo el hombre, animales domésticos y reservorios silvestres (Brener, 1979). Aunque son detectados en la sangre en gran cantidad, los tripomastigotes no se dividen sino luego de entrar a las células y diferenciarse en amastigotes. Después de la transformación, los parásitos se multiplican activamente por división binaria y sólo algunos amastigotes se diferencian en tripomasti-

gotes. Estos son liberados luego de la ruptura celular, ingresan a la circulación y son ingeridos eventualmente por el insecto, completando el ciclo de vida.

1.4.) MECANISMOS DE TRANSMISION:

1.4.1) Transmisión por el vector:

A pesar de la existencia de otras vías de transmisión, la infección por el vector es la verdadera responsable del mantenimiento de la endemia. Esta se produce por contacto directo de las heces contaminadas con la piel (a través de pequeñas heridas o la propia picadura del insecto) o las mucosas. Las observaciones frecuentes del síndrome de puerta de entrada ocular hace pensar que la infección por vía conjuntival es el mecanismo más común de contaminación (Romaña, 1963).

1.4.2) Transmisión congénita:

La infección congénita, que se produce por vía transplacentaria, fue sospechada inicialmente por Chagas (1911) y luego confirmada por diferentes autores (Dao, 1948; Howard y Rubio, 1968; Schmuñis y Szarfman, 1977; Lisboa Bittencourt, 1984). Los datos sobre la incidencia de casos son variables, pero de un modo general, esta vía de transmisión parece estar asociada a nacimientos prematuros y abortos (Pinto Días, 1979).

1.4.3) Transmisión por transfusión sanguínea:

La transmisión de la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea constituye un grave problema de salud pública y, probablemente, la principal causa de infección en áreas no endémicas (Amado Neto, 1968). Desde los primeros casos descritos en 1952, hasta 1979, el número registrado asciende a 130 (53 corresponden a

nuestro país). La incidencia de donadores seropositivos alcanza el 20% en algunos centros hospitalarios de América Latina (Pinto Días, 1979).

1.4.4) Transmisión accidental en el laboratorio:

Este tipo de infección puede producirse por contaminación con las heces de triatominos, parásitos en cultivo o sangre de animales inoculados. Si bien parece ser una vía de transmisión poco frecuente, según Brener (1990), el número de casos informados se eleva actualmente a más de 50.

1.5) FASE AGUDA:

La infección por *T. cruzi* generalmente ocurre durante la primera década de vida. El período agudo casi siempre es asintomático, estimándose que más del 90% de los individuos infectados pasa a la fase crónica sin advertirlo (Rosenbaum, 1964). El conjunto de signos clínicos que caracterizan a la fase aguda comprende: fiebre, parasitemia detectable, linfadenopatía, hepatosplenomegalia, vómitos, diarrea y especialmente, los signos de puerta de entrada (por ej.: "ojo de Romaña"). En un pequeño número de casos (1-5%) se observa la aparición de una miocarditis, generalmente reversible, caracterizada por taquicardia, cardiomegalia y disfunción cardíaca, acompañada o no por alteraciones electrocardiográficas (Laranja y col., 1956; Rosenbaum, 1964). La muerte ocurre excepcionalmente, y en las necropsias suelen encontrarse un gran número de nidos de amastigotes en el miocardio, músculo esquelético y liso y células gliales. El daño tisular parece estar directamente relacionado con la presencia del parásito y se origina, probablemente, por la acción citolítica de los eosinófilos o bien por interferencia de los amastigotes sobre el metabolismo celular (Molina y Kierszbaum, 1989; Morris y col., 1990).

1.6) FASE CRONICA:

La mayor parte de la población crónicamente infectada jamás presenta evidencias discernibles de enfermedad; sólo un porcentaje de hasta el 30%, con grandes diferencias regionales, desarrolla al cabo de 10, 20 o más años síntomas y/o signos de daño visceral. Esto es lo que se denomina enfermedad de Chagas crónica, cuya manifestación clínica más frecuente es una cardiomiopatía. Esencialmente se trata de una cardiomiopatía dilatada, que en sus estadios más avanzados cursa con marcado agrandamiento de las cavidades cardíacas, deterioro de la función sistólica e insuficiencia cardíaca (Rosenbaum, 1964). Existen características distintivas de la cardiopatía chagásica crónica que facilitan el diagnóstico diferencial con respecto a otras cardiomiopatías dilatadas. Estas incluyen las alteraciones segmentarias de la motilidad parietal y el aneurisma apical, el bloqueo de rama derecha y el hemibloqueo anterior, la frecuencia cardíaca lenta por compromiso del nódulo sinusal, las ondas Q anormales y las arritmias ventriculares posteriormente malignas (Laranja y col., 1956; Rosenbaum, 1964). Frecuentemente se observan focos inflamatorios activos, tanto en los cuadros más avanzados de la enfermedad como en los estadios iniciales de la cardiomiopatía. Esta inflamación crónicamente activa podría desempeñar un papel decisivo en la patogenia de la lenta y progresiva destrucción miocárdica (Chiale y Rosenbaum, 1989). Desafortunadamente, ésta sólo puede ser detectada mediante el estudio histológico de pequeños trozos de miocardio, lo que requiere el empleo de técnicas invasivas como la biopsia endomiocárdica.

Otras alteraciones clínicas de la enfermedad de Chagas son las formas digestivas (megasíndromes), que son atribuidas a la destrucción de las células del sistema nervioso vegetativo (Koberle, 1968). La incidencia de estos casos varía considerablemente con la región geográfica considerada. Los datos estadísticos señalan

frecuencias relativamente bajas (1-6%) en Brasil, Argentina, Uruguay Paraguay y Perú, y una prevalencia mayor (más del 70%) en Chile (Rezende, 1979).

1.7) PATOGENESIS DE LA CARDIOPATIA CHAGASICA CRONICA:

Como se mencionó anteriormente, la forma más severa de la enfermedad de Chagas crónica es una miocarditis activa que se manifiesta muchos años después de ocurrida la infección. En esta etapa de la enfermedad raramente se encuentran nidos de amastigotes en las fibras miocárdicas (Rosenbaum, 1964; Morris y col., 1990). Si bien esta observación no descarta la posibilidad de que el parásito esté siempre presente, muchos autores encuentran poco probable que el daño tisular se deba a la acción directa de *T. cruzi* sobre el miocardio (Torres, 1941; Muniz y Azevedo, 1947; Rosenbaum, 1964; Koberle, 1968; Andrade y Andrade, 1979). Además, aunque suelen observarse nidos de amastigotes en otros órganos, en estos casos la presencia de parásitos está acompañada por reacciones inflamatorias muy leves, sugiriendo la existencia de un proceso que actúa específicamente en el corazón (Barboza Jr. y Andrade, 1984).

Los mecanismos alternativos propuestos para explicar el origen de la miocarditis chagásica crónica son: 1) acción directa de "toxinas" secretadas por *T. cruzi*, 2) denervación parasimpática por infección y destrucción neuronal (teoría neurogénica) y 3) reacciones autoinmunes.

1.7.1) "Toxinas" de *T. cruzi*:

Algunos trabajos señalaron la existencia de "toxinas" en *T. cruzi* con acción citolítica sobre células de mamífero (Koberle y Nador, 1955; Seneca y Peer, 1966). Esta hipótesis fue refutada por varios autores, quienes demostraron la incapacidad de homogenatos,

fracciones celulares y sobrenadantes de cultivos del parásito de ejercer algún efecto tóxico en ratones o sobre monocapas de células (Musacchio y Meyer, 1962; Andrade y Andrade, 1979).

1.7.2) Teoría neurogénica:

Según esta hipótesis, inicialmente propuesta por Koberle (1968), el daño miocárdico se originaría por una pérdida gradual del control que ejerce el sistema nervioso autónomo sobre el corazón, debida a la infección y destrucción neuronal selectiva provocada por el parásito en la fase aguda de la enfermedad (Koberle, 1968; Oliveira y col., 1985). Aunque frecuentemente se observa denervación parasimpática en el corazón de pacientes con miocarditis chagásica crónica, ésta parece ser la consecuencia y no la causa del daño miocárdico (Dávila y col., 1989; Morris y col., 1990). Por otra parte, esta denervación ocurre también en otras cardiopatías dilatadas, lo que indica que no es un fenómeno específico de la miocarditis chagásica crónica (Amorim y col., 1982).

1.7.3) Autoinmunidad en la enfermedad de Chagas crónica:

La participación de mecanismos autoinmunes en la patogénesis de la enfermedad fue sugerida inicialmente por Torres (1941), quien postuló un origen "alérgico" para la cardiopatía chagásica crónica. Aunque el concepto de autoinmunidad continúa siendo hasta nuestros días tema de controversia, ha sido la hipótesis más aceptada para explicar la etiología de la enfermedad (rev. en Hudson, 1985; Kierszbaum, 1986; Schmuñis, 1987; Petry y Eisen, 1989).

1.7.3.1) Autoinmunidad celular:

a) Autoinmunidad celular en la infección humana:

Varios autores mostraron la capacidad de los linfocitos de pacientes chagásicos crónicos de proliferar en presencia de extractos de corazón murino y humano (Mosca y Plaja, 1981; Todd y col., 1983), así como de ejercer un efecto citotóxico sobre células cardíacas fetales humanas (Teixeira y col., 1978). Sin embargo, debido al carácter alogeneico de los sistemas empleados, estos resultados deben ser tomados con extrema precaución (Kierszbaum, 1986). Más aún, luego de un análisis más detallado del tema, Todd y col. (1983) cuestionaron la especificidad de dichas reactividades al encontrar una elevada correlación entre las respuestas proliferativas anti-corazón murino y anti-antígenos estreptocócicos.

b) Autoinmunidad celular en el modelo experimental de ratón:

Los trabajos realizados en el modelo experimental de ratón demostraron que es posible inducir una miocarditis similar a la chagásica en ratones normales por inoculación de extractos de corazón homólogos (Cossio y col., 1984) o de células mononucleares de ratones singeneicos crónicamente infectados (Laguens y col., 1981). Acosta y Santos Buch (1985) mostraron la acción citolítica de los linfocitos de ratones infectados sobre fibras miocárdicas singeneicas. Hontebeyrie-Joskowicz y col. (1987) obtuvieron células T CD4+ de ratones crónicamente infectados capaces de proliferar en presencia de homogenatos de *T. cruzi* o de nervios periféricos. La inoculación de algunas de estas líneas celulares en nervios ciáticos de animales singeneicos provocaba reacciones inflamatorias comparables a las encontradas en la enfermedad de Chagas crónica experimental. La respuesta proliferativa de las células T CD4+ de ratones infectados crónicamente también fue observada en presencia de miosina (y no de actina) (Rizzo y col., 1989). Los autores

de este trabajo postularon que esta autorreactividad específica podría desempeñar un papel importante en el origen de la miocarditis. Más recientemente, Ribeiro dos Santos y col. (1990) injertaron corazones de ratones recién nacidos en animales singeneicos infectados crónicamente. Al cabo de 20-30 días, los injertos fueron completamente rechazados y reabsorbidos, mientras que en los receptores normales persistieron aún después de un año. Por tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8, demostraron que las células involucradas en dicha reacción eran linfocitos T CD4+.

1.7.3.2) Autoinmunidad humoral:

a) Autoinmunidad humoral en la infección humana:

En 1974 Cossio y col. demostraron la capacidad de los sueros de pacientes chagásicos crónicos de reaccionar por inmunofluorescencia con endocardio, endotelio de vasos e intersticio (EVI) humanos y murinos. En particular estos anticuerpos eran detectados en el 95% de los pacientes con cardiopatía mientras que sólo el 40% de los individuos seropositivos asintomáticos mostraban esta reactividad. La absorción de los sueros anti-EVI+ con epimastigotes inhibía esta reacción, indicando que ésta era debida a determinantes antigénicos comunes presentes en dichas estructuras y en el parásito. Sin embargo, trabajos posteriores señalaron la existencia de anticuerpos anti-EVI en pacientes con otras parasitosis (malaria y leishmaniasis), hecho que ponía en duda la participación de estos anticuerpos en la patogénesis de la enfermedad de Chagas (Szarfman y col., 1975; Hubsch y col., 1976). Finalmente, varios de los resultados mencionados no pudieron ser reproducidos. Los mismos autores del trabajo original publicaron una "retractación" en la que señalaron no sólo la falta de correlación entre la reactividad anti-EVI y la cardiopatía, sino también la incapacidad de los sueros de reconocer tejidos humanos, indicando la naturaleza heterófila de dicha reacción (Khoury y col., 1983).

Santos Buch y col. (1985) detectaron anticuerpos anti-retículo sarcoplásmico de músculo estriado humano en pacientes chagásicos agudos, crónicos asintomáticos y con cardiopatía severa. Como estos anticuerpos también estaban presentes en sueros de individuos con otras cardiomiopatías dilatadas, distrofia muscular de Duchenne y polimiositis, los autores sugirieron que podrían estar involucrados en la inducción de daño muscular.

Otra autorreactividad descrita es la dirigida contra células del sistema nervioso. Khoury y col. (1979), mostraron la capacidad de los sueros chagásicos crónicos de reaccionar con vainas de Shwann de nervios periféricos. Esta reacción era inhibida por absorción con epimastigotes liofilizados. Sin embargo, la validez de estas experiencias fue discutida, ya que los parásitos empleados habían sido cultivados en medios ricos en extractos de cerebro (Kierszbaum, 1986). Además, aunque dicha reactividad había sido observada empleando tejidos murinos y humanos, experiencias posteriores revelaron el carácter heterófilo de estos anticuerpos, cuestionando, por lo tanto, su participación en la patogénesis de la enfermedad (Khoury y Fields, 1980). Por otra parte, Ribeiro dos Santos y col. (1979), mostraron por inmunofluorescencia la reacción de los sueros chagásicos crónicos con cortes de cerebelo de diversos orígenes, incluyendo el humano. En este caso, las experiencias de inhibición indicaron que dicha reactividad no era debida a una reacción cruzada con antígenos parasitarios.

Szarfman y col. (1982) detectaron anticuerpos anti-laminina murina en sueros de pacientes chagásicos crónicos y de monos infectados por *T. cruzi*. Posteriormente, experiencias de inhibición demostraron que el epitope reconocido por estos sueros, así como los de pacientes con leishmaniasis e individuos normales, era un carbohidrato (Gal α 1-3Gal) presente en la laminina murina pero ausente en la humana (Towbin y col., 1987). La naturaleza heterófila de los anticuerpos anti-laminina fue confirmada por Gazzinelli y col. (1988), quienes mostraron por ELISA la incapacidad de los sueros chagásicos crónicos de reconocer a la laminina humana.

Otros trabajos probaron la reactividad de los sueros chagásicos contra proteínas heterólogas. Borda y col. (1984) señalaron la existencia de anticuerpos (IgG) en algunos pacientes asintomáticos capaces de unirse a receptores β -adrenérgicos de miocardio de rata. Por otra parte, Avila y col. (1986) detectaron anticuerpos anti-nidógeno murino (una proteína de la membrana basal) en sueros de pacientes chagásicos crónicos. Debido a que aún no se ha demostrado la capacidad de estos anticuerpos de reconocer a las proteínas análogas humanas, su participación en la etiología de la enfermedad es meramente especulativa.

b) Autoinmunidad humoral en el modelo experimental de ratón:

Algunos trabajos mostraron la autorreactividad anti-corazón de los sueros de ratones infectados por *T. cruzi*. Mc Cormick y Rowland (1989) señalaron la aparición de anticuerpos anti-miocardio durante la fase aguda y crónica de la infección. Experiencias de absorción indicaron que los antígenos reconocidos estaban presentes tanto en extractos de tripomastigotes como de miocardio y músculo estriado, pero ausentes en músculo liso. Por otra parte, se demostró la capacidad de los anticuerpos de sueros de ratones crónicamente infectados de unirse a la superficie de cardiocitos singeneicos y mediar una respuesta citotóxica (ADCC) (Laguens y col., 1988).

Con respecto a la patogenicidad de los anticuerpos sobre células nerviosas, Said y col. (1985) no observaron lesiones tisulares al transferir sueros de ratones crónicamente infectados en nervios ciáticos singeneicos.

Ternynck y col. (1990) analizaron los autoanticuerpos producidos durante la infección experimental en comparación con los autoanticuerpos naturales presentes en ratones normales. Observaron altos niveles de anticuerpos (IgM e IgG) anti-actina, anti-miosina, anti-tubulina, anti-mioglobina y anti-ADN en el período de mayor

parasitemia. Luego de un año de infección, el 50% de los animales presentaron niveles elevados de autoanticuerpos (IgG), en particular anti-tubulina. En un análisis detallado de estas reactividades, concluyeron que los autoanticuerpos naturales eran afectados durante la infección por *T. cruzi*, no sólo porque eran producidos en mayor cantidad, sino también porque presentaban mayor afinidad y especificidad por dichos antígenos.

1.8) ORIGEN DE LOS AUTOANTICUERPOS EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS CRONICA:

La aparición de autoanticuerpos en la enfermedad de Chagas crónica podría originarse según diferentes mecanismos: 1) activación policlonal B, 2) liberación de antígenos propios por ruptura celular y 3) mecanismos "dirigidos" por el antígeno (anticuerpos anti-idiotipo y mimetismo molecular).

1.8.1) Activación policlonal B:

El concepto de "activación policlonal B" se refiere a una alteración del sistema inmune que lleva a la expansión de todos los clones de linfocitos B, incluyendo los autorreactivos. Una consecuencia directa de dicha expansión es el aumento de Igs séricas (hipergammaglobulinemia) y la aparición de autoanticuerpos (Argov y col., 1989).

En particular, la activación policlonal B fue demostrada tanto en el período agudo como en la fase crónica de la enfermedad de Chagas experimental (D'Imperio Lima y col., 1986). Minoprio y col. (1988) señalaron que sólo un bajo porcentaje (2%) de los clones B activados durante la fase aguda tenían especificidad anti-*T. cruzi*, mientras que la mayoría de ellos eran autorreactivos. Por otra parte, los isotipos inducidos durante la infección eran de clase IgG2a-IgG2b. Este perfil, característico de las respuestas T (CD4+)-dependientes, indicaba una co-expansión de las células T

CD4+ (D'Imperio Lima y col., 1985). Trabajos posteriores demostraron que todas las clases de linfocitos eran igualmente activadas (Minoprio y col., 1989).

Por el contrario, no hay evidencias que sugieran la existencia de este tipo de respuesta en la infección humana. Los datos acerca de los niveles de Igs séricas de pacientes chagásicos agudos y crónicos son contradictorios (Brener, 1980). Lelchuk y col. (1970) detectaron niveles normales de Igs durante la fase aguda, mientras que otros autores demostraron que los niveles de IgM e IgG estaban aumentados (Vattuone y col., 1973; Schmuñis y col., 1978). En la fase crónica, Vattuone y col. (1973) encontraron niveles levemente aumentados de IgG. Contrariamente, Marsden y col. (1970) no detectaron diferencias en comparación con los controles sanos.

1.8.2) Liberación de antígenos propios por ruptura celular:

Los autoanticuerpos podrían producirse también como respuesta hacia antígenos propios "secuestrados" en el interior de las células y que son expuestos al sistema inmune luego del daño tisular. Una propuesta alternativa fue la presentada por Cabeza Meckert y col. (1991), quienes demostraron una expresión "aberrante" de antígenos de histocompatibilidad de clase II (MHC II) en el sarcóplasma de las células de corazón y músculo esquelético de ratones crónicamente infectados por *T. cruzi*. Los autores postularon que las proteínas propias, normalmente presentadas por células MHC II (-), podrían así exponerse al sistema inmune en un contexto diferente y provocar una respuesta deletérea sobre determinados tejidos.

1.8.3) Mecanismos dirigidos por el antígeno:

Dentro de los mecanismos que podrían inducir la formación de autoanticuerpos como parte de la respuesta hacia el parásito, se encuentran: a) producción de anticuerpos anti-idiotipo y b) mimetismo molecular (molecular mimicry).

a) Anticuerpos anti-idiotipo:

La participación de anticuerpos anti-idiotipo en reacciones autoinmunes fue estudiada en diversas enfermedades. En particular, parece estar asociada a la presencia de anticuerpos anti-receptores (como en miastenia gravis, diabetes mellitus y enfermedad de Graves (rev. en Shoenfeld y Schwartz, 1984)) y a infecciones virales (Plotz, 1983).

Aunque los anticuerpos anti-idiotipo producidos durante la respuesta anti-*T. cruzi* podrían reconocer antígenos del huésped, no hay evidencias en la literatura que sugieran tal origen para las autorreactividades descritas en la enfermedad de Chagas crónica.

b) Mimetismo molecular:

El término "mimetismo molecular" (molecular mimicry) fue introducido por Damian (1964) y se refiere a la existencia de determinantes antigénicos compartidos por el parásito y el huésped. Una consecuencia de este fenómeno podría ser la inducción de una respuesta autoinmune durante el curso de la infección (Damian, 1964).

La existencia de epitopes compartidos por *T. cruzi* y tejidos de mamífero fue claramente demostrada por diferentes autores. Wood y col. (1982) obtuvieron un anticuerpo monoclonal a partir de un ratón inmunizado con preparaciones de ganglios de la raíz dorsal de rata. Este monoclonal reaccionaba tanto con varios tipos de

células neuronales como con los diferentes estadios del parásito. Por otra parte, se demostró que dos monoclonales derivados de ratones inmunizados con epimastigotes reconocían extractos de cerebro y de espina dorsal murinos (Snary y col., 1983). Petry y col. (1987) obtuvieron anticuerpos monoclonales contra *T. dionisii* y *T. vespertilionis* capaces de reaccionar con *T. cruzi* y con astrocitos y neuronas murinas. Los antígenos reconocidos por estos anticuerpos fueron identificados como glicolípidos y fosfolípidos. Más recientemente, Van Vooris y Eisen (1989) aislaron un antígeno recombinante de *T. cruzi*, F1-160, reconocido por sueros de ratones infectados crónicamente. El suero policlonal anti-F1-160 preparado en conejo reaccionaba con una proteína de 160 kDa del parásito y con un polipéptido de 48 kDa presente en diferentes extractos de tejido nervioso murino y humano. En particular, se determinó que el epitope común estaba definido en el antígeno recombinante F1-160 por un péptido de 48 aa. Este péptido fue reconocido por sueros de pacientes chagásicos crónicos, sugiriendo que la reacción cruzada observada en las experiencias anteriores podría ocurrir durante la infección humana (Petry y Van Vooris, 1991).

Con respecto a la reacción cruzada con antígenos musculares, Savidursky y col. (1982) mostraron la existencia de epitopes compartidos por el parásito y preparaciones de retículo sarcoplásmico de músculo estriado (SR). Empleando un suero policlonal anti-SR, se comprobó que este antígeno común (SRA) estaba presente en diferentes especies animales y varias cepas de *T. cruzi* (Acosta y col., 1983).

1.9) ANTIGENOS DE *T. cruzi*:

El desarrollo de las técnicas de ADN recombinante y de anticuerpos monoclonales permitió, durante la última década, la identificación y caracterización de un gran número de antígenos de *T.*

cruzi. Se han descrito en la literatura proteínas aparentemente relacionadas con la interacción parásito-célula hospedera (Zingales y Colli, 1985; Alves y col., 1986; Ouassi y col., 1986; Boschetti y col., 1987; De Arruda y col., 1989) y/o con capacidad de conferir protección frente a la infección (Snary, 1983; Scott y col., 1985; Yoshida y col., 1989; Ruiz y col., 1990; Ouassi y col., 1990). Otros antígenos estarían involucrados en la inducción de anticuerpos líticos (Mortara y col., 1988; Norris y col., 1989).

Los resultados de un estudio multicéntrico organizado recientemente por la Organización Mundial de la Salud, revelaron la potencialidad diagnóstica de antígenos purificados y proteínas recombinantes de *T. cruzi* obtenidos en diferentes laboratorios (Ibañez y col., 1988; Levin y col., 1989; Lafaille y col., 1989; Hoft y col., 1989; Paranhos y col., 1990; Cotrim y col., 1990; Zingales y col., 1990; Moncayo y Luquetti, 1990).

Finalmente, se identificaron antígenos reconocidos predominantemente por sueros de pacientes chagásicos con compromiso cardíaco (Levin y col., 1989), o en las etapas más tempranas de la infección (Affranchino y col., 1989; Reyes y col., 1990). Estos podrían ser empleados en el pronóstico y diagnóstico diferencial.

Algunas características del antígeno recombinante JL5:

El clon recombinante JL5 fue aislado en nuestro laboratorio por rastreo inmunológico de una biblioteca de ADNc de *T. cruzi* (estadio epimastigote) en λ gt11 con el suero de un paciente chagásico con cardiopatía severa (Levin y col., 1989). Varias evidencias experimentales sugirieron que este antígeno, de 35 aa, codificaba para una proteína ribosomal P del parásito: a) la secuencia de los 11 aa C-terminales de JL5 presentaba una homología de más del 90% con la misma región de las proteínas ribosomales P humanas, definida como epitope P en lupus (Rich y Steitz, 1987; Elkon y

col., 1988, Levin y col., 1989), b) los tamaños de los ARNm de epimastigotes que hibridizaban con el inserto de JL5 eran similares a los informados para el sistema ribosomal P humano (Rich y Steitz, 1987; Levin y col., 1989), y c) los anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados a partir de sueros chagásicos reaccionaban con un polipéptido presente en extractos totales de epi, tripo y amastigotes de PM idéntico a la proteína ribosomal P0 (38 kDa) (Towbin y col., 1982; Levin y col., 1989).

Con respecto a la antigenicidad de JL5, éste era reconocido predominantemente por sueros de pacientes chagásicos crónicos con cardiopatía severa, mientras que los sueros de individuos seropositivos sin compromiso cardíaco mostraban una reactividad baja o nula. Esta reacción también era negativa para los sueros de pacientes chagásicos agudos, con leishmaniasis, con cardiomiopatía no chagásica y para los sueros de individuos sanos (Levin y col., 1989; Levin, comunicación personal). Según la evaluación de un estudio multicéntrico que incluyó 50 sueros (OMS, 1990), JL5 podría ser empleado en el diagnóstico de la enfermedad, debido a su alta especificidad (Moncayo y Luquetti, 1990). Sin embargo, los resultados obtenidos con 226 sueros en otro estudio (Red Iberoamericana de Laboratorios, 1990) indicaron lo contrario, ya que JL5 resultó no ser reconocido por todos los sueros chagásicos (Levin, comunicación personal).

1.10) PROTEINAS RIBOSOMALES P:

Las proteínas ribosomales P forman parte de la subunidad mayor del ribosoma. Constituyen una familia compuesta por tres polipéptidos, P0, P1 y P2, siendo P0 una fosfoproteína neutra de 38 kDa y P1/P2, fosfoproteínas ácidas cuyos PM varían entre 10 y 18 kDa (Zinker y Warner, 1976; Towbin y col., 1982; Francoeur y col., 1985; Elkon y col., 1985). Debido a su función y a sus propiedades fisicoquímicas, P1 y P2 son consideradas análogas a las pro-

teínas L7/L12 de *E. coli*. Como L7/L12, P1 y P2 interactúan con los factores de elongación eucariontes EF1 y EF2, y son requeridas para la unión del aminoacil-ARNt y para la actividad GTPasa dependiente de EF2 (Howard y col., 1976; Sánchez-Madrid y col., 1981; Vidales y col., 1981). Si bien la función de P0 aún no ha sido esclarecida, se cree que es equivalente a la proteína L10 de *E. coli* (Elkon y col., 1986).

Mediante anticuerpos monoclonales y policlonales específicos, se demostró que las proteínas P estaban presentes en todas las especies eucariontes en las que fueron estudiadas. Estas experiencias indicaban, además, la existencia de determinantes antigénicos compartidos tanto entre las tres proteínas P del mismo sistema, como entre proteínas P análogas de diferentes organismos (Vidales y col., 1981; Towbin y col., 1982).

Por otra parte, las proteínas P humanas fueron definidas como autoantígenos en la enfermedad de lupus eritematoso sistémico (Elkon y col., 1985; Francoeur y col., 1985). Bonfa y Elkon (1986) señalaron que el 12% de los pacientes lúpicos analizados presentaba anticuerpos anti-P. Estos sueros reconocían también a las proteínas P de diferentes especies eucariontes. Por el contrario, no raccionaban con las proteínas ribosomales de *E. coli* (Francoeur y col., 1985; Elkon y col., 1985). El análisis de la reactividad anti-P mostró que el epítopo reconocido por los sueros lúpicos estaba restringido a los 11 aa C-terminales de las proteínas P (Elkon y col., 1988). La conservación de este epítopo a lo largo de la escala evolutiva fue confirmada a través de la secuencia de los ADNc informados para algunas proteínas P. Efectivamente, dicha comparación reveló una homología de más del 90% entre las secuencias aminoacídicas de los epítopos P de las diferentes especies (Maassen y col., 1985; Rich y Steitz, 1987; Mitsui y Tsurugi, 1988a, 1988b, 1988c):

```

JL5          ASAPTAAAAASGGAAAPAAAA.....EEEEDDDMGFGLFD
YPA1         +G*S+*+P*++*+*+G+D**...EEKEEEEAK**S*****
ASRP12'      +GVGA*P**+G+**TE*P**KEEKKEEKKEES*****
ASRP12       PT+GAP****G*+*****E*KEAKKEEKKEES*****
RLRP2        P++GAV*V+*+P*****+APAAEE.KEES**KK*****
P2           V+VSA+P+++P+++AP***.EEKKDEKKEES**S*****
P1           *P*AG**P*+GP+P+TA**V*EEKKVEAKKEES**S*****
P0           V+*APV***T+++P**A**P*...KVEAKEES**S*****

```

Comparación de las secuencias aminoacídicas de los extremos C-terminales de diferentes proteínas P con JL5. YPA1, corresponde a la proteína P1 de *Saccharomyces cerevisiae*; ASRP12 y 12', a las proteínas P2 de *Artemia salina*, codificadas por dos genes distintos; RLRP2, a la proteína P2 de rata; y P0, P1 y P2, a las proteínas P humanas. *: aminoácidos idénticos; +: cambios conservativos de aminoácidos.

1.11) AUTOANTIGENOS INTRACELULARES DESCRITOS EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES:

Una característica de ciertas enfermedades autoinmunes es la existencia de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos intracelulares. Estos son generalmente conservados, como en el caso de ADN, histonas y enzimas presentes en todos los tipos celulares y en diferentes especies (rev. en Tan, 1982). La caracterización molecular e inmunoquímica de estos autoantígenos permitió el empleo de determinados autoanticuerpos como marcadores en el diagnóstico. Así, los anticuerpos anti-ADN nativo, anti-P y anti-Sm son específicos para lupus eritematoso sistémico (LES), los anticuerpos anti-aminoacil ARNt sintetasas son marcadores de dermatopolimiositis y los anticuerpos anti-centrómero y anti-ADN topoisomerasa I son propios de escleroderma (Tan y col., 1988). Hay otros autoanticuerpos que se presentan, aunque con diferentes fre-

cuencias, en varias enfermedades. Se han descrito anticuerpos anti-histonas en LES y enfermedad mixta del tejido conectivo, y anticuerpos anti-Ro/La en LES y síndrome de Sjogren (Tan y col., 1988).

Aunque la función de algunos autoantígenos aún no ha sido esclarecida, se demostró la participación de las proteínas RNP y Sm en el splicing, de las proteínas P en la síntesis proteica y del antígeno La en el procesamiento de los ARN transcriptos por la ARN polimerasa III. Otros han sido identificados como aminoacil-ARNt sintetasas (Jo-1, PL-7 y PL-12) y ADN topoisomerasa I (ScI-70) (rev. en Tan, 1989).

Con respecto a la patogenicidad de estos autoanticuerpos, se ha demostrado en LES el efecto deletéreo de los anticuerpos anti-ADN, que a través de la formación de complejos inmunes son capaces de depositarse en los glomérulos del riñón, fijar complemento y activar procesos inflamatorios. La participación de otros autoanticuerpos en la patología aún no ha sido comprobada (rev. en Tan, 1989).

1.12) OBJETIVOS DE LA TESIS:

Las evidencias presentadas en la introducción demuestran que la existencia de autoinmunidad en la enfermedad de Chagas crónica y su asociación con la patología aún no han sido probadas. Más aún, hasta el momento no se han caracterizado molecularmente ninguno de los blancos de la postulada respuesta autoinmune. A partir de estas observaciones, los objetivos de esta tesis se centraron en a) investigar la existencia de autoanticuerpos en los sueros de pacientes chagásicos crónicos, b) caracterizar molecularmente alguno(s) de los autoantígenos reconocidos por estos autoanticuerpos y c) analizar la asociación entre la presencia de autoanticuerpos y la patología. Además, dada la alta homología del extre-

mo C-terminal del antígeno recombinante JL5 con la misma región de las proteínas ribosomales P humanas, se decidió estudiar la capacidad autorreactiva de los anticuerpos anti-JL5 de los sueros chagásicos crónicos y compararla con la de los anticuerpos anti-P de los pacientes lúpicos. Para alcanzar estos objetivos se propuso:

- 1) Analizar por Western Blot la reactividad de los sueros de pacientes chagásicos crónicos contra extractos de tejidos homólogos y heterólogos.
- 2) Investigar la presencia de autoanticuerpos en estos sueros por los métodos empleados comúnmente en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes: ELISA, inmunofluorescencia y conrainmuno-electroforesis.
- 3) Caracterizar molecularmente alguno(s) de los autoantígenos detectados por los sueros chagásicos crónicos.
- 4) Estudiar la correlación entre los niveles de autoanticuerpos presentados por los sueros de pacientes y la severidad de la cardiopatía.
- 5) Caracterizar el sistema de proteínas ribosomales P de *T. cruzi* empleando sueros de pacientes chagásicos, anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados a partir de dichos sueros y sueros de pacientes lúpicos anti-P+.
- 6) Estudiar la capacidad de los anticuerpos anti-JL5 de sueros chagásicos de reaccionar en forma cruzada con las proteínas ribosomales P humanas.

- 7) Analizar la respuesta humoral anti-JL5 de los pacientes chagásicos crónicos, en particular contra el epitope C-terminal de la proteína recombinante: distribución de subclases, incidencia de estos anticuerpos en la infección chagásica en comparación con otras parasitosis y asociación entre los niveles de dichos anticuerpos y la severidad de la miocarditis.

