

Tesis de Posgrado

Antígenos del estadio tripomastigote sanguíneo de la cepa Ra I de *Trypanosoma cruzi* y de la cepa Boitron de *Leishmania braziliensis* : respuesta humoral anti-HSP70 en la enfermedad de Chagas y Leishmaniasis

Levy Yeyati, Patricia

1992

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:

Levy Yeyati, Patricia. (1992). Antígenos del estadio tripomastigote sanguíneo de la cepa Ra I de *Trypanosoma cruzi* y de la cepa Boitron de *Leishmania braziliensis* : respuesta humoral anti-HSP70 en la enfermedad de Chagas y Leishmaniasis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2509_LevyYeyati.pdf

Cita tipo Chicago:

Levy Yeyati, Patricia. "Antígenos del estadio tripomastigote sanguíneo de la cepa Ra I de *Trypanosoma cruzi* y de la cepa Boitron de *Leishmania braziliensis* : respuesta humoral anti-HSP70 en la enfermedad de Chagas y Leishmaniasis". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2509_LevyYeyati.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ANTIGENOS DEL ESTADIO TRIPOMASTIGOTE SANGUINEO
DE LA CEPA RA I DE *Trypanosoma cruzi* Y DE LA CEPA BOITRON DE
Leishmania braziliensis braziliensis: RESPUESTA HUMORAL ANTI-
HSP70 EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS Y LEISHMANIASIS

PATRICIA LEVY YEYATI

Tesis para optar por el
título de Doctor en
Ciencias Biológicas

Director Dr. Mariano Jorge Levin

1992

Instituto de Investigaciones en
Ingeniería Genética y Biología Molecular

(INGEBI-CONICET)

Tesis
2509
ej. 2.

*A mis padres, por el amor y la
dedicación con que me educaron.
A Andrés porque me prestó
su brújula cuando desapareció
el camino.*

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Mariano Levin porque me permitió realizar el trabajo en su laboratorio y aprendí muchas cosas no solo de orden laboral y me llevo los viejos recuerdos de una cálida relación.

Al Dr. Torres porque sin él el INGEBI no hubiera existido.

A la Dra. Mirta Flawiá porque sin los seminarios del medio día no me hubiera iniciado en la terapia génica ni tendría visa de trabajo en NY. Pero sobre todo por su afecto.

A Gerardo Glikin y Alejandro Paladini por su particular sentido del humor compartido y porque siempre pude contar con su ayuda. A Alejandro Mentaberry porque me transmitió el stress de vivir en NY, aunque ahora se donde comprar la todo terreno por tres dólares.

A Gabi Levitus porque nos conocimos al comienzo de esta "carrera" científica y salimos de la pista caminando juntas en las buenas y en las malas.

A Betina Orman porque vá a ser mamá y le gustó su propia idea de adoptarme y cuidarme y me encantó.

A Jorge Muschietti, por TANTAS compartidas.

A Sonia Lafón por su cariño, las horas compartidas y la amistad que surge de las cosas cotidianas y de las otras.

A las generaciones del grupo Chagas: Ale Schijman porque a pesar suyo terminé la tesis, a Alfredo Panebra porque en su peruano silencio es un amigo cálido y cuando habla dá gusto escucharlo. A Martín Vazquez porque tiene tanto entusiasmo que dan ganas de armar geles otra vez, interesarse por promotores y transfecciones y sonreír ante la montaña de experimentos que vinieron y vendrán, a Dan Kaplan por su percepción y a todos, a Sonia otra vez, porque compartimos millones de horas en el lab. sin por ello dejar de tener una palabra de aliento, tolerancia y amistad; y podríamos hablar de la familia laboral de becarios chagásicos.

A los ex-211 porque me enseñaron los primeros y fundamentales pasos experimentales de la carrera. Al Tacho porque creyó que yo dibujaba, a Dani porque siempre me hacía dudar de todo, a Ricki y Lili Attar por su cariño y al anexo del 211 Javier Cáceres porque; porqué?

A Mercedes Goin y Pablo Nardone porque compartimos el placer de flotar sobre el río y me enseñaron que bajar la cabeza no siempre es humillante, sobre todo si viene la botabara.

A todos mis compañeros del INGEBI: Rita Ulloa por las cartas, las charlas y el cariño, a Bibi Bernath, Leo Erijman, Fernando Bravo, Gustavito Pesce, Pablo Rabi, Horacio Martineto, Anabella Sbrwbrw (?), Claudia, Sandra, Rosana Celnik, Omar Coso por los miles de buenos y malos momentos compartidos; y a la nueva generación que no tuve mucho tiempo de conocer.

A Norberto Malarini que por años compartimos boleros y aeropuertos y ahora canta Sevillanas.

A Adriana Urman, por su cariño, paciencia y excelente trabajo.

A la sección ejecutiva, Marianito, Irma y Luis porque siempre creían ver el sol cuando todo estaba nublado, y nos reímos juntos de tantas tormentas.

A Tito, la señora Mari y la señora Leonor por su afecto.

A mis hermanos Elen, Alfredo y Marce, a Oria y Adela porque los quiero y siempre me acompañaron.

A Patricia Kandus por la pintura, a Patricia Prieto por la bici y la natación, a ambas por la enorme amistad.

Finalmente a Luis Hurtado porque me enseñó que la aventura comienza cuando abrimos la puerta.

TRABAJOS PUBLICADOS

Levin, M.J., Mesri, E.A., Benarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Chiale, P., Ruiz, A., Kahn, A., Rosebaum, M.B., Torres, H.N. and Segura, E.L. (1989) Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in Chronic Chagas heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41: 530-539.

Schijman, A.G., Dusetti, N.J., Vazquez, M.P., Lafon, S., Levy-Yeyati, P. and Levin, M.J. (1990) Nucleotide cDNA and complete deduced amino acid sequence of a *Trypanosoma cruzi* P ribosomal protein (P-JL5). *Nucleic Acids Res.* 18: 3399.

Levin, M.J., Levitus, G., Kerner, N., Lafon, S., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Finkielstein, C., Chiale, P., Schejtman, D., Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1990) Autoantibodies in Chagas Heart Disease: Possible markers of severe heart complaint. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85: 539-543.

Levy Yeyati, P., Bonnefoy, S., Mirkin, G., Debrabant, A., Lafon, S., Panebra, A., Gonzalez-Cappa, E., Dedet, J.P., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Levin, M.J. (1991) The 70 kDa heat shock protein is a major antigenic determinant in human *Trypanosoma cruzi*-*Leishmania braziliensis braziliensis* mixed infection. *Immunol. Letters.* 31: 27-34.

Búa, J., Bontempi, E.J., Levin, M.J., Orn, A., Velasco, D., Moreno, M., Levy-Yeyati, P., Engstrom, A., Segura, E.L., Ruiz, A.M. (1991) Molecular identification and chemical synthesis of an immunogenic *Trypanosoma cruzi* flagellar fraction component able to evoke an immune response against the parasite. *Experimental Parasitology* 72: 54-62.

Levy yeyati, P., Panebra, A. and Levin, M., J. The C-terminal region of the hsp70 is highly antigenic in human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. (En preparación).

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Immunologic "shot-gun" screening of *Trypanosoma cruzi* expression libraries. Levin, M.J.; Benarous, R.; Mesri, E.; Levitus, G.; Levy Yeyati, P.; Schijman, A.; Torres, H.N.; Ruiz, A.; Segura, E.L. Centenary Symposium, Institut Pasteur. 5-9 de octubre 1987. Referencia en Molecular Biology and Infectious Diseases, edited by M. Schwartz, Elsevier, pág. 373, 1988.

Caracterización genética de epitopes de *T. cruzi*: Levitus, G.; Schijman, A.; Mesri, E.; Levy-Yeyati, P.; Benarous, R.; Torres, H.N.; Segura, E.L.; Levin, M.J. Congreso de SAIB, La Falda, Córdoba. Octubre 1987.

Construcción de una biblioteca genómica de *Trypanosoma cruzi*. Rastreo genético e inmunológico. Schijman, A.; Levy-Yeyati, P.; Mesri, E.; Segura, E.; Levin, M.J. Congreso de SAIB, La Falda, Córdoba. Octubre 1987.

Serological Differential Screening and Characterization of *Trypanosoma cruzi* Recombinant Clones. Mesri, E., Schijman, A., Levitus, G., Levy-Yeyati, P., Chiale, P., Levin, M. 30th International Colloquium "Resistance, Immunity and Tolerance to Trypanosomatid Parasites", 15-16 de septiembre de 1988, Amberes, Bélgica.

Serological Differential Screening and Characterization of *Trypanosoma cruzi* Recombinant Clones. Mesri, E.; Schijman, A.; Levitus, G.; Levy-Yeyati, P.; Chiale, P.; Levin, M. XIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Amsterdam, Holanda. 18-23 de setiembre de 1988. Publicado en Excerpta Medica, International Congress Series 810, Editors: P.A. Kager & A.M. Polderman, pág. 25 (1988).

Clinical Association of anti *Trypanosoma cruzi*-cloned-peptide antibodies. Levin, M.; Levitus, G.; Levy-Yeyati, P.; Mesri, E.; Schijman, A.; Chiale, P.; Benarous, R.; Torres, H.N. XV Reunión Anual sobre Investigación Básica en Enfermedad de Chagas. Caxambú, Brasil. 7-9 de noviembre de 1988.

Péptidos antigénicos del *Trypanosoma cruzi*. Secuencia nucleotídica y subclonado en plásmidos de expresión. Levy-Yeyati, P.; Schijman, A.; Mesri, E.; Levitus, G.; Levin, M. XXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, V Congreso PAABS.

Clonado y caracterización de antígenos de *Trypanosoma cruzi*: Diagnóstico serológico diferencial de distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas. Levy-Yeyati, P.; Mesri, E.; Levitus, G.; Schijman, A.; Rossi, R.; Lafon, S.; Levin, M.J. XXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Buenos Aires, 22-24 de octubre de 1989.

Familia de proteínas P ribosomales en *Trypanosoma cruzi*. Schijman, A.; Rossi, R.; Levitus, G.; Levy-Yeyati, P.; Lafon, S.; Mesri, E.; Levin, M.
XXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Buenos Aires, 22-24 de octubre de 1989.

The 70 kDa heat shock protein is a major antigen in human *Trypanosoma cruzi*-*Leishmania braziliensis braziliensis* mixed infection. Levy-Yeyati, P.; Bonnefoy, S.; Mirkin, G.; Kaplan, D.; Nigro, F.; Lafon, S.; Dedet, J.P.; Gonzalez-Cappa, E.; Hontebeyrie-Joskowicz, M.; Levin, M.J.
Abstract, VII International Congress of Parasitology, Paris, Francia, 1990.

The *Trypanosoma cruzi* P ribosomal protein family: Antigenicity in Chagas disease and genetic organization. Schijman, A.; Levy-Yeyati, P.; Dusetti, N.; Vasquez, M.; Lafon, S.; Levitus, G.; Mesri, E.; Levin, M.
XVII International Congress of Parasitology, Paris, Francia, 20-24 de agosto de 1990.

Identificación y caracterización de HSP70 como antígeno mayoritario de la infección mixta *T. cruzi*-*L. brasiliensis brasiliensis*. Levy-Yeyati, P.; Lafon, S.; Carrillo, G.; Finkelstein, C.; Levin, M.
III Congreso Argentino de Protozoología y Reunión sobre Enfermedad de Chagas, Buenos Aires, Argentina, 17-20 de noviembre de 1990.