- 8) Comparar los epitopes definidos por los sueros chagásicos y los sueros lúpicos anti-P+.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1) COMPOSICION DE SOLUCIONES Y MEDIOS EMPLEADOS FRECUENTEMENTE EN EL TEXTO:

LB: 1% bacto-triptona (Difco, Detroit, MI, USA), 0,5% extracto de levadura (Difco, Detroit, MI, USA), 1% NaCl, pH: 7,0

LB-amp: LB + 100 µg/ml ampicilina

LB-agar: LB + 1,5% bactoagar (Difco, Detroit, MI, USA)

LB-"top" agarosa: LB + 0,7% agarosa

PBS: 10 mM fosfato de sodio pH: 7,4, 150 mM NaCl

PBS-G: PBS + 1% gelatina

PBS-TW: PBS + 0,05% Tween 20

TBS: 50 mM Tris-HCl pH: 7,4, 150 mM NaCl

TBS-TW: TBS + 0,05% Tween 20

SM: 50 mM Tris-HCl pH: 7,5, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 0,02% gelatina

PMSF (solución madre): 100 mM PMSF (Sigma, St. Louis, MO, USA) en etanol absoluto

Mezcla antiproteolítica: 0,5 mg/ml quimostatina (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,5 mg/ml antipaina (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,5 mg/ml aprotonina (Sigma, St. Louis, MO, USA)

2.2) BACTERIAS Y FAGOS:

2.2.1) Cepas bacterianas:

Y1090 (ATCC nº 37197): *E.coli*, Δ lacU169, proA+, Δ lon, araD139, strA, supF, (trp c22::Tn 10), (pMC9). pMC9=pBR322, lacI^q.

Y1089 (ATCC nº 37196): *E.coli*, Δ lacU169, proA+, Δ lon, araD139, strA, hflA150,(chr::Tn10), (pMC9).

Aclaraciones importantes para la comprensión del sistema:

supF: gen que codifica para un ARN de transferencia supresor de mutaciones ámbar (suprime la mutación Sam100 de λ gt11).

hflA: (high frequency lisogenization) La ausencia del producto del gen hflA aumenta la estabilidad de la proteína cII del fago. Esta activa la transcripción del represor cI, responsable del establecimiento de la lisogenia.

lacI^q: mutación del gen lacI que provoca un aumento en la producción del represor del operón lac.

lon: gen que codifica para una proteasa ATP-dependiente, responsable de la degradación de proteínas foráneas o anormales en *E. coli*.

pMC9: asegura la presencia del gen lacI^q a través de la selección en medios con ampicilina.

Mantenimiento de las cepas:

Ambas cepas se mantuvieron en placas de LB-agar-amp por cortos períodos (15 días) a 4°C, y por meses, en cultivos líquidos con 50% de glicerol a -70°C.

Bacterias lisógenas:

Las bacterias *E. coli* Y1089 lisógenas para los fagos recombinantes λ gt11-P1 y λ gt11-P2 (correspondientes a las proteínas ribosomales P1 y P2 humanas) fueron cedidas por el Dr. Jack Keene (Department of Microbiology, Duke University Medical Center, North Carolina, USA).

2.2.2) Fagos:

λ gt11: Δ lac5, Δ shndIII λ 2-3, srI λ 3^o, cIts857, srI λ 4^o, nin5, srI λ 5^o, Sam100.

Sam100: mutación ámbar involucrada en la lisis de la membrana bacteriana. Produce la acumulación de partículas fágicas dentro de huéspedes no supresores (sin supF).

cIts857: mutación termosensible que produce la inactivación del represor cI a 42°C, originando la inducción del ciclo lítico.

Fagos recombinantes:

λ gt11-JL5: clon recombinante aislado a partir de una biblioteca de ADN complementario de *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2, estadio epimastigote) en λ gt11 (Levin y col., 1989).

λ gt11-A1: subclon obtenido a partir del anterior. Comprende los 15 aa C-terminales de JL5 (Levin y col., 1990).

λ gt11-T31: clon recombinante purificado a partir de una biblioteca de ADN complementario de *T. cruzi* (cepa RA, estadio tripomastigote) en λ gt11 (Levy-Yeyati y col., 1990).

Amplificación de los fagos:

Para obtener una suspensión de fagos de aproximadamente 10¹⁰ ufp/ml, se infectaron 200 μ l de bacterias *E. coli* Y1090 preparadas como se detalla más adelante (2.18.1) con 10 μ l de fagos (aprox. 10⁸ ufp/ml). Luego de 20 min a 37°C se mezclaron con 3 ml de top-agarosa (previamente fundida y mantenida a 50°C) y se sembraron en una placa de Petri (96 mm) de LB-agar-amp. Esta se colocó a 42°C. Al cabo de 4 h se observó el crecimiento a confluencia de los fagos. Se agregaron 5 ml de SM por placa y se incubó

durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se pasó la suspensión de fagos a un tubo resistente al cloroformo. Los fagos remanentes se colectaron en 2 ml más de SM y se mezclaron con la preparación anterior. Se agregó cloroformo (3% final) y se dejó agitando suavemente durante 15 min a temperatura ambiente. Las bacterias no infectadas y los restos celulares se separaron por centrifugación a 3000g x 10 min a 4°C. Se colectó el sobrenadante, se agregó cloroformo (0,3% final) y se mantuvo a 4°C.

2.3) SUEROS:

2.3.1) Sueros de pacientes chagásicos:

En el presente trabajo se utilizaron 50 sueros de pacientes chagásicos. En todos ellos el diagnóstico inicial de la infección por *T. cruzi* se realizó por los ensayos de fijación de complemento, hemoaglutinación pasiva e inmunofluorescencia indirecta. Un suero se consideró chagásico cuando fue positivo por lo menos para dos de dichos ensayos.

Los pacientes fueron evaluados clínicamente en el Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía. Este estudio consistió en electrocardiograma en reposo, teleradiografía de toráx, ecocardiograma bidimensional y ventriculograma en reposo con tecnecio 99m. En 14 pacientes se efectuó, además, un estudio hemodinámico que incluyó cinecoronariografía y biopsia endomiocárdica del ventrículo derecho.

Durante el transcurso de este período examinatorio se extrajo sangre a la mayoría de los pacientes. El volumen promedio de una extracción fue de 20 ml. La sangre se colectó en tubos plásticos (Falcon 50 ml). Luego de varias horas a temperatura ambiente se centrifugó a 1.500g x 10 min. Los sueros se fraccionaron en tubos

ependorf y se guardaron a -20°C . En un número reducido de casos los sueros fueron obtenidos en el Hospital Ramos Mejía y se recibieron alicuotados y congelados.

Sueros empleados en el análisis de la correlación entre los datos serológicos y el cuadro clínico de los pacientes:

Para determinar la posible asociación entre los datos serológicos y las diferentes formas clínicas de la enfermedad, los pacientes fueron clasificados en tres grupos (ver tabla I, Ap. I). Fueron excluidos de este estudio los individuos mayores de 60 años que presentaron compromiso cardíaco y los pacientes para los cuales no se logró completar todas las pruebas mencionadas anteriormente. Los grupos se establecieron sobre la base de la fracción de eyección en reposo y la presencia o ausencia de anomalías de la motilidad parietal (hipoquinesia global o segmentaria, disquinesia regional o aquinesia). Para una mejor definición de los grupos II y III fue necesario utilizar, además, criterios electrocardiográficos.

Grupo I: CARDIOMIOPATIA CRONICA CHAGASICA SEVERA O AVANZADA
(14 pacientes):

Fracción de eyección menor de 0.40 con anomalías definidas de la motilidad parietal y/o aneurisma apical.

Grupo II: CARDIOMIOPATIA CRONICA CHAGASICA LEVE A MODERADA
O CON COMPROMISO PREDOMINANTE DEL SISTEMA DE CONDUCCION (6 pacientes):

Fracción de eyección mayor de 0.40, ausencia de anomalías definidas de la motilidad parietal y presencia de cualquiera de los siguientes hallazgos:

1. Cualquier forma de bloqueo intraventricular avanzado
2. Bloqueo auriculoventricular de 2º o 3º grado
3. Disfunción del nódulo sinusal
4. Extrasistolia ventricular multiforme y/o con formas repetitivas

Grupo III: CARDIOMIOPATIA CRONICA CHAGASICA PRECLINICA
(7 pacientes):

Fracción de eyección mayor de 0.50, ausencia de anomalías definidas de la motilidad parietal y electrocardiograma normal

Los sueros fueron analizados en nuestro laboratorio sin que ninguno de los miembros del mismo conociera los grupos clínicos a los que pertenecían los pacientes. La identidad de los sueros fue revelada en reuniones conjuntas con los Dres. P. Chiaie y D. Shejtman, del Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía.

2.3.2) Otros sueros humanos:

Los sueros de individuos africanos infectados con *Plasmodium falciparum* (20 pacientes), *Trypanosoma brucei* (20 pacientes) y *Leishmania sp* (24 pacientes) fueron obtenidos por el Dr. P. Druilhe (Unité de Parasitologie BioMedicale, Institut Pasteur, París).

Los sueros de 34 pacientes franceses y 17 pacientes argentinos con lupus eritematoso sistémico fueron evaluados y cedidos para este estudio por los Dres. G. Dighiero (Unité d'Immunohematologie et Immunopathologie, Institut Pasteur, Paris) y A.M. Di Lonardo (Unidad de Inmunología del Hospital Durand, Buenos Aires), respectivamente.

Los sueros de 7 individuos con cardiopatía no chagásica fueron obtenidos de pacientes del Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires.

Los sueros de individuos sanos argentinos (n=11), franceses (n=15) y africanos (n=9), cedidos por el Dr. P. Chiale (Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires), el Dr. G. Dighiero (Unité d'Immuno-hématologie et Immunopathologie, Institut Pasteur, Paris) y el Dr. P. Druilhe (Unité de Parasitologie Bio-Medicale, Institut Pasteur, Paris), respectivamente, fueron empleados como controles en los diferentes ensayos serológicos.

2.3.3) Obtención del suero policlonal anti-JL5 en conejo:

La inmunización de un conejo con la proteína recombinante JL5 fue realizada por Pascale Liégeard en el laboratorio de la Dra. Mireille H. Joskowicz (Unité d'Immunoparasitologie, Institut Pasteur, Paris).

El inserto correspondiente al clon JL5 se subclonó en el vector de expresión pRIT5 y la proteína de fusión (proteína A-JL5) se purificó por cromatografía de afinidad empleando columnas de IgG-sefarosa (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. El conejo se hiperinmunizó intradérmicamente con 200 µg de proteína recombinante por vez. En el mismo laboratorio se obtuvo el suero de un conejo hiperinmunizado con extracto total de *T. cruzi* (tripomastigotes, cepa CL).

2.4) PREPARACION DE EXTRACTOS TOTALES DE *T. cruzi*:

2.4.1) Antígeno total de tripomastigotes:

El extracto total de tripomastigotes se preparó como fue descrito por Hontebeyrie-Joskowicz y col. (1987). Los tripomastigotes (cepa CL) se obtuvieron luego de la infección de monocapas de células Vero crecidas en medio Dulbecco suplementado con 5% de suero fetal bovino (Flow Laboratories, Rockville, MD, USA). Los parásitos liberados se cosecharon por centrifugación a 500g x 5 min a 4°C, se lavaron tres veces en medio Dulbecco (sin suero) y finalmente se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Flow Laboratories, Rockville, MD, USA), de modo de obtener una suspensión de 10⁷ tripomastigotes/ml. Luego de tres ciclos de congelamiento-descongelamiento (nitrógeno líquido-agua corriente), se determinó la concentración proteica del extracto por el método de Bradford (Bradford, 1976), se alicuotó y conservó a -70°C.

2.4.2) Antígeno total de epimastigotes:

Los epimastigotes (cepa Tulahuen 2) fueron obtenidos y gentilmente cedidos para el presente estudio por la Dra. Berta F. de Cazzulo. Los parásitos se cosecharon por centrifugación a 500g x 5 min a 4°C, se lavaron 3 veces en PBS y se resuspendieron en 5 volúmenes de tampón de lisis (PBS conteniendo 1 mM EDTA, 5 mM mercaptoetanol, 0,1% SDS y 1/100 vol. de mezcla antiproteolítica). Luego de 15 min en hielo, la lisis se completó utilizando un homogeneizador Dounce. La concentración proteica del extracto se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951), se alicuotó y conservó a -70°C.

2.5) PREPARACION DE EXTRACTOS TOTALES DE DIFERENTES TEJIDOS DE MAMIFERO:

2.5.1) A partir de células HeLa (extracto nuclear):

Las células se cultivaron y cosecharon como se describe más adelante (2.6.1). Luego de 3 lavados en PBS, las células se resuspendieron en 5 vol. de tampón hipotónico (10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH: 7,8) y se lisaron utilizando un homogeneizador Dounce. Los núcleos se separaron por centrifugación a 800g x 10 min a 4°C y se homogeneizaron en 3 vol. de tampón hipertónico (0,4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH: 7,8). La concentración proteica del extracto se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y se conservó, alicuotado, a -70°C.

2.5.2) A partir de otros tejidos:

Los tejidos humanos (músculo esquelético y miocardio) fueron obtenidos de biopsias realizadas en el Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires. Los tejidos de perro (miocardio, endocardio, fibras de Purkinje y bazo) fueron preparados por el Dr. Jorge Davidenco (Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires). Los tejidos de ratón (miocardio, cerebro, bazo y músculo) se extrajeron de ratones BALB/c. En todos los casos, la porción de órgano se trozó con tijera y se homogeneizó en 10 vol. de tampón de lisis (0,4 mM NaCl, 5 mM mercaptoetanol, 0,1% SDS, 1/100 vol. de mezcla antiproteolítica, 10 mM Tris-HCl pH: 8,0), con un homogeneizador Dounce. Luego de 15 min en hielo, se centrifugó a 12.000g x 30 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La concentración proteica del extracto se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y se conservó, fraccionado, a -70°C.

2.6) PREPARACION DE RIBOSOMAS:

2.6.1) A partir de células HeLa:

Se siguió básicamente el método descrito por Elkon y col. (1986). Las células HeLa se obtuvieron a partir de 50 placas (96 mm) de cultivo, crecidas a confluencia en medio Dulbecco suplementado con 5% de suero fetal bovino (Flow Laboratories, Rockville, MD, USA), 2 mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO, USA), 100 µg/ml de penicilina (Sigma, St. Louis, MO, USA) y 100 µg/ml de estreptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA). Luego de descartar el medio de cultivo y lavar con PBS, las células se suspendieron en 2 ml de PBS por placa con ayuda de un rastrillo de goma. Se cosecharon por centrifugación a 500g x 10 min a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS y se lisaron en 20 ml de tampón L (5 mM MgCl₂, 25 mM acetato de potasio, 1 mM DTT, 250 mM sacarosa, 1% Triton-X100, 20 mM Tris-HCl pH: 7.4), con un homogeneizador Dounce. El homogenato se centrifugó a 12.000g x 30 min a 4°C y los ribosomas se obtuvieron por centrifugación del sobrenadante a 105.000g x 2 h a 4°C (rotor Ti 50). Se lavaron en TMK (1 mM MgCl₂, 100 mM acetato de potasio, 10 mM Tris-HCl pH: 7,4) y finalmente se resuspendieron en 600 µl del mismo tampón.

2.6.2) A partir de parásitos:

Los ribosomas de *T. cruzi* se prepararon a partir de 1 g de epimastigotes, cepa Tulahuen 2 (ver 2.4.2). Se siguió el protocolo empleado para la preparación de ribosomas a partir de células HeLa, excepto que los parásitos se lisaron por 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento (nitrógeno líquido-agua corriente). Los ribosomas, resuspendidos en 1 ml de TMK, se purificaron por centrifugación sobre capas de 1,5 y 2M de sacarosa en TMK a 105.000g x 2 h a 4°C (rotor Ti 50). Finalmente se lavaron en TMK y se resuspendieron en 600 µl del mismo tampón. De la misma manera se aislaron los ribosomas de *Leishmania major* (promastigotes).

2.7) INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA SOBRE CELULAS HEp2 Y TRIPOMASTIGOTES:

2.7.1) Inmunofluorescencia sobre células HEp2:

Para la detección de autoanticuerpos por inmunofluorescencia sobre células humanas se utilizó el protocolo y los sueros controlados empleados en el Servicio de Inmunología del Hospital de Clínicas, Buenos Aires, para el diagnóstico de rutina de enfermedades autoinmunes.

Los portaobjetos se incubaron durante 24 h a 37°C en una caja de Petri plástica (150 mm) conteniendo 20 ml de un cultivo líquido de células HEp2 (línea de células epiteliales humanas) crecidas en medio 199 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Luego de la adhesión, las células se fijaron en acetona por 10 min. Los diferentes sueros, diluidos en PBS-TW (1:40), se depositaron en alícuotas de 20 µl en orificios previamente delimitados con esmalte para uñas. Los portaobjetos se colocaron dentro de una caja plástica junto con un algodón embebido en agua (cámara húmeda) y se dejaron a 37°C durante 45 min. Luego de lavar 2 veces en PBS-TW, se sembraron 20 µl del segundo anticuerpo (anti-IgG humana marcado con fluoresceína (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluido 1:200 en PBS-TW y se incubó a 37°C en cámara húmeda por 30 min más. Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando 2 veces con PBS-TW. Antes de observar al microscopio, se secó el portaobjeto tocando con un pañuelo de papel entre los orificios, se agregaron 2 gotas de PBS conteniendo 30% de glicerol y se colocó el cubreobjeto.

2.7.2) Inmunofluorescencia sobre tripomastigotes:

Se siguió el protocolo empleado en el punto anterior, salvo que en este caso los parásitos (obtenidos como fue descrito en 2.4.1) se diluyeron en PBS (5×10^6 tripomastigotes/ml) y se depositaron en alícuotas de 20 µl en cada orificio. Los diferentes sueros de

conejo y el anticuerpo anti-Ig total de conejo marcado con fluoresceína (Institut Pasteur Production, Institut Pasteur, Paris, France) se utilizaron diluidos 1:40 y 1:500 respectivamente.

2.8) DETECCION DE AUTOANTICUERPOS POR CONTRAINMUNOELECTROFORESIS:

Para la detección de anticuerpos anti-La, anti-RNP, anti-Ro y anti-Sm, se siguió el protocolo descrito por Hudson y Hay (1989). Los antígenos y controles fueron los utilizados en el diagnóstico de rutina para enfermedades autoinmunes que realiza el Servicio de Inmunología del Hospital de Clínicas, Buenos Aires.

La lámina (8 x 10 cm) se cubrió con agarosa (1,5% agarosa en tampón B (0,05 M barbital, pH: 8,2)) y se dejó en cámara húmeda a 4°C durante 2 semanas. Se marcaron los pocillos correspondientes (2 hileras sobre sendos bordes de la lámina), y se colocó en la cuba. Esta se llenó con tampón B y los bordes de la lámina se "conectaron" al tampón con papel de filtro. Sobre la hilera de la derecha (ánodo) se sembraron 10 µl de suero por pocillo (dil. 1:10 en PBS). En el pocillo superior de la hilera de la izquierda (cátodo), se colocó azul de bromofenol como indicador del frente de corrida. Los sueros se precorrieron durante 15 min a 50 V. Luego se sembraron 10 µl de antígeno por pocillo (extractos salinos de timo de ternera y de bazo de perro) en la hilera de la izquierda y se continuó la migración por 45 min más. La lámina se incubó en cámara húmeda a 37°C durante toda la noche. Las proteínas no precipitadas se lavaron primero con 1 M NaCl-0,1% azida sódica y luego con agua destilada. La lámina se secó durante 20 min colocando sobre ésta 3 filtros Whatman 3MM, servilletas de papel y 1 kg de peso. Finalmente se tiñió con Coomassie Blue y destiñió como se indica más adelante (2.9.1).

2.9) ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA:

2.9.1) Electroforesis unidimensional:

La separación de las proteínas en una dimensión se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli (1970) para geles discontinuos conteniendo SDS. Se utilizaron las cubas y accesorios de los sistemas de Bio Rad (Richmond, CA, USA) "mini-Protean II" para geles pequeños de 7x8 cm y "Protean II" para geles grandes de 16x16 cm. Todos los reactivos empleados también fueron de Bio Rad (Richmond, CA, USA).

Para el armado de un gel pequeño, se siguió la siguiente tabla (para los geles grandes se mantuvieron las proporciones, calculando un volumen final de 30 ml por gel separador y de 15 ml por gel concentrador):

a) Gel separador (0,375 M Tris, pH: 8,8):

Solución madre	Concentración final de acrilamida			
	7,5%	10%	12%	15%
30% acril./0,8% bis ⁽¹⁾	2,5 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
1,5 M Tris-HCl pH: 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
H ₂ O	4,9 ml	4,1 ml	3,4 ml	2,4 ml
10% PSA ⁽²⁾	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
total	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

(1) La solución madre se mantuvo en frascos oscuros a 4°C por un mes como máximo.

(2) La solución de persulfato de amonio se preparó en el momento.

b) Gel concentrador (0,125 M Tris, pH: 6,8):

Soluciones madre	Concentración final de acrilamida 4%
30% acril./0,8% bis(1)	0,67 ml
0,5 M Tris-HCl pH: 6,8	1,25 ml
10% SDS	50 µl
H ₂ O	3,05 ml
10% PSA(2)	25 µl
TEMED	5 µl
	<hr/>
total	5 ml

Para evitar la inhibición de la polimerización por contacto con el aire y obtener una interfase recta, luego de verter entre los vidrios la mezcla del gel separador, se colocó 1 ml de agua. Ocurrida la polimerización (20 min a temperatura ambiente), se volcó el agua y se completó el armado con la mezcla corespondiente al gel concentrador y el peine elegido.

Las muestras a analizar se colocaron en tubos eppendorf, se completaron con 1 vol. de tampón de siembra (0,02% azul de bromofenol, 4% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 20% glicerol, en TBS) y se calentaron a ebullición durante 3 min.

Como tampón de corrida se utilizó una solución 0,1% SDS, 192 mM glicina, 25 mM Tris, pH: 8,3. Las condiciones de migración fueron: 20 mA (cc) por gel pequeño (aprox. 45 min a temperatura ambiente) o 35 mA (cc) por gel grande (aprox. 3 h con refrigeración).

(1) La solución madre se mantuvo en frascos oscuros a 4°C por un mes como máximo.

(2) La solución de persulfato de amonio se preparó en el momento.

Armado de geles en gradiente:

Para analizar la reactividad de los sueros con diferentes extractos totales, se emplearon geles grandes en gradiente. En éstos, la concentración de acrilamida varía en forma continua y lineal desde la base (15%) hasta el borde superior (7,5%) del gel separador, obteniéndose una mayor resolución de las bandas de alto y bajo peso molecular. Se utilizó la cámara y accesorios del sistema de Bio Rad (Richmond, CA, USA) "Protean II Multi-gel Casting Chamber", que permite el armado de hasta 10 geles a la vez, y una bomba peristáltica para la generación del gradiente.

Se colocaron en la cámara los vidrios y espaciadores usando membranas de policarbonato entre los geles para facilitar la separación de los mismos luego de la polimerización. El volumen total de la cámara se midió con agua hasta la altura deseada para el gel separador y se prepararon, por separado 1/2 del vol. de las mezclas correspondientes a 7,5 y 15% de acrilamida sin el agregado de PSA ni TEMED. Ambas mezclas se colocaron en hielo para disminuir la velocidad de polimerización, y la de 7,5% se dispuso sobre un agitador magnético para homogeneizar suavemente la solución. Las cánulas de la bomba paristáltica se dispusieron de modo que la preparación de 15% goteara en la de 7,5%, generando el gradiente, y que de la mezcla de 7,5% partieran dos cánulas hacia el orificio de entrada de la cámara, en la base de la misma. Una vez preparado el sistema, se agregaron las cantidades correspondientes de PSA y TEMED, se encendió la bomba y la cámara se fue llenando de abajo hacia arriba hasta completar el volumen esperado. Inmediatamente se colocó 1 ml de agua sobre cada gel y se dejó polimerizar a temperatura ambiente. Los geles se conservaron dentro de la cámara a 4°C durante dos semanas como máximo y se fueron retirando a medida que se necesitaron. El armado de cada gel se completó con el agregado del gel concentrador y el peine elegido.

Tinción de los geles con Coomassie-blue:

Para observar el perfil proteico de las muestras luego de la migración, se incubó el gel en la solución de tinción (0,05% Coomassie Brilliant blue R (Sigma, St. Louis, MO, USA), 45% metanol, 10% ácido acético) durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación suave y se destiñó incubando de la misma manera en una solución 45% metanol, 10% ácido acético, hasta la visualización de las bandas. Para conservarlo, el gel se colocó sobre un papel de filtro Whatman 3MM, se cubrió con una lámina de celofán y se secó utilizando un secador de geles a 80°C durante 1 h.

Patrones de peso molecular:

Se utilizaron marcadores de peso molecular preteñidos, abarcando dos rangos diferentes:

- a) 27.000-180.000 (Prestained kit protein Molecular Weight, (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- b) 2.400-46.000 (Rainbow coloured protein Molecular Weight markers, Amersham, Buckinghamshire, England).

Se prepararon según la indicación de los fabricantes, y se emplearon 5 µl/calle en los geles pequeños y 10 µl/calle en los geles grandes.

2.9.2) Electroforesis bidimensional:

La electroforesis bidimensional se realizó siguiendo el protocolo descrito por O'Farrel (1975). Se utilizaron la cuba y los accesorios del sistema "Mini-Protean II 2D Cell" de Bio Rad (Richmond, CA, USA).

2.9.2.1) Primera dimensión:

Los geles para la primera dimensión se prepararon en tubos capilares de 1mm de diámetro. Se llenaron 10 capilares a la vez, colocándolos en un tubo más grande y vertiendo dentro de éste 5 ml de la siguiente mezcla:

9,2 M urea

4% acrilamida (monómero total)

0,1% NP-40

2% anfolitos 5-7 (Pharmalyte, Pharmacia, Uppsala, Sweden)

3% anfolitos 3-10 (Pharmalyte, Pharmacia, Uppsala, Sweden)

0,01% PSA

0,1% TEMED

Ocurrida la polimerización, se dispusieron los tubos en la cuba y se equilibraron durante 15 min con 5 μ l de tampón S₁ (9,5 M urea, 2% NP40, 5% β -mercaptoetanol, 1,6% anfolitos 5-7, 0,4% anfolitos 3-10)⁽¹⁾. La cuba se completó con los tampones de corrida (C₁: 20 mM NaOH, superior y C₂: 100 mM H₃PO₄, inferior), previamente des-gaseados durante 30 min.

La pre-corrida se realizó aumentando progresivamente el voltaje: 10 min a 200 V, 15 min a 300 V y 15 min a 400 V constantes. Las muestras se sembraron luego de retirar los tampones empleados en la pre-corrida y completar los tubos y la parte superior de la cuba con tampón C₁. Estas se prepararon mezclándolas con 1 vol. de tampón S₁ y dejándolas 15 min a temperatura ambiente. Cada tubo se completó con 20 μ l de tampón S₂ (9 M urea, 0,02% azul de bromofenol, 0,8% anfolitos 5-7, 0,2% anfolitos 3-10). La migración se llevó a cabo a 500 V (los primeros 10 min) y a 750 V constantes durante 4 h.

(1) Para las diferentes siembras se utilizó una jeringa Hamilton.

Se emplearon marcadores de pI (IEF mix, Sigma, St. Louis, MO, USA) abarcando un rango de 3,6-9,3. Estos se visualizaron por tinción con Coomasie-blue (ver 2.9.1).

2.9.2.2) Segunda dimensión:

Para la segunda dimensión se prepararon geles de la misma manera como fue descrito en 2.9.1, colocando un peine preparativo en el gel concentrador. Luego de la primera migración, se retiró el gel de cada tubo y se dispuso inmediatamente sobre el gel concentrador. El tampón y las condiciones de migración fueron exactamente las empleadas en 2.9.1. El frente de corrida se visualizó colocando unas gotas de azul de bromofenol (0,02%) en el tampón de migración.

2.10) ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEINAS A FILTROS DE NITROCELULO-SA:

Las condiciones de transferencia fueron básicamente las descritas por Towbin y col. (1979). Se utilizaron los sistemas de Bio Rad (Richmond, CA, USA) "Mini-Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell" para geles pequeños y "Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell" para geles grandes.

Previamente al armado del aparato de transferencia, se recortaron dos papeles Whatman 3MM y un filtro de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham, Buckinghamshire, England) del tamaño del gel y junto con las esponjas se dejaron sumergidos en tampón T (192 mM glicina, 25 mM Tris, 20% metanol, pH: 8,3). Luego de la electroforesis, se separó una de las placas de vidrio, se retiró el gel con-

centrador(1) y se levantó el gel separador apoyando sobre el mismo uno de los papeles Whatman 3MM. El dispositivo de transferencia se armó dentro de otro recipiente conteniendo tampón T. Sobre la placa plástica "negativa" se colocó una esponja y el papel Whatman 3MM con el gel hacia arriba. Se lo cubrió con la nitrocelulosa y se completó el armado con el papel Whatman 3MM restante, la otra esponja y la placa plástica "positiva". Se ajustaron ambas placas entre sí y el dispositivo completo se colocó dentro de la cuba conteniendo tampón T, previamente enfriado a 4°C.

En el caso del sistema para geles pequeños, la transferencia se llevó a cabo a 150 mA cc, a temperatura ambiente, durante 1 h, y para geles grandes, a 35 V constantes, a 4°C, durante 12-16 h.

Finalizada la transferencia y verificada a través de los marcadores preteñidos, se retiró la nitrocelulosa (tomando la precaución de marcar los límites del gel y el orden de las calles) y se la sumergió directamente en solución de bloqueo (ver 2.11). Cuando no se utilizaron los filtros inmediatamente, se los conservó entre dos papeles Whatman 3MM a -20°C, incluso durante varios meses.

2.11) DETECCION DE PROTEINAS CON ANTICUERPOS:

Las proteínas transferidas a nitrocelulosa se detectaron, en todos los casos, siguiendo las indicaciones de los fabricantes del kit Vecta Stain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

(1) Debido a su baja concentración de acrilamida, el gel concentrador suele quedar adherido a la nitrocelulosa luego de la transferencia. Antes de retirarlo, se marcaron los límites de las calles haciendo pequeños cortes en el borde superior del gel separador.

Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la nitrocelulosa, el filtro se colocó en solución de bloqueo (SB: 2% glicina, 4% leche descremada (Molico), en TBS), durante 20 min como mínimo⁽¹⁾. Se retiró la solución anterior y se incubó por 2 h con el suero, previamente diluido en SB-TW (SB conteniendo 0,05% de Tween 20). Los anticuerpos no unidos se eliminaron con 3 lavados de 5 min en TBS-TW. Se agregó el segundo anticuerpo (anti-IgG humana total, biotinilado, preparado en cabra (kit ABC Vecta Stain, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA.)), diluido 1:200 en SB-TW y se incubó por 45 min. Luego de 3 lavados de 5 min en TBS-TW, se colocó el complejo avidina-biotina-peroxidasa, (preparado 30 min antes como sugieren los fabricantes: 2 gotas de A (avidina DH) + 2 gotas de B (peroxidasa biotinilada) en 10 ml de TBS) y se incubó por 45 min más. El exceso de complejo se eliminó con 3 lavados de 3 min en TBS. Para el revelado, se agregaron 15 mg de 4-cloro-1-naftol (Merck, Darmstadt, Germany) disueltos en 5 ml de metanol frío y 8 µl de H₂O₂ 30 % a 20 ml de 50 mM Tris-HCl pH: 6.8. Esta solución se volcó inmediatamente sobre el filtro y se incubó en la oscuridad hasta la aparición de las bandas (5 a 15 min). La reacción se paró lavando el filtro con agua.

Para la detección de proteínas utilizando anticuerpos inmunopurificados (ver 2.17), se siguió el protocolo descrito sin diluir la solución de anticuerpos.

Cuando fue necesario competir la reactividad inespecífica de los sueros contra proteínas de *E. coli* (por ejemplo, en la detección de proteínas de fusión), se agregó a la solución del primer anticuerpo, 20% de lisado de *E. coli* Y1089 lisógena para λgt11 salvaje preparado como se describe más adelante (ver 2.15).

(1) Todas las incubaciones y lavados se efectuaron a temperatura ambiente y con agitación, adaptando los volúmenes de cada reactivo al número y tamaño de los filtros, de modo de mantenerlos siempre cubiertos y sin superponerse entre sí. En los casos en que fue inevitable usar pequeños volúmenes de suero, las incubaciones se realizaron en bolsas plásticas selladas.

En las experiencias de inhibición, los sueros diluidos en SB-TW se preincubaron durante 2 h con filtros de nitrocelulosa de 5 cm² conteniendo el antígeno correspondiente (proteínas de fusión, extracto total de epimastigotes o lisado de *E. coli*, diluidos en TBS). Los filtros se prepararon como se indica más adelante (2.17).

2.12) LISOGENIZACION DE *E. coli* Y1089 CON FAGOS λ gt11:

En el presente trabajo se prepararon bacterias lisógenas para el fago λ gt11 salvaje y los fagos recombinantes λ gt11-JL5, λ gt11-A1 y λ gt11-T31, siguiendo básicamente el protocolo descrito por Huynh y col. (1985).

Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* Y1089 (crecida en LB-agar-amp) en 3 ml de LB-amp conteniendo 0,2% de maltosa y se dejó crecer durante toda la noche a 37°C con agitación. Este cultivo saturado se diluyó 100 veces en 50 ml de LB-amp-10 mM MgSO₄ y se incubó con agitación a 37°C hasta una DO₆₀₀ = 0,25. Se infectaron 100 μ l de bacterias (aprox. 2×10^7 células) con un volumen igual de fagos (10^8 ufp en SM), durante 30 min a 30°C(1). La mezcla se diluyó sucesivamente hasta 1:10⁵ y 100 μ l de esta dilución final se rastrilló sobre una placa de LB-agar-amp. Luego de incubar la placa toda la noche a 30°C, se obtuvieron colonias aisladas cuya lisogenia se ensayó tomando cada una con un escarbadiante y marcando una cruz sobre dos placas de LB-agar-amp (esto se repitió para 25 colonias aisladas), cuidando de reproducir el esquema de siembra en ambas. Una de ellas se incubó a 30°C y la otra a 42°C durante toda la noche. Se consideraron lisógenas aquellas bacterias que crecieron a 30°C y no a 42°C (a esta temperatura se induce el ciclo lítico del fago debido a la inactivación del repre-

(1) La relación fagos/bacterias debe ser aprox. 5/1.

sor cI. La falta de supresión de la mutación Sam100 provoca una acumulación de partículas fágicas dentro de la bacteria, inhibiendo su crecimiento). La frecuencia de lisógenas obtenidas en las diferentes experiencias varió entre 10 y 50%. Para conservarlas, se estriaron separadamente sobre LB-agar-amp y luego de incubarlas toda la noche a 30°C, se las guardó a 4°C. A partir de algunas colonias aisladas se prepararon cultivos saturados (a 30°C) en LB-amp, se mezclaron con glicerol en volúmenes iguales y se mantuvieron a -70°C.

2.13) INDUCCION DE LA EXPRESION DE LAS PROTEINAS DE FUSION:

Para obtener altos niveles de expresión de las proteínas de fusión a partir de bacterias lisógenas, se emplearon las condiciones de incubación propuestas por Hall y col. (1984), en las cuales la replicación del fago se produce por inactivación del represor cI a 42°C y la síntesis de la proteína de fusión se induce por el agregado de IPTG al sistema. Los cambios de temperatura indicados se realizaron utilizando tres agitadores diferentes, calibrados a 30, 37 y 42°C.

Se inocularon 3 ml de LB-amp con 30 µl de bacterias lisógenas (cultivo líquido mantenido en glicerol a -70°C) y se incubó durante toda la noche a 30°C. Este cultivo saturado se diluyó 1:100 en LB amp⁽¹⁾ y se dejó crecer a 30°C hasta una DO₆₀₀ = 0,4. (En estas condiciones, el represor cI del fago permanece activo, manteniendo el estado de lisogenia).

(1) El volumen final del cultivo varió según se indica en los puntos 2.14, 2.15 y 2.16.

La inducción de la replicación del fago se produjo incubando a 42°C durante 30 min. (A esta temperatura el represor cI se inactiva, permitiendo la replicación del fago. Este se acumula en el interior de la célula debido a la incapacidad de la cepa *E. coli* Y1089 de suprimir la mutación Sam100, involucrada en la lisis de la membrana bacteriana).

Luego se agregó IPTG (Sigma, St. Louis, MO, USA) (5 mM IPTG final, a partir de una solución madre 100 mM) y se incubó a 37°C por 2 h más. (El IPTG desplaza al represor del operón lac, permitiendo la transcripción a partir del promotor del gen de la β -galactosidasa y dando como resultado una gran producción de proteína de fusión).

2.14) PREPARACION DE EXTRACTOS TOTALES A PARTIR DE CULTIVOS DE BACTERIAS LISOGENAS:

Para verificar la expresión de las proteínas de fusión se emplearon extractos totales de bacterias lisógenas. Estos se prepararon a partir de 50 ml de cultivos inducidos según 2.13. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 1.500g x 10 min a temperatura ambiente y se resuspendieron directamente en 500 μ l de tampón de siembra (ver 2.9.1).

El contenido proteico de las muestras se analizó (5 μ l/calle) en geles pequeños de 7,5% de poliacrilamida teñidos con Coomassie-blue (ver 2.9.1).

2.15) PREPARACION DE LISADO DE *E. coli* Y1089 LISOGENA PARA λ gt11 SALVAJE:

El lisado de bacterias *E. coli* Y1089 lisógenas para λ gt11 salvaje utilizado para competir la reactividad inespecífica de los sueros, se preparó a partir de 1 l de cultivo inducido según 2.13.

Las bacterias se centrifugaron a 1.500g x 10 min a temperatura ambiente, se resuspendieron en 50 ml de TBS y se lisaron por 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento (nitrógeno líquido-agua corriente). El homogenato final se guardó a -20°C.

2.16) PURIFICACION DE LAS PROTEINAS DE FUSION:

La purificación de las proteínas de fusión se realizó a partir de 250 ml de cultivo inducido según 2.13, siguiendo el protocolo descrito por Hall y col.(1984). Este se basa en la ruptura celular a través de diferentes agentes, la centrifugación diferencial de los cuerpos de inclusión⁽¹⁾, y la solubilización de las proteínas de fusión en 8 M urea.

Las bacterias se concentraron por centrifugación a 1.500g x 10 min a temperatura ambiente, se resuspendieron en 4 ml de TNE (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH: 8,0) y se pasaron a un tubo resistente a nitrógeno líquido. Manteniendo el tubo siempre en hielo, se agregaron 4 ml de TNE conteniendo 50% de sacarosa y luego de 10 min, 8 ml de lisozima (Sigma, St. Louis, MO, USA) 4 mg/ml, preparada en el momento, que se dejó actuar por 15 min más. La lisis se completó con el agregado de 2 ml de EDTA 0.5 M y 2 ml de NP40 10%, seguido de 1 ciclo de congelamiento-descongelamiento (nitrógeno líquido-agua corriente). Para disminuir la viscosidad debida a los ácidos nucleicos, el homogenato se pasó 10 veces por una aguja 21G'. Luego se colocó en un tubo Córrex de 30 ml, se centrifugó a 13.000g x 30 min a 4°C, y el precipitado, conteniendo la proteína de fusión, se resuspendió en 10 ml de 8 M

(1) Generalmente, en *E. coli*, una gran producción de proteínas de alto peso molecular, provoca la agregación de las mismas en gránulos citoplasmáticos denominados "cuerpos de inclusión" (Marston, 1987).

urea. Para eliminar las partículas insolubles, esta suspensión se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y el sobrenadante se guardó, fraccionado, a -20°C .

Cada muestra se analizó (5 μl /calle) en geles pequeños de 7,5% de poliacrilamida, obteniéndose una única banda del peso molecular esperado. Con este protocolo se obtuvieron entre 2 y 5 mg de proteína recombinante por litro de cultivo inducido.

2.17) INMUNOPURIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEINAS DE FUSION:

Los anticuerpos contra las proteínas de fusión fueron inmunoseleccionados a partir de sueros chagásicos siguiendo el método descrito por Hall y col.(1984). Este se basa en la elución ácida de los anticuerpos unidos a las proteínas de fusión previamente inmovilizadas sobre filtros de nitrocelulosa.

La proteína de fusión se inmovilizó sobre nitrocelulosa incubando un filtro de Hybond-C (Amersham, Buckinghamshire, England) de 5 cm^2 con 3 ml de proteína recombinante purificada (ver 2.16), durante 2 h⁽¹⁾. Se lavó 10 min con TBS para eliminar el exceso de proteína, se bloqueó durante 20 min (ver 2.11) y se incubó durante toda la noche a 4°C con 5 ml de suero, diluido 1:10 en solución de bloqueo conteniendo 30% de lisado de *E. coli* Y1089 lisógena para $\lambda\text{gt}11$ salvaje⁽²⁾.

(1) Salvo en los casos en que se indica lo contrario, todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y con agitación.

(2) Para eliminar la reactividad inespecífica de los sueros se empleó, alternativamente y con igual rendimiento, una preincubación durante 1 h de los 5 ml de suero con un filtro de nitrocelulosa conteniendo lisado de *E. coli* Y1089 lisógena para $\lambda\text{gt}11$ salvaje, diluido 1:3 en TBS e inmovilizado como se indicó para las proteínas de fusión.

Los anticuerpos no unidos se removieron con 3 lavados de 10 min en TBS-TW y 2 lavados de 5 min. en 0,15 M NaCl-TW (0,15 M NaCl conteniendo 0,05% de Tween 20). La elución ácida se llevó a cabo incubando el filtro durante 30 min con 5 ml de tampón E (0,2 M glicina, 0,15 M NaCl, 10 µg/ml BSA, 1 mM PMSF (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,05% Tween 20, pH:2,8). El material eluido se pasó a un tubo plástico y, manteniéndolo en hielo, se neutralizó rápidamente con 5 ml de 1 M Tris-HCl pH: 8,0 y 2 ml de solución de bloqueo. Esta preparación de anticuerpos se alicuotó en tubos eppendorf y se guardó a -20°C.

2.18) REACTIVIDAD DE LOS SUEROS CON FAGOS RECOMBINANTES:

Para determinar la reactividad de los sueros contra los diferentes fagos recombinantes se utilizó, básicamente, el método descrito por Mesri (1990).

2.18.1) Preparación de las bacterias para la infección:

Se inocularon 50 ml de LB-amp con una colonia aislada de *E. coli* Y1090 y se dejó crecer durante toda la noche a 37°C con agitación. A partir de este cultivo saturado, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 1.500g x 10 min a 4°C, se resuspendieron en 8 ml de 10 mM MgSO₄ (frío y estéril) y se conservaron a 4°C durante 15 días como máximo.

2.18.2) CreCIMIENTO, inducción de los fagos recombinantes e inmovilización de las proteínas sobre filtros de nitrocelulosa:

Para la formación del césped bacteriano, se mezclaron 500 µl de bacterias con 3 ml de "top"-agarosa (previamente fundida y mantenida a 50°C), se sembraron sobre una placa (96 mm) de LB-agar-amp y se dejaron crecer a 37°C. Luego de 30 min se retiró la caja

y se dejó secar abierta, cerca del mechero, durante 10 min. Se depositaron asimétricamente y en orden, 2 µl de cada preparación de fagos amplificados (aprox. 10^{10} ufp/ml) y luego de dejar secar 10 min, la placa se incubó a 42°C por 40 min (al final de esta etapa puede ya observarse el comienzo de la lisis bacteriana). Por otro lado, se recortó un filtro de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham, Buckinghamshire, England), se lo marcó en un extremo, se lo sumergió en 10 mM IPTG⁽¹⁾, y se lo dejó secar sobre papel Whatman 3MM. El filtro así preparado se apoyó sobre los fagos sembrados (haciendo coincidir, por ej., la marca del filtro con la ubicación del fago salvaje) y se incubó la placa a 37°C (durante esta etapa se produce la inducción de la expresión de la proteína de fusión, que junto con las proteínas bacterianas y del fago quedan inmovilizadas sobre el filtro). Luego de 2 h se retiró el filtro (puede observarse lisis confluyente en los sitios de siembra de los fagos), se colocó directamente en solución de bloqueo y se siguió exactamente el protocolo descrito en 2.11.

2.19) EXPERIENCIAS DE ELISA:

2.19.1) ELISA con péptidos sintéticos:

Los péptidos R18 (AAAAEEEEEDDDMGFGLFD), R13 (EEEDDDMGFGLFD), H13 (EESDDDMGFGLFD), R7 (MGFGLFD) e I6 (EEEDDD) fueron sintetizados por Neosystem, (Strasbourg, France) a partir de la secuencia aminoacídica del extremo C-terminal de JL5 (Levin y col., 1989) y de las proteínas ribosomales P1/P2 humanas (Rich y Steitz, 1987).

(1) En nuestro laboratorio obtuvimos idénticos resultados sin necesidad de embeber el filtro en IPTG. Probablemente el nivel basal de producción de la proteína de fusión resulte suficiente para su detección por este método.

Las experiencias de ELISA empleando el péptido C22 (KKEEKKEESEEE-DEDMGFGLFD), fueron realizadas en el laboratorio de la Dra. Eloisa Bonfa (Servicio de Reumatología, Facultad de Medicina, USP, São Paulo). Este péptido corresponde a la secuencia de los 22 aminoácidos C-terminales de la proteína ribosomal P2 (el12') de *Artemia salina* (Elkon y col., 1986).

2.19.1.1) Reactividad de los diferentes sueros contra los péptidos sintéticos:

A partir de los péptidos recibidos, se prepararon soluciones madre de 10 mg/ml en tampón carbonato (0,1 M carbonato de sodio, pH: 9,6), se alicuotaron cada 20 µl en tubos eppendorf y se conservaron a -70°C.

La cantidad óptima para cubrir cada pocillo se determinó construyendo una curva (DO₄₉₀ vs. µg de péptido) con 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 y 2,0 µg de péptido, obteniéndose una DO₄₉₀ máxima con 1 µg. La placa (CEB, Paris, France) se cubrió con 50 µl/pocillo de una dilución 1:500 de la solución madre en tampón carbonato, se tapó con celofán y se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se volcó el contenido, se lavó 3 veces con PBS-TW utilizando una pisseta y se escurrió golpeando sobre servilletas de papel⁽¹⁾. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la placa, se bloqueó con 200 µl/pocillo de PBS-G durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavar y escurrir la placa como anteriormente, se colocaron 98 µl de PBS-G en cada uno de los pocillos de la 1ª columna y 50 µl en los restantes. Se depositaron 2 µl de suero en cada pocillo de la 1ª columna (dil. 1:50) y empleando una pipeta multicanal (Finnpipette Titertek Multichannel Pipet, Labsystems, Finland), se realizaron diluciones seriadas 1:2 hasta la última columna. No se colocó suero en los pocillos de la última fila

(1) En todo momento se evitó el secado de la placa.

(blancos de la reacción). Luego de 2 h a temperatura ambiente, la placa se lavó y escurrió como anteriormente y se depositaron 50 μ l/pocillo del segundo anticuerpo diluido en PBS-G (1:4.000 en el caso del conjugado anti-IgG humana-peroxidasa y 1:1.000 en el caso del conjugado anti-Ig total de conejo-peroxidasa, Biosys, Paris, France). La placa se dejó a temperatura ambiente por 1 h más, y luego de los lavados correspondientes, las Ig unidas se detectaron colocando 100 μ l/pocillo de una solución 0,5 mg/ml OPD (Sigma, St. Louis, MO, USA) en tampón citrato (50mM citrato de sodio, pH: 5,5) conteniendo 0,5 μ l/ml de H₂O₂ 30 %. Se dejó desarrollar el color (amarillo) manteniendo la placa en la oscuridad y luego de 10 min se paró la reacción agregando 100 μ l/pocillo de 10% SDS. Las DO se midieron a 490 nm en un lector Dynatech MR5000 y se graficaron (DO₄₉₀ vs. dil. de suero) sobre papel semilogarítmico.

Análisis estadístico de los datos:

Para comparar los niveles de anticuerpos anti-R13 y anti-R18 presentados por los diferentes sueros, se eligieron las reactividades correspondientes a la dilución 1:400, debido a que en todos los casos los valores obtenidos a esta dilución se hallaban sobre la porción lineal de la curva. La DO₄₉₀ obtenida para cada suero se dividió por el promedio de las DO₄₉₀ correspondientes a los 4 controles normales colocados en la misma placa (N)⁽¹⁾. Estos valores a su vez se promediaron con los obtenidos en las diferentes experiencias (cada suero se ensayó por lo menos por triplicado en experiencias independientes). Se consideró positivo aquel suero cuyo promedio fue mayor o igual que 3N (es decir cuya reactividad resultó mayor o igual a 3 veces la de los controles normales).

(1) En cada placa se colocaron 4 sueros tomados al azar de una muestra de 35 individuos sanos. Las reactividades dentro de este grupo no variaron significativamente.

La comparación de los niveles de anticuerpos anti-R13 entre los pacientes chagásicos del Grupo I y los de los Grupos II y III tomados en conjunto, se realizó aplicando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (Mann y Whitney, 1947). Se efectuó un análisis similar para comparar los niveles de anticuerpos anti-R13 en los pacientes con y sin miocarditis activa, demostrada por biopsia endomiocárdica. Se utilizó un programa estadístico por computación (Systad, version 2, 1985, Arizona University, USA).

2.19.1.2) Experiencias de inhibición:

Se siguió el protocolo descrito en 2.19.1.1 salvo que los sueros, diluidos 1:100 en PBS-G, se preincubaron durante 2 h a temperatura ambiente con cantidades crecientes de péptido sintético. Como control negativo de la inhibición se utilizó un péptido de 13 aa (AEAALVKMALMKV) correspondiente a una proteína de *Plasmodium falciparum* cedido gentilmente por el Dr. G. Langsley (Unité de Parasitologie Experimental, Institut Pasteur, Paris) y cuya secuencia aminoacídica no presenta ninguna homología con R13 ni R18. Los datos obtenidos se expresaron como porcentajes de inhibición con respecto a la reactividad del mismo suero sin competir y se graficaron sobre papel milimetrado (% de inhibición vs. μg de péptido).

2.19.2) Determinación del título anti-*T. cruzi* total de los diferentes sueros:

Se utilizó como antígeno un extracto total de tripomastigotes (cepa CL) preparado según 2.4.1 y diluido en tampón KK2 (50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH:8,0) de modo de obtener una solución 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Cada pocillo se cubrió con 50 μl (0,25 ng) de esta solución y se siguió exactamente el protocolo descrito en 2.19.1.1.

Se consideraron positivos los sueros cuyas reactividades a lo largo de la porción lineal de la curva fueron mayores o iguales a 3 veces el promedio, para cada dilución, de los 4 controles normales colocados en la misma placa. El título se determinó a partir de cada curva como la inversa de la dilución a la cual se obtuvo el 50% de la DO_{490} máxima. Cada suero se ensayó por triplicado en experimentos independientes y los títulos obtenidos en cada uno se promediaron.

2.19.3) Determinación del perfil isotípico de las respuestas anti-R13 y anti-*T. cruzi* de los diferentes pacientes:

2.19.3.1) Control de la especificidad de los anticuerpos monoclonales empleados:

La especificidad de la reacción de cada anticuerpo monoclonal contra los diferentes isotipos de inmunoglobulinas (IgG) humanas se ensayó utilizando anticuerpos de referencia (IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 humanas), gentilmente cedidos para este estudio por los Dres. Preud'Homme y Aucouturier (URA CNRS, Pointiers, France).

Cada pocillo se cubrió con 200 ng de cada uno de los anticuerpos de referencia diluidos en tampón KK2. Se siguió exactamente el protocolo descrito en 2.19.1.1 empleando como 1º anticuerpo cada uno de los monoclonales anti-isotipo (anti-IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humanas, Oxoid, Hampshire, England), diluidos 1:1.000 en PBS-G. Las inmunoglobulinas unidas se detectaron incubando durante 1 h a temperatura ambiente con 50 µl/pocillo de una dilución 1:500 de conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa (Biosys, Paris, France) seguido del revelado ya descrito.

2.19.3.2) Determinación de la distribución de subclases de los anticuerpos (IgG) anti-R13 y anti-*T. cruzi* en sueros de pacientes chagásicos y lúpicos:

Se siguió exactamente el protocolo descrito en 2.19.1.1, empleando en este caso 2 µg de péptido/pocillo (la cantidad de antígeno de *T. cruzi* fue la misma que en 2.19.2). Luego de la incubación con los sueros humanos, se agregaron 50 µl/pocillo de una dilución 1:1.000 en PBS-G de cada uno de los anticuerpos anti-isotipo y se dejó la placa a temperatura ambiente durante 1 h. Las inmunoglobulinas unidas se detectaron como se indicó en 2.19.3.1.

Análisis de los datos:

Las inmunoglobulinas humanas correspondientes a cada suero fueron más o menos reconocidas por el 3º anticuerpo utilizado para detectar los anticuerpos anti-isotipo. Este nivel basal fue restado de la DO₄₉₀ obtenida para cada isotipo. La reactividad de los sueros (dil. 1:100) para cada subclase se expresó en porcentajes tomando como 100% la suma de las DO₄₉₀ correspondientes a cada uno de los 4 isotipos. Estos porcentajes se promediaron con los obtenidos en una segunda experiencia independiente.

2.19.4) Reactividad de los sueros contra las proteínas de fusión:

2.19.4.1) Reactividad de los sueros contra las proteínas recombinantes JL5, A1 y T31:

Se empleó como antígeno las proteínas de fusión obtenidas en 2.16. La cantidad óptima para cubrir cada pocillo se determinó a través de una curva con 25, 50, 100, 200 y 400 ng de proteína, obteniéndose una DO₄₉₀ máxima con 200 ng. Se siguió el protocolo descrito en 2.19.1.1, salvo que en la 1º columna se depositaron 100 µl de suero previamente diluido 1:500 en PBS-G. Las restantes

diluciones (1:1000 y 1:2000) se obtuvieron por dilución seriada 1:2 utilizando una pipeta multicanal (Finnpipette Titertek Multi-channel Pipet, Labsystems, Finland).

El mayor problema para determinar las mejores condiciones de medición de la reactividad contra las proteínas de fusión, fue la alta actividad inespecífica que presentaron los sueros, tanto de pacientes chagásicos como de controles normales, contra la β -galactosidasa y las pequeñas cantidades de proteínas bacterianas y del fago copurificadas con la proteína de fusión. Se decidió ensayar dos métodos para detectar la reactividad específica de los sueros:

a) Sustracción de las reactividades contra la proteína de fusión y la β -galactosidasa pura:

Cada pocillo se cubrió con 50 μ l de una solución 4 μ g/ml de proteína de fusión (filas impares) o de β -galactosidasa pura (Sigma, St. Louis, MO, USA, filas pares) en tampón carbonato. Se siguió el protocolo descrito y la reactividad específica para cada dilución de suero se determinó restando las DO_{490} obtenidas entre ambos antígenos.

b) Competición de la reactividad inespecífica con un extracto de *E. coli* Y1089 lisógena para λ gt11 salvaje:

La cantidad de extracto necesario para competir la inespecificidad de los sueros se determinó preincubando, durante 2 h a temperatura ambiente, 1 ml de la dilución 1:500 de cada suero con cantidades crecientes del extracto (preparado a partir de un cultivo de *E. coli* Y1089 lisógena para λ gt11 salvaje inducido según 2.14), obteniéndose una inhibición máxima y constante a partir de 0,1 μ g de extracto.

Para comprobar que en estas condiciones la inhibición de la reactividad inespecífica era total, los sueros competidos se ensayaron sobre 200 ng/pocillo de extracto salvaje, observándose una reactividad remanente del 10-20%, dependiendo del suero (ésta se mantuvo aún compitiendo con mayores cantidades de extracto y/o aumentando el tiempo de preincubación). Por lo tanto, se decidió cubrir la placa con 200 ng/pocillo de proteína de fusión (filas impares) y 200 ng/pocillo de extracto salvaje (filas pares), y restar, para cada una de las diluciones de suero competido, las DO₄₉₀ obtenidas entre ambos antígenos. Para comparar los datos obtenidos, se eligió la dilución 1:1000, siguiendo los criterios establecidos en 2.19.1.1.

2.19.4.2) Reactividad de los sueros contra la proteína recombinante P2 humana:

La proteína de fusión λ gt11-proteína ribosomal P2 humana empleada en este ensayo fue cedida por la Dra. Eloisa Bonfá (Servicio de Reumatología, Facultad de Medicina, USP, São Paulo). Se siguió el protocolo descrito en 2.19.4.1, salvo que los sueros se ensayaron diluidos 1:200. Estos se compitieron con 0,1 μ g/ml de extracto de *E. coli* Y1089 lisógena para λ gt11 salvaje.

2.19.5) Detección de autoanticuerpos:

Los niveles de anticuerpos anti-ADN nativo, anti-ADN desnaturalizado, anti-actina, anti-miosina y anti-tubulina, presentes en sueros chagásicos crónicos, se midieron en el laboratorio del Dr. G. Dighiero (Unité d'Immunohemathologie et Immunopathologie, Institut Pasteur, Paris).

La actina, miosina y tubulina fueron purificadas en dicho laboratorio a partir de músculo (actina y miosina) y cerebro (tubulina) de ratones BALB/c (Dighiero y col., 1985). Cada pocillo se cubrió con 1 μ g de cada antígeno diluido en tampón carbonato. El ADN na-

tivo (tipo I, timo de ternera, Sigma, St. Louis, MO, USA) se disolvió en tampón citrato (100 µg/ml) y cada pocillo se cubrió con 100 µl de esta solución. El ADN desnaturalizado se preparó a partir del anterior, calentando a 100°C durante 10 min y enfriando rápidamente en hielo.

La reactividad de los sueros contra estos antígenos se determinó siguiendo el protocolo ya descrito (ver 2.19.1.1). Los sueros se emplearon diluidos 1:200.

3 . RESULTADOS

3.1) REACTIVIDAD DE LOS SUEROS CHAGASICOS CRONICOS CON DIFERENTES TEJIDOS DE MAMIFERO (MODELOS HETEROLOGOS):

Como se mencionó en la introducción, varios trabajos demostraron la existencia de anticuerpos contra tejidos heterólogos en sueros chagásicos crónicos. Con el objetivo de identificar alguno de los antígenos de mamífero reconocidos por dichos sueros, se realizó una primera serie de experiencias empleando extractos totales de corazón de perro y de diferentes tejidos de ratón.

3.1.1) Western blot con tejidos de corazón de perro:

Se ensayó la reactividad de 12 sueros chagásicos crónicos (P1, P3, P4, P5, P8, P9, P10, P11, EC, EG, MQ y WL) contra endocardio, miocardio y fibras de Purkinje de corazón de perro. Sólo 2 sueros (P4 y EC) presentaron un perfil diferente al suero normal empleado como control. Estas bandas adicionales correspondieron a polipéptidos de aprox. 35 kDa de endocardio y miocardio (fig. 1).

3.1.2) Western blot con tejidos de ratón:

Se emplearon extractos totales preparados a partir de corazón, músculo esquelético, cerebro e hígado de ratones BALB/c. Como se observa en la fig. 2, A, además de las bandas reveladas por el suero normal, el suero chagásico WL reconoció varias proteínas en cada uno de los extractos. En particular, la preincubación de este suero con un filtro de nitrocelulosa conteniendo extracto total de epimastigotes de *T. cruzi*, anuló la reacción con el polipéptido de 100 kDa de corazón. Como control negativo de la inhibición, se utilizó un filtro con lisado de *E. coli* (fig. 2, B).

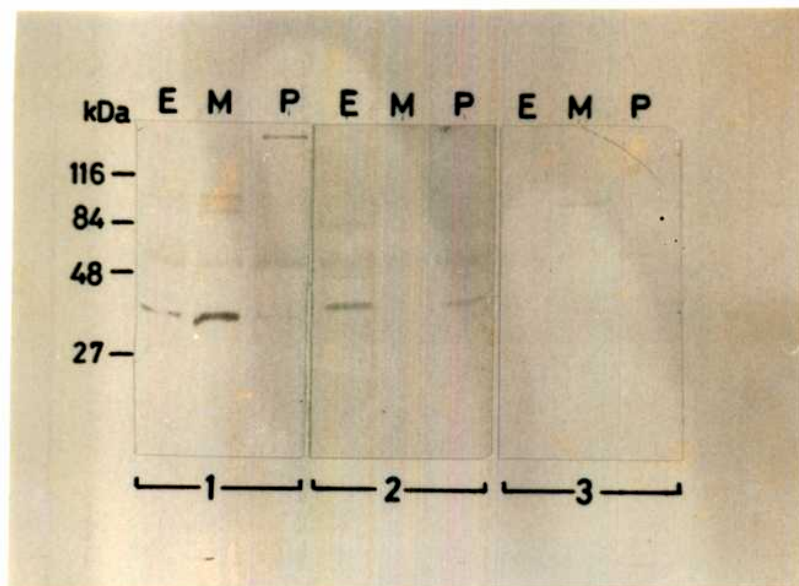


Figura 1:

Reacción de los sueros chagásicos con extractos de corazón de perro. Las muestras (40 $\mu\text{g}/\text{calle}$) se separaron por electroforesis en geles pequeños de poliacrilamida (gradiente 7,5-15%), se transfirieron a nitrocelulosa y se enfrentaron con los sueros chagásicos P4 (1) y EC (2), y con un suero normal (3). Los sueros se emplearon dil. 1:200. E: endocardio, M: miocardio y P: fibras de Purkinje.

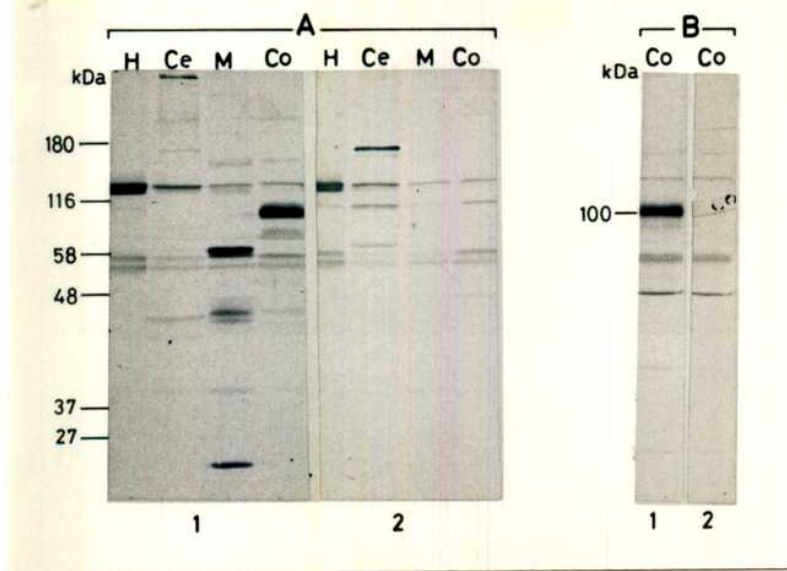


Figura 2:

Reactividad de los sueros chagásicos con diferentes tejidos de ratón, analizada por Western blot. Los extractos proteicos (70 $\mu\text{g}/\text{calle}$) se separaron por electroforesis en geles grandes de poliacrilamida (gradiente 7,5-15%). Los sueros se emplearon dil. 1:200. (A): reacción del suero chagásico WL (1) y de un suero normal (2) con los diferentes tejidos murinos, y (B): reactividad anti-corazón del suero chagásico WL, preincubado con 500 μg de lisado de *E. coli* (1) y con 50 μg de extracto total de epimastigotes (2). H: hígado, C: cerebro, M: músculo esquelético y Co: corazón.

Estas experiencias demostraron la capacidad de los sueros chagásicos crónicos de reaccionar con proteínas de tejidos de perro y de ratón. Sin embargo, la limitación de este enfoque reside en la naturaleza heteróloga del sistema. Si bien algunos sueros chagásicos reaccionaron con estos extractos, también lo hicieron los sueros normales, mostrando una elevada reactividad heteróloga independiente de la infección chagásica. Estos resultados, junto con algunos datos de la literatura sobre el carácter heterófilo de ciertos autoanticuerpos, nos llevaron a trabajar con otros sistemas.

3.2) DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS EN PACIENTES CHAGASICOS CRONICOS POR TECNICAS DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES:

Algunas experiencias realizadas en nuestro laboratorio demostraron la fuerte reactividad de los sueros chagásicos crónicos contra la proteína recombinante JL5. La secuencia de la región C-terminal de este polipéptido presenta una alta homología con la misma región de las proteínas ribosomales P humanas, definida como "epitope P" en lupus eritematoso sistémico. Como los anticuerpos anti-P son marcadores de lupus, se decidió estudiar en sueros de pacientes chagásicos la presencia de otros autoanticuerpos marcadores de enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, los sueros se ensayaron por técnicas empleadas en el diagnóstico de rutina de enfermedades autoinmunes: ELISA para la detección de anticuerpos anti-ADN y anti-proteínas del citoesqueleto, Western blot con diferentes tejidos de mamífero, inmunofluorescencia indirecta sobre células HEp2 y contrainmunolectroforesis para la detección de anticuerpos anti-La, anti-Ro, anti-RNP y anti-Sm.

3.2.1) Detección de autoanticuerpos por ELISA:

La presencia en sueros de pacientes chagásicos crónicos de anticuerpos anti-ADN nativo (ADNn), anti-ADN desnaturalizado (ADNd), anti-actina, anti-miosina y anti-tubulina, se analizó por ELISA, empleando los antígenos y controles utilizados en el diagnóstico de rutina de enfermedades autoinmunes.

En las tablas II y III (Ap. I) se muestran los resultados obtenidos para 33 pacientes chagásicos crónicos y 10 pacientes con enfermedades autoinmunes, respectivamente. Como controles se colocaron en la misma placa 10 sueros de individuos sanos negativos para la reactividad contra estos antígenos. Los sueros de los pacientes LES2 y AR2 se emplearon como controles positivos en la detección de anticuerpos anti-ADN y anti-proteínas del citoesqueleto respectivamente (ver tabla III, Ap. I). El 36,4% de los sueros fue positivo para la reacción contra ADNn, el 30,3% contra ADNd, el 63,6% contra actina, el 33,3% contra miosina y el 66,7% contra tubulina (fig. 3).

La correlación entre los niveles de autoanticuerpos obtenidos y los títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* para cada paciente fue nula: $r = -0,18$ para ADNn; $r = -0,16$ para ADNd; $r = -0,05$ para actina; $r = -0,20$ para miosina y $r = +0,15$ para tubulina.

Con respecto a la asociación entre los datos serológicos y las diferentes formas de la enfermedad, los niveles de autoanticuerpos presentados por los pacientes con cardiopatía severa (grupo I) fueron semejantes a los obtenidos por los pacientes con cardiopatía moderada (grupo II) y preclínica (grupo III) tomados en conjunto. Por otra parte, los niveles de autoanticuerpos detectados en pacientes con o sin miocarditis fueron similares (tabla IV, Ap. I).

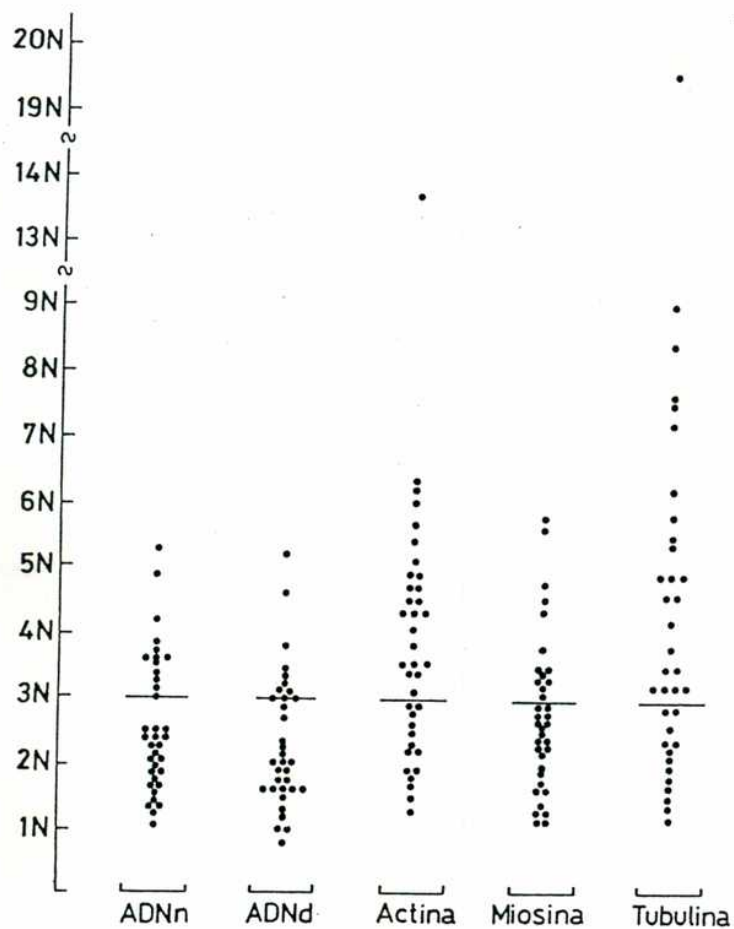


Figura 3:

Reactividades anti-ADN, anti-actina, anti-miosina y anti-tubulina de 33 sueros chagásicos crónicos, medidas por ELISA. Los sueros se ensayaron dil. 1:200 y los datos obtenidos se expresaron como n veces la DO490 promedio de 10 controles sanos (N). Se consideraron positivos los valores mayores o iguales a 3N (líneas horizontales).