Clonado molecular de ARN mensajeros de proteínas ribosomales P de *T. cruzi*. Schijman, A.G.; Vasquez, M.; Levy-Yeyati, P.; Dusetti, N.; Levin, M.J.
III Congreso Argentino de Protozoología y Reunión sobre Enfermedad de Chagas, Buenos Aires, Argentina, 17-20 de noviembre de 1990.

Reactividad de Sueros de pacientes peruanos con infección mixta *T. cruzi*-*L. brasiliensis brasiliensis* con una batería de antígenos recombinantes de *T. cruzi*. Levy Yeyati, P., Panebra, A., Levin, M., J.
XXVII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Huerta Grande, Córdoba, Argentina, 21-24 octubre 1991.

INDICE GENERAL

Pág.

1) INTRODUCCION

1.1)	Breve historia de la enfermedad de Chagas.....	1
1.2)	Epidemiología.....	1
1.3)	El parásito y su ciclo de vida.....	2
1.4)	Leishmaniasis.....	4
1.5)	Epidemiología.....	5
1.6)	El parásito y su ciclo de vida.....	5
1.7)	Aspecto clínico y distribución.....	6
1.7.1)	Leishmaniasis tegumentaria.....	6
1.7.2)	Leishmaniasis visceral.....	8
1.8)	Detección y tratamiento de la enfermedad.....	9
1.9)	Aspectos evolutivos de ambas parasitosis.....	10
1.10)	Estrategias de evasión parasitarias.....	12
a)	Los parásitos libres en el torrente sanguíneo.....	12
b)	Entrada y supervivencia intracelular.....	14
c)	Modulación de la respuesta inmunológica.....	18
1.11)	Respuesta inmune del hospedador frente al parásito.....	20
1.11.1)	Fase aguda en la infección por <i>T.cruzi</i>	20
1.11.2)	Fase crónica.....	22
1.11.3)	Estudio de la respuesta humoral en Chagas.....	23
1.11.4)	Defensa inmunológica del hospedador frente a la infección por <i>Leishmania</i>	25
1.12)	Posibles orígenes de la patogenicidad en ambas infecciones.....	27
1.13)	El sistema inmunológico frente a proteínas conservadas.....	30
1.14)	Infección mixta por <i>T.cruzi</i> y <i>L.b.braziliensis</i>	32
1.15)	Objetivos de la tesis.....	33

2) MATERIALES Y METODOS

2.1)	Composición de soluciones y medios empleados.....	35
2.2)	Bacterias y Fagos.....	36
2.2.1)	Cepas bacterianas.....	36
2.2.2)	Fagos.....	38
2.2.3)	Amplificación y mantenimiento de los fagos.....	39
2.3)	Sueros utilizados.....	40
2.3.1)	Sueros de pacientes chagásicos.....	40
2.3.2)	Sueros de Pacientes infectados por <i>Leishmania sp.</i>	41
2.3.3)	Sueros de pacientes con infección mixta (<i>T.cruzi</i> - <i>L.b.braziliensis</i>).....	41
2.3.4.)	Otros sueros Humanos.....	44
2.3.5)	Sueros de ratones.....	44

2.3.6)	Anticuerpo monoclonal.....	44
2.3.7)	Conservación de los sueros.....	44
2.4)	Obtención de tripomastigotes sanguíneos.....	45
2.4.2)	Antígenos totales de parásitos de cultivo.....	46
2.4.3)	Obtención de promastigotes de cultivo.....	46
2.5)	Preparación de extractos totales de proteínas parasitarias.....	47
2.6)	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	47
2.6.1)	Electrotransferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa.....	50
2.7)	Detección de proteínas por anticuerpos.....	51
2.7.1)	Experiencias de competición.....	52
2.8)	Obtención de ARN total.....	53
2.9)	Obtención de ARN poli A+.....	55
2.10)	Cuantificación de ARN.....	57
2.11)	Construcción de las genotecas de ADNc en λ gt11.....	57
2.12)	Obtención de bacterias competentes <i>E. coli</i> Y1090.....	60
2.13)	Plaqueo de la biblioteca de λ gt11 en <i>E. coli</i> Y1090.....	60
2.14)	Transferencia a nitrocelulosa de las proteínas producidas por los fagos recombinantes e inducción con IPTG.....	61
2.15)	Transferencia del ADN producido en placas de lisis a filtros de nylon.....	61
2.16)	Detección inmunológica de las proteínas recombinantes.....	62
2.17)	Detección de fagos recombinantes con sondas radioactivas.....	62
2.18)	Obtención de bacterias lisógenas para λ gt11.....	63
2.19)	Inducción de la expresión de las proteínas de fusión.....	64
2.20)	Extracto total de proteínas de bacterias lisógenas.....	65
2.21)	Purificación de las proteínas de fusión.....	65
2.22)	Purificación de anticuerpos anti-proteína de fusión.....	67
2.23)	Ensayos de placas de lisis.....	68
2.24)	Detección inmunológica de los fagos recombinantes.....	69
2.25)	Enzimas de restricción y modificadoras.....	69
2.26)	Preparación de ADN de fagos recombinantes.....	71
2.27)	Determinación de la longitud de los insertos de ADNc.....	73
2.27.1)	Purificación de los insertos a partir de fagos amplificados en medio líquido.....	73
2.27.2)	Purificación de los insertos amplificados por PCR.....	74
2.28)	Subclonado en el fago vector M13.....	76
2.28.1)	Preparación del inserto.....	77
2.28.2)	Ligación del ADNc al vector M13.....	77
2.28.3)	Obtención de bacterias <i>E. coli</i> JM101 competentes.....	78
2.28.4)	Transformación de células competentes (JM101).....	78
2.29)	Selección de los subclones M13.....	80
2.30)	Preparación de ADNss del fago M13.....	81
2.31)	Secuenciación por el método de Sanger.....	82

2.31.2)	Resolución de secuencias con fuerte estructura secundaria.....	83
2.32)	Geles de poliacrilamida para secuencias de ADN.....	84
2.33)	Preparación de ADN total de <i>T. cruzi</i> y <i>L. b. braziliensis</i>	85
2.33.1)	Cuantificación de ADN.....	86
2.34)	Separación de ADN en geles de agarosa.....	86
2.35)	Purificación de ADN a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión.....	87
2.36)	<i>Southern blots</i>	88
2.37)	Electroforésis de ARN en geles de agarosa formaldehído.....	88
2.38)	Preparación de sondas radioactivas.....	90
2.39)	Condiciones de hibridización para sondas de alta homología.....	92

3) RESULTADOS

3.1)	Búsqueda de antígenos con posible actividad lítica.....	95
3.1.1)	Antecedentes.....	95
3.1.2)	Construcción de la biblioteca en λ gt11.....	95
3.1.3)	Estrategias de Inmunoselección.....	96
3.1.4)	Resultados del rastreo inmunológico.....	98
3.2)	Criterios de identidad entre los fagos.....	99
3.2.1)	Reactividad inmunológica de los recombinantes.....	100
3.2.2)	Identidad por homología de secuencias de ADN.....	101
3.3)	Caracterización genética de los fagos Lyt8 y Lyt5.....	102
3.3.1)	Determinación del tamaño de los insertos.....	103
3.3.2)	Caracterización del ARNmensajero que codifica para el recombinante Lyt8.....	103
3.3.3)	<i>Southern blot</i> del recombinante Lyt8.....	103
3.3.4)	Secuenciación del clon LYT8.....	104
3.4)	Caracterización inmunológica de lyt8.....	104
3.4.1)	Proteínas de <i>T. cruzi</i> reconocidas por anticuerpos anti-Lyt8.....	105
3.5)	Estudio de la hsp70 de <i>T. cruzi</i>	105
3.5.1)	Rastreo inmunológico de la biblioteca de tripomastigotes.....	105
3.5.2)	Rastreo con sondas radioactivas de la biblioteca de epimastigotes.....	105
3.6.)	Caracterización inmunológica de los nuevos clones.....	106
3.7)	Caracterización genética.....	106
3.7.1)	Determinación del tamaño de los insertos.....	106
3.7.2)	Secuenciación del ADNc de los recombinantes.....	107
3.8)	Correlación entre el título anti-hsp70 y actividad lítica.....	108
3.9)	Caracterización inmunológica de sueros doble infectados.....	109
3.10)	Rastreo inmunológico de la biblioteca de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	110
3.10.1)	Caracterización del cDNA de los fagos RA1 Y RA2.....	110

3.10.2)	Reactividad de los anticuerpos anti-RA1.....	111
a)	Identificación de la proteína de <u>T. cruzi</u> reconocida por anticuerpos anti-RA1.....	111
b)	Reactividad con proteínas de <u>L. b. braziliensis</u>	111
c)	Reactividad con el monoclonal D4F18.....	111
3.11)	Búsqueda del antígeno reactivo de <u>Leishmania</u> SP.....	112
3.11.1)	Construcción de la biblioteca de <u>L. b. braziliensis</u>	112
3.11.2)	Estrategia de selección de los clones.....	112
3.12)	Caracterización del recombinante Lbb1.....	113
3.12.1)	Identidad inmunológica de Lbb1.....	113
3.12.2)	Caracterización genética.....	113
a)	Tamaño del inserto clonado.....	113
b)	Secuenciación del recombinante Lbb1.....	114
3.13)	Disección de la respuesta anti-hsp70 de los sueros doble infectados.....	115
a)	Comparación entre las reactividades de los sueros doble infectados contra las proteínas de fusión LBB1 y RA1 por Western blot.....	115
b)	Comparación entre las reactividades de los sueros doble infectados contra las proteínas totales resueltas en geles de poliacrilamida.....	116
3.14)	Reactividad anti-ral de sueros de individuos chagásicos.....	117
3.15)	Reactividad del recombinante ral con sueros leishmanicos.....	118
3.16)	Perfil inmunológico diferencial.....	119
3.17)	Análisis de reactividad del recombinante ral con otros sueros.....	120
3.18)	Comparación de secuencia de aminoácidos entre <u>T. cruzi</u> , <u>L. b. brasiliensis</u> y Homo sapiens.....	120
3.19)	Búsqueda de anticuerpos anti-hsp70 autorreactivos.....	121
DISCUSION.....		123
Función de las hsp-70.....		128
Características de la respuesta inmunológica humoral contra hsp70.....		131
a)	Estudio con sueros de pacientes Chagásicos.....	131
b)	Estudio con sueros de pacientes con Kala-azar, Uta y Espundia.....	132
c)	Estudio con sueros de pacientes doble infectados	133
Comparación de los aminoácidos de las hsp70 clonadas con cepas reportadas de <u>T. cruzi</u> , <u>L. b. braziliensis</u> y humanas		134
Autoinmunidad en pacientes doble infectados.....		135
CONCLUSIONES.....		139
BIBLIOGRAFIA.....		142

TABLA 6	161
TABLA 7	163

INTRODUCCION

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*. Más tarde, la detección del parásito en la sangre de niños con cuadros febriles y de animales domésticos junto con estudios experimentales 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.

En 1934 Mazza informó la existencia de varios casos agudos en el norte argentino, 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 (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 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 tripomastigotes.

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

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 bajo 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 mayor parte de la población crónicamente infectada no 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 en Argentina es una cardiomiopatía.

Existen características distintivas de la cardiopatía Chagásica crónica que facilitan el diagnóstico diferencial con respecto a otras cardiopatías (Rosenbaum, 1964). En esta etapa de la enfermedad raramente se encuentran nidos de amastigotas 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 (Rosenbaum, 1964; Koberle, 1968; Andrade y Andrade 1979).

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). Esta sólo puede ser detectada mediante el estudio histológico, 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.

1.4) LEISHMANIASIS:

Breve historia de la enfermedad: Las leishmaniasis tegumentarias son conocidas en América Latina desde el siglo XVI. Se encuentran representaciones de la enfermedad en la época precolombina, en particular sobre las cerámicas de Nazca en el Perú. Las primeras descripciones clínicas datan del siglo XVI donde se describe una enfermedad que destruye las cavidades nasales de los indígenas en los valles calientes y húmedos donde cultivaban coca. En el siglo XVII se identifica el rol que juegan los flebótomos en la transmisión (Cosme Buneo 1764). Hacia fines del siglo XIX y al inicio del siglo XX son clasificadas las leishmanias en América Latina (Bravo 1852, Cerqueira 1885). En 1909 se descubren los parásitos en las lesiones cutáneas en Brasil y luego en América Central. Finalmente en 1911 Vianna describe la especie *Leishmania brasiliensis*. El rol jugado por los flebótomos es demostrado por Cerqueira en 1920 y Beaurepaire-Aragao (1922) al inocular un animal sano con un triturado de flebótomos que había picado a un enfermo y visualizar la aparición de lesiones que contenían Leishmanias.

1.5) EPIDEMIOLOGIA:

La importancia epidemiológica está dada por el número de casos, aproximadamente 12 millones pero también el enorme el número de personas de riesgo: 350 millones (The control of leishmaniasis, Report of a WHO Expert Comitee, Technical Report Series no 793, 1990).

La leishmaniasis afecta al nuevo y viejo mundo, si bien cada una de las especies que provocan esta enfermedad tienen una distribución geográfica más restringida.

1.6) EL PARASITO Y SU CICLO DE VIDA:

Hoy sabemos que el agente causal de las Leishmaniasis es el parásito protozoario del género Leishmania transmitido por flebótomos infectados.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce 7 especies de Leishmania y numerosas subespecies que a veces son consideradas especies distintas. Todas las especies son morfológicamente similares. La clasificación ha sido establecida inicialmente en base a criterios clínicos de la enfermedad y luego por características epidemiológicas y geográficas. Los esfuerzos actuales tienden a una taxonomía bioquímica que requiere de otras técnicas; secuenciación de ADN, anticuerpos monoclonales e isoenzimas de formas flageladas de cultivos. En la actualidad existe información suficiente para hacer algunas generalizaciones sobre las formas del nuevo mundo (Grimaldi G. y col. 1987), a las que nos referiremos en adelante.

En América Latina se encuentran las especies: L. chagasi, L. mexicana, L. braziliensis, y L. peruviana. Si bien existe una correlación entre la especie de Leishmania causal y la forma clíni-

ca de la enfermedad, no se puede hacer una distinción absoluta ya que en muchos casos el desarrollo de la enfermedad depende de la respuesta inmunológica del hospedador (Badaro R. y col 1986). En términos generales se puede decir que la enfermedad abarca desde pequeñas úlceras de curación espontánea debidas a L. mexicana y L. braziliensis hasta severísimas lesiones viscerales que pueden ocasionar la muerte, la enfermedad es conocida como kala-azar causada por L. donovani chagasi.

El ciclo de vida de las diferentes leishmanias comprende la alternancia de dos huéspedes: un mamífero y un insecto hematófago que representa al huésped intermediario o vector.

En el tubo digestivo del vector (Phlebotomus spp y Lutzomyia spp) el promastigote evoluciona de una forma no infectiva a la forma de parásitos metacíclicos, altamente infectivos (Sacks D. y col. 1984). Estos son transmitidos al vertebrado del cual succionan su sangre. Los promastigotes son fagocitados por células mononucleares del huésped, donde se diferencian en amastigotes y se dividen asexualmente (Manson-Bahr y col. 1987).

Diversos mamíferos juegan un papel importante en la epidemiología de la enfermedad por ser los huéspedes reservóreos. Los mamíferos son infectados cuando flebótomos, portadores de la forma promastigote, succionan su sangre.

1.7) ASPECTO CLINICO Y DISTRIBUCION DE LAS DIFERENTES LEISHMANIASIS:

1.7.1) LEISHMANIASIS TEGUMENTARIAS:

La gravedad de las leishmaniasis cutáneas del nuevo mundo, está dada por su carácter recidivante, difuso (leishmaniasis cutáneas difusas), invasivo y mutilante (leishmaniasis mucocutánea), Dedet y col 1989.

Las distintas manifestaciones clínicas son producidas por dos especies, presentando cada una varias subespecies: L. mexicana y L. braziliensis.

El grupo L. mexicana:

La subespecie L. mexicana mexicana se encuentra en todo el norte de América Central. Este parásito afecta comúnmente a los trabajadores del látex. La lesión se sitúa en la oreja. Frecuentemente cura de forma espontánea, dejando una cicatriz y destrucción del pabellón de la oreja (Dedet, 1986).

La subespecie L. mexicana amazonensis, se encuentra en Brasil, Trinidad, Venezuela y Panamá. La infección provoca lesiones cutáneas localizadas sin tendencia a diseminarse (Dedet y col. 1985).

El grupo L. braziliensis

Las subespecies L. braziliensis guyanensis y L. braziliensis panamensis se encuentran en Guayana, Surinam, a lo largo de la costa nordeste de América del Sur, al norte del Amazonas y Panamá, respectivamente. Luego de la infección con L. b. guyanensis el cuadro clínico es una lesión ulcerosa, sin compromiso de las mucosas; por el contrario L. b. panamensis puede ocasionar lesiones en las mucosas (Dedet, 1990).

L. braziliensis braziliensis, es el agente causal de la espundia o leishmaniasis muco-cutánea. Se encuentra desde el norte de la Argentina hasta Costa Rica. Su reservóreo más conocido es el perro. Sus vectores son flebótomos del género Psychodopygus.

La espundia afecta principalmente a trabajadores que desmontan la selva y abren caminos en zonas rurales.

Los signos clínicos pueden sobrevenir luego de una incubación de 20 días. La lesión inicial es una ulceración cutánea con los bordes levantados, poco dolorosa. Es posible encontrar lesiones múltiples en el cuerpo. Meses o años después pueden sobrevenir lesiones extensivas y mutilantes. Las lesiones del cartílago de la nariz o de la oreja, de los labios y de la mucosa de la orofaringe son típicas, también reciben el nombre de lesiones metastásicas. Las lesiones de las mucosas son generalmente refractarias a la quimioterapia (Rucha y col. 1983). La afección esofágica, la alteración de la nutrición, las sobreinfecciones y los brotes extensivos pueden ser mortales (Gentilini y col. 1986).

L. b. peruviana descrita en Perú, es la única *Leishmania* de la costa Pacífica de los Andes. Es una forma no evolutiva de *L. b. braziliensis*, el reservóreo es el perro. Produce la forma Uta; generalmente afecta a los niños y se desarrolla una única ulceración; a veces se observan lesiones mutilantes de la mucosa de la boca o nasal (Gentilini y col. 1986).

1.7.2) LEISHMANIASIS VISCERAL:

La leishmaniasis visceral o kala-azar tiene una amplia distribución geográfica. Las especies causantes son *L. donovani* y *L. infantum*.

En América del Sur, principalmente el nordeste de Brasil, la leishmaniasis visceral es causada por la subespecie *L. donovani chagasi*. Su ciclo epidemiológico está condicionado por el flebótomo que actúa como vector (Dedet, 1976). Las manifestaciones clínicas son generalmente, una fiebre elevada, ondulante, acompañada por pérdida de peso y palidez relacionada con la anemia. El paciente sufre una marcada inmunosupresión celular y por el contrario un gran aumento de linfocitos B circulantes productores de inmunoglobulinas, con un alto porcentaje de anticuerpos contra el

parásito (Dedet, 1986). También pueden observarse síntomas particulares según la zona geográfica y el estado sanitario del paciente antes de la infección. Los casos no tratados evolucionan hacia la muerte, por coquexia terminal agravada por sobreinfecciones bacterianas o un síndrome hemorrágico. El tratamiento temprano de la enfermedad permite una reversión de las manifestaciones clínicas y una rápida disminución de anticuerpos circulantes hasta un nivel basal que puede perdurar por años antes de normalizarse completamente (Ranque y col. 1975). Del mismo modo se restaura la inmunidad celular, volviendo a ser positivos los ensayos de hipersensibilidad retardada.

1.8) DETECCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD:

El aspecto de las lesiones es característico, particularmente en las formas cutáneas y mucocutáneas. En la leishmaniasis visceral es característico la existencia de una esplenomegalia febril. En todos los casos debe obtenerse una confirmación parasitológica.

El examen parasitológico es simple y el hallazgo de leishmanias en la punción de las lesiones, es un elemento suficiente para hacer el diagnóstico. Hay casos donde es muy escaso el número de parásitos, entonces se recurre al sero diagnóstico por ELISA, inmunofluorescencia o cultivo del producto de la punción en medios especiales o animales de laboratorio sensibles al género *Leishmania*, como el hamster (Gentilini, y col. 1987).

Existen tres tipos de medicamentos utilizados en su tratamiento: los derivados de antimonio, las diamidinas, y la anfotericina B (Strobel y col. 1979). Son drogas de alta toxicidad, a modo de ejemplo los antimoniales tienen efectos cardiotóxicos y los tratamientos son largos. No siempre hay reversión completa de las lesiones y frecuentemente vuelven a aparecer al cabo de meses o años (Gentilini, y col. 1987).

Se han ensayado varias formas de vacunación que van desde la clásica inmunización con parásitos completos fenolizados (Pessoa, S. y col. 1940) o parásitos virulentos de *L. major*, leishmanización (Katzenelenbogen y col. 1968), hasta la utilización de antígenos aislados y caracterizados (Mayrnick y col 1985). Sin embargo los resultados aún no son definitivos.

Paradójicamente el control de la transmisión es simple, ya que sólo se requiere fumigación del vector con DDT. Muchas veces aunque no sea el objetivo directo, la fumigación para la erradicación de la malaria contribuye en la disminución de la transmisión de Leishmaniasis (Gentilini y col 1987).

1.9) ASPECTOS EVOLUTIVOS DE AMBAS PARASITOSIS:

Hace 20 a 30 años el concepto evolutivo: "muere el hospedador muere el parásito" originó varias preguntas sobre la relación huésped-parásito en infecciones crónicas. Los inmunólogos llegaron a cuestionarse si este tipo de parásitos serían o no inmunogénicos. Estudios serológicos y ensayos de reactividad cutánea frente a proteínas parasitarias demostraron que los parásitos eran inmunogénicos (Burnet y col. 1972).

Desde el punto de vista evolutivo se puede considerar entonces, que la persistencia del parásito y la supervivencia del huésped es un complejo equilibrio de interacciones entre las estrategias de evasión del parásito y la respuesta del hospedador frente a su presencia (Sprent y col 1962; Mitchel 1991).

Tanto *Leishmania sp.* como *T. cruzi* son parásitos intracelulares obligados, pero el tipo de célula que infectan no es el mismo. Esta diferencia reflejará mecanismos de evasión de los parásitos y respuesta inmunológica del huésped, diferentes en cada caso.