3.2.2) Detección de autoanticuerpos por Western Blot:

Empleando la técnica de Western Blot se estudió la reactividad de los sueros de pacientes chagásicos crónicos contra diferentes extractos (músculo esquelético y miocardio humano, células HeLa, bazo de perro y timo de ternera), preparados según se indicó en 2.5. Para abarcar el mayor rango posible de proteínas analizadas, se utilizaron geles grandes en gradiente (7,5-15% de poliacrilamida).

De los sueros estudiados, el 64% (9/14) reaccionó con músculo esquelético humano, el 30% (3/10) con timo de ternera, el 71% (10/14) con células HeLa (extracto nuclear), el 62% (8/13) con bazo de perro y el 49% (6/14) lo hizo con miocardio humano (tabla V, Ap. I). En promedio, los sueros positivos reconocieron 1-2 bandas en cada extracto. Los sueros de 5 individuos sanos utilizados como control no presentaron reactividad con dichas preparaciones. Las fig. 4, 5 y 6 muestran los perfiles obtenidos para 4 sueros chagásicos crónicos con las diferentes preparaciones, incluyendo un extracto total de *T. cruzi*. El suero lúpico utilizado como control reveló la presencia de la proteína La (uno de los autoantígenos descritos para lupus eritematoso sistémico) en los extractos de células HeLa, de timo de ternera y de bazo de perro (43-50 Kd).

Como puede observarse, el patrón de bandas obtenido fue diferente para cada uno de los sueros empleados y ninguno presentó reactividad con proteínas de peso molecular semejante a las detectadas por los pacientes con lupus (La: 43-50 kDa; Ro: 57 kDa; RNP: 68 kDa; P: 38 y 16-18 kDa y Sm: 25-26 y 18-19 kDa). Lo mismo se observó cuando se ensayaron los sueros chagásicos restantes.



Figura 4:

Reacción de los sueros chagásicos con proteínas de *T. cruzi* y de células HeLa, analizada por Western blot. Los extractos proteicos (70 μ g/calle) se separaron por electroforesis en geles grandes de poliacrilamida (gradiente 7,5-15%). (a): reacción de los sueros (1:500) con proteínas totales de epimastigotes y (b): reacción de los sueros (1:200) con un extracto nuclear de células HeLa. Las calles 1-4 corresponden a los sueros chagásicos MQ, P5, P4 y P11, respectivamente, y la calle 5, a un suero lúpico anti-La+. m: marcadores de PM.

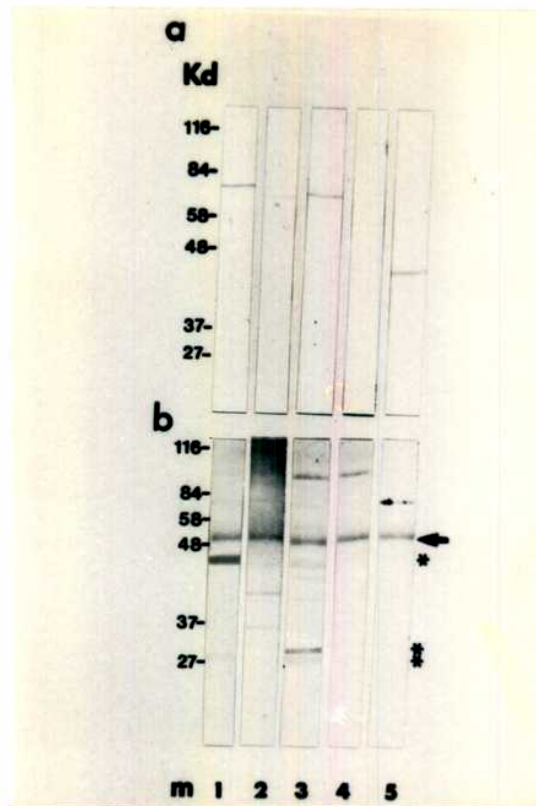


Figura 5:

Reactividad de los sueros chagásicos con extractos totales de timo de ternera (a) y de músculo esquelético humano (b), analizada por Western blot. Los extractos (70 $\mu\text{g}/\text{calle}$) se separaron por electroforesis en geles grandes de poliacrilamida (gradiente 7,5-15%). Los sueros se ensayaron dil. 1:200. Las calles 1-4 corresponden a los sueros chagásicos MQ, P5, P4 y P11, respectivamente, y la calle 5, a un suero lúpico anti-La+. m: marcadores de PM; (*): bandas diferentes a las detectadas por los sueros normales. La flecha (50 kDa) indica la posición de la cadena pesada de las IgG humanas, revelada por el segundo anticuerpo.

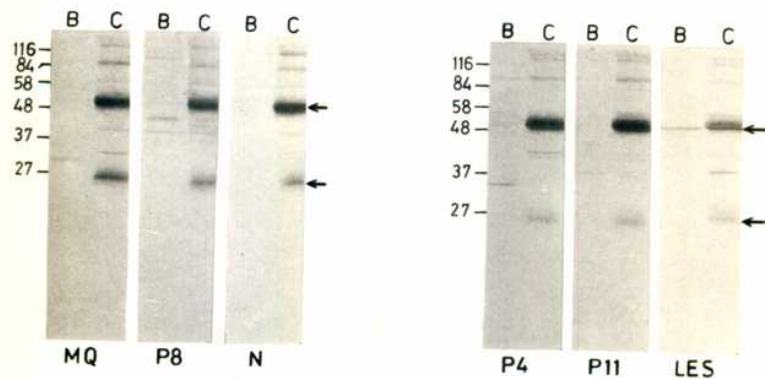


Figura 6:

Reacción de los sueros chagásicos con proteínas de bazo de perro y corazón humano, analizada por Western blot. Los extractos proteicos (70 $\mu\text{g}/\text{calle}$) se separaron por electroforesis en geles grandes de poliacrilamida (gradiente 7,5-15%). Los sueros se ensayaron dil. 1:200 (MQ, P8, P4 y P11 corresponden a sueros chagásicos; LES, a un suero anti-La+ y N a un suero normal). B: bazo de perro y C: corazón humano. m: marcadores de PM. Las flechas (25 y 50 kDa) indican la posición de las cadenas liviana y pesada de las IgG humanas, revelada por el segundo anticuerpo.

3.2.3) Detección de autoanticuerpos por contrainmunolectroforesis e inmunofluorescencia indirecta:

Se analizó la presencia de anticuerpos anti-La, anti-Ro, anti-Sm y anti-RNP por contrainmunolectroforesis en 33 sueros chagásicos crónicos. Se emplearon como fuente de antígeno extractos de timo de ternera y bazo de perro. Los antígenos y controles fueron los utilizados en el diagnóstico de rutina para enfermedades autoinmunes.

Ningún suero chagásico estudiado presentó líneas de precipitación comparables a las obtenidas para los controles positivos.

Igual resultado se obtuvo cuando los mismos sueros se ensayaron por inmunofluorescencia indirecta utilizando células HEp2 como sustrato. Ningún suero chagásico presentó patrones de fluorescencia característicos de las enfermedades autoinmunes, aunque algunos de ellos reaccionaron en forma muy débil, probablemente con proteínas del citoesqueleto, mostrando un patrón de tipo fibrilar.

En la tabla VI (Ap. I) se muestran los resultados obtenidos en ambas experiencias para 8 sueros lúpicos empleados como controles.

Analizados en conjunto, estos resultados muestran la existencia de autoanticuerpos en la enfermedad de Chagas crónica, detectables por las técnicas de Western blot y ELISA. Las especificidades de estos anticuerpos son claramente diferentes a las descritas en lupus y otras enfermedades autoinmunes. Sorprendentemente, cuando los sueros chagásicos se enfrentaron con diferentes tejidos de mamífero y células HEp2, ninguno de ellos mostró el perfil de reacción esperado para un suero anti-P+. Debido a la falta de correlación entre estos resultados y los altos niveles de anti-

cuerpos anti-JL5 presentados por dichos sueros, se decidió investigar en profundidad: 1) la identidad de JL5 como parte de una proteína ribosomal P de *T. cruzi*, 2) la capacidad de los sueros chagásicos de reaccionar con proteínas ribosomales P humanas y 3) la respuesta humoral anti-JL5 en los pacientes chagásicos y en particular, la respuesta humoral contra el extremo C-terminal de esta proteína recombinante.

3.3) IDENTIFICACION DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P DE *T. cruzi* EMPLEANDO ANTICUERPOS HUMANOS

Para probar que efectivamente el clon JL5 codificaba para una proteína ribosomal P del parásito, se ensayó por Western Blot la reactividad de diferentes preparaciones de anticuerpos y sueros contra ribosomas aislados de *T. cruzi*.

La fig. 7, A muestra la reacción de 4 sueros chagásicos crónicos con un gran número de proteínas ribosomales del parásito. Sin embargo, los anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados a partir de los mismos sueros reconocieron sólo 3 ó 4 polipéptidos, correspondientes a 38, 19, 15 y 14 kDa. (fig. 7, B). Los anticuerpos anti-JL5 no reaccionaron con las restantes fracciones celulares obtenidas durante la preparación de ribosomas (pellet post-mitochondrial y sobrenadante post-ribosomal).

La identidad de las bandas detectadas por los anticuerpos anti-JL5 se confirmó por comparación con las bandas reveladas por un suero lúpico anti-P +, marcador de proteínas ribosomales P. Este reaccionó con las proteínas de bajo peso molecular, 19, 14 y 15 kDa, reveladas también por los anticuerpos anti-JL5 (fig. 7, C, calle 2). El control positivo de esta experiencia fue la reacción de este suero lúpico con las proteínas ribosomales P humanas (fig. 7, C, calle 1).

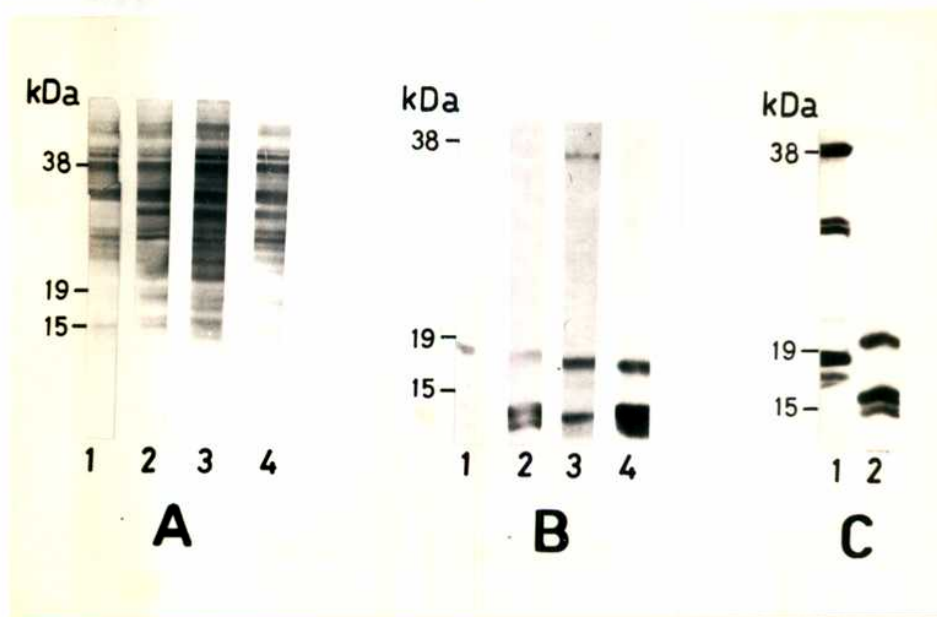


Figura 7:

Reacción de sueros humanos con proteínas ribosomales de *T. cruzi* y humanas, analizada por Western blot. Las proteínas ribosomales de células HeLa y de epimastigotes (30 μg /calle) se separaron por electroforesis en geles pequeños de 15% de poliacrilamida. (A): reactividad de diferentes sueros chagásicos crónicos (DP, FC, P10 y MQ, dil. 1:500) con ribosomas de *T. cruzi* (calles 1-4). (B): reactividad de los anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados a partir de los sueros empleados en (A), con ribosomas de *T. cruzi* (calles 1-4); (C): reactividad de un suero lúpico anti-P+ (dil. 1:200) con ribosomas de células HeLa (calle 1) y con ribosomas de *T. cruzi* (calle 2).

Para completar la caracterización del sistema P de *T. cruzi*, este suero lúpico se confrontó con las proteínas ribosomales del parásito separadas por electroforesis bidimensional y transferidas a filtros de nitrocelulosa. Como se observa en la fig. 8, el doblete de 15-14 kDa reconocido en la experiencia anterior (separación unidimensional), se resolvió en 2 manchas principales y 3 ó 4 de menor intensidad, mientras que la de 19 kDa se reveló como una mancha única. Los polipéptidos se ubicaron en el rango de pI= 5,3-5,7, siendo la proteína de 14 kDa más ácida que las de 15 y 19 kDa.

Estas experiencias permitieron confirmar: 1) la existencia de un sistema de proteínas ribosomales P en *T. cruzi*, compuesto por un doblete de 14-15 kDa (pI= 5,3 y 5,7, respectivamente) y los polipéptidos de 19 (pI= 5,7) y 38 kDa, y 2) la similitud de la reactividad de los anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados a partir de sueros chagásicos crónicos y de los anticuerpos anti-P de sueros lúpicos (a pesar de no reconocer estos últimos la p38 de *T. cruzi*).

3.4) IDENTIFICACION DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P DE *T. cruzi* EMPLEANDO UN SUERO POLICLONAL ANTI-JL5 DE CONEJO:

Para corroborar la identidad de la proteína JL5 como componente del sistema ribosomal P de *T. cruzi*, se preparó un suero policlonal anti-JL5 en conejo. Este se utilizó en experiencias de inmunofluorescencia sobre tripomastigotes y de Western Blot con ribosomas del parásito.

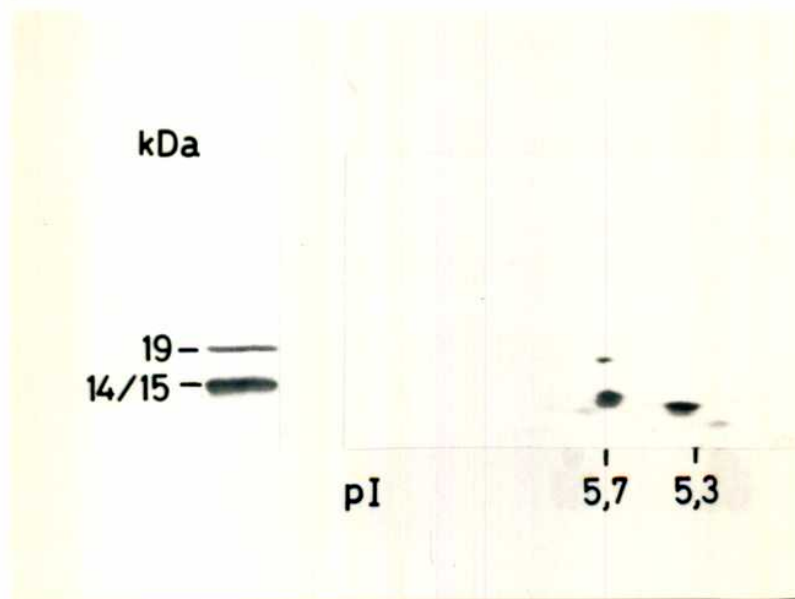


Figura 8:

Análisis del sistema ribosomal P de *T. cruzi* por electroforesis bidimensional. Las proteínas ribosomales de epimastigotes (30 μ g) se separaron primero en un gradiente de anfólitos (pI=3-10) y luego en geles pequeños de 15% de poliacrilamida conteniendo SDS. Después de la electroforesis, se transfirieron a nitrocelulosa y se enfrentaron con un suero lúpico anti-P+ (dil. 1:200). (A): reacción del suero lúpico con las proteínas ribosomales del parásito separadas por electroforesis unidimensional y (B): reacción del suero lúpico con las proteínas ribosomales del parásito separadas por electroforesis bidimensional.

La inmunofluorescencia sobre tripomastigotes mostró el patrón de manchas esperado para proteínas ribosomales, es decir, citoplasmático (fig. 9, A), mientras que el suero hiperinmune (anti-*T. cruzi*) reaccionó con toda la célula y en particular con el núcleo (fig. 9, B). El suero preinmune no reaccionó con los tripomastigotes (no se muestra en la figura).

En experiencias de Western Blot con ribosomas del parásito el suero policlonal anti-JL5 reaccionó exclusivamente con el doblete de 14-15 kDa (fig. 10, calle 2), reconocido también por los anticuerpos anti-JL5 de sueros de pacientes chagásicos crónicos (fig. 10, calle 1). En la calle 3 de la misma fig., se muestra la falta de reactividad del suero preinmune con las proteínas ribosomales del parásito.

Estos resultados demostraron la localización citoplasmática de las proteínas reconocidas por los anticuerpos anti-JL5. Además, confirmaron que la secuencia de JL5 forma parte de alguna de las proteínas ribosomales P del doblete de 15-14 kDa de *T. cruzi*. La caracterización de la reactividad anti-JL5 de este suero policlonal se analiza más adelante (3.10).

3.5) REACCION CRUZADA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-JL5 INMUNOPURIFICADOS A PARTIR DE SUEROS CHAGASICOS CON LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P HUMANAS:

La capacidad de los sueros chagásicos crónicos de reconocer proteínas ribosomales P humanas, se ensayó por Western Blot utilizando ribosomas aislados de células HeLa y proteínas recombinantes purificadas correspondientes a las proteínas ribosomales P1 y P2 humanas. Por otra parte, se midieron por ELISA los niveles séricos de anticuerpos anti-proteínas ribosomales P humanas. La base antigénica de este ensayo fue la proteína de fusión P2 humana.

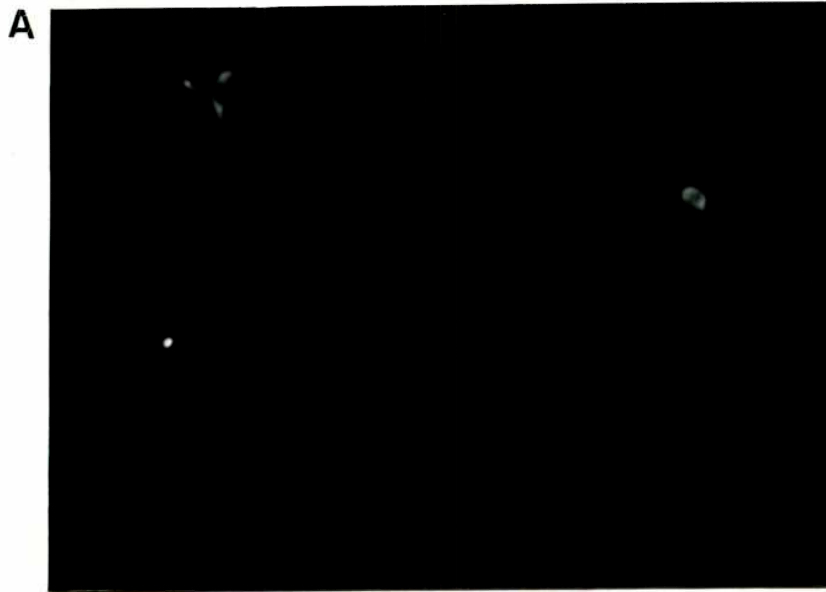


Figura 9:

Localización celular del antígeno JL5 en *T. cruzi*. Reacción por inmunofluorescencia del suero policlonal de conejo anti-JL5 (A) y anti-*T. cruzi* (B) con tripomastigotes. Los sueros se emplearon dil. 1:40.

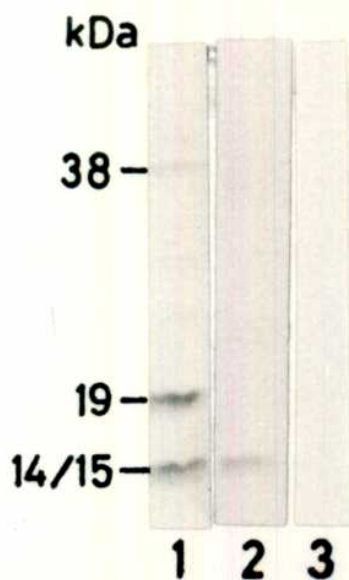


Figura 10:

Reacción del suero policlonal anti-JL5 de conejo con ribosomas de *T. cruzi*. Las proteínas ribosomales de epimastigotes (30 $\mu\text{g}/\text{calle}$) se separaron por electroforesis en geles pequeños de 15% de poliacrilamida, se transfirieron a nitrocelulosa y se enfrentaron con: (1): anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados a partir del suero del paciente chagásico MS; (2): suero policlonal anti-JL5 de conejo (dil. 1:100) y (3): suero preinmune de conejo (dil. 1:100).

3.5.1) Experiencias de Western Blot:

A pesar de la homología encontrada entre las regiones C-terminales de JL5 y las proteínas ribosomales P humanas, los sueros chagásicos, diluidos 1:100, no mostraron reacción alguna con los ribosomas humanos ni con las proteínas de fusión (no se muestra). Sin embargo esta reacción fue positiva cuando se emplearon anticuerpos anti-JL5 concentrados por inmunoafinidad a partir de estos sueros.

En experiencias con ribosomas de células HeLa, los anticuerpos anti-JL5 reconocieron una banda de 17 kDa del sistema ribosomal P humano (fig. 11, calle 2). La identidad de este polipéptido como componente del sistema ribosomal P quedó demostrada en la calle 1 (fig. 11), donde se muestra el perfil de reacción de un suero lúpico anti-P+ con la misma preparación de ribosomas. La reacción de los anticuerpos anti-JL5 de los sueros chagásicos fue completamente inhibida cuando los mismos anticuerpos se preincubaron con la proteína de fusión A1 (fig. 11, calle 3).

Además, los anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados a partir de sueros chagásicos reaccionaron con las proteínas de fusión P1 y P2 humanas. Esta reacción fue más débil que la obtenida con la proteína de fusión JL5 (fig. 12, B). Como era de esperar, el suero lúpico reconoció las proteínas P humanas y, confirmando los resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio (Levin y col., 1989), reaccionó con la proteína recombinante JL5 (fig. 12, A). Ni los anticuerpos anti-JL5 ni el suero lúpico reconocieron a la β -galactosidasa pura, probando la especificidad de la reacción.



Figura 11:

Reactividad cruzada de los anticuerpos anti-JL5 de sueros chagásicos crónicos con proteínas ribosomales humanas. Las proteínas ribosomales de células HeLa (30 μ g/calle) se separaron por electroforesis en geles pequeños de 15% de poliacrilamida, se transfirieron a nitrocelulosa y se enfrentaron con: (1): suero lúpico anti-P+ (dil. 1:200); (2): anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados a partir del suero chagásico P10 y (3): anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados a partir del suero chagásico P10, preincubados con la proteína de fusión A1 (AEEEEDDDMGFGLFD).

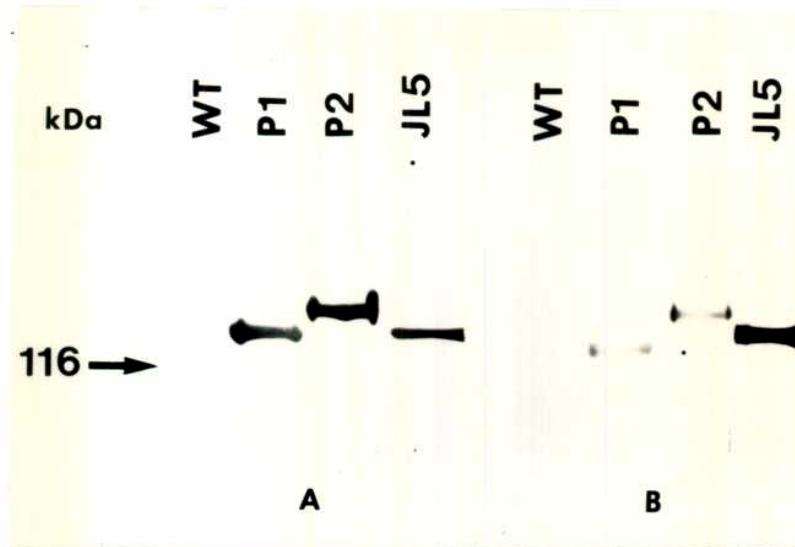


Figura 12:

Reactividad cruzada de los anticuerpos anti-JL5 de sueros chagásicos crónicos con las proteínas recombinantes P1 y P2 humanas. Las proteínas de fusión purificadas (2 $\mu\text{g}/\text{calle}$) se separaron por electroforesis en geles pequeños de 7,5% de poliacrilamida y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa. (A): reacción de un suero lúpico anti-P+ (dil. 1:200) y (B): reacción de los anticuerpos anti-JL5 preparados a partir del suero chagásico P10. WT: β -galactosidasa purificada de bacterias *E. coli* Y1089 lisógenas para $\lambda\text{gt}11$ salvaje; P1: proteína recombinante purificada de bacterias *E. coli* Y1089 lisógenas para $\lambda\text{gt}11$ -P1 humana; P2: proteína recombinante purificada de bacterias *E. coli* Y1089 lisógenas para $\lambda\text{gt}11$ -P2 humana y JL5: proteína recombinante purificada de bacterias *E. coli* Y1089 lisógenas para $\lambda\text{gt}11$ -JL5. La flecha (116 kDa) indica la posición de la β -galactosidasa.

3.5.2) Experiencias de ELISA:

La reactividad de 8 sueros chagásicos crónicos contra la proteína ribosomal P2 humana se probó también por ELISA.

La fig. 13 muestra los valores obtenidos para estos sueros. Como controles, se colocaron en la misma placa 3 sueros de individuos normales y uno lúpico anti-P+. Los niveles de anticuerpos anti-P presentados por los sueros chagásicos fueron significativamente más altos que los obtenidos para los controles normales (ver dil. 1:50). Ningún suero presentó niveles tan elevados como los del suero lúpico.

En su conjunto, estos resultados demostraron la capacidad de los anticuerpos anti-JL5 presentes en sueros chagásicos crónicos de reaccionar en forma cruzada con proteínas ribosomales P humanas. Como esta reacción fue completamente inhibida por A1 (fig. 11, calle 3), se concluye que son los anticuerpos definidos por los 15 aa C-terminales de JL5 los involucrados en esta autorreactividad.

3.6) REACCION CRUZADA CON PROTEINAS RIBOSOMALES P DE *Leishmania* sp.:

La fig. 14, calle 2, muestra la reactividad de los anticuerpos anti-JL5 con proteínas ribosomales de *Leishmania major*. A pesar de la baja intensidad de esta reacción, en comparación con la de los mismos anticuerpos con ribosomas de *T. cruzi* (fig. 14, calle 1), las bandas reveladas correspondieron a los PM del sistema ribosomal P, indicando la existencia de epitopes conservados entre las proteínas ribosomales P de ambas especies.

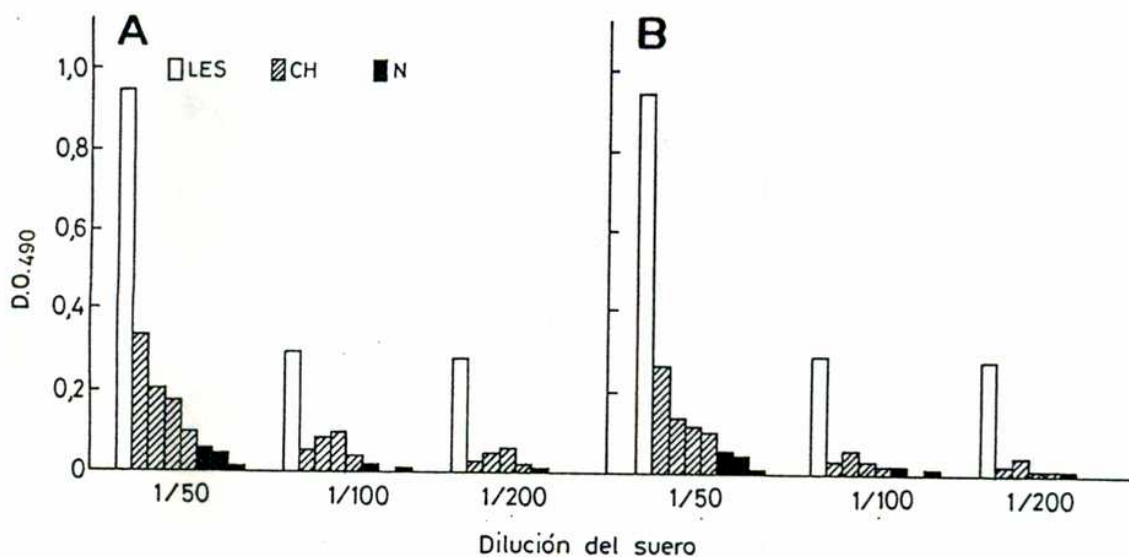


Figura 13:

Reacción cruzada de los sueros chagásicos con la proteína recombinante P2 humana, medida por ELISA. Las barras corresponden a la reactividad (D_O490) presentada por cada suero a diferentes diluciones (1/50, 1/100 y 1/200). Para facilitar la interpretación, los resultados se presentaron en dos histogramas, A y B. En ambos, los sueros controles lúpico anti-P+ (LES) y normales (N) son los mismos. Por el contrario, los sueros chagásicos (CH) representados en A y en B son diferentes.

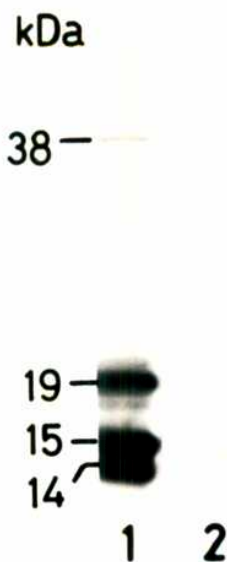


Figura 14:

Reactividad cruzada de los anticuerpos anti-JL5 de sueros de pacientes chagásicos con proteínas ribosomales de *Leishmania major*. Las proteínas ribosomales (30 μ g/calle) de *T. cruzi* (calle 1) y de *Leishmania major* (calle 2) se separaron por electroforesis en geles pequeños de 15% de poliacrilamida, se transfirieron a nitrocelulosa y se enfrentaron con los anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados a partir del suero chagásico MS.

3.7) ANALISIS DE LAS ACTIVIDADES ANTI-R13 Y ANTI-*T. cruzi* PRESENTADAS POR DIFERENTES SUEROS HUMANOS:

Dada la importancia de los 15 aa C-terminales de las proteínas P de *T. cruzi* (AEEEEDDDMGFGLFD) en la reactividad cruzada con las proteínas ribosomales P humanas, se decidió profundizar la caracterización de la respuesta dirigida contra esta región de JL5 en la infección chagásica humana. Como producto de trabajos previos efectuados en nuestro laboratorio, se disponía del péptido sintético R13 (EEEDDDMGFGLFD). Este había sido definido como el determinante antigénico lineal del extremo C-terminal de JL5 (Mesri y col., 1990). Sin embargo, antes de comenzar el estudio con R13, fue necesario determinar el efecto de los 2 aa, AE, presentes en A1 (ausentes en R13), sobre la antigenicidad de A1. Utilizando el péptido sintético R18 (AAAAEEEEDDDMGFGLFD), se demostró que la reactividad contra este péptido estaba definida por R13 (ver más adelante, 3.11.3). Por lo tanto, la reactividad anti-A1, al igual que la anti-R18, debía estar definida por R13, confirmando la validez del empleo de R13 en las experiencias siguientes.

Empleando la técnica de ELISA se ensayaron diferentes sueros humanos (se incluyeron sueros de individuos con diversas parasitosis, lúpicos, con cardiopatía no-chagásica y sanos) contra el péptido sintético R13 y el extracto total de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos para cada suero se muestran en la tabla VII (Ap. I). El 62% (31/50) de los sueros chagásicos fue positivo para la reacción contra R13, mientras que sólo 1 de los 7 sueros de individuos con cardiopatía no-chagásica (14,3%), el 8,3% (3/24) de los sueros de pacientes con leishmaniasis, el 20,1% (4/20) de los sueros de individuos infectados con *T. brucei* y ninguno de los sueros de pacientes con malaria fueron positivos para dicha reacción (fig. 15). Estos resultados muestran que la respuesta anti-R13 es altamente específica para la infección chagásica. El porcentaje de los sueros lúpicos positivos (12%, 6/50) coincidió con

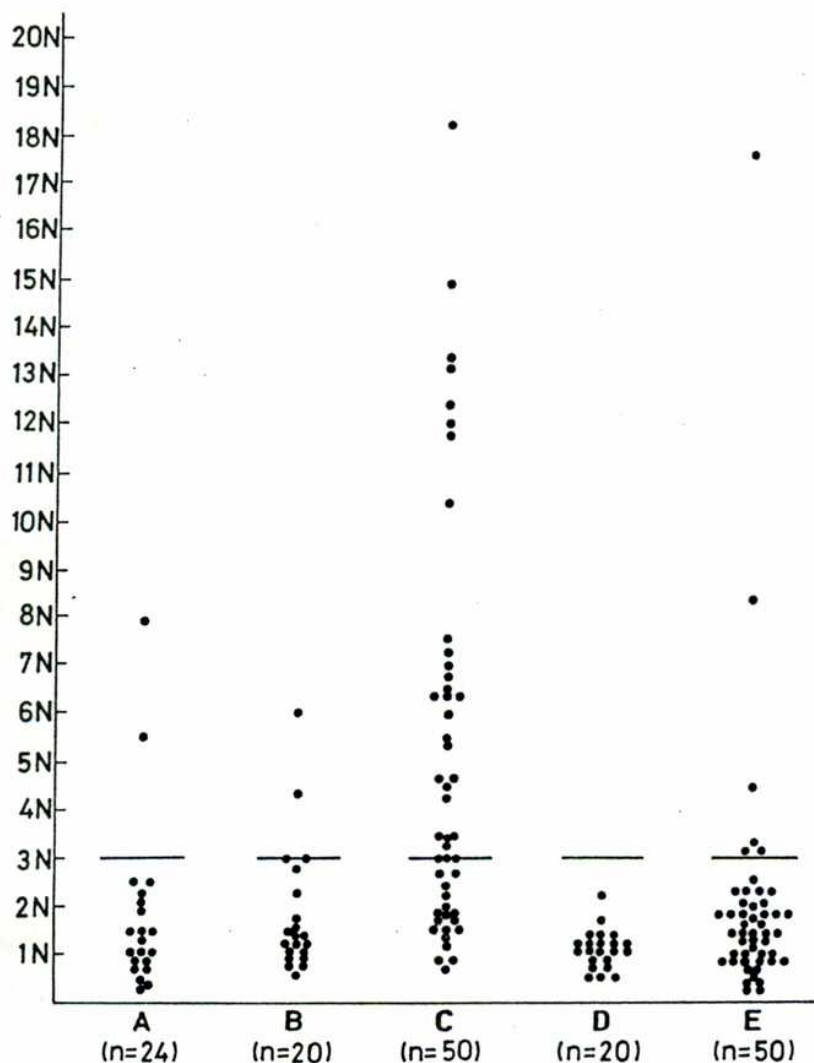


Figura 15:

Prevalencia de anticuerpos anti-R13 en sueros de pacientes chagásicos crónicos. La reactividad anti-R13 se midió por ELISA empleando el péptido sintético R13 (EEEDDDMGFGLFD) como antígeno. Los valores presentados para cada suero corresponden a la dil. 1:400, y se expresaron como n veces la DO490 promedio medida para 35 controles sanos (N). Se consideraron positivos los valores mayores o iguales a 3N (líneas horizontales). (A): individuos infectados con *Leishmania sp*; (B): individuos infectados con *Tripanosoma brucei*; (C): pacientes chagásicos crónicos; (D): individuos infectados con *Plasmodium falciparum* y (E): pacientes lúpicos.

los datos de la literatura sobre la incidencia de pacientes anti-P+ en la población de individuos con lupus eritematoso sistémico (Bonfa y Elkon, 1986).

Con respecto a los títulos anti-*T. cruzi* obtenidos para los diferentes sueros humanos, el 96% (48/50) de los sueros chagásicos fue positivo. Todos los sueros correspondientes a pacientes maláricos y a cardiópatas no-chagásicos fueron negativos, mientras que algunos sueros de individuos infectados con *Leishmania sp* (3/25, 12%) y con *T. brucei* (4/21, 19,1%) reaccionaron en forma débil con el extracto de *T. cruzi*. El 20% (10/50) de los sueros lúpicos también fue positivo para esta reacción (de éstos, 7 corresponden a pacientes argentinos) (tabla VII, Ap. I).

La correlación entre la actividad anti-R13 y el título anti-*T. cruzi* obtenidos para los pacientes chagásicos fue positiva, moderada y significativa ($r = 0,62$; $p < 0,001$).

3.8) ASOCIACION ENTRE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS ANTI-R13 PRESENTES EN LOS SUEROS CHAGASICOS Y LAS DIFERENTES FORMAS CLINICAS DE LA ENFERMEDAD:

La asociación entre la respuesta anti-R13 y la severidad de la cardiopatía chagásica se determinó para los sueros de 29 pacientes clasificados como se indicó en 2.3.1. La tabla VIII (Ap. I) y la fig. 16 muestran la distribución de las reactividades contra el péptido sintético R13 medidas por ELISA. Como puede observarse, los niveles más altos de anticuerpos anti-R13 correspondieron a los pacientes con severa enfermedad miocárdica. Mientras que en los grupos II (n=6) y III (n=9) las reactividades más altas fueron 4,6N y 6,4N respectivamente, 6 pacientes del grupo I (n=14) presentaron niveles mayores a 6,4N. El análisis estadístico de estos datos reveló que las reactividades contra el péptido R13

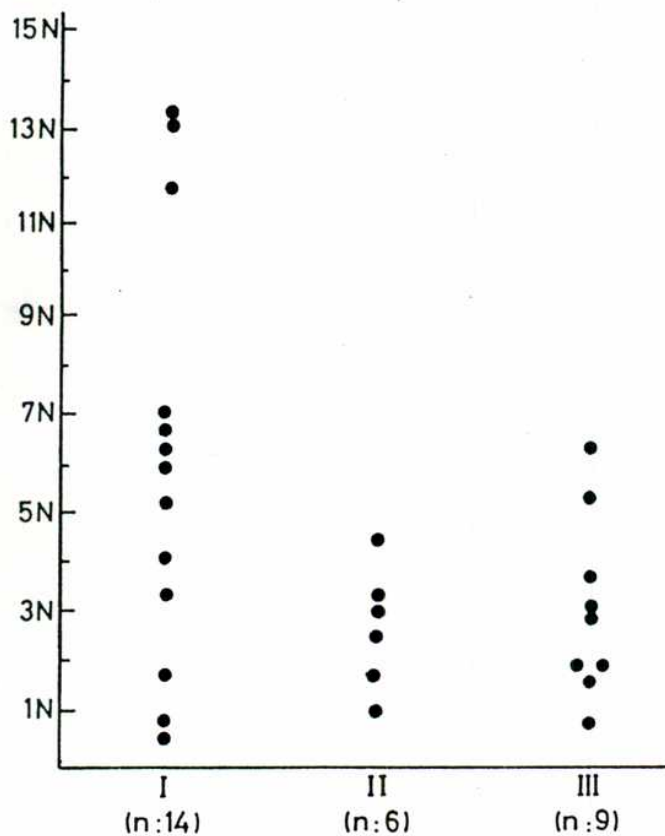


Figura 16:

Niveles de anticuerpos anti-R13 en sueros de pacientes chagásicos crónicos con cardiopatía severa (I), leve a moderada (II) y pre-clínica (III). Los valores se obtuvieron y se expresaron como se indicó en la fig. 15.

obtenidas para los pacientes del grupo I fueron significativamente más elevadas que para los pacientes de los grupos II y III tomados en conjunto ($p = 0,05$).

La tabla IX (Ap. I) y la fig. 17 muestran los niveles de anticuerpos anti-R13 presentados por los 14 pacientes sometidos a biopsia endomiocárdica (estos pacientes pertenecen a los grupos I y II definidos anteriormente). Siete de ellos mostraron evidencias histológicas de miocarditis activa y en los restantes el miocardio fue histológicamente normal o con focos aislados de fibrosis intersticial. Como en el caso anterior, las reactividades contra R13 fueron más altas en los pacientes con miocarditis crónica activa. Mientras el nivel máximo de anticuerpos anti-R13 presentado por los pacientes sin miocarditis fue 4,6N, el 71% (5/7) de los pacientes con miocarditis activa mostró niveles superiores a 5,3N. Las diferencias entre los dos grupos también fue estadísticamente significativa ($p = 0,041$).

3.9) DISTRIBUCION DE SUBCLASES DE IgG PARA LAS RESPUESTAS ANTI-R13 Y ANTI-*T. cruzi* EN PACIENTES CHAGASICOS CRONICOS:

Se determinó la distribución de isotipos de IgG para las respuestas anti-R13 y anti-*T. cruzi* en 24 pacientes chagásicos anti-R13+. Se empleó la técnica de ELISA y los resultados se expresaron como porcentajes de la respuesta total (IgG) hacia cada antígeno (tabla X, Ap. I). Como se observa en la fig. 18, para la mayoría de los pacientes (87,5%, 21/24) la respuesta anti-R13 fue predominantemente del tipo IgG1, mientras que el 12,5% (3/24) presentó además niveles significativos de IgG3. Para los 4 sueros lúpicos anti-R13 + empleados como control (tabla X, Ap. I), se obtuvo una distribución semejante a la informada para la respuesta anti-P de estos pacientes, del tipo IgG1 e IgG2 (Bonfa y col., 1988).

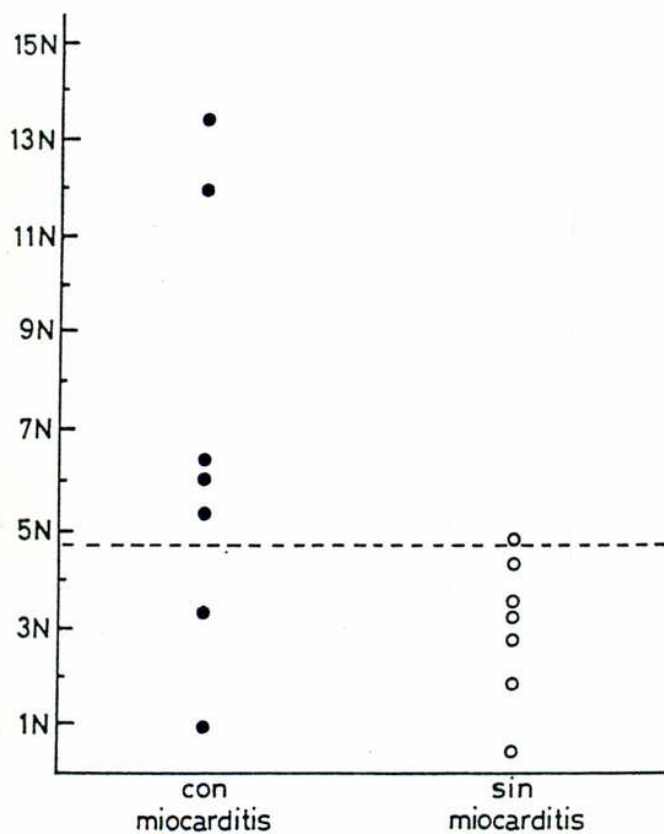


Figura 17:

Niveles de anticuerpos anti-R13 en sueros de 7 pacientes chagásicos con miocarditis crónica activa y 7 pacientes chagásicos sin evidencias histológicas de inflamación miocárdica. Los valores se obtuvieron y se expresaron como se indicó en la fig. 15.

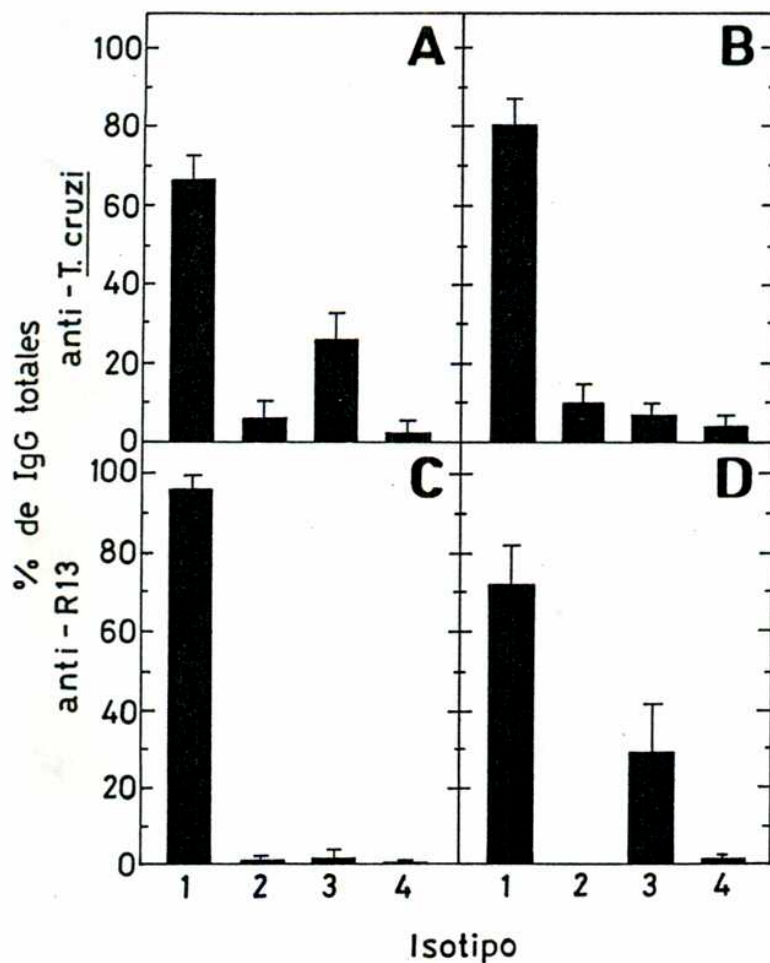


Figura 18:

Distribución de subclases de IgG para las respuestas anti-R13 y anti-*T. cruzi* de 24 pacientes chagásicos crónicos anti-R13+. (A) y (B): distribución isotípica para la respuesta anti-*T. cruzi*; (C) y (D): distribución isotípica para la respuesta anti-R13. Las barras indican los porcentajes promedios ($\pm s$) de las respuestas totales hacia cada antígeno. (A) y (C) representan los perfiles observados en la mayoría de los sueros ensayados (83% y 88% respectivamente).

Con respecto a la respuesta anti-*T. cruzi*, el 83,3% (20/24) de los sueros presentaron altos niveles de IgG1 con un aporte significativo de IgG3, mientras que en el 16,7% (4/24) restante la respuesta fue predominantemente del tipo IgG1 (fig. 18). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Scott y Gross-Sampson (1984).

Los 3 pacientes que presentaron un perfil "mixto" (IgG1-IgG3) para la respuesta anti-R13, mostraron una distribución similar en la reacción contra el extracto total de *T. cruzi*.

Por otra parte, se determinó la distribución de subclases de la respuesta anti-*T. cruzi* en 3 sueros chagásicos negativos para R13. Como se muestra en la tabla X (Ap. I), los isotipos involucrados fueron los mismos que los presentados por la mayoría de los sueros chagásicos anti-R13+ (IgG1-IgG3).

3.10) CARACTERIZACION DE LA REACTIVIDAD ANTI-JL5 DEL SUERO POLICLONAL PREPARADO EN CONEJO: AUSENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-R13

Previamente se describió la inmunización de un conejo con la proteína de fusión JL5 (ver 2.3.3). El suero policlonal obtenido se ensayó sobre los péptidos sintéticos R13 y R18, el extracto total de *T. cruzi*, las proteínas de fusión JL5 y A1 purificadas y los fagos recombinantes correspondientes a los mismos clones.

Como muestra la fig. 19, B, este suero reaccionó por Western Blot con la proteína de fusión JL5 pero no con la correspondiente a A1. Un resultado similar se obtuvo empleando fagos recombinantes (fig. 19, A).

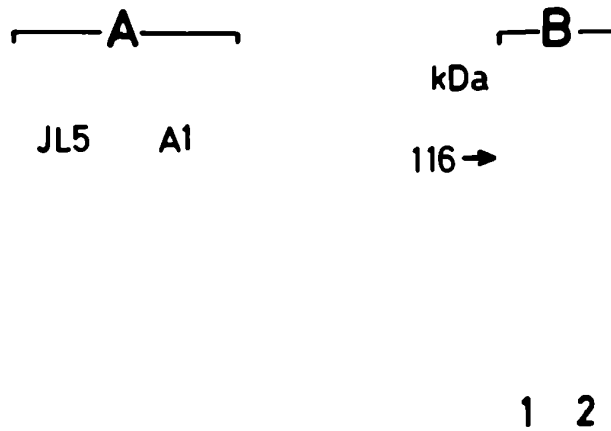


Figura 19:

Caracterización de la respuesta anti-JL5 del suero policlonal de conejo. Reacción del suero policlonal anti-JL5 (dil. 1:100) con: (A): los fagos recombinantes λ gt11-JL5 (JL5) y λ gt11-A1 (A1) y (B): las proteínas de fusión purificadas correspondientes a los clones λ gt11-JL5 (calle 1) y λ gt11-A1 (calle 2), separadas por electroforesis en geles pequeños de 7,5% de poliacrilamida (2 μ g/calle) y transferidas a nitrocelulosa. La flecha (116 kDa) indica la posición de la β -galactosidasa.

Además, este suero policlonal fue negativo para la reacción anti-R13 y anti-R18 medida por ELISA (fig. 20, B y C), mientras que presentó una reactividad moderada pero positiva contra el extracto de *T. cruzi* (fig. 20, A). Como controles se emplearon el suero preinmune y el suero de un conejo hiperinmunizado con un extracto de *T. cruzi* (cepa CL). Este último presentó altos niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi* (fig. 20, A) y más bajos, aunque significativos, contra ambos péptidos sintéticos (fig. 20, B y C).

Estos resultados demuestran que los anticuerpos presentes en el suero policlonal anti-JL5 de conejo reconocen epitopes en la proteína recombinante JL5 que están ausentes en la proteína recombinante A1 y en los péptidos R13 y R18.

3.11) CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA ANTI-JL5 EN LA INFECCION CHAGASICA:

Durante el análisis de la respuesta humoral contra la proteína recombinante JL5, algunas evidencias indicaron la presencia de epitopes adicionales en JL5, ausentes en A1. Esto fue sugerido por la reactividad diferencial que presentaron los sueros chagásicos crónicos contra ambos fagos recombinantes (fig. 23, A) y ensayos de ELISA con proteínas de fusión realizadas en nuestro laboratorio (Levin y col., 1990). Dada la relevancia del extremo C-terminal de JL5, se resolvió repetir experiencias previas y profundizar el estudio de la antigenicidad de esta proteína recombinante en la infección chagásica.

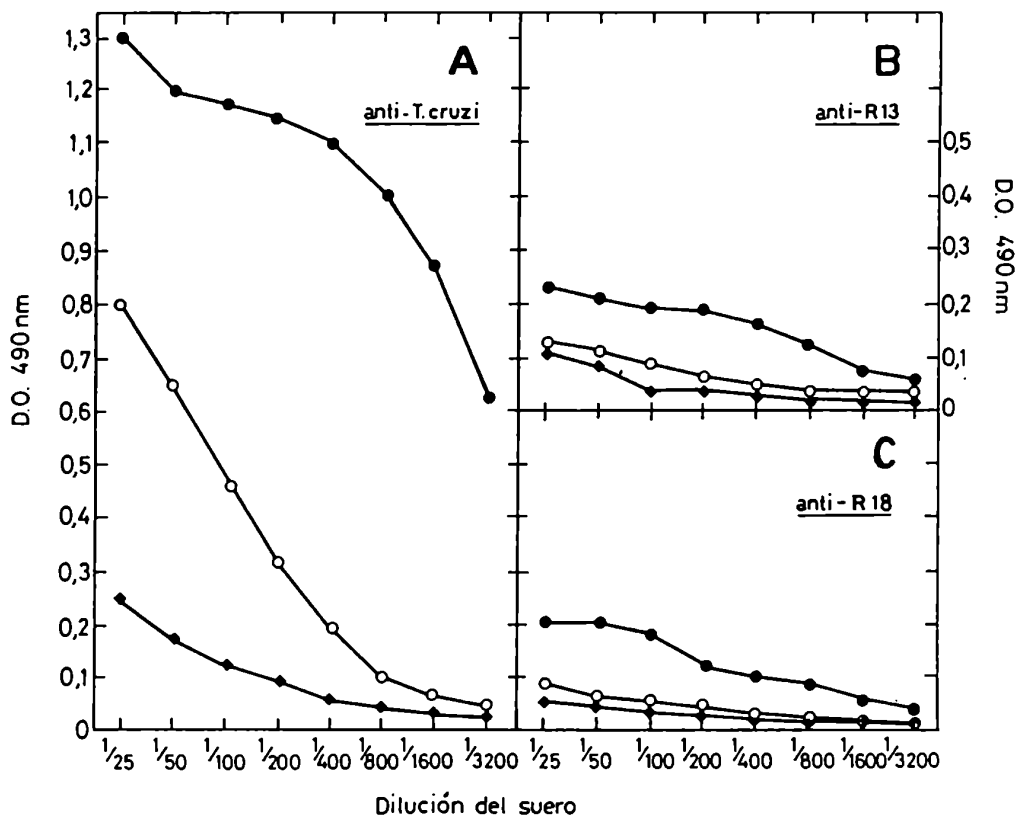


Figura 20:

Actividad anti-R13, anti-R18 y anti-*T. cruzi* del suero policlonal anti-JL5 de conejo. Las reactividades se midieron por ELISA empleando un extracto total de tripomastigotes (A) y los péptidos sintéticos R13 (EEEDDDMGFGLFD) (B) y R18 (AAAAEEEEEDDDMGFGLFD) (C). (◆): suero preimmune, (○): suero policlonal anti-JL5, y (●): suero policlonal anti-*T. cruzi*.

3.11.1) Comparación entre las reactividades de los sueros chagásicos crónicos contra las proteínas de fusión JL5 y A1 por ELISA:

Los sueros chagásicos (n=8) se ensayaron en experiencias de ELISA con las proteínas recombinantes JL5 y A1 purificadas colocadas en la misma placa. En la tabla XI (Ap. I) se presentan las reactividades de los diferentes sueros contra cada antígeno. La correlación entre los valores obtenidos para cada suero contra cada una de las proteínas de fusión fue positiva y muy alta ($r = 0,96$; $p < 0,001$).

Por otro lado, experiencias de inhibición mostraron que la preincubación de los sueros con la proteína de fusión A1 anulaba la reactividad anti-JL5 de los mismos (fig. 21). Como controles positivo y negativo de la inhibición se emplearon, respectivamente, la proteína de fusión JL5 purificada y un extracto total de *E. coli* Y1089 lisógena para λ gt11 salvaje.

La especificidad de la reacción de los sueros chagásicos contra estas proteínas recombinantes se verificó ensayando los mismos sobre una proteína de fusión purificada no relacionada, denominada T31. Esta corresponde a la proteína HSP 70 de *T. cruzi*, que es muy antigénica en la infección mixta *T. cruzi-Leishmania sp* y poco en la infección chagásica (Levy-Yeyati y col., 1990). Como se observa en la fig. 22, empleando esta técnica se obtuvieron los resultados esperados, es decir, los pacientes con infección mixta presentaron altos niveles de anticuerpos anti-T31 y bajos niveles de anticuerpos anti-JL5, mientras que en el caso de la infección chagásica estas reactividades se invirtieron. Esta experiencia sirvió para demostrar que la reacción presentada por los sueros era el resultado de una unión específica de los anticuerpos con proteínas recombinantes.

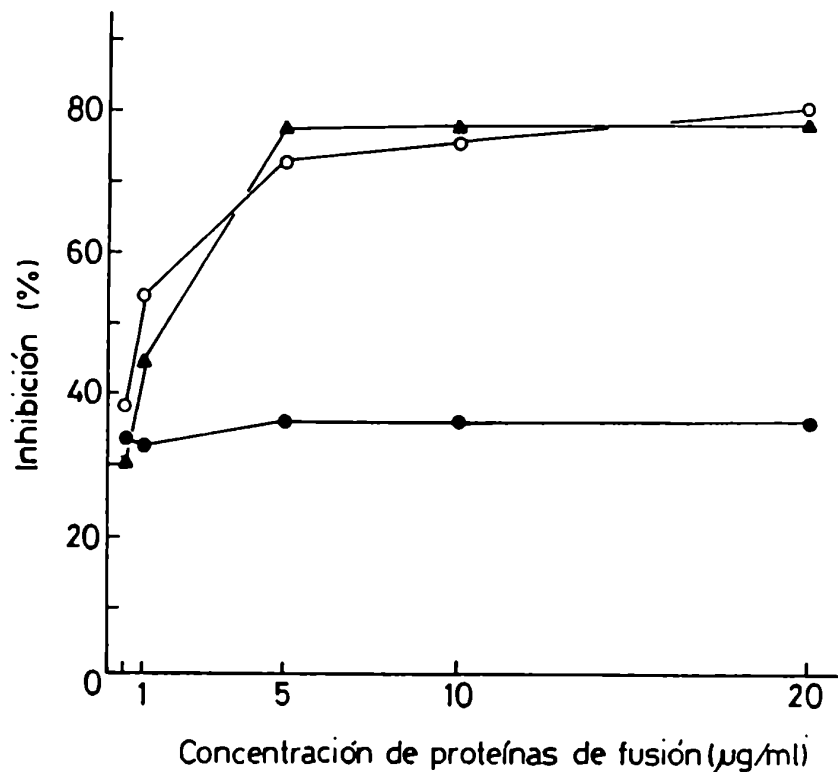


Figura 21:

Inhibición de la reactividad anti-JL5 de los sueros chagásicos por la proteína recombinante A1, determinada por ELISA. La reactividad anti-JL5 se midió empleando la proteína de fusión JL5 purificada como antígeno. Las curvas corresponden a la reacción del suero chagásico FE (dil. 1:1000) preincubado con cantidades crecientes de proteína recombinante JL5 (▲), proteína recombinante A1 (○) y extracto total de *E. coli* Y1089 lisógena para λ gt11 salvaje (●). Los valores se expresaron como porcentajes de inhibición.

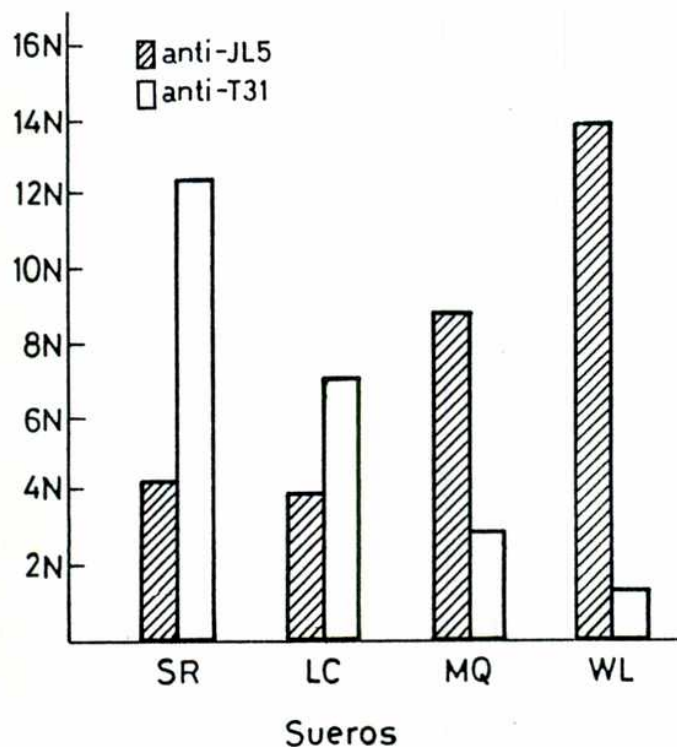


Figura 22:

Actividad anti-JL5 y anti-T31 de sueros de pacientes chagásicos crónicos y de individuos con infección mixta *T. cruzi-Leishmania sp.*, medida por ELISA. Como base antigénica del ensayo se emplearon las proteínas de fusión purificadas a partir de dichos clones. Las barras indican la reactividad de los sueros (dil. 1:1000) expresada como n veces la DO490 promedio medida para 4 controles sanos. Los sueros SR y LC corresponden a individuos con infección mixta *T. cruzi-Leishmania sp.* y los sueros MQ y WL, a pacientes chagásicos crónicos.

3.11.2) Inhibición de la reactividad anti-JL5 de los sueros chagásicos por la proteína de fusión A1 y el péptido R13:

La fig. 23, A muestra la inhibición de la reacción de un suero chagásico contra los fagos recombinantes JL5 y A1 luego de la preincubación del mismo con cantidades crecientes de la proteína de fusión A1 purificada e inmovilizada sobre filtros de nitrocelulosa. Como control negativo de la inhibición se utilizó un filtro de nitrocelulosa conteniendo extracto total de *E. coli* Y1089 lisógena para λ gt11 salvaje.

Por otra parte, 300 μ g de proteína recombinante A1 inhibieron la reactividad del suero chagásico contra la proteína de fusión JL5, ensayada por Western blot (fig. 23, B).

Además, la preincubación de los anticuerpos anti-JL5 (inmunoseleccionados a partir del mismo suero) con el péptido sintético R13, anuló la reacción de estos anticuerpos con la proteína de fusión JL5 y las proteínas ribosomales P del parásito (fig. 24).

3.11.3) Comparación entre los niveles de anticuerpos anti-R13 y anti-R18 en sueros chagásicos medidos por ELISA:

Para evaluar el efecto de los aminoácidos AE, presentes en A1 pero ausentes en R13, sobre la antigenicidad de la proteína recombinante A1, los diferentes sueros chagásicos se ensayaron en experiencias de ELISA sobre los péptidos sintéticos R13 (EEEDDDMGFGLFD) y R18 (AAAAEEEEEDDDMGFGLFD).

La tabla VII (Ap. I) muestra los resultados obtenidos para 50 pacientes chagásicos. La correlación entre los niveles de anticuerpos anti-R13 y anti-R18 correspondientes a cada suero fue positiva y muy alta ($r = 0,96$; $p < 0,001$). También se midieron las reactividades anti-R13 y anti-R18 para 50 sueros lúpicos (tabla VII, Ap. I), obteniéndose una correlación similar ($r = 0,97$; $p < 0.001$).

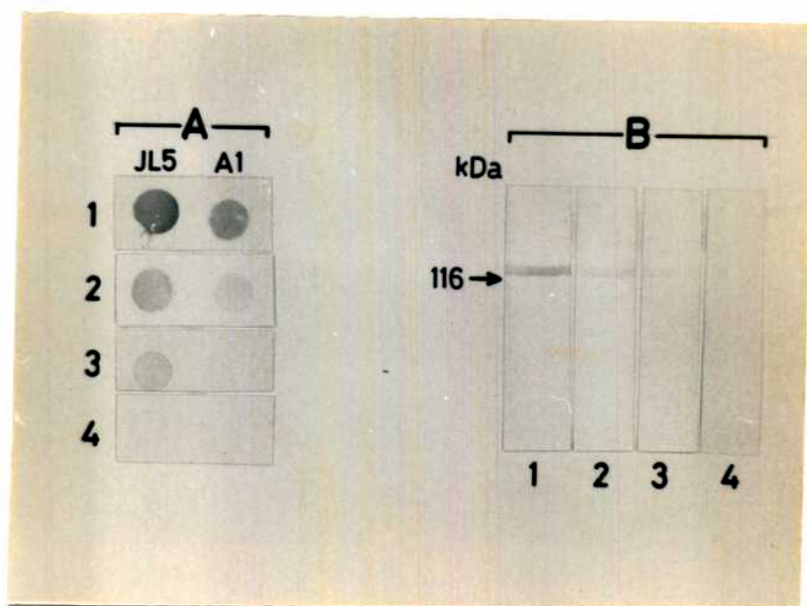


Figura 23:

Inhibición de la reactividad anti-JL5 de los sueros chagásicos por la proteína recombinante A1. (A): reacción del suero chagásico FE (dil. 1:1000) con los fagos recombinantes JL5, A1 y λ gt11 salvaje (WT) y (B): reacción del mismo suero con la proteína de fusión JL5 purificada, analizada por Western blot. En ambos casos (A y B) el suero se preincubó con 500 μ g de lisado de *E. coli* Y1089 lisógena para λ gt11 salvaje (calles 1 en A y B) y con cantidades crecientes (30, 100 y 300 μ g) de proteína recombinante A1 (calles 2, 3 y 4, en A y B). La flecha (116 kDa) indica la posición de la β -galactosidasa.

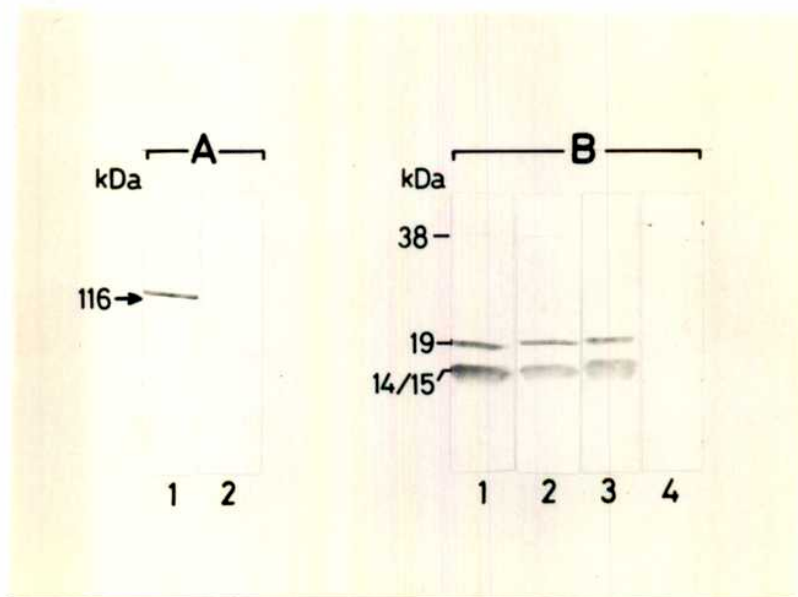


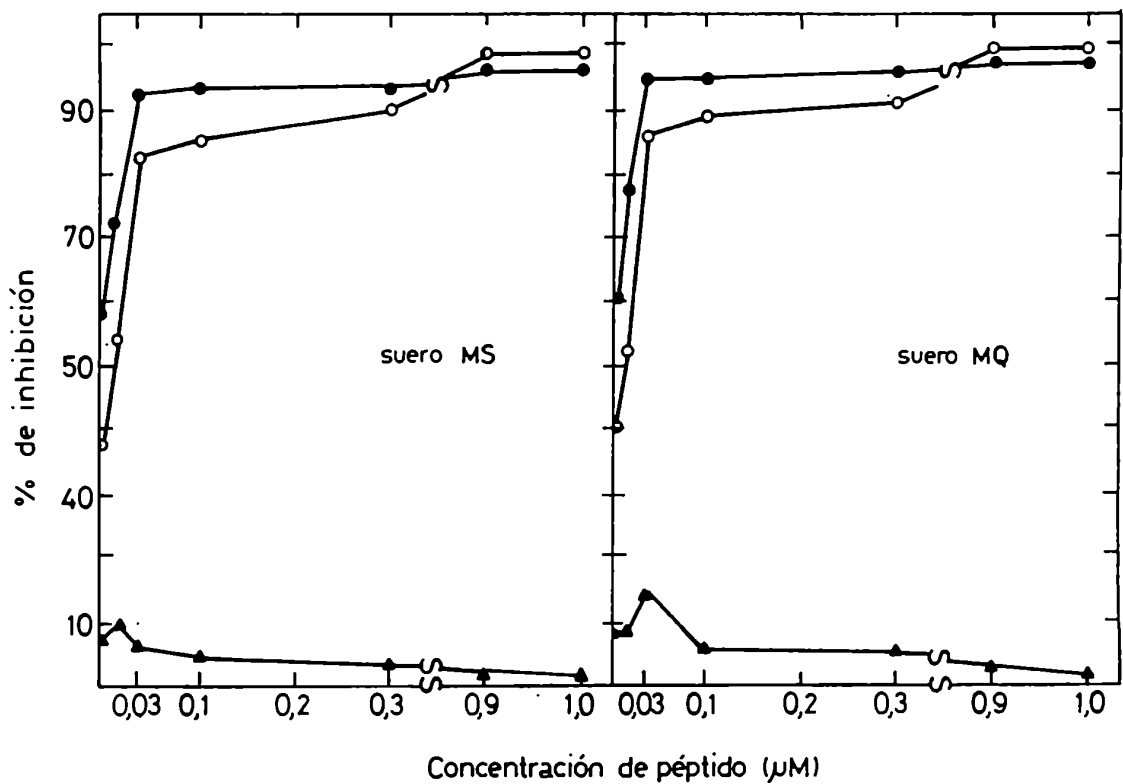
Figura 24:

Inhibición de la reactividad anti-JL5 y anti-ribosomas de *T. cruzi* de los sueros chagásicos por el péptido sintético R13. La reactividad anti-JL5 y anti-ribosomas de epimastigotes se determinó por Western blot como se indicó en las figs. 14 y 23. (A): reacción de los anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados a partir del suero chagásico P10 con la proteína recombinante JL5. Los anticuerpos se ensayaron sin tratamiento previo (calle 1) y preincubados con 60 μ M del péptido R13 (calle 2). La flecha (116 kDa) indica la posición de la β -galactosidasa. (B): reacción de los mismos anticuerpos con proteínas ribosomales de epimastigotes. Los anticuerpos se ensayaron sin tratamiento previo (calle 1), preincubados con 60 μ M del péptido I6 (EEEDDD) (calle 2), 60 μ M del péptido R7 (MGFGLFD) (calle 3) y 60 μ M del péptido R13 (EEE-DDDMGFGLFD) (calle 4).