Leishmania sp completa su ciclo de vida en macrófagos de mamíferos (Manson-Bahr y col. 1987).

El O₂ molecular en una célula es normalmente reducido a H₂O dentro de la mitocondria por adición de electrones y un 2-5% es parcialmente reducido originando radicales libres (anión superóxido: O₂⁻ y radicales oxidrilo .OH) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En estas cantidades los radicales libres y el peróxido de hidrógeno son destruidos por enzimas endógenas sin provocar daños celulares.

Cuando el macrófago es activado, un complejo enzimático ("oxidasas") genera rápidamente mayores cantidades de estos metabolitos intermedios, la célula no es capaz de neutralizarlos, se acumulan en el interior celular y finalmente son liberados al medio extracelular. Estos metabolitos son capaces de dañar proteínas, lípidos, ADN y por lo tanto membranas celulares. Son los responsables de la destrucción de los microorganismos fagocitados en los endosomas. Las células parasitarias y tumorales mueren probablemente por su susceptibilidad a estos intermediarios tóxicos del metabolismo del O₂ y no por ser fagocitados. Experiencias *in vitro* demostraron que macrófagos no activados no matan tripanosomas fagocitados y sí lo hacen cuando son activados por antígenos de BCG (Kress y col. 1977).

Una vez dentro de los macrófagos, los promastigotes de Leishmania deberán enfrentarse con enzimas lisosomales y sus bajos pHs. A esto debe sumarse la activación de los macrófagos por linfoquinas cuando el huésped ha registrado la entrada del patógeno.

Pocos microorganismos logran sobrevivir rodeados de enzimas lisosomales. Por tal motivo, la virulencia de Leishmania estará directamente relacionada con su supervivencia intralisosomal.

En cambio, si bien *T. cruzi* invade macrófagos durante la etapa temprana de la fase aguda, esta especie ha evolucionado utilizando otros tipos celulares para cumplir su ciclo de vida y su estrategia defensiva puede decirse centrada en la penetración a los distintos tipos celulares. Dentro de células no fagocíticas el medio intracelular es menos hostil al no contar con los mecanismos microbicidas de los macrófagos. Finalmente el parásito cumple su ciclo celular en el citoplasma de la célula huésped.

1.10) ESTRATEGIAS DE EVASION PARASITARIAS FRENTE A LA RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR:

a) *Los parásitos libres en el torrente sanguíneo.*

El sistema de complemento (C) puede ser visualizado como una estrategia del hospedador para limitar el potencial patogénico de los microorganismos promoviendo su destrucción y desaparición (Joiner y col. 1984).

A nivel bioquímico el sistema de complemento incluye más de 20 proteínas regulatorias y activadoras, y por lo menos cinco receptores celulares diferentes (Ross y col. 1985; Schreider y col. 1984). Estas proteínas están involucradas en clivados proteolíticos (Reid y col. 1981) y cambios conformacionales que originan una respuesta celular específica del huésped (Holers y col. 1985).

El sistema C promueve fagocitosis y degradación de complejos antígeno anticuerpos, origina inflamación y en algunos casos produce la lisis de bacterias y células animales.

Leishmania:

En *L. major* se ha demostrado que la cobertura de su superficie con el lipofosfoglicano (LPG) permite la unión del complemento hasta formar el complejo lítico; sin embargo ensayos *in vitro* con suero completo sugieren que varias especies de *Leishmania* son resistentes a la lisis mediada por C (Franke y col. 1985).

Estos resultados aparentemente contradictorios se han ido aclarando con investigaciones posteriores.

La hipótesis que plantea que la estructura molecular del LPG, impide estéricamente la interacción de algunos de los componentes del sistema C con la membrana celular del parásito, previniendo la formación de canales y su lisis, sin por ello disminuir la activación del sistema, es sostenida por varios datos experimentales (Saks 1989). La activación del sistema C es muy eficiente, se ha demostrado con C3 marcado radioactivamente que un 80% se convierte a la forma activa C3b (Puentes y col 1988). Recientemente se comprobó para *L. donovani* la liberación de la superficie del parásito del complejo C5-9 responsable de la formación de canales y lisis de la membrana celular (Puentes y col. 1990).

A su vez la glicoproteína de superficie de 63 kD (gp63) ha sido implicada en la virulencia de *Leishmania* (Kink y col. 1987 y 1988; Kweider y col 1987). Se estima que existen unas 500.000 copias de gp63 por célula (Bordier 1987). Su actividad proteolítica ha sido descrita en varias especies de *Leishmania* (Chaudhuri y col. 1989; Bordier y col. 1987; Etges y col. 1986). Por su actividad enzimática, su abundancia y localización en la superficie del parásito, se considera que gp63 es otro de los factores de *Leishmania* involucrados en su virulencia (Chaudhuri y col. 1989).

También se ha sugerido que la saliva del flebótomo contribuye de algún modo a la resistencia de los promastigotes infectivos, ya que lisados de glándulas salivales aumentan su infectividad (Titus y col. 1988).

T. cruzi:

T. cruzi tiene un estadio extracelular virulento, los tripomastigotes, que son refractarios a la lisis mediada por complemento (Nogueira N. y col 1975). A diferencia de los epimastigotes que son menos virulentos y activan la vía alternativa del complemento, los tripomastigotes son completamente resistentes (Joiner 1986). La resistencia podría deberse a varios factores. Se ha reportado que el parásito es capaz de producir moléculas regulatorias del sistema C (para review ver Fenton Hall y col. 1991). Estas moléculas regulatorias tienen distintos pesos moleculares pero coinciden en su capacidad de bloquear la activación de C en la superficie del parásito evitando su lisis.

b) *Entrada y supervivencia en el interior celular:*

Leishmanias:

La entrada:

Ensayos con anticuerpos monoclonales, competiciones e inhibición, han demostrado que distintas especies de *Leishmania* se unen a receptores de la superficie del macrófago (Russell y col. 1989).

La unión de *Leishmania* a los receptores del complemento CR1 y CR3 es coincidente con la alta eficiencia de activación del sistema C y la baja citólisis observada por esta vía. Hay varias evidencias que indican que los componentes del C fijados sobre parásitos in-

fectivos no son capaces de mediar su lisis pero sin embargo pueden facilitar la entrada del parásito al macrófago (Blackwel y col. 1985; Mosser y col. 1984 y 1985).

La entrada del parásito vía endocitosis del receptor CR1 es una hipótesis interesante, ya que su endocitosis no desencadena en gran producción de metabolitos oxidativos. Esta vía de entrada favorecería la supervivencia del parásito en el interior del macrófago (Mosser y col 1987; DaSilva y col. 1989)

También se han realizado estudios *in vitro* que demostraron que la fibronectina es capaz de unirse a la superficie del parásito permitiendo su entrada al macrófago vía los receptores de fibronectina: RFn (Rizvi y col 1988; Wyler y col. 1985). Sin embargo el RFn no es específico de macrófagos (Russel y col. 1989) y además es un potente inductor de la cadena respiratoria, desencadenando una alta producción de metabolitos intermedios.

Todos estos estudios sugieren que la entrada de *Leishmania* al macrófago en la infección natural, es probablemente debida a su interacción con varios receptores (Chang 1983). No se descarta la posibilidad de que en la entrada no medien receptores específicos y que simplemente se dé por un fenómeno de cargas de superficie (Saraiva y col. 1989); o por la interacción directa con receptores del macrófago sin que medien factores solubles del huésped o del vector (Russel y col. 1989; Ribeiro y col. 1989; Titus y col. 1988).

Supervivencia intracelular:

Las diferentes especies de *Leishmania* viven intracelularmente en fagolisosomas con hidrolasas ácidas y glicoproteínas lisosomales de membrana. Además inducen la bomba oxidativa al entrar al macrófago.

Evidencias experimentales sugieren que la protección se debería a varios factores:

L. donovani una vez en el interior de los fagocitos es capaz de bloquear la producción de peróxido de hidrógeno y radicales libres a través de una fosfatasa ácida de su superficie. (Glew y col. 1988).

El LPG podría conferir resistencia frente a mecanismos parasiticidas no oxidativos inhibiendo la glicosilasa lisosomal (El-On y col. 1980). También es capaz de inhibir una proteína quinasa C, una de las enzimas primordiales en la producción de metabolitos oxidativos (Locksley y col 1988).

La glicoproteína gp63 es una proteasa capaz de degradar enzimas lisosomales. Coincidente con esta hipótesis es la demostración de que su actividad enzimática es óptima bajo condiciones ácidas imperantes en el fagolisosoma (Chauduri y col. 1988)

La posibilidad de entrar al macrófago por endocitosis de receptor CRI (Mosser y col. 1984 y 1985), sería otro factor que algunos consideran esencial para la supervivencia dentro del macrófago (Manson-Bahr y col. 1987).

T. cruzi:

La Entrada:

T. cruzi entra al macrófago por un evento fagocítico (Zingales y col. 1985). La entrada a otros tipos celulares se considera un evento activo dirigido por el parásito y mediado por receptores (Schenckman 1991).

Los tripomastigotes de *T. cruzi* tienen poca capacidad de unión al componente C3 del C, además son capaces de infectar células que no tienen este receptor en su superficie. Estas evidencias, entre otras, dirigieron la búsqueda hacia otros mecanismos no fagocíticos que pudieran estar involucrados en la entrada del parásito a la célula (Fenton y col. 1991).

Ouaisssi y Caprón (1989), sugirieron que la fibronectina (Fn) actuaría como puente para facilitar la unión y entrada del parásito a la célula huésped. Todos los estadios de *T. cruzi* son capaces de unir Fn y su presencia, en ensayos *in vitro* aumenta la unión del parásito a las células blanco pero sólo los estadios virulentos logran entrar en células no fagocíticas, evidenciando que en la entrada interactuarían otros factores.

Durante más de dos décadas se ha postulado que en la interacción entre *T. cruzi* y su célula huésped están involucradas reacciones específicas de transglicosilación (Roseman 1970), sin embargo no se había podido identificar el sustrato dador de ácido siálico ni cuál era el mecanismo extracelular involucrado.

En 1987 Adrews y col., definieron inmunológicamente el epítipo denominado Ssp3, específico de tripomastigotes, que estaría involucrado en la unión del parásito a la célula blanco.

Recientemente Schenckman (1991), identificaron una transialidasa de superficie en tripomastigotes de *T. cruzi*, capaz de transferir ácido siálico exógeno al epítipo Ssp3. Esta enzima específica de estadio, se encuentra en la superficie del parásito. El grupo postula que la actividad transialidasa de esta enzima provee a Ssp3 el grupo necesario para el reconocimiento de la célula blanco.

Además, en 1991 se describió una *heparin-binding protein* (llamada perforina) como la responsable de la unión y penetración de *T. cruzi* a células de mamíferos (Ortega-Barria y col. 1991).

Supervivencia intracelular:

Dentro de la célula huésped, *T. cruzi* está contenido en vacuolas ácidas (Ulisses y col. 1989). Luego de 1 ó 2 horas los parásitos alterarían la membrana vacuolar quedando libres en el citoplasma para su replicación (Ley y col. 1990). Este evento está asociado con la liberación de una proteína funcional al bajo pH registrado en los fagolisosomas y capaz de formar poros en la membrana vacuolar. Esta proteína (TC-TOX) está inmunológicamente relacionada con el factor C9 del complemento humano (Andrews y col. 1990).