Además, se realizaron experiencias de inhibición de la reactividad anti-R18 por el péptido R13. Como muestra la fig. 25, la reacción de los sueros MS y MQ contra este péptido fue inhibida por cantidades crecientes de R13 de la misma forma que lo hizo el propio R18. Como control negativo de la misma se empleó un péptido sintético de 13 aa (P76) correspondiente a una proteína de *Plasmodium falciparum* y cuya secuencia no presenta ninguna homología con los péptidos R13 y R18.

Todas estas experiencias muestran, en conjunto, que los sueros chagásicos reconocen en la proteína recombinante JL5 sólo la región definida por A1 y dentro de ésta, la secuencia de los 13 aa C-terminales. Sin embargo, llamó la atención que a pesar de la alta reactividad anti-R13 de los sueros chagásicos, éstos reaccionaran débilmente con las proteínas ribosomales P humanas (ver 3.5.1 y 3.5.2).

Una de las hipótesis para explicar las diferentes reactividades anti-P humanas presentadas por los sueros chagásicos y lúpicos, surgió del análisis de las secuencias de los 13 aa C-terminales de las proteínas P humanas y de *T. cruzi*. Esta hipótesis, capaz de ser sometida a prueba experimental, planteaba la posibilidad de que los epitopes definidos por ambos sueros dentro de R13 no fueran los mismos.



Figuras 25:

Inhibición de la reactividad anti-R18 de los sueros chagásicos por el péptido sintético R13. La reactividad anti-R18 se midió por ELISA, empleando el péptido R18 como antígeno. Las curvas corresponden a los sueros chagásicos MQ y MS (dil. 1:100) preincubados con cantidades crecientes de los péptidos sintéticos R18 (AAAAEEEEEDDDMGFGLFD) (●), R13 (EEEDDDMGFGLFD) (○), y P76 (AEAALV-KMALMKV). Los valores se expresaron como porcentajes de inhibición.

3.11.4) Reactividad diferencial presentada por los sueros chagásicos con los péptidos R13, I6 y R7:

Para precisar la ubicación del epítopo P dentro de los 13 aminoácidos C-terminales de JL5, se sintetizaron dos péptidos más pequeños, I6 y R7, cuyas secuencias se indican a continuación:

R13	EEEDDDMGFGLFD
I6	EEEDDD
R7	MGFGLFD

Se realizaron experiencias de inhibición por ELISA, empleando el péptido R13 como antígeno y cantidades crecientes de los péptidos arriba mencionados, como inhibidores. La fig. 26 muestra las curvas de inhibición obtenidas para 3 sueros chagásicos y uno lúpico anti-P+. Analizando los resultados de 13 sueros chagásicos estudiados, se observa que las inhibiciones máximas obtenidas varían entre 12 y 58% para R7 y entre 12 y 69% para I6. En el caso del lúpico, el péptido R7 inhibió un 60% esta reacción mientras que I6 lo hizo apenas en un 20% (tabla XII, Ap. I). Como control positivo, la preincubación de todos los sueros con 1 μ M del péptido R13, anuló completamente la reactividad anti-R13.

Por otra parte, la reacción diferencial de estos sueros contra el péptido R13 y contra los péptidos I6 y R7 sumados, se analizó cubriendo la mitad de una placa con R13 (0,68 nmoles/pocillo) y la otra mitad con una mezcla (1:1) de I6 y R7 (0,68 nmoles totales/pocillo). Los niveles de anticuerpos anti-(I6+R7) de los sueros chagásicos, representaron entre el 41 y el 89% de la reactividad anti-R13, mientras que para el suero lúpico, los valores obtenidos para R13 e I6+R7 fueron similares (tabla XIII, Ap. I).

Estos resultados demostraron que 1) R13, completo, constituye un epítopo en la infección chagásica y 2) a diferencia de lo que ocurre en lupus, la región definida por I6 es importante en la antigenicidad de R13.

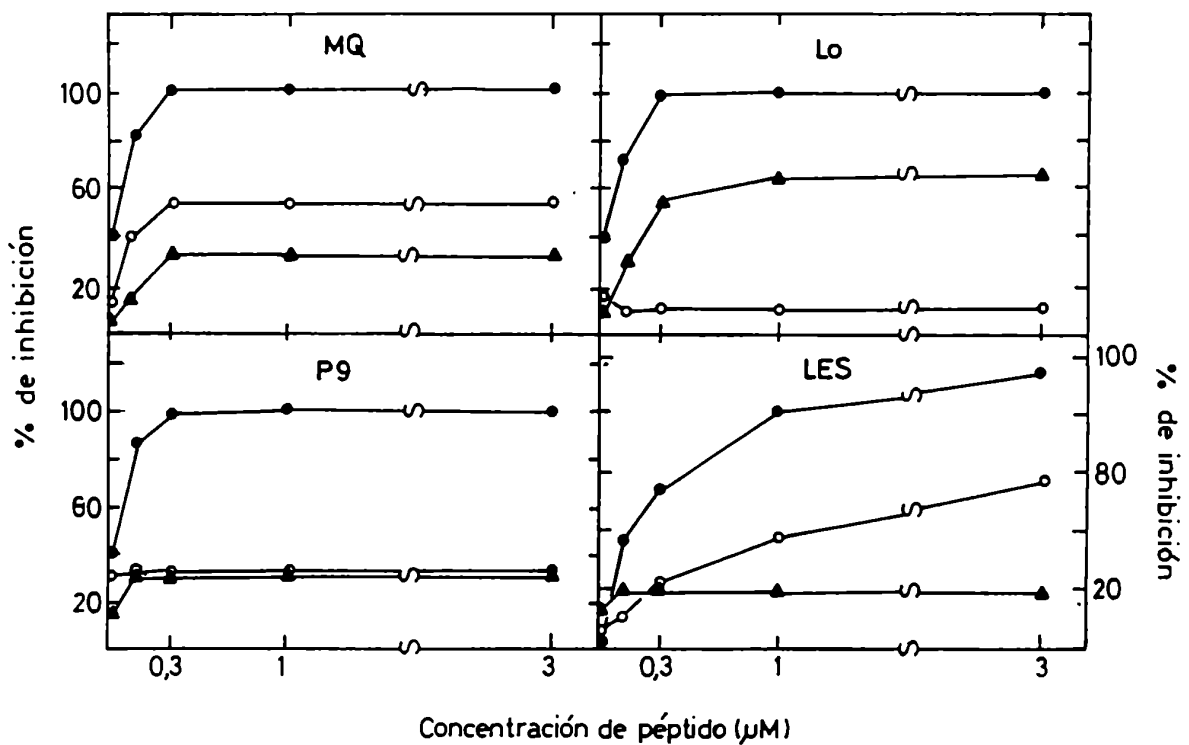


Figura 26:

Inhibición de la reactividad anti-R13 de los sueros chagásicos por los péptidos sintéticos R13, I6 y R7. La reactividad anti-R13 se determinó por ELISA, empleando el péptido sintético R13 como antígeno. Las curvas corresponden a los sueros chagásicos MQ, Lo y P9, y a un suero lúpico anti-P+ (LES) (todos dil. 1:100), preincubados con cantidades crecientes de los péptidos sintéticos R13 (EEEDDDMGFGLFD) (●), I6 (EEEDDD) (▲), y R7 (MGFGLFD) (○). Los valores se expresaron como porcentajes de inhibición.

Comparando las secuencias, se observa que existe un único cambio no conservativo (ExS) entre los 13 aa C-terminales de JL5 y de las proteínas ribosomales P humanas. Si el residuo E fuera esencial en la reacción de los sueros chagásicos con R13, el cambio ExS podría ser la causa de la baja actividad anti-proteínas ribosomales P humanas de estos sueros. Si la hipótesis anterior fuera cierta, los sueros chagásicos deberían reaccionar fuertemente con la región C-terminal de las proteínas ribosomales P de *Artemia salina* ya que esta secuencia no presenta ningún cambio no conservativo con respecto a R13.

3.12) REACCION CRUZADA DE LOS SUEROS CHAGASICOS CRONICOS CON LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P DE *Artemia salina*:

La reactividad de los sueros chagásicos contra la proteína P2 (el12') de *A. salina* se analizó por ELISA empleando el péptido C22, sintetizado a partir de la secuencia de los 22 aminoácidos C-terminales de dicha proteína (Elkon y col., 1986).

C22 (<i>A. salina</i>)	KKEEKKEESEEEDEDMGFGLFD
R13 (<i>T. cruzi</i>)	EEDEDMGFGLFD

Se ensayaron 3 sueros chagásicos, junto con 3 controles normales y uno lúpico (anti-P+). En la fig. 27 se muestran los niveles de anticuerpos contra este péptido, en comparación con los valores anti-R13 y anti-P2 humana. Como se puede observar, las reactividades de los sueros chagásicos contra C22 fueron elevadas y comparables a las obtenidas con el péptido R13, mientras que los niveles de anticuerpos anti-P2 humana de estos sueros fueron significativamente menores. El suero lúpico reaccionó por igual con los tres antígenos.

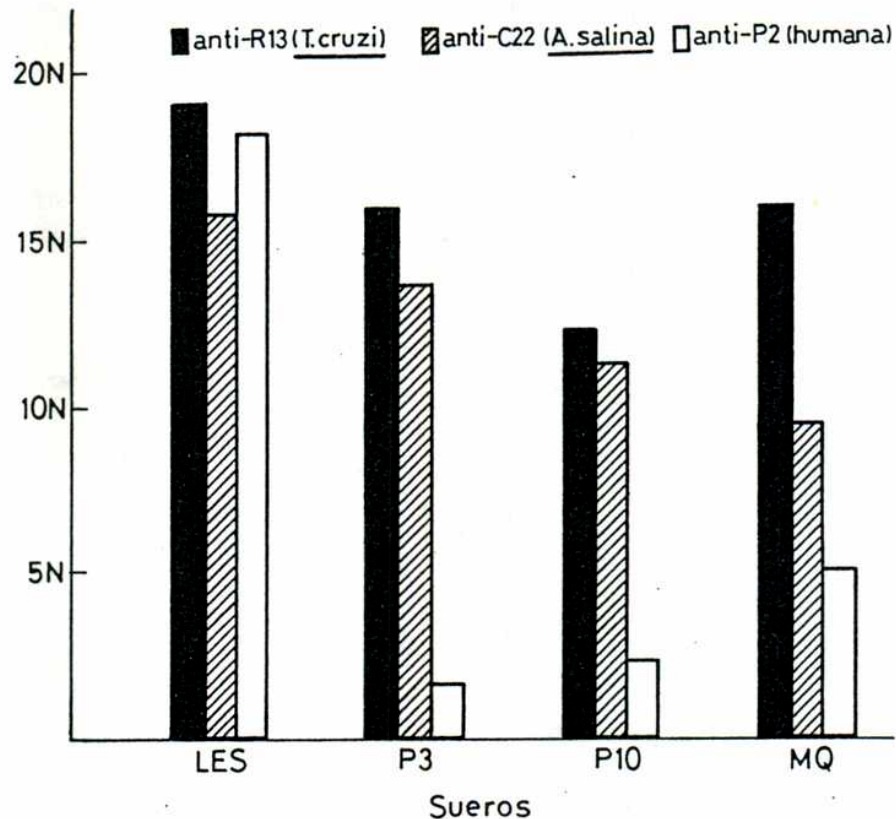


Figura 27:

Reacción cruzada de los sueros chagásicos con el extremo C-terminal de la proteína P2 de *Artemia salina*. Las barras indican la reactividad de los sueros chagásicos (P3, P10 y MQ) y de un suero lúpico anti-P+ (LES), con los péptidos sintéticos R13 (EEEDDDMGFGLFD) y C22 (KKEEKKEESEEEDEDMGFGLFD), y con la proteína recombinante P2 humana. Los sueros (dil. 1:50) se ensayaron por ELISA y los valores obtenidos se expresaron como n veces la DO₄₉₀ promedio medida para 4 controles sanos (N).

3.13) REACCION CRUZADA DE LOS SUEROS CHAGASICOS CRONICOS CON EL PEPTIDO SINTETICO H13:

Para demostrar fehacientemente que la débil autorreactividad anti-P presentada por los sueros chagásicos es consecuencia del cambio no conservativo ExS, se sintetizó un péptido, H13, correspondiente a la secuencia de los 13 aa C-terminales de las proteínas P1/P2 humanas:

R13 (<i>T. cruzi</i>)	EEEDDDMGFGLFD
H13 (P1/P2 humanas)	EESDDDMGFGLFD

La reactividad contra estos péptidos se determinó por ELISA para 13 sueros chagásicos, 3 sueros lúpicos anti P+ y 10 sueros normales. Como se observa en la fig. 28, todos los sueros chagásicos reaccionaron fuertemente con R13 mientras que mostraron una baja reactividad anti-H13. Como control de la experiencia, los sueros lúpicos reaccionaron con ambos péptidos con igual intensidad.

Los resultados presentados en 3.12 y 3.13 demuestran el papel fundamental del residuo C-11 (E) en la reacción de los sueros chagásicos crónicos con el péptido R13 y explicarían la baja autorreactividad anti-P presentada por estos sueros.

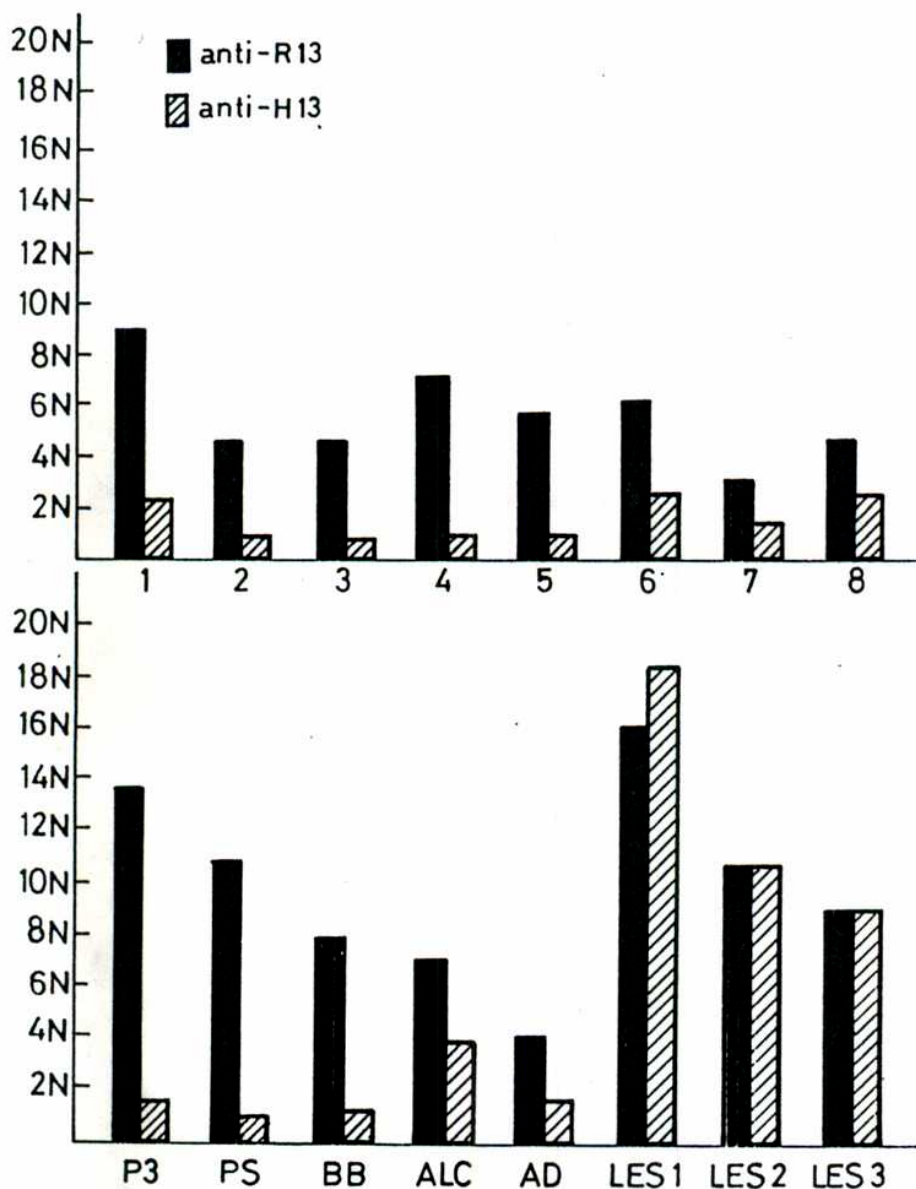


Figura 28:

Reacción cruzada de los sueros chagásicos con los 13 aa C-terminales de las proteínas P1/P2 humanas (H13). Las barras indican la reactividad de los sueros chagásicos (1-8, P3, PS, AD y BB) y lúpicos anti-P+ (LES1-3), con los péptidos sintéticos R13 (EEEDD-DMGFGLFD) y H13 (EESDDDMGFGLFD). Los sueros (dil. 1:100) se ensayaron por ELISA y los valores obtenidos se expresaron como n veces la DO490 promedio medida para 10 controles sanos.

4. DISCUSSION

Una de las características más llamativas de la cardiopatía chagásica crónica es la falta de correlación entre el número de parásitos detectados en los tejidos lesionados y la severidad de la miocarditis (Rosenbaum, 1964; Morris y col., 1990). Estas observaciones, junto con la existencia de un largo período latente que precede al daño tisular, llevaron a postular la hipótesis de un mecanismo autoinmune como una posible explicación de la patogénesis de la enfermedad. Debido a la falta de pruebas directas que demuestren la capacidad de los sueros y/o células inmunes de pacientes chagásicos de reconocer antígenos propios, el concepto de autoinmunidad en la enfermedad de Chagas continúa siendo un tema de controversia.

Para contribuir al esclarecimiento de la postulada naturaleza autoinmune de la cardiopatía chagásica crónica, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos generales: 1) investigar la existencia de autoanticuerpos en sueros chagásicos crónicos, 2) caracterizar molecularmente alguno(s) de los antígenos reconocidos por estos autoanticuerpos, y 3) estudiar la asociación entre los niveles de estos autoanticuerpos y la severidad de la cardiopatía.

Si bien el concepto de autoinmunidad en la enfermedad de Chagas fue sugerido hace muchos años (Torres, 1941; Muniz y Azevedo, 1947), sólo a partir de 1974 comenzaron a publicarse resultados tendientes a demostrar su existencia. Estos trabajos reúnen básicamente dos tipos de evidencias. Por una parte, aquellos que prueban la existencia de epitopes compartidos por proteínas del parásito y del huésped (Sadigursky y col., 1982; Wood y col., 1982; Snary y col., 1983; Van Vooris y Eisen, 1989), y por otra, aquellos que muestran la reactividad de los sueros y células inmunes de pacientes con tejidos heterólogos (Cossio y col., 1974; Szarfman y col., 1982; Acosta y col., 1983; Borda y col., 1984; Avila y col., 1986). Sin embargo, trabajos posteriores probaron

(por ej., en el caso de las reactividades anti-EVI y anti-lamina) que los sueros de pacientes eran incapaces de reaccionar con las proteínas análogas humanas (Khoury y col., 1983; Gazzinelli y col., 1988).

En este trabajo se confirmó la reactividad heteróloga de algunos sueros chagásicos crónicos mediante la técnica de Western blot. En particular, el suero WL reconoció varias bandas de miocardio murino (fig. 2, A). Sólo algunas de ellas fueron eliminadas por preincubación con un extracto total de *T. cruzi* (fig. 2, B). Esto indicó que la reacción con algunos antígenos miocárdicos podría deberse a la existencia de epitopes compartidos por proteínas del parásito y de miocardio de ratón. Cabe mencionar que los sueros humanos normales reaccionaron con los diferentes extractos de ratón, demostrando una elevada reactividad heteróloga. Sin embargo, los sueros positivos en las experiencias con sistemas heterólogos (chagásicos y normales) no reaccionaron con proteínas de miocardio humano (tabla V, Ap. I). Esto descartó la posibilidad de que las reactividades heterólogas observadas se debieran a la presencia de verdaderos autoanticuerpos.

Estos resultados, junto con los trabajos de Khoury y col. (1983) y Gazzinelli y col. (1988) nos llevaron a abandonar el empleo de modelos heterólogos para demostrar la existencia de autoanticuerpos en la enfermedad de Chagas crónica.

Como una aproximación al empleo de sistemas homólogos, se analizó la reactividad de los sueros chagásicos crónicos contra diferentes autoantígenos definidos para enfermedades autoinmunes: proteínas del citoesqueleto, ADN, y proteínas nucleares (La, RNP, Ro y Sm).

Los anticuerpos anti-proteínas del citoesqueleto (anti-PC) son considerados "autoanticuerpos naturales", ya que constituyen una fracción importante de las Igs circulantes de sueros humanos nor-

males (Guilbert y col., 1982). La presencia de altos niveles de anticuerpos anti-actina (act), anti-miosina (mios) y anti-tubulina (tub) está asociada, sin embargo, a diferentes enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoidea, hepatitis crónica activa, cirrosis biliar primaria, "injerto vs. huésped" (graft vs. host) y enfermedad mixta del tejido conectivo (Smith y Steinberg, 1983; Dighiero y col., 1987; Dighiero y col., 1990), y algunas parasitosis, como leishmaniasis visceral (Howard y Miles, 1986). Estas reactividades son detectadas en el diagnóstico por ELISA con proteínas purificadas de diversos orígenes (murino, bovino) (Dighiero y col., 1990).

En el presente trabajo encontramos que un alto porcentaje de los sueros chagásicos crónicos ensayados fue positivo para estas reacciones (64% para anti-act, 33% para anti-mios, y 67% para anti-tub) (fig. 3). Los valores obtenidos fueron significativamente menores que los presentados por los controles positivos y no mostraron asociación con la severidad de la cardiopatía ni con los títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* (tablas II y IV, Ap. I). Como estas proteínas estructurales están muy conservadas en todas las especies eucariontes, la reactividad anti-PC presentada por los sueros chagásicos podría deberse a 1) la existencia de verdaderos autoanticuerpos capaces de reconocer epitopes presentes tanto en las PC murinas como en las humanas, 2) una reacción cruzada entre epitopes compartidos sólo por las PC murinas y de *T. cruzi* (como en el caso de la reactividad heteróloga observada para laminina murina (Gazzinelli y col., 1988)), y/o 3) la existencia de altos niveles de autoanticuerpos naturales en algunos sueros chagásicos. En base a nuestros resultados no podemos concluir cuál de estas hipótesis es la correcta; sin embargo, la falta de correlación entre los niveles de estos anticuerpos y los títulos anti-*T. cruzi* descartaría la segunda de ellas.

Otro tipo de autoanticuerpos descritos en enfermedades autoinmunes son los anticuerpos anti-ADN nativo (ADNn) y anti-ADN desnaturalizado (ADNd). Los anticuerpos anti-ADNn son considerados

marcadores específicos de lupus eritematoso sistémico (LES) (Tan y col., 1988). Por el contrario, los anticuerpos anti-ADNd han sido detectados en diversas enfermedades, tales como cirrosis biliar primaria, artritis reumatoidea, glomerulonefritis crónica, hepatitis crónica activa, leishmaniasis visceral, lepra, malaria y tripanosomiasis africana, así como en algunos individuos sanos (Koffler y col., 1969; Lindsley y col., 1974; Bonfa y col., 1987; Argov y col., 1989). En nuestras experiencias, el 30% de los sueros chagásicos estudiados fue positivo para ambas reacciones (fig. 3). Como en el caso de los anticuerpos anti-PC, los niveles medidos no se correlacionaron con los títulos anti-*T. cruzi* ni con el cuadro clínico de los pacientes (tablas II y IV, Ap. I). Debido a la alta especificidad de la reactividad anti-ADNn para LES, llamó la atención encontrar sueros chagásicos positivos. Sin embargo, la validez de este hallazgo debe ser confirmada, ya que algunos ejemplos demostraron que la reacción anti-ADNn descrita en otras enfermedades (distintas de LES), era debida a una contaminación de la preparación de ADNn con ADNd (Tan y col., 1988).

La detección de anticuerpos anti-La, anti-RNP, anti-Ro y anti-Sm también es utilizada en el diagnóstico y la clasificación de pacientes con enfermedades autoinmunes (Tan y col., 1988). Los métodos empleados comúnmente son la contrainmunolectroforesis (CIE) y el Western blot (WB). Si bien en éstos se usan extractos de tejidos heterólogos (timo de ternera, bazo de perro), la validez de su empleo fue confirmada por experiencias que demostraron la reacción de los sueros positivos con los antígenos análogos humanos (Elkon y Culhane, 1984; Combe y col., 1989).

Todos los sueros chagásicos ensayados por ambas técnicas en este estudio fueron negativos para las reactividades mencionadas (figs. 4, 5 y 6). Además, estos sueros tampoco reaccionaron con las proteínas recombinantes Ro y La humanas (experiencias de WB y ELISA no presentadas). Resultados similares se informaron para lepra y malaria. Ninguno de los sueros analizados por WB y CIE

presentó anticuerpos con estas especificidades (Bonfa y col., 1987). Por el contrario, Argov y col. (1989) empleando proteínas recombinantes, detectaron por ELISA altos niveles de anticuerpos anti-La, anti-RNP, anti-Ro y anti-Sm en sueros de pacientes con leishmaniasis visceral.

Para continuar la búsqueda de autoanticuerpos en los sueros chagásicos, fue imprescindible probar su capacidad de reaccionar con proteínas humanas. Esta se analizó por inmunofluorescencia indirecta (IF) sobre células HEp2 y por Western blot (WB) con extractos de células HeLa, músculo esquelético y miocardio humanos.

La IF es un método de detección de autoanticuerpos muy empleado en el diagnóstico y aunque no brinda información sobre las especificidades involucradas en la reacción, ciertos patrones de inmunofluorescencia suelen asociarse a determinadas enfermedades autoinmunes (Whittingham y McNeilage, 1988). Por el contrario, el WB es una técnica altamente sensible que permite la identificación de los antígenos detectados. Cuando los sueros chagásicos analizados en este trabajo se ensayaron por IF, todos resultaron negativos, aunque algunos mostraron patrones de tipo fibrilar muy tenues probablemente debidos a la presencia de anticuerpos anti-proteínas del citoesqueleto (3.2.3.). Este patrón es frecuentemente observado en diversas enfermedades e inclusive en algunos individuos sanos (Bonfa, E., comunicación personal). Por el contrario, para malaria y lepra se detectaron patrones de tinción semejantes a los descritos para enfermedades autoinmunes (Bonfa y col., 1987).

Por WB, algunos sueros chagásicos reaccionaron con tejidos homólogos. Los perfiles de reacción variaron de paciente en paciente, y ninguna de las bandas reveladas coincidió, en PM, con los autoantígenos descritos en enfermedades autoinmunes (figs. 4, 5 y 6). Resultados similares se informaron para malaria y lepra (Bonfa y col., 1987).

La falta de correlación entre los títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* de los sueros chagásicos y las reactividades detectadas mediante las técnicas arriba mencionadas (tabla V, Ap. I), indica que éstas no se originarían por reacción cruzada entre epitopes compartidos por el parásito y el huésped. Además, tampoco se encontró asociación entre los patrones de reacción y la severidad de la cardiopatía (tabla V, Ap. I), cuestionando el papel de estos autoanticuerpos en la etiología de la enfermedad.

En conclusión, los resultados discutidos anteriormente demuestran que existen autoanticuerpos en los sueros de algunos pacientes chagásicos crónicos y que estas autorreactividades no están asociadas a la patología. Sin embargo, no fue posible identificar los autoantígenos involucrados en estas reacciones. La disponibilidad en el laboratorio del antígeno recombinante JL5 y su caracterización, permitieron el análisis molecular de una posible respuesta autoinmune en la infección chagásica.

JL5 es un antígeno recombinante de *T. cruzi* reconocido predominantemente por sueros de pacientes con cardiopatía chagásica crónica (Levin y col., 1989). La secuencia de este polipéptido, junto con otras evidencias experimentales sugerían que era parte de una proteína ribosomal P de *T. cruzi* (Levin y col., 1989). En particular, el extremo C-terminal de JL5 reveló una alta homología (más del 90%) con la misma región de las proteínas ribosomales P humanas, definida como epitope P en lupus eritematoso sistémico (Elkon y col., 1986). El objetivo específico de esta etapa del trabajo fue demostrar la naturaleza autoinmune de los anticuerpos dirigidos contra las proteínas ribosomales P del parásito. Para esto fue necesario confirmar primero la identidad ribosomal P de JL5 y caracterizar el sistema ribosomal P de *T. cruzi*.

En primer lugar, se demostró una elevada reactividad de los sueros de pacientes chagásicos con la mayoría de las proteínas ribosomales de *T. cruzi*, indicando que a pesar de su localización citoplasmática, los ribosomas del parásito son muy antigénicos (fig. 7, A). Los anticuerpos anti-JL5 de estos sueros reconocieron, en cambio, sólo 3 ó 4 polipéptidos de la fracción ribosomal (fig. 7, B). Varias evidencias indicaron que estas proteínas correspondían al sistema ribosomal P de *T. cruzi*: 1) fueron detectadas sólo en la fracción ribosomal del parásito (3.3), 2) sus PM (38, 19 y 14-15 kDa) son similares a los informados para los diferentes sistemas P (Vidales y col., 1981; Towbin y col., 1982; Elkon y col., 1985; Francoeur y col., 1985), 3) el suero policlonal anti-JL5 de conejo reconoció específicamente el doblete de 14-15 kDa, 4) los pI determinados para los polipéptidos de 19 y 14-15 kDa (5,3-5,7) están en el rango descrito para las proteínas P análogas (Vidales y col., 1981; Elkon y col., 1985), y 5) fueron reconocidas por los sueros lúpicos anti-P+ (con excepción de la proteína de 38 kDa).

Si bien estos resultados demostraron la existencia de un sistema ribosomal P en *T. cruzi* semejante a los descritos en otras especies, cabe destacar algunas diferencias. En primer lugar, los PM determinados para las proteínas ribosomales P del parásito no son idénticos a los informados para las humanas. Vidales y col. (1981) observaron una relación directa entre el tamaño de las proteínas P1 y P2 y la posición filogenética de las especies en las que fueron estudiadas. Esta observación no es válida para *T. cruzi*, ya que el polipéptido de 19 kDa es mayor y el doblete de 14-15 kDa es menor que las proteínas P1 y P2 humanas, respectivamente (fig. 7, C). En segundo lugar, cuando el sistema ribosomal P es analizado por electroforesis tanto uni como bidimensional, la proteína P2 humana (y las análogas de otras especies) se revela como una única banda (Vidales y col., 1981; Elkon y col., 1985). En *T. cruzi*, en cambio, además del polipéptido de 19 kDa, existe un doblete de 14-15 kDa que por electroforesis bidimen-

sional se resuelve en dos manchas principales y 4 ó 5 menos intensas (fig. 8). Finalmente, los anticuerpos anti-JL5 de algunos sueros chagásicos no reaccionaron con la proteína p38 del parásito (fig. 7, B). Este polipéptido tampoco fue reconocido por los sueros lúpicos anti-P+ (fig. 7, C), sugiriendo que debía presentar diferencias en su extremo C-terminal con las proteínas ribosomales P0 de otras especies. La caracterización genética de otro antígeno recombinante de *T. cruzi*, JL52, realizada recientemente en nuestro laboratorio, parece corroborar esta hipótesis. Varias evidencias demostraron que este antígeno era parte de la proteína ribosomal P0 del parásito (datos no presentados). Su secuencia mostró que existen diferencias importantes con las otras P0 conocidas. Efectivamente, JL52 no posee en el extremo C-terminal la secuencia consenso que caracteriza a las proteínas ribosomales P (Schijman, A., comunicación personal).

C-11 JL5 (*T. cruzi*): EDDDMGFGLFD

C-11 JL52 (*T. cruzi*): DDDDFGMGALF

C-11 P1/P2 (humanas): SDDDMGFGLFD

Con respecto a la naturaleza autorreactiva de los anticuerpos dirigidos contra las proteínas P del parásito, se demostró la capacidad de los anticuerpos anti-JL5 de sueros de pacientes chagásicos de reaccionar con las proteínas ribosomales P humanas. Estos anticuerpos reconocieron una banda de 17 kDa cuando se enfrentaron a ribosomas de células HeLa por Western blot (fig. 11, calle 2). La inhibición de esta reacción con la proteína recombinante A1 demostró que esta reactividad era debida a la existencia de epitope(s) compartidos por las proteínas P humanas y los 15 aa C-terminales de JL5 (fig. 11, calle 3). Cabe notar que en esta experiencia los anticuerpos anti-JL5 no reconocieron las restantes proteínas P (fig. 11, calle 2). La dificultad para visualizar ambas proteínas, P1 y P2, pudo deberse a características propias del sistema, ya que el suero lúpico anti-P+ empleado como control sólo reveló la banda de 17 kDa (fig. 11, calle 1). Los anticuer-

pos anti-JL5 detectaron, sin embargo, las proteínas recombinantes P1 y P2 humanas por Western blot, confirmando su capacidad de reaccionar en forma cruzada con estos polipéptidos (fig. 12, B). La falta de reacción de estos anticuerpos con la proteína P0 humana es más difícil de explicar, ya que la única diferencia que presenta este polipéptido con respecto a las proteínas P1 y P2 humanas, a nivel de la secuencia del epitope P, es un cambio de aminoácidos conservativo (ExD) (Rich y Steitz, 1987).

C-11 P1/P2 (humanas): SDDDMGFGLFD

C-11 P0 (humana): SDDEMGFGLFD

A pesar de haberse demostrado la autorreactividad de los anticuerpos anti-JL5, ésta fue detectable sólo cuando estos anticuerpos se concentraron por inmunoselección. Efectivamente, los sueros chagásicos crónicos, aún a bajas diluciones, fueron negativos cuando se enfrentaron tanto a ribosomas de HeLa como a las proteínas recombinantes P1 y P2 humanas (3.5.1). Además, ninguno mostró un patrón de inmunofluorescencia comparable al de un suero lúpico anti-P+ (3.2.3). Estos resultados indicaban que los anticuerpos capaces de reaccionar en forma cruzada con las proteínas ribosomales P humanas estaban presentes en bajas concentraciones en los sueros chagásicos crónicos. Esto no se correlacionaba con las elevadas actividades anti-JL5 de estos sueros. Como esta diferencia podía deberse a la existencia de epitopes adicionales en la proteína recombinante, fue necesario caracterizar más detalladamente la respuesta humoral de los pacientes chagásicos contra JL5 y en particular contra su extremo C-terminal. En el presente trabajo se demostró que la reactividad anti-JL5 de los sueros analizados está restringida a los 13 aa C-terminales de este polipéptido (3.11). Esta secuencia, R13, había sido definida como un epitope lineal de JL5 en la infección chagásica (Mesri y col., 1990). Esto fue corroborado en el presente trabajo para un mayor número de sueros (n=50). El 60% de los sueros chagásicos analizados fue positivo para la reacción contra el péptido R13, medida

por ELISA, alcanzando en algunos casos altos niveles, comparables a los presentados por los lúpicos anti-P+ (fig. 15). Estas elevadas actividades anti-R13 no se correlacionaban con la capacidad autorreactiva anti-P de los sueros chagásicos, que como se mencionó anteriormente, era baja. Mientras los sueros lúpicos presentaron actividades anti-P humanas elevadas, los sueros chagásicos con niveles de anticuerpos anti-R13 similares a los de dichos sueros lúpicos, mostraron una débil autorreactividad (3.5). Para resolver esta contradicción se realizaron experiencias tendientes a comparar los epitopes definidos en R13 por los sueros chagásicos y lúpicos anti-P+. Estas demostraron que los sueros chagásicos reconocen tanto los 7 aa C-terminales de R13 como los 6 aa restantes de esta secuencia. Sin embargo, la reactividad máxima sólo se obtiene con el péptido R13 completo. Por el contrario, la respuesta de los sueros lúpicos parece estar dirigida contra el extremo más C-terminal y no contra los 6 aa N-terminales de R13 (3.11.4).

R13 (*T. cruzi*): EEEDDDMGFGLFD
 I6 (*T. cruzi*): EEEDDD
 R7 (*T. cruzi*): MGFGLFD

Por otra parte, experiencias realizadas recientemente en nuestro laboratorio con el péptido sintético R11 (EDDDMGFGLFD), indicaron que el epitope reconocido por los sueros chagásicos estaba definido por R13 y no por R11 (datos no presentados). Estos resultados señalan otra característica distintiva de la respuesta anti-R13 de los pacientes chagásicos, ya que para los sueros lúpicos anti P+, el epitope está definido por los 11 aa C-terminales tanto de R13 (datos no presentados) como de las proteínas ribosomales P humanas (Elkon y col., 1988).

La única diferencia entre R13 y la secuencia de los 13 aa C-terminales de las proteínas ribosomales P humanas es una sustitución (ExS) en posición C-11:

R13 (JL5, *T. cruzi*): EEEDDDMGFGLFD
H13 (P1/P2, humanas): EESDDDMGFGLFD

Nuestras experiencias demostraron que el residuo glutámico (E) en esa posición desempeña un papel fundamental en la antigenicidad de R13 en la infección chagásica (3.12 y 3.13). Efectivamente, mientras los sueros chagásicos reconocieron débilmente la proteína recombinante P2 humana, reaccionaron fuertemente tanto con R13 como con C22, péptido correspondiente al extremo C-terminal de la proteína P2 de *A. salina*, que posee un residuo glutámico en dicha posición (fig. 27). La importancia del cambio no conservativo (ExS) en la autorreactividad anti-P de los sueros chagásicos, también fue demostrada empleando el péptido sintético H13, correspondiente a los 13 aa C-terminales de las proteínas P1 y P2 humanas. Mientras los sueros chagásicos presentaron altos niveles de anticuerpos anti-R13, reaccionaron débilmente con H13, confirmando que la baja autorreactividad anti-P de los sueros chagásicos crónicos era debida exclusivamente al cambio de aminoácidos mencionado. Probablemente esta característica presentada por el extremo C-terminal de las proteínas P de *T. cruzi* explique las bajas reactividades anti-R13 detectadas en otras parasitosis (leishmaniasis, malaria y tripanosomiasis africana) (fig. 15). Esta hipótesis es meramente especulativa puesto que no existe información en la literatura sobre la secuencia de estas proteínas en dichos parásitos.

En base a todos estos datos experimentales podemos concluir que el extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* es altamente antigénico en la infección chagásica, y que una fracción de los anticuerpos dirigidos contra esta región es capaz de reaccionar en forma cruzada con las proteínas P humanas.

Experimentos previos de nuestro laboratorio habían demostrado la alta reactividad de los sueros de pacientes con cardiopatía chagásica severa con el antígeno recombinante JL5 (Levin y col., 1989). El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron, en particular, una asociación entre la existencia de altos niveles de anticuerpos anti-R13 y las formas más severas de la cardiopatía chagásica (severo compromiso miocárdico y franco deterioro de la función ventricular). Aún más, los niveles de estos anticuerpos fueron más elevados en los casos de miocarditis activa demostrada por biopsia endomiocárdica. Aunque el valor de este hallazgo debe ser confirmado con un mayor número de sueros, esta asociación sugiere que estos anticuerpos serían marcadores de daño miocárdico y podrían emplearse en el pronóstico de las formas leves y moderadas de la cardiopatía, cuya caracterización clínica es más compleja (Schejtman y col., 1990).

A pesar de haberse demostrado la correlación entre los niveles de anticuerpos anti-R13 y la inflamación miocárdica activa, no tenemos evidencias que sugieran el papel de estos anticuerpos en la patogénesis de la enfermedad. Ruiz y col. (1985) demostraron que la inmunización de ratones con la fracción ribosomal de *T. cruzi* inducía una miocarditis severa en los animales. Más recientemente se detectó un gran número de células B productoras de anticuerpos anti-R13 en el corazón de ratones infectados crónicamente (Cabeza Meckert y col., manuscrito en preparación). Aunque estas evidencias indican una relación entre las proteínas ribosomales del parásito, R13 y la cardiopatía, ésta debe ser demostrada con pruebas más directas (por ej., aparición de la cardiopatía por inoculación del péptido R13 y/o de los anticuerpos anti-R13 en modelos experimentales como ratón, perro o mono).

En conclusión, los resultados presentados en este trabajo constituyen la primera evidencia directa del papel desempeñado por mecanismos de mimetismo molecular ("molecular mimicry") en la generación de autoanticuerpos en la enfermedad de Chagas crónica: 1) los anticuerpos anti-JL5 de los sueros chagásicos son capaces de reconocer a las proteínas ribosomales P del parásito y humanas, 2) los epitopes definidos en ambas han sido bien caracterizados y comparten más del 90% de homología, 3) existe una correlación positiva entre los niveles de anticuerpos anti-R13 y los títulos anti-*T. cruzi* y los perfiles isotípicos son similares para ambas respuestas, y 4) la respuesta anti-R13 es altamente específica para la infección chagásica.

Desafortunadamente, muchos de los parámetros considerados se determinaron para la respuesta anti-R13 y no para los autoanticuerpos *per se* (anti-H13), los cuales representan tan sólo una fracción de los anticuerpos anti-R13. Por lo tanto, para confirmar que la autorreactividad anti-P es originada por un mecanismo dirigido por las proteínas P del parásito, así como para determinar su asociación con la patología chagásica, es necesario profundizar, de aquí en más, el análisis de la respuesta autoinmune utilizando los diferentes péptidos sintéticos correspondientes a la secuencia de las proteínas P humanas.

5. CONCLUSIONES

1) Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten descartar el empleo de sistemas heterólogos para el estudio de la autoinmunidad humoral en la enfermedad de Chagas crónica.

2) Las experiencias con tejidos homólogos demuestran la existencia de autoanticuerpos en los sueros de algunos pacientes chagásicos, detectables por Western blot. Estas autorreactividades no se correlacionan con la severidad de la cardiopatía ni con la respuesta anti-*T. cruzi*. Los antígenos reconocidos por estos autoanticuerpos son diferentes, al menos en PM, a los definidos por los sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes.

3) Cuando los sueros de pacientes chagásicos crónicos son ensayados por los métodos corrientes de diagnóstico de enfermedades autoinmunes, resultan negativos para las reactividades anti-La, anti-RNP, anti-Ro y anti-Sm, y no muestran patrones de inmunofluorescencia celular comparables a los presentados por los sueros autoinmunes controles. Por el contrario, se detectan en algunos sueros chagásicos anticuerpos anti-ADN, anti-actina, anti-miosina y anti-tubulina. La presencia de estos autoanticuerpos no se correlaciona con la patología ni con los títulos anti-*T. cruzi*.

4) Se demostró que el sistema de proteínas ribosomales P de *T. cruzi* está compuesto por un doblete de 14-15 kDa (pI= 5,3 y 5,7, respectivamente) y polipéptidos de 19 (pI= 5,7) y 38 kDa. Este último presentaría diferencias con respecto a las P0 informadas para otras especies, ya que no es reconocido por los sueros lúpicos anti-P+.

5) Los anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados a partir de sueros de pacientes son capaces de reaccionar en forma cruzada con las proteínas ribosomales P humanas. Como esta reacción fue positiva sólo cuando los anticuerpos anti-JL5 se concentraron por inmunoselección, se deduce que los autoanticuerpos anti-P se encuentran en baja concentración en los sueros chagásicos.

7) La reactividad anti-JL5 de los sueros chagásicos crónicos está definida por la secuencia de los 13 aa C-terminales de la proteína recombinante (R13). El perfil isotípico de la respuesta anti-R13 es predominantemente del tipo IgG1. Los anticuerpos anti-R13 son altamente específicos para la infección chagásica, ya que se detectan con muy baja frecuencia en individuos con otras parasitosis. Los niveles de anticuerpos anti-R13 de los sueros chagásicos se correlacionan moderadamente con la respuesta contra el parásito y son mayores en pacientes con cardiopatía chagásica severa. La comparación de los valores obtenidos para pacientes sometidos a biopsia endomiocárdica, muestra una asociación entre altos niveles de anticuerpos anti-R13 y presencia de miocarditis.

8) Las experiencias con péptidos sintéticos demuestran que los sueros chagásicos reaccionan fuertemente con R13 y que el residuo glutámico en posición C-11 desempeña un papel fundamental en la antigenicidad de este péptido en la infección chagásica. Esta observación explicaría la baja autorreactividad de los sueros chagásicos observada en experiencias de Western blot y ELISA con proteínas ribosomales humanas, ya que en éstas existe un cambio de aminoácidos no conservativo (ExS) en dicha posición.

9) Los resultados obtenidos sugieren que la autorreactividad anti-P de los sueros chagásicos forma parte de la respuesta humoral hacia el parásito. Esta observación, junto con las diferencias encontradas entre los epitopes definidos por sueros chagásicos y lúpicos, demuestran que las respuestas anti-P en estas enfermedades no son semejantes.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abreu Salgado, A. & Pellegrino, J. 1968. Distribuicao geográfica. En: Doença de Chagas, Cancado, R. (Ed.), Belo Horizonte, pp. 143-162.
- Acosta, A.M., Sadigursky, M. & Santos Buch, C.A. 1983. Antistriated muscle antibody activity produced by *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 172: 364-369.
- Acosta, A.M. & Santos Buch, C.A. 1985. Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation* 71: 1255-1261.
- Affranchino, J.L., Ibañez, C.F., Luquetti, A.O., Rassi, A., Reyes, M.B., Macina, R.A., Aslund, L., Petterson, U. & Frach, A.C.C. 1989. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34: 221-228.
- Alves, M.J.M., Abuin, G., Kuwajima, V.Y. & Colli, W. 1986. partial inhibition of trypomastigotes entry and into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21: 75-82.
- Amado Neto, V. 1968. Transmissao por transfusao de sangue. En Doença de Chagas, Cancado, R. (Ed.), Belo Horizonte, pp. 130-142.
- Amorim, D.S., Eckhardt, G. & Olsen, J. 1982. Assessment of heart neurons in dilated (congestive) cardiomyopathy. *Br. Heart J.* 47: 11-12.
- Andrade, Z. & Andrade, S. 1979. Patología. En: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Brener, Z. & Andrade, Z. (eds.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 199-248.

- Argov, S., Jaffe, C.L., Krupp, M., Slor, H. & Shoenfeld, Y. 1989. Autoantibody production by patients infected with *Leishmania*. *Clin. Exp. Immunol.* 76: 190-197.
- Avila, J.L., Rojas, M., Velázquez Avila, G., Von der Mark, H. & Timpl, R. 1986. Antibodies to basement membrane protein nidogen in Chagas' disease and American cutaneous leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 24: 775-778.
- Barboza Jr, A. & Andrade, Z. 1984. Identificacao do *Trypanosoma cruzi* nos tecidos extra-cardíacos de portadores de miocardite crônica chagásica. *Rev. Bras. Med. Trop.* 17: 123-126.
- Bonfa, E. & Elkon, K. 1986. Clinical and serologic associations of the antiribosomal P protein antibody. *Arthritis Rheum.* 29: 981-985.
- Bonfa, E., Llovet, R., Scheinberg, M., de Souza, M. & Elkon, K.B. 1987. Comparison between autoantibodies in malaria and leprosy with lupus. *Clin. Exp. Immunol.* 70: 529-537.
- Bonfa, E., Llovet, R. & Elkon, K.B. 1988. Immunoblot analysis of IgG subclasses of multiple lupus autoantibodies. *J. Immunol.* 140: 2231-2236.
- Borda, E., Pascual, J., Cossio, P.; de la Vega, M., Arana, R. & Sterin-Borda, L. 1984. A circulating IgG in Chagas' disease wich binds to β -adrenoreceptors of myocardium and modulates their activity. *Clin. Exp. Immunol.* 57: 679-686.
- Boschetti, M.A., Piras, M. N., Henriquez, D. & Piras, R. 1987. The interaction of a *Trypanosoma cruzi* protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24: 175-184. μ

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brener, Z. 1979. O parasito: relacoes hospedeiro-parasito. En *Trypanosoma cruzi e Doenca de Chagas*. Brener, Z. & Andrade, Z. (eds.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 1-41.
- Brener, Z. 1980. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.* 18: 247-292.
- Brener, Z. 1990. Conferencia: Situación actual de la terapéutica específica de la Enfermedad de Chagas. III Congreso Argentino de Protozoología y Reunión sobre Enfermedad de Chagas. Buenos Aires, 17-20 de noviembre.
- Cabeza Meckert, P., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Chambó, J., Levin, M. & Laguens, R. 1991. *Trypanosoma cruzi*: aberrant expression of class II major histocompatibility complex molecules in skeletal and heart muscle cells of chronically infected mice. *Exp. Parasitol.* 72: 8-14.
- Combe, B., Rucheton, M., Graafland, H., Lussiez, V., Brunel, C. & Sany, J. 1989. Clinical significance of anti-RNP and anti-Sm autoantibodies as determined by immunoblotting and immunoprecipitation in sera from patients with connective tissue diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 75: 18-24.
- Cossio, P.M., Diez, C., Szarfman, A., Kreutzer, E., Candiolo, B. & Arana, R.M. 1974. Chagasic cardiopathy: demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* 49: 13-21.

- Cossio, P.M., Bustuoabad, O., Paterno, E., Iotti, R., Casanova, M.B., Podestá, M.R., Arana, R.M. & Pasqualini, C.D. 1984. Experimental myocarditis induced in Swiss mice by homologous heart immunization resembles chronic experimental Chagas' disease. *Clin. Exp. Immunol.* 33: 165-175.
- Cotrim, P.C., Paranhos, G.S., Mortara, R.A., Wanderley, J., Rassi, A., Camargo, M.E. & Franco Da Silveira, J. 1990. Expression in *Escherichia coli* of a dominant immunogen of *Trypanosoma cruzi* recognized by human chagasic sera. *J. Clin. Microbiol.* 28: 519-524.
- Chagas, C. 1909. Nova tripanosomíase humana. Estudos sôbre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schyzotrypanum cruzi* N. Gen., N. sp., o agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Chagas, C. 1911. Moléstia de Chagas ou tiroidite parasitária. Nova doença humana transmitida pelo "barbeiro". Segunda Conferência na Academia Nacional de Medicina. Tipogr. Leuzinger (Rio de Janeiro).
- Chiale, P.A. & Rosenbaum, M.B. 1989. Clinical and pharmacological characterization and treatment of potentially malignant arrhythmias of chronic chagasic cardiomiopathy. En: *Handbook of experimental pharmacology*; vol. 89. Vaughan Williams, E.M. & Campbell, T.J. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- Damian, R. 1964. Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am. Naturalist.* 98: 129-149.
- Dao, L. 1948. Otros casos de Enfermedad de Chagas en el Estado de Evarico (Venezuela). Formas agudas y crónicas. Observación sobre enfermedad de Chagas congénita. *Rev. Policl. Caracas*, 17: 17-32.

- Dávila, D.F., Rossel, R.O. & Donis, J.H. 1989. Cardiac parasympathetic abnormalities: cause or consequence of Chagas' heart disease?. *Parasitol. Today* 5: 327-329.
- De Arruda, M.V., Colli, W. & Zingales, B. 1989. Terminal β -D-galactofuranosyl epitopes recognized by antibodies that inhibit *Trypanosoma cruzi* internalization into mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 182: 413-421.
- Dighiero, G., Intrator, L., Cordonnier, C., Tortevoeye, P. & Venaut, J.P. 1987. High levels of anti-cytoskeleton autoantibodies are frequently associated with chronic GVHD. *Brit. J. Haematol.* 67: 301-305.
- Dighiero, G., Lymberi, P., Monot, C. & Abuaf, N. 1990. Sera with high levels of anti-smooth muscle and anti-mitochondrial antibodies frequently bind to cytoskeleton proteins. *Clin. Exp. Immunol.* 82: 52-56.
- D'Imperio Lima, M.R., Joskowicz, M., Coutinho, A., Kipnis, T. & Eisen, H. 1985. Very large and isotipically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Immunol.* 15: 201-203.
- D'Imperio Lima, M.R., Eisen, H., Minoprio, P., Joskowicz, M. & Coutinho, A. 1986. Persistence of polyclonal activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* 137: 353-356.
- Elkon, K. & Culhane, L. 1984. Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with the sicca syndrome and lupus erythematosus. *J. Immunol.* 132: 2350-2356.

- Elkon, K.B., Parnassa, A.P. & Lee Foster, C. 1985. Lupus auto-antibodies target ribosomal P proteins. *J. Exp. Med.* 162: 459-471.
- Elkon, K., Skelly, S., Parnassa, A., Moller, W., Danho, W., Weissbach, H. & Brot, N. 1986. Identification and chemical synthesis of a ribosomal protein antigenic determinant in systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 7419-7423.
- Elkon, K., Bonfa, E., Llovet, R., Danho, W., Weissbach, H. & Brot, N. 1988. Properties of the ribosomal P2 protein auto-antigen are similar to those of foreign protein antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5186-5189.
- Francoeur, A.M., Peebles, C.L., Heckman, K.J, Lee, J.C. & Tan, E.M. 1985. Identification of ribosomal protein autoantigens. *J. Immunol.* 135: 2378-2384.
- Gazzinelli, R.T., Galvão Castro, L.M.C., Cardoso, J.E., Romeu Cancado, J., Krettli, A.U., Brener, Z. & Gazzinelli, G. 1988. Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-laminin antibodies in chagasic patients after specific treatment. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1795-1800.
- Guilbert, B., Dighiero, G. & Avrameas, S. 1982. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in normal humans. I. Detection, isolation and characterization. *J. Immunol.* 128: 2779-2787.
- Hall, R., Hyde, J., Goman, M., Simmons, D., Hope, I., Mackay, M., Scaife, J., Merkli, B., Richle, R. & Stocker, J. 1984. Major surface antigen gene of human malaria parasite cloned and expressed in bacteria. *Nature (Lond.)* 311: 379-382.

- Hoft, D.F., Kin, K.S., Otsu, K., Moser, D.R., Yost, W.J., Blumin, J.H., Donelson, J.E. & Kirchhoff, L.V. 1989. *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect. Immun.* 57: 1959-1967.
- Hoare, C.A. 1964. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision and Systematics. *J. Protozool.* 11: 200-207.
- Hontebeyrie-Joskowicz, M., Said, G., Milon, G., Marchal, G. & Eisen, H. 1987. L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur. J. Immunol.* 17: 1027-1033.
- Howard, G.A., Smith, R.L. & Gordon, J. 1976. Chicken liver ribosomes: characterization of cross-reaction and inhibition of some functions by antibodies prepared against *E. coli* ribosomal proteins L7 and L12. *J. Mol. Biol.* 106: 623-637.
- Howard, J. & Rubio, M. 1968. Enfermedad de Chagas congénita. I. Estudio y epidemiología de 30 casos. *Bol. Chil. Parasitol.* 23: 107-112.
- Howard, M.K. & Miles, M.A. 1986. Anti-tubulin antibodies in visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 493-494.
- Hubsch, R.M., Sulzer, A.J. & Kagan, I.G. 1976. Evaluation of an autoimmune type antibody in the sera of patients with Chagas' disease. *J. Parasitol.* 62: 523-527.
- Hudson, L. 1985. Autoimmune phenomena in chronic chagasic cardiopathy. *Parasitol. Today* 1: 6-7.

- Hudson, L. & Hay, F.C. 1989. Antibody interaction with antigen. Counterimmunoelectrophoresis. En: Practical Immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 241-242.
- Huynh, T., Young, R. & Davis, R. 1985. Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11. En: DNA cloning. A practical approach. Vol. I, Cap. 2. D.M. Glover (Ed.). IRL Press, Oxford.
- Ibañez, C.F., Affranchino, J.L., Macina, R.A., Reyes, M.B., Leguizamon, S., Camargo, M.E., Aslund, L., Petterson, U. & Frach, A.C.C. 1988. Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30: 27-38.
- Khoury, E.L., Ritacco, V., Cossio, P.M., Laguens, P., Szarfman, A., Diez, C. & Arana, R.M. 1979. Circulating antibodies to peripheral nerve in American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.* 36: 8-15.
- Khoury, E.L. & Fields, K.L. 1980. Chagas' disease and autoimmunity. *Lancet* 1: 1088.
- Khoury, E.L., Diez, C., Cossio, P.M. & Arana, R.M. 1983. Heterophil nature of EVI antibody in *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Immunol. Immunopath.* 27: 283-288.
- Kierszbaum, F. 1986. Autoimmunity in Chagas' disease. *J. Parasitol.* 72: 201-211.
- Koberle, F. & Nador, E. 1955. Etiologia e patogenia do megaesôfago no Brasil. *Rev. Paul. Med.* 47: 643-661.
- Koberle, F. 1968. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* 6: 63-116.

- Koffler, D., Carr, R.I., Aguello, V., Fiezi, T. & Kunkel, H.G. 1969. Antibodies to polynucleotides: distribution in human serums. *Science* 166: 1648-1649.
- Kraus, R. 1915. Kropf, Kretinismus und die Krankheit Von Chagas. *Wien. Klin. Wschr.* 28: 942-945.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227: 680-685.
- Lafaille, J.J., Linss, J., Krieger, M.A., Souto-Padrón, T., De Souza, W. & Goldenberg, S. 1989. Structure and expresion of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35: 127-136.
- Laguens, R.P., Cabeza Meckert, P., Chambó, G. & Gelpi, R.J. 1981. Chronic Chagas' disease in the mouse. II. Transfer of the heart disease by means of immunocompetent cells. *Medicina (Buenos Aires)* 41: 40-43.
- Laguens, R.P., Cabeza Meckert, P. & Chambó, G. 1988. Antiheart antibody-dependent cytotoxicity in the sera of mice chronicaly infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 56: 993-997.
- Laranja, F.S., Dias, E., Nobrega, G. & Miranda, A. 1956. Chagas' disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation* 14: 1035-1060.
- Lelchuk, R., Dalmaso, A.P., Inglesini, C.L., Alvarez, M. & Cerisola, J.A. 1970. Immunoglobulin studies in serum of patients with American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.* 6: 547-555.

- Levin, M.J., Mesri, E., Benarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Chiale, P., Ruiz, A.M., Kahn, A., Rosenbaum, M., Torres, H.N. & Segura, E.L. 1989. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41: 530-538.
- Levin, M.J., Rossi, R., Levitus, G., Mesri, E., Bonnefoy, S., Kerner, N. & Hontebeyrie-Joskowicz, M. 1990. The cloned C-terminal region of a *Trypanosoma cruzi* P ribosomal protein harbors two antigenic determinants. *Immunol. Lett.* 28: 69-74.
- Levy-Yeyati, P., Bonnefoy, S., Mirkin, G., Kaplan, D., Nigro, F., Lafon, S., Dedet, J.P., González Cappa, E., Hontebeyrie-Joskowicz, M. & Levin, M.J. 1990. The 70 kDa heat shock protein is a major antigen in human *Trypanosoma cruzi*-*Leishmania braziliensis braziliensis* mixed infection. Resumen, VII International Congress of Parasitology, Paris, France.
- Lindsley, H.B., Kysela, S. & Steinberg, A.D. 1974. Nucleic acid antibodies in African trypanosomiasis. Studies in Rhesus monkeys and man. *J. Immunol.* 113: 1921-1927.
- Lisboa Bittencourt, A.C. 1984. Doença de Chagas congênita na Bahia. *Rev. baiana Saúde publ.* 11: 165-208.
- Lowry, O.H., Roseborough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Maasen, J.A., Schop, E.N., Brands, J.H.G.M., Van Hemert, F.J., Leustra, J.A. & Muller, W. 1985. Molecular cloning and analysis of cDNA sequences for the two ribosomal proteins from *Artemia*: the coordinate expression of genes for ribosomal proteins and elongation factor 1 during embryogenesis of *Artemia*. *Eur. J. Biochem.* 149: 609-616.

- Mann, H.B. & Whitney, D.R. 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Statist.* 18: 50-60.
- Mardsen, P.D., Seah, S.K.K., Mot, K.E., Prata, A. & Platt, H. 1970. Immunoglobulins in Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73: 157-161.
- Marston, F.A.O. 1987. The purification of eukaryotic polipeptides expressed in *E. coli*. En: DNA cloning: a practical approach. Vol. III, cap.4. Glover, D.M. (Ed.). IRL Press, Oxford.
- Mazza, S. 1934. Casos agudos benignos de enfermedad de Chagas comprobados en la provincia de Jujuy. *MEPRA* 28: 41-46.
- Mazza, S. 1943. Comprobaciones de *Triatoma platensis*, *Eutriatoma oswaldoi*, *Pastrongylus seai* y *Psamulester coreodes* en la provincia de Santiago del Estero, todas ellas sobre infestación por *T. cruzi*. Otros datos sobre infestación esquizotripanosómica natural silvestre de *Triatoma* infestans. *Prensa Médica Arg.* 30: 1583-1595.
- Mc Cormick, T.S. & Rowland, E.C. 1989. *Trypanosoma cruzi*: cross-reactive anti-heart autoantibodies produced during infection in mice. *Exp. Parasitol.* 69: 393-401.
- Mesri, E. 1990. Clonado y caracterización genética de antígenos de *Trypanosoma cruzi*. Diagnóstico serológico diferencial de distintas formas clínicas de la Enfermedad de Chagas. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

- Mesri, E., Levitus, G., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Diguiero, G., Van Regenmortel, M.H.V. & Levin, M.J. 1990. Major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinant in Chagas' heart disease shares homology with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1219-1224.
- Minoprio, P., Burlen, O., Pereira, P., Guilbert, B., Hontebeyrie-Joskowicz, M. & Coutinho, A. 1988. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* 28: 553-561.
- Minoprio, P., Itohara, S., Heusser, C., Tonegawa, S. & Coutinho, A. 1989. Immunobiology of murine *Trypanosoma cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TcRI T cells. *Immunol. Rev.* 112: 183-207.
- Mitsui, K. & Tsurugi, K. 1988a. cDNA and deduced aminoacid sequence of 38 kDa-type acidic ribosomal protein A0 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 16: 3574.
- Mitsui, K. & Tsurugi, K. 1988b. cDNA and deduced aminoacid sequence of acidic ribosomal protein A1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 16: 3574.
- Mitsui, K. & Tsurugi, K. 1988c. cDNA and deduced aminoacid sequence of acidic ribosomal protein A2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 16: 3575.
- Molina, H.A. & Kieszbaum, F. 1989. Eosinophil activation in acute and chronic chagasic myocardial lesions and deposition of toxic eosinophil granule proteins on heart myofibers. *J. Parasitol.* 75: 129-133.
- Moncayo, A. & Luquetti, A.O. 1990. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85: 489-495.

- Morris, S.A., Tanowitz, B.H., Wittner, M. & Bilezikian, J.P. 1990. Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation* 82: 1990-1999.
- Mortara, R.A., Araguth, M.F. & Yoshida, N. 1988. Reactivity of stage-specific monoclonal antibody 1G7 with metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* strains: lytic property and 90.000 mol. wt surface antigen polymorphysm. *Parasite Immunol.* 10: 369-378.
- Mosca, W. & Plaja, J. 1981. Delayed hypersensitivity to heart antigens in Chagas' disease as measured by in vitro lymphocyte stimulation. *J. Clin. Microbiol.* 14: 1-5.
- Muniz, J. & Azevedo, P. 1947. Novo conceito da patogenia da doenca de Chagas. *Hospital (Rio de Janeiro)* 32: 165-183.
- Musacchio, M.O. & Meyer, H. 1962. Acao do *Schizotrypanum cruzi* degenerado ou em suspensao de tripanosomos mortos sobre células nervosas em cultura de tecido de embriao de galinhas. *An. Congr. Internac. Doenca de Chagas* 3: 1065-1068.
- Norris, K.A., Harth, G. & So, M. 1989. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein with elicits lytic antibodies. *Infect. Immun.* 57: 2372-2377.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4012.
- Oliveira, J. S. M., dos Santos, M., Muccillo, G. & Ferreira, A. L. 1985. Increase capacity of the coronary arteries in chronic Chagas' heart disease: further support for the neurogenic pathogenesis concept. *Am. Heart J.* 109: 304-308.

- Ouassi, M., Cornette, J. & Capron, A. 1986. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19: 201-211.
- Ouassi, M., Taibi, A., Cornette, J., Velge, P., Marty, B., Loyens, M., Esteva, M., Rizvi, F. & Capron, A. 1990. Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitology* 100: 115-124.
- Paranhos, G.S., Cotrim, P.C., Mortara, R.A., Rassi, A., Corral, R., Freilij, H.L., Grinstein, S., Wanderley, J., Camargo, M.E. & Franco Da Silveira, J. 1990. *Trypanosoma cruzi*: cloning and expression of an antigen recognized by acute and chronic human chagasic sera. *Exp. Parasitol.* 71: 284-293.
- Petry, K., Voisin, P. & Baltz, T. 1987. Complex lipids as common antigens to *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma dionisii*, *Trypanosoma vespertilionis* and nervous tissue. *Acta Trop.* 44: 381-386.
- Petry, K. & Eisen, H. 1989. Chagas' disease: a model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol. Today* 5: 111-116.
- Petry, K. & Van Vooris, W.C. 1991. Antigens of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissues: investigations of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas' disease. *Res. Immunol.* 142: 151-156.
- Pinto Dias, J.C. 1979. Mecanismos de transmissao. En *Trypanosoma cruzi e Doenca de Chagas*. Brener, Z. & Andrade, Z. (eds.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 152-174.

- Plotz, P.H. 1983. Autoantibodies are antiidiotype antibodies to antiviral antibodies. *Lancet* *ii*: 824-826.
- Reyes, M.B., Lorca, M., Muñoz, P. & Frasch, A.C.C. 1990. Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *87*: 2846-2850.
- Rezende, J.M. 1979. Clínica: Manifestacoes digestivas. En *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Brener, Z. & Andrade, Z. (eds.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 312-361.
- Ribeiro dos Santos, R., Marquez, J.O., Von Gal Furtado, C., Ramos de Oliveira, J., Martins, A. & Koberle, F. 1979. Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. *Tropenmed. Parasit.* *30*: 19-23.
- Ribeiro dos Santos, R., Laus, J.L., Mengel, J.O. & Savino, W. 1990. Chronic chagasic cardiopathy: role of CD4 T cells in the anti heart autoreactivity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *85*: 367-369.
- Rich, B.E. & Steitz, J.A. 1987. Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1 and P2: Analysis of cDNA clones, in vitro synthesis, and assembly. *Mol. Cell. Biol.* *7*: 4065-4074.
- Rizzo, L.V., Cunha Neto, E. & Teixeira, A.R.L. 1989. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* *57*: 2640-2644.
- Romaña, C. 1963. Enfermedad de Chagas. López Libreros Ed., Buenos Aires.
- Rosenbaum, M.B. 1964. Chagasic miocardiopathy. *Progr. Cardiovasc. Dis.* *7*: 199-225.

- Ruiz, A.M., Esteva, M., Cabeza Meckert, P., Laguens, R.P. & Segura, E.L. 1985. Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 42: 299-309.
- Ruiz, A.M., Esteva, M., Subías, E., Moreno, M., Campanini, A.R. D., Velázquez, E. & Segura, E.L. 1990. Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Immunoprotection against metacyclic trypomastigotes obtained by immunization of mice with an affinity-purified antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39: 117-126.
- Sadigursky, M., Acosta, A.M. & Santos Buch, C.A. 1982. Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *Trypanosoma cruzi* clone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 934-941.
- Said, G., Joskowicz, M., Barreira, A.A. & Eisen, H. 1985. Neuro-pathy associated with experimental Chagas' disease. *Ann. Neurol.* 18: 676-683.
- Sánchez-Madrid, F., Vidales, F.J. & Ballesta, J.P.G. 1981. Functional role of acidic ribosomal proteins. Interchangeability of proteins from bacterial and eukaryotic cells. *Biochemistry* 20: 3263-3266.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Santos Buch, C.A., Acosta, A.M., Zweerink, H.J., Sadigursky, M., Andersen, O.F., Von Kreuter, B.F., Brodskyn, C.I., Sadigursky, C. & Cody, R.J. 1985. Primary muscle disease: definition of a 25 kDa polypeptide miopathic specific Chagas antigen. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 37: 334-350.