La reactividad inmunológicamente cruzada entre el factor C9 y TC-TOX, sugiere que las proteínas comparten determinantes antigénicos. Es cada vez más evidente que las proteínas capaces de formar poros en las membranas de células eucariontes tienen dominios conservados (Lichtenheld y col. 1989; Stanley y col. 1987). Estos resultados refuerzan la hipótesis de la actividad formadora de canales de TC-TOX.

*c) Modulación de la respuesta inmunológica:***Leishmania:**

Macrófagos de ratones infectados con *L. donovani* presentan una severa disminución de antígenos de Histocompatibilidad clase II, y de expresión y secreción de interleuquina 1 (IL1). Además los macrófagos infectados por *L. donovani* no se activan por interferón γ , IFN- γ (Reiner y col 1988).

Estos datos se correlacionan con la falta de respuesta celular de LT observada en pacientes con Kala-azar (Murray y col. 1984) (Saks 1987).

Recientemente se ha demostrado que pacientes infectados con *L. donovani* tienen una severa inmunosupresión debida a la presencia de receptores para IL2 en el suero, presumiblemente de origen parasitario. Todo esto parece indicar que las células CD4+ son requeridas para montar una respuesta inmunológica efectiva contra la leishmaniasis visceral (Barral-Netto y col. 1991).

Estos resultados sugieren que *L. donovani* es capaz de evadir la respuesta inmunológica del hospedador desarticulando su activación.

Para la leishmaniasis cutánea americana (LCA) originada por Leishmanias del complejo *L. mexicana* y *L. braziliensis* (Lainson y col. 1978; Mifess y col. 1981), se conoce la respuesta inmunológica en cada caso pero no se sabe cuáles son los mecanismos parasitarios que determinan este comportamiento. Sólo para la forma LCD se sabe que el número de receptores de interleuquina 2 (IL2) en la superficie de los linfocitos de un paciente infectado es un orden menor a los valores normales (Oppenheim y col. 1983; Castes y col. 1988). Este desequilibrio en el sistema inmunológico de los pacientes sería el motivo por el cual no pueden controlar su infección (Murray y col. 1984). Sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual se produce esta disminución en el número de receptores.

En la enfermedad de Chagas el tripanosoma produce un factor parasitario inmunosupresivo (TIF) que bloquea efectivamente los receptores de IL-2 (Kierszenbaum y col 1990).

1.11) RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR FRENTE AL PARASITO:

Reacción temprana:

Una reacción temprana del huésped infectado por parásitos protozoarios, es la secreción y producción de potentes citoquinas que incluyen el factor de necrosis de tumores (TNF), IL1 e IL6. La acción combinada de estas citokinas causan fiebre, leucocitosis y la producción de proteínas específicas de la fase aguda (APP) o , proteínas C-reativas del complemento (CRP). Esta respuesta temprana contribuye a sobrellevar la infección influenciando su curso y regulando la respuesta inmunológica específica hacia el parásito. Simultáneamente sucede la activación de células T, B y macrófagos. Paradójicamente aunque estas citoquinas protegen al huésped infectado, su sobreproducción es capaz de inducir efectos patogénicos y en algunos casos causar la muerte del hospedador (Titus 1991).

1.11.1) FASE AGUDA EN LA INFECCION POR *T. cruzi*:

Durante la fase aguda de la infección se encuentran parásitos en varios tejidos del huésped (Zingales y col. 1985).

A pesar de observarse una masiva proliferación de células T y B, este estadio está caracterizado en ratones por una severa inmunosupresión (Minoprio y col. 1986) junto con la ausencia, durante las dos primeras semanas de infección, de cantidades detectables de IL-2 (Harel-Bellan y col. 1983) e IFN γ (Plata y col. 1987) de modo que los bajos niveles de ambas linfoquinas podrían ser las responsables al menos en parte de la baja actividad inmunológica. La eliminación de los parásitos por anticuerpos específicos que inducen su lisis y la activación de los macrófagos también podría estar disminuida (Minoprio 1991).

Coinciden con esta observación los trabajos reportados por Kierzbaum y col. 1989, que demuestran que T. cruzi disminuye el número de receptores de alta afinidad para IL-2 por supresión de la expresión de las proteínas p55 y p70, ambas componentes del receptor de IL-2.

En el modelo experimental murino, se activan todos los tipos de linfocitos (CD4 $\alpha\beta$, CD8 $\alpha\beta$, CD8 $\gamma\sigma$, DNT $\gamma\sigma$, y células CD5 B); su número y reactividad no serían compatibles con una respuesta específica contra el parásito (Minoprio y col. 1989). Se observa una expansión clonal de células B que segregan anticuerpos con isotipos específicos (IgG1 e IgG2)(Minoprio 1989). Estas inmunoglobulinas no reconocen antígenos parasitarios, aunque son capaces de reaccionar con componentes propios (Minoprio y col. 1988; Spinella y col. 1990). Sin embargo se ha reportado la presencia de anticuerpos específicos contra el parásito en la fase aguda de la infección humana (Frasch y col 1989).

En 1987 Ibañez y col. identificaron un antígeno liberado durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas; el antígeno denominado SAPA es detectable durante un período corto de la infección, y es reconocido por un 93% de los sueros de pacientes en fase aguda (Affranchino y col. 1989). O sea, durante la fase aguda hay proteínas parasitarias capaces de inducir la producción de anticuerpos; se ha planteado la posibilidad de que estas proteínas sean utilizadas por el parásito para evadir la acción del sistema inmunológico (Frasch 1989).

La participación de los linfocitos T (LT) en la inmunidad a T. cruzi ha sido estudiada en el modelo experimental ratón. Su importancia ha quedado demostrada por la susceptibilidad de los ratones *nude* y ratones depletados de células T a la infección con T. cruzi (Tarleton 1990).

El rol de las células T CD4⁺ es particularmente evidente en el control de los parásitos circulantes; ya que mayores parasitemias han sido observadas en ratones depletados de esta población. Esto podría ser explicado en términos de la función *helper* de los linfocitos efectores que media el *clearance* de los parásitos. La depleción de los linfocitos CD4 *in vivo* eliminaría la respuesta de linfocitos B y T CD8⁺ inducidos por *T. cruzi* (Minoprio y col. 1987). Sin embargo los animales depletados de células CD4, si bien tienen mayor número de parásitos tienen menor daño de los tejidos por procesos inflamatorios. El mismo grupo plantea como hipótesis que el efecto patogénico de la subpoblación CD4⁺, específicamente la Th2 (Mosman y col. 1989; Fiorentino y col. 1989) contenga clones autoreactivos expandidos durante la activación policlonal descrita en las primeras etapas de la infección, siendo éstos los responsables de los daños tisulares observados (Minoprio y col. 1989).

La respuesta inmunológica protectora contra *T. cruzi* claramente requiere de la acción combinada de todo el sistema inmunológico, incluyendo los tipos celulares CD4⁺ y CD8⁺, células productoras de anticuerpos y actividad NK (Tarleton 1990) donde la alteración de cualquiera de estos componentes volvería a los ratones incapaces de controlar la fase aguda de la infección.

La respuesta inmunológica en el modelo experimental murino se puede esquematizar como se muestra en la Fig. 1 (Tarleton 1991).

1.11.2) FASE CRONICA:

La activación policlonal del sistema inmunitario persiste en la fase crónica de la enfermedad de Chagas (D'Imperio Lima y col. 1986), sin embargo esta etapa está caracterizada por una respuesta humoral efectiva y específica (Tarleton 1991).

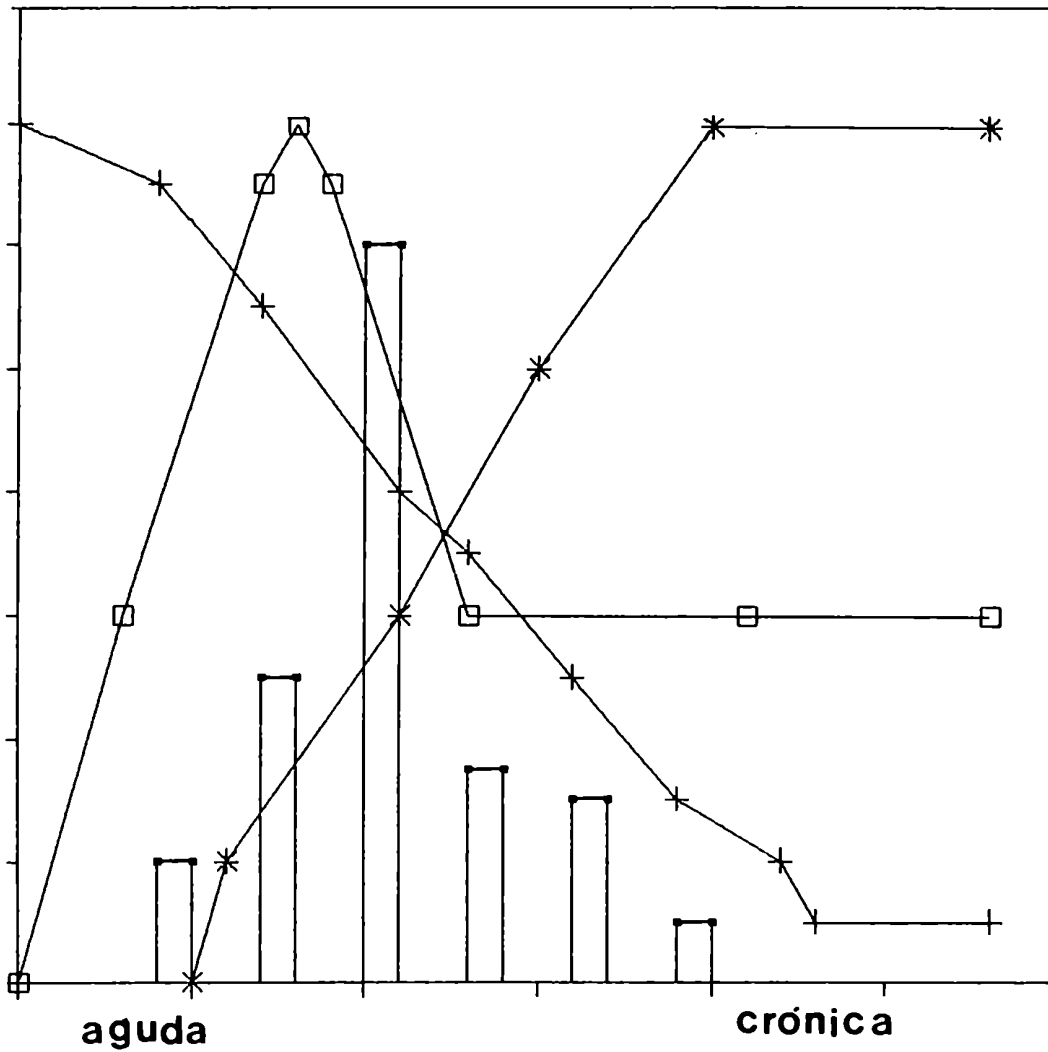


Figura 1:
 Relación entre la actividad de células T, Producción de anticuerpos, parasitemia y patogénesis en la infección murina con *T. cruzi* (Tarleton 1991). Las barras representan los niveles de parasitemia. (*): respuesta humoral. (+): células T en la patogénesis. (■): células T en la inmunidad. Se trata de esquematizar la respuesta inmunológica desglosando la influencia de cada una de las poblaciones en el modelo experimental.

A pesar de que la respuesta inmunológica por anticuerpos es sumamente efectiva en el control de la parasitemia, tanto en infecciones humanas como en modelos animales, esta respuesta no produce una inmunidad esterilizante.

Hasta 1982 el único dato seguro sobre inmunoprotección era que la resistencia a reinfecciones solo podía estar desencadenada por una infección inicial activa (Krettli y Brener 1982). Inmunizaciones con fracciones subcelulares, parásitos fijados o aún con antígenos parcialmente purificados (Segura y col. 1977) sólo producían inmunidad parcial.

1.11.3) ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL EN CHAGAS:

La infección activa con *T. cruzi* origina dos clases de anticuerpos con actividades funcionales diferentes (Krettli y Brener 1982). En primer lugar están aquellos anticuerpos capaces de proteger al hospedador, son anticuerpos que se unen a parásitos vivos y los lisan en conjunción con el sistema de complemento (LMC), son los anticuerpos líticos.

La segunda clase son los anticuerpos involucrados en la serología convencional y utilizados para tests diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Estos anticuerpos no son protectivos ni capaces de unirse a parásitos vivos, determinado por CML o inmunofluorescencia sobre tripomastigotes vivos (VIF), son los anticuerpos serológicos (Trischmann 1983; Krettli y col 1982; Hammer y col. 1981).

A pesar de que tanto los anticuerpos líticos como los serológicos pueden estar presentes en pacientes chagásicos crónicos y ratones experimentalmente infectados, la inmunización de animales con parásitos fijados sólo origina anticuerpos serológicos (Krettli y Brener 1982). Esta observación sugiere que el o los antígenos in-

volucrados en la génesis de los anticuerpos líticos podrían ser secretados activamente por el parásito o destruidos durante la fijación.

En varios casos, pacientes bajo tratamiento quimioterapéutico, recuperan un xenodiagnóstico negativo pero mantienen serología claramente positiva. La actividad de los anticuerpos líticos declina más rápidamente que la de anticuerpos responsables de la serología convencional detectados sobre parásitos fijados o aglutinación de látex (Krettli y col 1982; Brener y col. 1990).

También ratones parasitológicamente curados por quimioterapia, permanecen serológicamente positivos. En estos casos se demostró la existencia de antígenos parasitarios sobre células dendríticas (Andrade y col. 1990). Este mecanismo de "memoria inmunológica" podría ser la explicación de la serología positiva en los pacientes tratados (Andrade 1991).

Estudios de las cinéticas de desaparición de los anticuerpos líticos en pacientes bajo tratamiento quimioterapéutico y modelo experimental murino, demostraron que la actividad de LMC estaba asociada con la presencia de anticuerpos específicos contra antígenos de peso molecular entre 100 y 160 kD (Martins y col 1985).

Es conocido para muchos parásitos intracelulares que la resistencia a la lisis mediada por complemento está regulada según el estadio de desarrollo del parásito (Franke y col. 1985; Budzco y col. 1975; Nogueira y col. 1975). Los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* son resistentes a la lisis mediada por complemento en ausencia de anticuerpos específicos de dicho estadio (Krettli y Brener 1982), esto significaría que la lisis ocurre por la vía clásica del C (Reid 1986). Sin embargo se demostró que los anticuerpos líticos destruyen el parásito principalmente a través de la vía alternativa del C (Kipnis y col. 1985). Esta combinación, si bien se ha visto para otros microorganismos (Cooper y col. 1986; Kotwal y col. 1988) sugiere

un mecanismo particular de resistencia al complemento, ya que la lisis por vía alternativa no requiere la presencia de anticuerpos específicos (Pangburn y col. 1984).

1.11.4) DEFENSA INMUNOLOGICA DEL HOSPEDADOR FRENTE A LA INFECCION POR Leishmania spp:

Leishmaniasis tegumentarias o mucocutáneas:

Para analizar la respuesta inmune del huésped contra las leishmanias es importante considerar la especie causante de la infección, ya que si bien la respuesta celular es importante en todas, el grado de participación y efectos depende claramente de la especie.

En adelante nos referiremos sólo a las formas tegumentarias de las leishmaniasis. En estas formas de las leishmaniasis humanas, la respuesta inmune celular es la responsable del control y resolución de la infección (Howrd 1986). Los pacientes con enfermedad mucosa o cutánea localizada tienen, generalmente, una fuerte respuesta celular, contra antígenos homólogos o heterólogos, lo cual se deduce de los resultados de los ensayos de hipersensibilidad retardada o proliferación de linfocitos T para antígenos específicos del parásito (Carvalho y col. 1985; Castes y col. 1984) en contraste con los pacientes con formas viscerales que presentan poca evidencia de respuesta celular contra antígenos parasitarios hasta que la cura no es completa (Carvalho y col. 1981).

Si bien hay pocos datos experimentales en humanos se puede inferir que la recuperación de la infección con Leishmania por una respuesta celular específica para el parásito, da como resultado resistencia a reinfecciones (Naggan y col. 1972). En 1989 Melby y col. fueron los primeros en identificar antígenos parasitarios

capaces de estimular linfocitos T humanos extraídos de pacientes curados espontáneamente que habían sido infectados por *L. braziliensis*.

También se determinó, *in vitro*, que linfocitos productores de IFN γ son capaces de activar macrófagos y matar parásitos intracelulares *Leishmania sp* (Nacy y col. 1981), en particular para pacientes con leishmaniasis cutánea y mucosa (Carvalho y col. 1985; Passwell y col 1987). La activación de los macrófagos es también un mecanismo de defensa importante contra las formas intracelulares.

Además se ha reportado en *Leishmania* la participación de citoquinas de macrófagos que actuarían sobre la inflamación y que inhibirían su migración del foco inflamatorio (Richard y col 1991).

De estos resultados se deduce que aquellos antígenos capaces de estimular linfocitos T productores de IFN γ podrían contribuir, al menos en parte al control y resolución de la infección con *Leishmania* en humanos y podrían estar involucrados en la protección contra reinfecciones, aunque una exacerbada producción de IFN γ podría tener efectos patogénicos (ver más adelante, patogénesis).

En definitiva casi todas las formas de leishmaniasis tegumentarias tienden a curarse espontáneamente; y en el caso particular de *L. b. braziliensis* la pregunta es por qué si la respuesta inmunológica es tan marcada la cura es tan lenta con o sin la quimioterapia.

1.12) POSIBLES ORIGENES DE LA PATOGENIA EN AMBAS INFECCIONES:*PATOGENESIS EN CHAGAS:*

Los hallazgos anatomopatológicos de la etapa aguda y crónica de la enfermedad de Chagas sugieren que la respuesta inmune del huésped estaría involucrada en la patología de la enfermedad. El bajísimo número de parásitos y el tipo de células encontradas en los infiltrados de las lesiones crónicas han llevado a postular que éstas serían en parte producidas por una respuesta inmunológica autoagresiva mediada por células o anticuerpos (Rosenbaum 1964; Schumúñis, 1987).

Paulatinamente se fueron identificando antígenos capaces de originar anticuerpos autorreactivos (Sadigursky y col. 1982; Schmuñis 1987; Petry y col. 1989) y linfocitos T helper capaces de proliferar en presencia de tejidos del huésped, en el modelo experimental ratón (Said y col. 1985; Hontebeyrie-Joskowicz y col. 1987).

Se demostró que la inyección de LT procedentes de ratones crónicamente infectados, en el nervio ciático, causaban en los ratones receptores la misma sintomatología observada en los ratones donantes de las células (Petry y col. 1989).

Estas experiencias sugieren una base autoinmune dependiente de células TH para la neuropatología observada en los ratones crónicos.

Con el fin de encontrar los antígenos capaces de estimular este tipo de linfocitos, el mismo grupo estableció líneas celulares de TH libres de parásitos. Los resultados indicaron que las mismas poblaciones de LTH capaces de transferir la neuropatología a ratones sanos, eran capaces de reaccionar con antígenos comunes entre el parásito y el tejido nervioso del hospedador (Hontebeyrie-

Joskowicz y col. 1987). Reforzando la hipótesis de un mecanismo autoinmune en la patogénesis, pero sin identificar el o los antígenos responsables.

La existencia de anticuerpos autorreactivos también fue considerada como tema de estudio para entender el origen de la patología chagásica. Los autoanticuerpos EVI, capaces de reaccionar con el tejido endotelial de los intersticios vasculares (Schumuñis 1987b) fueron muy discutidos. Este tipo de anticuerpos estaba presente en el 90% de los pacientes con Chagas crónico (Szarfman y col. 1982), sin embargo en pacientes con malaria y leishmaniasis también se encontraron anticuerpos capaces de reaccionar contra estos antígenos (Towbin y col. 1987). La poca especificidad de estos anticuerpos los convertía en pobres candidatos a causar la patología chagásica.

También se encontraron anticuerpos capaces de reaccionar con células de Schwann y *T. cruzi* (Khoury y col. 1979). Santos Buch y col. 1985 asociaron la presencia de anticuerpos contra una proteína de 25 kda, presente en epimastigotes de *T. cruzi* con la actividad anti-sarcolema de los anticuerpos. El mismo tipo de anticuerpos y otros similares se encontraron en pacientes con enfermedades musculares degenerativas, sugiriendo que la presencia de estos anticuerpos podría causar la destrucción de los tejidos de mamíferos infectados por *T. cruzi* (ver Petry y col. 1989).

Se buscaron autoanticuerpos en modelos experimentales induciendo la producción de anticuerpos con especies relacionadas a *T. cruzi* para las cuales los ratones eran resistentes. De este modo se obtuvieron 10 anticuerpos monoclonales, de los cuales 5 eran capaces de reaccionar en forma cruzada con *T. cruzi* y células cerebrales de ratones sanos, en cultivo (Petry y col. 1987).

En 1989, Van Vooris y col., identificaron un antígeno de superficie de *T. cruzi* que comparte determinantes antigénicos con tejido del sistema nervioso de mamíferos.

A pesar de no haberse identificado aún los blancos de la actividad autorreactiva de estos anticuerpos, llama la atención el alto porcentaje de anticuerpos autorreactivos en Chagas. Quizás algunos de ellos sean responsables, en parte, de la patología autoinmune observada en la enfermedad de Chagas.

En 1989 Levin y col. caracterizaron un antígeno parasitario (JL5), la reactividad contra el epítotope R13 de JL5 fue correlacionada con compromiso cardíaco severo de la enfermedad. El antígeno JL5 comprende la región carboxiterminal de una proteína ribosomal P de *T. cruzi* (Levin y col. 1990). En base a la homología de secuencia observada con las proteínas ribosomales P humanas, se estudió la posibilidad de que poseyeran epítotos compartidos.

Se demostró que anticuerpos anti-JL5 reconocían la proteína ribosomal P1 y P2 humanas (Levitus y col. 1991). La identificación de los isotipos de las inmunoglobulinas capaces de reconocer R-13 demostró que coincidían con la distribución de isotipos de la respuesta anti-*T. cruzi*.

Este trabajo constituye la primer evidencia molecular sobre el origen de un autoanticuerpo en la enfermedad de Chagas aunque queda por demostrar si intervienen en la patogénesis.