- Schejtman, D. Levitus, G., Chiale, P., Levin, M., Elizari, M.V. & Rosenbaum, M. 1990. Determinantes antigénicos diferenciales de *T. cruzi* en pacientes chagásicos crónicos con y sin cardiomiopatía. Resumen, XVII Congreso Argentino de Cardiología, 4-8 de setiembre.
- Schmuñis, G.A. & Szarfman, A. 1977. La enfermedad de Chagas congénita. *Medicina (Buenos Aires)* 37: 47-53.
- Schmuñis, G.A., Szarfman, A., Coarasa, L. & Vamstok, C. 1978. Immunoglobulin concentration in treated human acute Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 473-477.
- Schmuñis, G. 1987. Autoimmunity in Chagas' disease. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 82 (Suppl. I): 287-310.
- Scott, M.T. & Gross-Sampson, M. 1984. Restricted IgG isotype profiles in *Trypanosoma cruzi* infected mice and Chagas' disease patients. *Clin. Exp. Immunol.* 58: 372-379.
- Scott, M.T., Neal, R.A. & Woods, N.C. 1985. Immunization of marmosets with *Trypanosoma cruzi* cell surface glycoprotein (GP90). *Trans. R. Soc. Trp. Med. Hyg.* 79: 451-454.
- Seneca, H. & Peer, P.M. 1966. Immunobiological properties of chagastoxin (lipopolysaccharide). *Trans. R. Soc. Trp. Med. Hyg.* 60: 610-620.
- Shoenfeld, Y. & Schwartz, R. 1984. Immunologic and genetic factors in autoimmune diseases. *N. Engl. J. Med.* 311: 1019-1029.
- Smith, H.R. & Steinberg, A.D. 1983. Autoimmunity-A perspective. *Ann. Rev. Immunol.* 1: 175-210.

- Snary, D. 1983. Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. *Trans. R. Soc. Trp. Med. Hyg.* 77: 126-129.
- Snary, D., Flint, J.E., Wood, J.N., Scott, M.T., Chapman, M.D., Dodd, J., Jessell, T.M. & Miles, M.A. 1983. A monoclonal antibody with specificity for *Trypanosoma cruzi*, central and peripheral neurones and ganglia. *Clin. Exp. Immunol.* 54: 617-624.
- Szarfman, A., Khoury, E.L., Cossio, P.M., Arana, R.M. & Kagan, I. 1975. Investigation of the EVI antibody in parasitic diseases other than American trypanosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 19-24.
- Szarfman, A., Terranova, V.P., Rennard, S.I., Foidart, J.M., Lima, M.F., Scheinman, J.I. & Martins, G.R. 1982. Antibodies to laminin in Chagas' disease. *J. Exp. Med.* 155: 1161-1171.
- Tan, E.M. 1982. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv. Immunol.* 33: 167-240.
- Tan, E.M., Chan, E.K.L., Sullivan, K.F. & Rubin, R.L. 1988. Antinuclear antibodies (ANAs): Diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 47: 121-141.
- Tan, E.M. 1989. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 44: 93-151.
- Teixeira, A. R. L., Teixeira, G., Macedo, V. & Prata, A. 1978. *Trypanosoma cruzi*-sensitized T-lymphocyte mediated ⁵¹Cr release from human heart cells in Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 1097-1107.

- Ternynck, T., Bleux, C., Gregoire, J., Avrameas, S. & Kanellopoulos-Langevin, C. 1990. Comparison between autoantibodies arising during *Trypanosoma cruzi* infection in mice and natural autoantibodies. *J. Immunol.* 144: 1504-1511.
- Todd, C.W., Todd, N. R. & Guimaraes, A.C. 1983. Do lymphocytes from chagasic patients respond to heart antigens? *Infect. Immun.* 40: 832-404.
- Torres, C.M. 1941. Sôbre a anatomía patológica da Doença de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 3: 276-293.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- Towbin, H., Ramjoué, H.P., Kuster, H., Liverani, D. & Gordon, J. 1982. Monoclonal antibodies against eucaryotic ribosomes. Use to characterize a ribosomal protein not previously identified and antigenically related to the acidic phosphoproteins P1/P2. *J. Biol. Chem.* 257: 12709-12715.
- Towbin, H., Rosenfelder, G., Wieslander, J., Avila, J.L., Rojas, M., Szarfman, A., Esser, K., Nowack, H. & Timpl, R. 1987. Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas' disease, American cutaneous leishmaniasis and normal individuals recognize terminal galactosyl(α 1-3) galactose epitopes. *J. Exp. Med.* 166: 419-432.
- Van Vooris, W.C. & Eisen, H. 1989. F1-160: a surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. Exp. Med.* 169: 641-652.

- Vattuone, N.H., Szarfman, A. & Gonzalez Cappa, S.M. 1973. Anti-body response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas' disease). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 45-47.
- Vidales, F.J., Sánchez-Madrid, F. & Ballesta, J.P.G. 1981. The acidic proteins of eukaryotic ribosomes: a comparative study. *Biochem. Biophys. Acta* 656: 28-35.
- Walsh, J.A. 1988. Establishing health priorities in the Developing World. United Nations, Development Programme, New York.
- Whittingham, S. & McNeilage, L.J. 1988. Antinuclear antibodies as molecular and diagnostic probes. *Mol. Cell. Probes* 2: 169-179.
- Wood, J.N., Hudson, L., Jessel, T.M. & Yamamoto, M. 1982. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature (Lond.)* 296: 34-38.
- Yoshida, N., Mortara, R.A., Araguth, M.F., González, J. & Russo, M. 1989. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-Kilodaltons surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 57: 1663-1667.
- Zeledón, R. & Rabinovich, J.E. 1981. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Ann. Rev. Entomol.* 26: 101-111.
- Zingales, B. & Colli, W. 1985. *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 117: 129-152.
- Zingales, B., Gruber, A., Ramalho, C.B., Umezawa, E.S. & Colli, W. 1990. Use of two recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85: 519-522.

Zinker, S. & Warner, J.R. 1976. The ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 251: 1799-1807.

7. APENDICE I

TABLAS

TABLA I: LISTA DE LOS 29 PACIENTES CHAGASICOS CRONICOS AGRUPADOS
SEGUN LAS FORMAS CLINICAS DE LA ENFERMEDAD

NOMBRE	SEXO	EDAD	PROCEDENCIA	GRUPO	BEM
P1	F	54	Sgo. del Estero	I	-
P3	M	55	Sgo. del Estero	I	+
P4	F	39	Salta	II	-
P5	M	21	Bolivia	I	-
P7	M	59	Sgo. del Estero	I	+
P8	M	41	Córdoba	I	+
P10	F	47	San Luis	I	+
P11	M	49	Chaco	I	-
P12	F	35	San Luis	II	-
P14	M	48	?	I	+
P15	F	50	Sgo. del Estero	II	-
P19	M	38	Salta	II	-
CP	F	50	Sgo. del Estero	I	+
PG	M	28	Sgo. del Estero	I	+
P9	F	47	Chaco	I	NR
FE	F	49	Paraguay	I	NR
MIV	F	49	Córdoba	II	NR
GM	M	42	San Luis	III	NR
CA	M	70	San Luis	III	NR
PS	M	27	Sgo. del Estero	I	NR
DP	M	40	?	III	NR
EG	F	57	?	III	NR
EC	M	30	Bolivia	II	NR
MF	F	56	?	III	NR
AD	F	53	Tucumán	III	NR
CM	M	62	Entre Ríos	III	NR
FC	M	41	Paraguay	III	NR
AC	M	45	Sgo. del Estero	I	NR
CT	F	45	Jujuy	III	NR

Lista de 29 pacientes empleados en este trabajo, clasificados según los criterios mencionados en 2.3.1. BEM: biopsia endomiocárdica, BEM +: con miocarditis, BEM -: sin miocarditis, NR: no realizada.

TABLA II: DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-ADN, ANTI-ACTINA, ANTI-MIOSINA Y ANTI TUBULINA EN SUEROS DE PACIENTES CHAGASICOS

SUERO	ADNn	ADNd	ACT.	MIOS.	TUB.
P1	3,5	3,0	5,4	3,8	5,8
P3	3,6	3,0	2,9	3,4	4,9
P4	1,5	1,3	2,3	2,3	3,5
P5	2,5	2,2	2,2	1,9	4,9
P8	1,3	1,0	1,3	1,4	6,2
P9	5,3	5,2	4,3	2,9	3,2
P10	1,7	1,0	1,7	3,2	1,2
P11	2,2	1,6	2,9	2,7	2,4
P12	1,4	1,5	1,5	1,2	1,5
P14	1,9	1,6	1,8	1,6	2,2
P15	3,0	2,9	3,8	3,5	4,6
ALC	2,4	2,1	3,5	1,3	1,4
AC	3,6	3,2	6,3	2,7	5,5
MQ	2,1	1,6	4,7	3,3	4,6
MS	2,4	2,3	5,7	2,9	7,5
PS	2,3	2,0	4,0	2,0	2,4
EG	1,7	1,7	3,4	2,8	2,9
GM	2,1	1,8	6,0	2,2	8,4
CA	1,8	2,0	3,1	2,3	2,1
FE	3,1	3,1	3,5	2,8	4,2
FC	1,4	1,2	2,5	1,3	3,2
DN	2,0	1,7	4,3	2,6	3,2
TCh	1,1	0,8	1,9	1,2	1,7
DP	1,9	1,6	2,8	1,6	1,5
CM	3,7	3,0	5,1	3,5	7,2
JA	4,9	4,6	13,7	5,6	5,0
WL	2,5	1,8	4,5	2,4	2,6
AS	3,6	3,8	4,3	5,8	10,8
AD	3,6	3,2	4,3	4,7	7,6
MF	2,3	2,0	2,6	3,1	3,5
RM	4,2	3,4	6,2	4,5	3,0
PG	1,6	1,6	3,4	2,5	4,9
JM	3,2	2,7	3,5	2,4	3,8
x =	2,6	2,3	3,9	2,7	4,2
s =	1,1	1,0	2,2	1,2	2,3
r =	-0,18	-0,16	-0,05	-0,20	+0,15

Niveles de anticuerpos anti-ADN nativo (ADNn), anti-ADN desnaturalizado (ADNd), anti-actina (act.), anti-miosina (mios.) y anti-tubulina (tub.) de 33 sueros chagásicos crónicos (dil. 1:200), medidos por ELISA y expresados como n veces la DO₄₉₀ promedio medida para 10 controles sanos (N). x: media, s: desviación estándar, r: correlación de los niveles de cada autoanticuerpo con los títulos anti-*T. cruzi* de cada suero.

TABLA III: DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-ADN, ANTI-ACTINA, ANTI-MIOSINA Y ANTI-TUBULINA EN 10 SUEROS DE PACIENTES CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES UTILIZADOS COMO CONTROL

SUERO	ADNn	ADNd	ACT.	MIOS.	TUB.
LES1	4,5	4,4	2,0	1,7	2,5
LES2*	5,9	7,8	4,0	1,4	5,4
LES3	2,8	4,2	1,4	1,0	3,3
LES4	1,2	1,0	1,5	1,0	0,8
LES5	5,1	5,5	8,2	4,5	5,9
LES6	2,8	3,8	3,1	4,1	4,1
LES7	1,5	1,9	0,7	0,4	0,9
LES8	1,7	4,0	2,0	2,8	3,7
AR1	1,6	1,5	3,0	1,9	1,8
AR2**	2,1	3,5	21,3	7,5	15,9

Niveles de anticuerpos anti-ADN nativo (ADNn), anti-ADN desnaturalizado (ADNd), anti-actina (act.), anti-miosina (mios.) y anti-tubulina (tub.) de 10 sueros autoinmunes (dil. 1:200) medidos por ELISA y expresados como n veces la DO₄₉₀ promedio medida para 10 controles sanos. *: control positivo empleado en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-ADN nativo y simple cadena en sueros chagásicos. **: control positivo empleado en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-proteínas del citoesqueleto en sueros chagásicos.

TABLA IV: DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-ADN, ANTI-ACTINA, ANTI-MIOSINA Y ANTI-TUBULINA EN PACIENTES CHAGASICOS AGRUPADOS SEGUN LAS DIFERENTES FORMAS CLINICAS DE LA ENFERMEDAD

1) Anticuerpos anti-ADNn:

GRUPO I (n=12)	GRUPO II+III (n=11)	SIN MIOCAR. (n=6)	CON MIOCAR. (n=5)
pac. anti-ADN	pac. anti-ADN	pac. anti-ADN	pac. anti-ADN
P1 3,5	P4 1,5	P1 3,5	P3 3,6
P3 3,6	P12 1,4	P4 1,5	P8 1,3
P5 2,5	P15 3,0	P5 2,5	P10 1,7
P8 1,3	MF 2,3	P11 2,2	P14 1,9
P9 5,3	AD 3,3	P12 1,4	PG 1,6
P10 1,7	FC 1,4	P15 3,0	
P11 2,2	CA 1,8		
P14 1,9	EG 1,7		
PG 1,6	CM 3,7		
FE 3,1	GM 2,1		
PS 2,3	DP 1,9		
AC 3,6			
$x=2,8 \pm 1,0$	$x=2,2 \pm 0,8$	$x=2,4 \pm 0,8$	$x=2,0 \pm 0,9$

2) Anticuerpos anti-ADNd:

GRUPO I (n=12)	GRUPO II+III (n=11)	SIN MIOCAR. (n=6)	CON MIOCAR. (n=5)
pac. anti-ADN	pac. anti-ADN	pac. anti-ADN	pac. anti-ADN
P1 3,0	P4 1,3	P1 3,0	P3 3,0
P3 3,0	P12 1,5	P4 1,3	P8 1,0
P5 2,2	P15 2,9	P5 2,2	P10 1,0
P8 1,0	MF 2,0	P11 1,6	P14 1,6
P9 5,2	AD 3,2	P12 1,5	PG 1,6
P10 1,0	FC 1,2	P15 2,9	
P11 1,6	CA 2,0		
P14 1,6	EG 1,7		
PG 1,6	CM 3,0		
FE 3,1	GM 1,8		
PS 2,0	DP 1,6		
AC 3,2			
$x=2,4 \pm 1,2$	$x=2,0 \pm 0,7$	$x=2,1 \pm 0,7$	$x=1,6 \pm 0,8$

Continuación tabla IV:

3) Anticuerpos anti-actina:

GRUPO I (n=12)		GRUPO II+III (n=11)		SIN MIOCAR. (n=6)		CON MIOCAR. (n=5)	
pac. anti-act		pac. anti-act		pac. anti-act		pac. anti-act	
P1	5,4	P4	2,3	P1	5,4	P3	2,9
P3	2,9	P12	1,5	P4	2,3	P8	1,3
P5	2,2	P15	1,8	P5	2,2	P10	1,7
P8	1,3	MF	2,6	P11	2,9	P14	1,8
P9	4,3	AD	4,3	P12	1,5	PG	3,4
P10	1,7	FC	2,5	P15	1,8		
P11	2,9	CA	3,1				
P14	1,8	EG	3,4				
PG	3,4	CM	6,0				
FE	3,5	GM	5,1				
PS	4,0	DP	2,8				
AC	6,3						
x=3,3 ± 1,5		x=3,2 ± 1,4		x=2,7 ± 1,4		x=2,2 ± 0,9	

4) Anticuerpos anti-miosina:

GRUPO I (n=12)		GRUPO II+III (n=11)		SIN MIOCAR. (n=6)		CON MIOCAR. (n=5)	
pac. anti-mio		pac. anti-mio		pac. anti-mio		pac. anti-mio	
P1	3,8	P4	2,3	P1	3,8	P3	3,4
P3	3,4	P12	1,2	P4	2,3	P8	1,4
P5	1,9	P15	3,5	P5	1,9	P10	3,2
P8	1,4	MF	3,1	P11	2,7	P14	1,6
P9	2,9	AD	4,7	P12	1,2	PG	2,5
P10	3,2	FC	1,3	P15	3,5		
P11	2,7	CA	2,3				
P14	1,6	EG	2,8				
PG	2,5	CM	3,5				
FE	2,8	GM	2,2				
PS	2,0	DP	1,6				
AC	2,7						
x=2,6 ± 0,7		x=2,6 ± 1,0		x=2,6 ± 1,0		x=2,4 ± 0,9	

Continuación tabla IV:

5) Anticuerpos anti-tubulina:

GRUPO I (n=12)		GRUPO II+III (n=11)		SIN MIOCAR. (n=6)		CON MIOCAR. (n=5)	
pac. anti-tub		pac. anti-tub		pac. anti-tub		pac. anti-tub	
P1	5,8	P4	3,5	P1	5,8	P3	4,9
P3	4,9	P12	1,5	P4	3,5	P8	6,2
P5	4,9	P15	4,6	P5	4,9	P10	1,9
P8	6,2	MF	3,5	P11	2,4	P14	2,2
P9	3,2	AD	7,6	P12	1,5	PG	4,9
P10	1,9	FC	3,2	P15	4,6		
P11	2,4	CA	2,1				
P14	2,2	EG	2,9				
PG	4,9	CM	7,2				
FE	4,2	GM	8,4				
PS	2,4	DP	1,5				
AC	5,5						
x=4,0 ± 1,5		x=4,2 ± 2,5		x=3,8 ± 1,6		x=4,0 ± 1,9	

Niveles de anticuerpos anti-ADN nativo (ADNn), anti-ADN desnaturizado (ADNd), anti-actina (act.), anti-miosina (mios.) y anti-tubulina (tub.) medidos por ELISA en 23 sueros de pacientes chagásicos (dil. 1:200) clasificados como se indicó en 2.3.1. Los valores se expresaron como n veces la DO_{470} , promedio medida para 4 controles sanos. Miocar.: miocarditis, pac.: paciente, x: media ± desviación estándar.

TABLA V: REACTIVIDAD DE LOS SUEROS DE PACIENTES CHAGASICOS CRONICOS CON DIFERENTES TEJIDOS DE MAMIFERO

SUERO	M(h)	H(h)	C(h)	B(p)	T(t)	GRUPO	anti- <i>T. cruzi</i>
P1	+	+	-	NR		I	700
P3	+	+	NR	+	-	I	6.200
P4	+	+	-	+	+	II	1.600
P5	-	+	+	NR	-	I	8.700
P8	+	+	+	+	+	I	2.700
P9	+	+	-	+	-	I	1.500
P10	-	-		+		I	2.900
P11		-		+	-	I	1.100
P12	-	+	-	-	NR	II	1.100
P14	NR	-	+	-	NR	I	4.200
P15	+	-	+	+	NR	II	600
MQ	+	+	+	+	+	c	7.200
EG	+	+	+	-	-	III	2.300
WL	-	NR	-		-	c	6.300
EC	+	+			NR	II	2.600

POS. 9/14 10/14 6/14 8/13 3/10

Reactividad de los sueros chagásicos crónicos con extractos de diferentes tejidos de mamífero, determinada por Western blot. M(h): músculo esquelético humano; H(h): extracto nuclear de células HeLa; C(h): corazón humano; B(p): bazo de perro y T(t): timo de ternera. +: sueros que reaccionaron con los extractos; -: sueros que no reaccionaron con los extractos; NR: experiencia no realizada; POS: positivos. Los grupos corresponden a los establecidos en 2.3.1 para la clasificación de los pacientes de acuerdo con las formas clínicas de la enfermedad. c: pacientes con compromiso cardíaco no incluidos en la clasificación anterior. Los títulos anti-*T. cruzi* se determinaron como se indicó en 2.19.2.

TABLA VI: DETECCION DE AUTOANTICUERPOS POR CONTRAINMUNOELECTROFO-
 RESIS E INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA EN 8 SUEROS LUPI-
 COS UTILIZADOS COMO CONTROL

SUERO	CIF.				IF INDIRECTA sobre HEp2
	anti-La	anti-Ro	anti-Sm	anti-RNP	
15	+	-	-	-	-
83	-	+	-	-	nuclear
110	-	+	-	-	homog./perif.
237	-	+	-	+	mot.
319	-	+	-	-	mot.
A	-	+	-	-	mot.
B	-	+	-	-	mot.
E	+	+	+	-	mot.

Detección de autoanticuerpos por contrainmunolectroforesis (CIE)
 e inmunofluorescencia indirecta (IF) sobre células Hep2 en 8 sue-
 ros lúpicos empleados como control. Los sueros se emplearon dil.
 1:10 (CIF) y 1:40 (IF). Homog.: homogéneo, perif.: periférico,
 mot.: moteado, +: positivo, -: negativo.

TABLA VII: REACTIVIDADES ANTI-*T. cruzi*, ANTI-R13 Y ANTI-R18 PRESENTADAS POR DIFERENTES SUEROS HUMANOS:

1) Pacientes infectados con *T. cruzi* (n=50):

SUERO	ANTI- <i>T. cruzi</i>	ANTI-R13	ANTI-R18
P1	700	1,9	2,0
P3	6.200	11,8	14,8
P4	1.600	3,2	2,9
P5	8.700	4,1	3,7
P7	5.000	6,4	7,4
P8	2.700	5,3	6,2
P9	1.500	3,0	3,6
P10	2.900	13,3	14,9
P11	1.100	0,6	0,9
P12	1.100	4,6	4,6
P14	4.200	6,0	5,7
P15	600	2,7	1,8
P19	500	3,4	2,6
AC	7.000	13,1	16,0
ALC	2.600	7,6	10,7
MQ	7.200	12,0	9,2
MS	13.000	18,2	18,7
PS	2.000	6,8	7,8
EG	2.300	2,0	2,2
GM	5.300	3,0	3,3
CA	6.000	3,2	3,1
FE	2.500	7,0	5,0
FC	8.500	2,0	2,8
DN	1.500	1,8	1,3
TCh	8.500	12,4	10,2
DP	2.200	5,4	6,3
JM	6.000	4,6	3,0
JS	300	1,5	1,0
JG	6.000	6,4	5,6
CM	600	0,9	0,5
JA	700	2,4	2,1
WL	6.300	14,7	17,7
AS	5.300	9,7	9,4
AD	4.000	6,4	6,3
MF	800	3,7	2,4
CD	-	1,4	1,5
Mo	1.900	1,5	1,4
SL	3.500	2,0	1,8
CR	-	0,8	0,7
EC	2.600	1,2	1,0
MIV	900	1,9	1,6
CT	1.100	1,7	0,9
PG	2.900	3,4	3,2
BB	1.000	10,3	6,2
ME	600	1,6	1,9
CP	900	0,8	0,9

Continuación tabla VII:

Lo	1.600	9,8	9,6
Fa	ND	3,0	2,8
Fb	3.200	4,5	4,5
Fc	1.600	2,8	1,8
x=	3.500	5,2	5,1
s=	3.000	4,3	4,7
		$r = 0,62$ $r = 0,96$	

2) Pacientes lúpicos (n=50):

2.a) Argentinos (n=17):

SUERO	ANTI-T. cruzi	ANTI-R13	ANTI-R18
15	-	0,9	1,1
48	-	0,3	0,6
57	-	0,9	0,8
58	-	0,4	0,1
66	1.600	2,3	2,5
83	1.800	1,0	1,8
110	-	1,7	1,5
166	-	1,3	1,8
237	1.100	2,3	2,2
319	750	8,4	10,4
413	300	3,2	3,2
818	2.500	17,6	16,1
E	-	0,6	1,1
ML	-	0,5	0,9
G	1.000	1,7	1,3
Sm+	-	1,2	0,9
La+	-	1,7	1,3

2.b) Franceses (n=33):

SUERO	ANTI-T. cruzi	ANTI-R13	ANTI-R18
3953		0,4	0,6
5406		2,0	2,0
5524		2,3	2,0
6109		1,5	1,0
6151		1,9	2,2
6596		0,3	0,5
6819		2,0	1,7
7059		1,9	1,4
7416		0,8	1,0
7517		1,3	1,7
7674		1,0	1,0
8029		1,0	1,3
8067		1,8	2,0

Continuación tabla VII:

8209	-	1,4	1,0
8301	-	3,9	3,4
8360	-	1,6	2,0
8518	-	1,4	1,1
8656	-	1,1	0,7
8799	-	1,7	2,0
8820	-	0,8	0,5
8837	-	1,3	0,8
9047	-	0,9	0,9
9073	-	0,9	0,6
9076	500	1,7	1,9
9112	-	0,7	0,5
9678	-	1,3	1,5
9718	-	1,1	0,7
10228	-	1,8	2,3
10230	-	1,8	1,6
10988	800	3,1	3,0
11072	-	1,2	1,3
11105	-	1,0	0,8
11532	900	4,3	3,6
x=		1,9	1,9
s=		2,6	2,5

$$r = 0,97$$

3) Pacientes con cardiopatía no-chagásica (n=7):

SUERO	ANTI- <i>T. cruzi</i>	ANTI-R13
P13		0,4
P16		0,9
P17		0,7
P18		0,8
MAC		3,0
MA		1,5
B		1,1
x=		1,2
s=		0,9

4) Pacientes infectados con *Leishmania sp.* (n=24):

SUERO	ANTI- <i>T. cruzi</i>	ANTI-R13
PDV	800	5,4
GJ	-	1,4
G	400	2,7
BP	-	1,0
B	-	0,6

Continuación tabla VII:

KT	-	1,0
TM	-	0,7
MP	-	0,2
BPa	-	0,3
PS	-	2,5
MD	-	0,8
Br	-	1,3
LO	-	1,8
BY	-	1,1
L	800	1,3
RLJ	-	0,6
JV	-	0,4
DLJ	-	0,9
AM	-	6,0
LH	-	2,1
PL	-	0,8
OV	-	2,5
RN	-	1,2
M	-	0,5
x=		1,5
s=		1,4

5) Pacientes infectados con *T. brucei* (n=20):

SUERO	ANTI- <i>T. cruzi</i>	ANTI-R13
VM	-	0,6
VN	-	1,3
VC	-	0,9
VG	-	0,8
SA	-	3,0
S	-	2,3
MM	-	1,7
MI	-	4,2
AN	-	1,0
DT	400	3,0
MN	-	1,3
BB	-	1,5
NKP	300	6,0
EA	-	1,0
PK	-	1,5
C	-	1,1
PF	400	1,4
GP	-	1,4
GB	-	1,2
J	800	2,9
x=		1,8
s=		1,3

Continuación tabla VII:

6) Pacientes infectados con *Plasmodium falciparum* (n=20):

SUERO	ANTI- <i>T. cruzi</i>	ANTI-R13
SJ		1,2
DL		0,7
GF		1,1
757A		1,0
761A		0,7
762A		1,1
763A		0,7
764B		1,2
765A		1,5
766C		0,6
767B		0,9
768B		0,6
769A		1,0
770A		0,7
771B		1,3
772A4		1,0
773A1		0,8
774-2		0,9
775-1		1,0
776-2		1,2
x=		1,0
s=		0,3

Niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi*, anti-R13 y anti-18 en diferentes sueros humanos, medidos por ELISA y expresados como título (anti-*T. cruzi*) o como n veces la DO₄₉₀ promedio obtenida para 35 controles sanos (anti-R13 y anti-R18). Las reactividades contra los péptidos sintéticos corresponden a sueros dil. 1:400. Los niveles de anticuerpos anti-R18 sólo se determinaron para los sueros chagásicos y lúpicos. x: media, s: desviación estándar, r: coeficiente de correlación.

TABLA VIII: NIVELES DE ANTICUERPOS ANTI-R13 EN PACIENTES CON DIFERENTES FORMAS DE CARDIOPATIA CHAGASICA CRONICA

GRUPO I (n=14)		GRUPO II (n=6)		GRUPO III (n=9)	
pac. anti-R13		pac. anti-R13		pac. anti-R13	
P1	1,9	P4	3,2	MF	3,7
P3	11,8	P12	4,6	AD	6,4
P5	4,1	P15	2,7	FC	2,0
P7	6,4	P19	3,4	CA	3,2
P8	5,3	EC	1,2	CT	1,7
P9	3,0	MIV	1,9	EG	2,0
P10	13,3			CM	0,9
P11	0,6	x=2,8 ± 1,2		GM	3,0
P14	6,0			DP	5,4
PG	3,4				
FE	7,0			x=3,1 ± 1,8	
PS	6,8				
AC	13,1				
CP	0,8				
n=14, x=6,0 ± 4,2		n=15, x=3,0 ± 1,5			

Niveles de anticuerpos anti-R13 medidos por ELISA para 29 sueros de pacientes chagásicos (dil. 1:400) clasificados como se indicó en 2.3.1. Los valores se expresaron como n veces la DO₄₉₀ promedio medida para 35 controles sanos. pac.: paciente, x: media ± desviación estándar.

TABLA IX: NIVELES DE ANTICUERPOS ANTI-R13 EN PACIENTES SOMETIDOS
A BIOPSIA ENDOMIOCARDICA

con miocarditis (n=7)		sin miocarditis (n=7)	
pac.	anti-R13	pac.	anti-R13
P3	11,8	P1	1,9
P7	6,4	P4	3,2
P8	5,3	P5	4,1
P10	13,3	P11	0,6
P14	6,0	P12	4,6
PG	3,4	P15	2,7
CP	0,8	P19	3,4
x= 6,7 ± 4,4		x= 2,9 ± 1,6	

Niveles de anticuerpos anti-R13 medidos por ELISA para 14 sueros de pacientes chagásicos (dil. 1:400) sometidos a biopsia endomiocárdica. Los valores se expresaron como n veces la DO₄₉₀ promedio medida para 35 controles sanos. pac.: paciente, x: media ± desviación estándar.

TABLA X: DISTRIBUCION DE SUBCLASES DE IgG PARA LAS RESPUESTAS ANTI-*T. cruzi* TOTAL Y ANTI-R13 EN PACIENTES CHAGASICOS CRONICOS Y LUPICOS

1) Sueros chagásicos anti-R13 (+):

SUERO	ANTI-R13				ANTI- <i>T. cruzi</i>			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
P3	97	0	2	1	62	7	24	7
P4	100	0	0	0	87	0	13	0
P5	61	0	39	0	73	5	22	0
P7	91	4	5	0	64	0	36	0
P8	96	1	3	0	65	0	35	0
P9	95	5	0	0	68	5	16	11
P10	100	0	0	0	74	0	18	8
P12	95	5	0	0	70	7	23	0
P14	96	2	0	2	72	7	12	9
P15	99	0	1	0	85	9	4	2
AC	100	0	0	0	61	12	27	0
MQ	85	0	15	0	75	3	20	2
MS	100	0	0	0	72	0	26	2
PS	94	3	3	0	59	9	28	4
GM	69	0	31	0	54	11	29	6
CA	93	0	7	0	69	6	23	2
FE	96	4	0	0	67	11	22	0
TCh	91	4	5	0	75	3	19	3
JM	100	0	0	0	60	6	34	0
JG	100	0	0	0	73	6	20	1
WL	95	5	0	0	84	11	5	0
AS	92	1	7	0	57	5	38	0
AD	98	0	2	0	67	11	17	5
BB	95	0	5	0	67	0	33	0

2) Sueros chagásicos anti-R13 (-):

SUERO	ANTI-R13				ANTI- <i>T. cruzi</i>			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
EG	NR	NR	NR	NR	75	4	21	0
DN	NR	NR	NR	NR	62	3	34	1
Mo	NR	NR	NR	NR	58	9	31	2

Continuación tabla X:

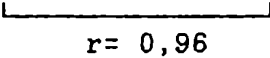
3) Sueros lúpicos anti-R13 (+):

SUERO	ANTI-R13				ANTI- <i>T. cruzi</i>			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
319	19	68	11	2	NR	NR	NR	NR
818	56	44	0	0	NR	NR	NR	NR
10988	16	51	17	16	NR	NR	NR	NR
11532	50	45	0	5	NR	NR	NR	NR

Distribución de subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) para las respuestas anti-*T. cruzi* y anti-R13, medidas por ELISA para 24 sueros chagásicos anti-R13(+), 3 sueros chagásicos anti-R13(-) y 4 sueros lúpicos anti-R13(+) (todos dil. 1:100). Los valores se expresaron como porcentajes de la respuesta total hacia cada antígeno. NR: no realizado.

TABLA XI: REACTIVIDADES ANTI-JL5 Y ANTI-A1 MEDIDAS POR ELISA PARA
8 SUEROS CHAGASICOS CRONICOS

SUERO	anti-JL5	anti-A1
P10	23,7	18,3
P20	10,9	10,0
DP	14,3	10,2
FC	6,9	5,8
FE	12,2	14,0
MQ	15,7	16,7
MS	19,2	16,7
WL	30,7	30,7



 $r= 0,96$

Niveles de anticuerpos anti-JL5 y anti-A1 medidos por ELISA en 8 sueros chagásicos crónicos (dil. 1:1000). Los valores se expresaron como n veces la DO₄₉₀ promedio medida para 5 controles sanos. r: coeficiente de correlación.

TABLA XII: INHIBICION DE LA REACTIVIDAD ANTI-R13 POR R13, I6 Y R7

SUERO	Inhibición máxima (%)		
	R13	I6	R7
P3	97	13	26
P8	99	37	38
P9	100	31	30
P10	99	30	28
AD	95	21	34
FE	94	12	29
Lo	100	67	12
Mo	100	42	37
MQ	100	33	53
O	100	30	45
TC	99	31	58
Uc	99	43	27
Ve	95	69	17
LES	99	20	60

Inhibición de la reactividad anti-R13 de 13 sueros chagásicos crónicos y uno lúpico (LES) por los péptidos R13, I6 y R7. Los valores se expresaron como porcentajes máximos de inhibición.

TABLA XIII: COMPARACION ENTRE LAS REACTIVIDADES ANTI-R13 Y ANTI-(I6+R7)

SUERO	$\frac{\text{anti-(I6+R7)}}{\text{anti-R13}} \times 100$
P1	80
P3	51
P8	60
P10	54
AC	46
AD	46
AS	59
BB	47
FE	21
Lo	58
Mo	78
MQ	75
O	76
TC	79
Uc	67
Ve	72
WL	59
LES	100

Reactividades anti-I6 y anti-R7 medidas en conjunto y expresadas como porcentajes de la reactividad anti-R13, para 18 sueros chagásicos crónicos y uno lúpico (LES) (todos dil. 1:400).

8. APENDICE II
SECUENCIA DEL CLON JL5