PATOGENESIS EN LEISHMANIA:

Pacientes con leishmaniasis mucocutáneas (LMC) tienen hipersensibilidad a los antígenos de *Leishmania* (Castes y col. 1984) posiblemente por una respuesta inmunológica exacerbada debido al tiempo durante el cual el paciente ha estado expuesto al parásito (Carvalho y col. 1985).

Sin embargo estos pacientes son incapaces de eliminar completamente al parásito y carecen de una adecuada regulación del sistema inmunológico (Castes y col. 1984; Castes y col. 1987). La gran

reactividad de células T frente a antígenos de *Leishmania*, podrían desencadenar una expansión clonal de estos linfocitos que a su vez inducen una gran producción de IFN γ . Se cree que el interferón no sólo participaría en la estimulación de los macrófagos, sino también en la patogénesis de la enfermedad (Castes y col 1988).

Pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL), controlan su infección sin sufrir un progresivo daño tisular y no presentan hipersensibilidad a antígenos de *Leishmania*, *in vitro* (Castes y col. 1983). La producción de IFN γ es menor que en los pacientes con LMC, la proporción de linfocitos CD4+/CD8+ es igual que la de pacientes normales. Estos datos sugieren una respuesta inmunológica adecuada, con actividad estimuladora y supresora bien balanceada (Castes y col. 1988). Los pacientes tienen una respuesta inmunológica efectiva. El mismo grupo correlacionó el equilibrio del sistema inmunológico con la conspicua distribución de las lesiones.

Estos resultados sugieren que los daños en las leishmaniasis cutánea Americana (LCA) se deben principalmente al desequilibrio del sistema inmunológico causado por el parásito y no a un proceso autoinmune (Convit y col. 1972). Coincidentemente se ha demostrado, en humanos y modelos experimentales, que la irradiación con dosis de luz ultravioleta (UV B), que disminuyen la activación del sistema inmunológico del hospedador, mejoran las lesiones de la piel (Giannini 1992).

1.13) EL SISTEMA INMUNOLOGICO FRENTE A PROTEINAS CONSERVADAS:

En términos generales se acepta que un sistema inmunológico sano es tolerante a las moléculas que residen dentro de sí. El mecanismo por el cual se establece la tolerancia permanece aún en franca discusión. La demostración de la delección de ciertas célu-

las T durante su maduración en el timo (Von Boehmer 1990) provee un apoyo experimental para la hipótesis de que la tolerancia hacia los propios antígenos es por delección de los clones auto-reactivos (Burnet 1959). Sin embargo se han encontrado individuos sanos con linfocitos capaces de reconocer antígenos propios. En estos casos la mayoría de los investigadores coinciden que los antígenos tienen poca capacidad inmunogénica. Sin embargo es sorprendente que en una gran variedad de infecciones bacterianas y parasitarias, entre los antígenos más reconocidos se encuentren aquéllos que pertenecen a familias de proteínas muy conservadas.

Entre éstos se encuentran las proteínas ribosomales P en Lupus (Elkon y col. 1986) y Chagas (Levitus 1991); la aldolasa en Malaria (Certa y col. 1988); la superóxido dismutasa dependiente de magnesio en Lepra (Thangaraj 1989 NAR 17: 3878). Además en casi todas las parasitosis conocidas se ha reportado la presencia de anticuerpos anti-proteínas de choque térmico (para review ver Cohen y col. 1991).

Estos antígenos parasitarios tienen entre un 40 y 70% de homología con moléculas correspondientes de los huéspedes (Jindal y col. 1988). No sólo son poderosos inmunógenos sino que, en algunos casos, se ha demostrado su capacidad de originar anticuerpos reactivos con antígenos propios.

Estos autoanticuerpos también fueron asociados a patologías auto-inmunes: anticuerpos anti-hsp 65 en artritis reumatoidea en ratones (van Eden y col. 1988) y humanos (Res y col. 1988); diabetes en ratones no obesos (Elias y col. 1990); anticuerpos anti proteínas P se han correlacionado con psicosis en lupus (Bonfa y col. 1987); y en Chagas con daños cardíacos (Levin y col. 1990).

Entre las proteínas conservadas y muy antigénicas se encuentran los antígenos que pertenecen a la familia de proteínas inducibles por calor, hsp (Cohen y col. 1991).

Las proteínas de shock térmico fueron primero identificadas por el aumento de su síntesis en respuesta a temperaturas elevadas (Lindquist 1986). En la actualidad se sabe que son inducibles por casi cualquier forma de stress celular en todos los tipos celulares (Young 1989). En esta familia de proteínas las bacterias y eucariontes comparten más de un 50% de identidad de secuencia (Jindal y col 1989). O sea cada hsp de parásito o bacteria presenta epítopes que podrían ser considerados como propios por el sistema inmunológico del huésped.

Así como la respuesta humoral originada por los miembros de la familia hsp está asociada a las infecciones mencionadas, también se ha descrito la presencia de niveles elevados de anticuerpos anti-hsp en patologías autoinmunes como ser AR (van Eden y col 1988) y LSE (Minota y col. 1988).

1.14) INFECCION MIXTA POR T. cruzi Y L.b. braziliensis:

En Bolivia, ambas parasitosis constituyen un serio problema sanitario. Cambios socioeconómicos han promovido el traslado de trabajadores y sus familias, desde zonas forestales, endémicas para leishmaniasis mucocutánea a zonas rurales, endémicas para Chagas. Estos movimientos poblacionales tienen como consecuencia para los pobladores, el riesgo de una doble infección por T. cruzi y L.b. braziliensis.

1.15) OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO:

- 1) Identificar antígenos parasitarios contra los que se producen anticuerpos con capacidad lítica.
- 2) Caracterizar el perfil inmunológico de pacientes infectados por *L.b.braziliensis* y *T. cruzi*.
- 3) Caracterización genética e inmunológica de el o los antígenos blancos de las respuestas humorales, en Chagas, Leishmaniasis mucocutánea y en la doble infección por *T. cruzi* y *L. b.braziliensis*.

MATERIALES Y METODOS

2.1) COMPOSICION DE SOLUCIONES Y MEDIOS EMPLEADOS FRECUENTEMENTE:

BPB: 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilene cyanol, 30% glicerol.

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

M9-agar: (medio mínimo); 1,3% Na₂HPO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,05% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 4% glucosa, suplementado con tiamina.

2-TY: 1,6% bacto-triptona, 1% extracto de levadura, 0,5% NaCl, pH: 7,0.

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

PBS-G: PBS + 1% gelatina

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

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

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

SSC 20X: 17,5% NaCl, 8,8% citrato de sodio.

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

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

TBE 10X: 10,2% Tris (SIGMA), 5,5% ácido bórico, 20 ml EDTA (pH: 8,0) por litro.

TE: 10 mM Tris.Cl (pH: 7,6), 1 mM EDTA (pH: 8.0).

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)

Proteína Bovina hsp-70 comercial 2µg/µl Stress Gene TM.

BACTERIAS Y FAGOS.

2.2) BACTERIAS Y FAGOS:

2.2.1) Cepas bacterianas:

Y1090: E.coli, lacU169, proA+, lon, araD139, strA, supF, (trp c22::Tn 10), (pMC9). pMC9=pBR322, lacI^q.

Y1089: E.coli, lacU169, proA+, lon, araD139, strA, hflA150, (chr::Tn10), (pMC9).

JM101: E.coli, supE, thi, (lac-proAB), F'[traD36 proAB+ lacI^q lacZM15].

Aclaraciones importantes para la comprensión de los referentes sistemas de clonado:

λgt11:

supF y supE: genes que codifican para un ARN de transferencia supresor de mutaciones ámbar (suprime la mutación Sam100 de λgt11).

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*.

JM101:

thi: mutación en el metabolismo de tiamina, la bacteria requiere tiamina para su crecimiento en medio mínimo.

(lac-proAB): deleción en el cromosoma bacteriano que abarca parcialmente los genes β -D-galactosidasa y genes para el metabolismo de prolina. La bacteria requiere prolina para su crecimiento en medio mínimo.

traD36: (Transfer factor mutation) previene la transferencia del episoma F'.

proAB+: Permite el crecimiento bacteriano de cepas proAB en medio mínimo sin el agregado de prolina. El crecimiento en medio mínimo sin prolina indica que la bacteria es portadora del episoma.

lacZM15: deleción parcial del gen de la β -D-galactosidasa. Complementa la mutación que lleva el cromosoma bacteriano recuperando la actividad β -gal. Permite la selección de colonias blancas/azules cuando se utiliza X-gal en el medio de cultivo.

pmc9: asegura la presencia del gen lacI^q a través de la selección en medios con ampicilina.

Mantenimiento de las cepas:

Las cepas Y1090 e Y1089, se mantuvieron en placas de LB-agar-amp por cortos períodos (15 días) a 4°C.

La cepa JM101 se mantuvo a 4°C en M9-agar y se repicó a placas de LB-agar para la obtención de colonias frescas a partir de las cuales se prepararon las células competentes para las transformaciones (ver 2.28.3).

Las cepas se mantuvieron por varios meses en cultivos líquidos con 50% de glicerol a -70°C.

2.2.2) Fagos:

λ gt11: lac5, shndIII λ 2-3, srI λ 3°, cIts857, srI λ 4°, nin5, srI λ 5°, 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:

Los fagos recombinantes JL5, JL7, JL8 y JL9 (JL52) utilizados durante este trabajo fueron aislados a partir de una biblioteca de ADN complementario de *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2, estadio epimastigote) en λ gt11 (Levin y col., 1989).

La proteína recombinante expresada por el fago JL7, permite diagnosticar serologicamente la infección crónica con *T. cruzi*.

2.2.3) Amplificación y mantenimiento de los fagos:

Para obtener una suspensión de fagos de aproximadamente 10^{10} unidades formadoras de placa (ufp/ml), se infectaron 200 μ l de bacterias *E. coli* Y1090 preparadas como se detalla más adelante (2.12) con 10^4 ufp. Luego de 15 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 1 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.

De este modo el título viral permanece estable por períodos de 2 a 6 meses. Para conservar los títulos de fagos por períodos mayores (ej: conservación de bibliotecas) se agregó dimetil sulfóxido (DMSO) a la suspensión viral hasta una concentración final de 7% V/V. Se homogeneizó y guardó a -70°C. De este modo las bibliotecas amplificadas conservaron altos títulos por varios años.

SUEROS Y ANTICUERPO MONOCLONAL

2.3) SUEROS UTILIZADOS:

2.3.1) Sueros de pacientes chagásicos:

Todos los sueros de pacientes chagásicos utilizados en el presente trabajo fueron diagnósticados como tales 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.

Sueros de pacientes brasileros:

Los sueros fueron cedidos por la Dra. Krettli, A. Belho Horizonte, Brasil.

Los pacientes chagásicos fueron tratados con drogas tripanomicidas, siguiendose la evolución de la parasitemia por los ensayos serológicos que se detallan en la Tabla 1.

Sueros de pacientes argentinos:

Los sueros de pacientes argentinos fueron extraídos de jóvenes del distrito militar Córdoba al inicio de su conscripción. Estos fueron cedidos por el Dr. Lagens, La Plata.

Los pacientes con cardiopatía chagásica fueron evaluados clínicamente en el Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía. (Ver Tabla 2)

La sangre se colectó en tubos plásticos (Falcon 50 ml). Luego de varias horas a temperatura ambiente (formación del coágulo) se centrifugó a 1.500g x 10 min. Los sueros se fraccionaron en tubos eppendorf y se guardaron a -20°C.

2.3.2) Sueros de Pacientes infectados por *Leishmania sp*:

Los sueros de pacientes con *L.b.braziliensis*, forma mucocutánea (LMC) y leishmaniasis cutánea localizada (LCL), forma UTA, fueron provistos por el Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Lima, Perú.

2.3.3) Sueros de pacientes con infección mixta (*T.cruzi* - *L.b.braziliensis*):

Los sueros fueron obtenidos de pacientes crónicamente infectados por *T. cruzi* y *L.b.braziliensis*, mostrando lesiones metastásicas de la mucosa nasofaríngea, ensayo dérmico positivo e inmunofluorescencia positiva para Leishmania. La existencia de la infección por *T. cruzi* fue ensayada serológicamente por fijación de complemento, hemaglutinación pasiva, inmunofluorescencia y ELISA. La evaluación clínica y electrocardiológica de los pacientes mostraron claros signos de una severa cardiopatía chagásica crónica. Estos pacientes fueron clínicamente caracterizados por profesionales del Instituto Boliviano de Biología de Altura (IBBA) La Paz, Bolivia.

Los nombres de estos sueros son: PM, FR, LCH, CB, y SR.

Tabla 1: Detalle de los pacientes chagásicos brasileros en tratamiento tripanomicida. Resultados de los ensayos serológicos.

Paciente	Extracción de sangre.	LMC	SC
MPS	22/12/82	+	+
	06/08/86	-	+
ISS	07/08/83	+	+
	04/12/84	-	+
	04/12/85	-	-
	17/09/86	-	-
FSJ	05/11/79	+	+
	04/12/79	+	+
	28/12/82	-	+
	27/05/86	-	-
FGS	11/10/84	+	+
EHO	05/08/86	+	+

La primer fecha de extracción corresponde al momento de iniciación de la quimioterapia. CML: ensayo de lisis de tripomastigotes vivos lisados por complemento. SC: ensayo de serología clásica por ELISA con extractos totales de proteínas parasitarias.

Tabla 2: Detalle de los pacientes argentinos y resultados de los ensayos serológicos.

Paciente	fecha de extracción	MG	% ACLit(a)
GJ	10/03/88	+	40
AG	22/12/87	+	51
RM	10/06/87	+	39
TM	08/01/88	+	10
GL	?	+	19
SJ	?	-	16

MG: ensayo de Machado Guerreiro. (a): Porcentaje de anticuerpos líticos, determinado por el cociente entre el número de parásitos viables luego de la incubación con el suero del paciente (inactivado) con complemento exógeno, y número de parásitos viables luego de incubados con suero normal inactivado más complemento exógeno. Para los rastreos inmunológicos se consideró como suero con actividad lítica a aquél cuyo cociente fuera mayor que 30.

2.3.4.) Otros sueros Humanos:

El estudio de la reactividad del recombinante RA1 con sueros de pacientes con diversas afecciones se ensayó durante el transcurso del taller Iberoamericano (Septiembre 1990).

El estudio y características clínicas de los pacientes se describen en el trabajo publicado por Levin y col. 1991.

2.3.5) Sueros de ratones:

Luego de alcanzar el nivel de parasitemia más alto, se recolectó la sangre de los ratones por punción del plexo-retroorbital

2.3.6) Anticuerpo monoclonal:

El anticuerpo monoclonal utilizado en los ensayos fue cedido por el Dr. Philippe Dubois, Institut Pasteur, París, France. El monoclonal reconoce el determinante antigénico ANGILNVTAVEKSTGK de la región carboxilo terminal de la hsp70 de Plasmodium falciparum (Blisnick T. y col 1988) (Mattei D. y col 1989)

Este anticuerpo reconoce hsp70 de varias especies de protozoarios así como la proteína de mamíferos.

2.3.7) Conservación de los sueros:

Los sueros se conservaron con 50% de glicerol a -20°C.

OBTENCION DE PARASITOS:

2.4) OBTENCION DE TRIPOMASTIGOTES :

2.4.1) Obtención de tripomastigotes sanguíneos:

Los parásitos de este estadio fueron obtenidos por los miembros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, UBA, dirigido por la Dra. González Cappa.

La infección de los ratones y purificación de las formas sanguíneas de *T. cruzi* fueron realizadas en particular por Gerardo Mirkin, quien optimizó la purificación de los parásitos que se detalla a continuación.

Los ratones fueron infectados con $2 \cdot 10^5$ tripomastigotes sanguíneos de la cepa RA. A la semana fueron sangrados por punción cardíaca utilizando heparina como anticoagulante. La sangre con parásitos se diluyó hasta $2 \cdot 10^7$ parásitos/ml en tampón Tris-cloruro de amonio (0,83% cloruro de amonio en Tris-HCl pH: 7,2) y se depositó sobre Dextrano (3% en PBS), formandose dos fases. El colchón así formado se centrifugó a $60 \times g$ por 10 min a temperatura ambiente. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó para decantar los parásitos a $3000 \times g$ durante 30 min a $4^\circ C$. El pellet se lavó dos veces con medio M199-HIS. Posteriormente se resuspendieron en el mismo medio a una concentración final de $5 \cdot 10^7$ parásitos/ml y depositaron en un gradiente discontinuo de Ficoll-meglumie dia-trizoato (FMD) PBS. El gradiente se centrifugó a $650 \times g$ durante 30 min a $4^\circ C$. Finalmente se tomó la interfase, precipitó por centrifugación y lavó con M199-HIS.

Este pellet de parásitos se congeló y conservó en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización para extracción de proteínas totales o preparación de ARN.

2.4.2) Antígenos totales de parásitos de cultivo:

Los tripomastigotes de *T. cruzi* cepa RA fueron los cultivados por Gerardo Mirkin.

Los epimastigotes (cepa Tulahuen 2) fueron cultivados para el presente estudio por la Dra. Berta F. de Cazzulo, Fundación Campomar.

2.4.3) Obtención de promastigotes de cultivo:

Las formas promastigóticas de *L. b. braziliensis* fueron cultivadas en el Instituto Boliviano de Biología de Altura IBBA, para el presente estudio.

Los promastigotes de *L. b. braziliensis* fueron cultivados en el medio bifásico NNN (*Genes and Antigens of Parasites, A Laboratory Manual*, Fundación Osvado Cruz, Río de Janeiro, 1984 pág: 48). Los promastigotes se cosecharon aspirando el medio de cultivo, se lavaron e incubaron durante 1 hr a 42°C para enriquecer la población celular en ARN mensajeros inducibles por calor.

Los parásitos se precipitaron por centrifugación a 500g durante 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante. El pellet se sumergió en nitrógeno líquido y guardó a -70°C hasta el momento de ser procesados.

ANALISIS DE PROTEINAS:

2.5) PREPARACION DE EXTRACTOS TOTALES DE PROTEINAS PARASITARIAS:

Todos los parásitos provenientes de cultivo 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.

2.6) ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA:

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. Todos los reactivos empleados fueron de Bio Rad (Richmond, CA, USA).

Para el armado de un gel pequeño, se siguió la siguiente tabla:

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

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

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	

(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.

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 isobuta-

nol. Ocurrida la polimerización (20 min a temperatura ambiente), se volcó y enjuagó el alcohol y se completó el armado con la mezcla correspondiente al gel concentrador y el peine elegido.

Cuando se requirieron geles de mayor tamaño se aumentó el volumen final de las soluciones aumentando proporcionalmente el agregado de cada uno de los componentes. En tales casos se utilizó la cuba Bio Rad "Protean II".

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 incubaron a 100°C 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), y mA (cc) por gel grande.

Tinción de los geles con Coomasie-blue:

Para observar el perfil proteico de las muestras luego de la migración, se incubó el gel en la solución de tinción (0,05% Coomasie 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 el siguiente rango de pesos moleculares:

27; 36.5; 48.5; 58; 84; 116; 180 Kda. (Prestained kit protein Molecular Weight, (Sigma, St. Louis, MO, USA)

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

2.6.1) ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEINAS A FILTROS DE NITROCELULOSA (*Western blots*):

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.

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 concentrador⁽¹⁾ y se levantó el gel separador apoyándolo sobre un papel Whatman 3MM sumergido en el buffer T. 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 el filtro de nitrocelulosa y se completó el armado con otro papel Whatman 3MM, 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.

La transferencia se llevó a cabo a 150 mA cc, durante 1 h y a 4°C.

Finalizada la transferencia y verificada a través de los marcado-

res 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 2.7). Cuando no iban a ser utilizados inmediatamente, se los conservó entre dos papeles Whatman 3MM a -20°C , incluso durante varios meses.

(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.

2.7) DETECCION DE PROTEINAS POR 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).

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 H_2O_2 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 2.22), se siguió el protocolo descrito sin diluir la solución de anticuerpos.

2.7.1) Experiencias de competición:

a) Agregando a la dilución de suero (en SB-TW) una cantidad definida del antígeno (proteínas de fusión extracto total de proteínas parasitarias o lisado de E. coli) con el cual se quiere realizar la competición. Esta mezcla se incubó 1h con agitación continua a temperatura ambiente. Luego se agregó el filtro de nitrocelulosa sobre el cual estaban fijados los antígenos, ya sea por electrotransferencia de un Western blot o adsorción de proteínas de las placas de lisis de los fagos crecidos en una placa de petri a filtros Hybond C.

b) Preabsorción del suero con antígeno inmovilizado a membrana de nylon. En este caso el suero se preincubó con el antígeno fijado durante 2 hs al cabo de las cuales se retiró el filtro. El suero competido se utilizó luego para revelar los filtros en estudio. Este protocolo se utilizó para disminuir la alta reactividad anti-E. coli de los sueros de ratones.

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.

Para los rastreos inmunológicos de las bibliotecas se agregó a la

mezcla preparada con los sueros, 5 mg/ml de proteínas totales de un homogenato de *E. coli* lisógena para λ gt11 salvaje para inhibir la unión con la β -galactosidasa de las proteínas recombinantes.

CONSTRUCCION DE BIBLIOTECAS DE EXPRESION:

2.8) OBTENCION DE ARN TOTAL : (Chirgwin y col. 1979)

SOLUCIONES MADRES:

a) GTC Tiocianato de Guanidinio 4M: (para 100 ml finales)

Tiocianato de guanidinio	47,5 g
Citrato de sodio (25 mM)	0,735 g
Sarkosyl	0.50 %
β - mercaptoetanol (0,1M)	0,710 ul

Se disolvió el tiocianato de Guanidinio (Merk) en el tampón Tris-Cl 50 mM, pH:7,6. La solución se filtró para remover los coloides insolubles y se agregó Sarkosyl hasta la concentración final indicada mas arriba, luego se esterilizó tres veces consecutivas en autoclave (45' a 1 atmósfera cada ciclo).

El mercaptoetanol se agregó inmediatamente antes de usar la solución.

b) CsCl 6,2 M:

CsCl	6,2M
EDTA	0,1M

La solución se preparó H₂O previamente tratada con 0,2% de dietilpirocabonato (DEPC) y autoclavada. En algunos casos se autoclavó la solución de CsCl directamente en los tubos de polipropi-

leno de la ultracentrífuga en los cuales se correría el colchón.

Para garantizar la calidad de las preparaciones de ARN, se utilizó material de vidrio esterilizado por horneado durante ocho horas a 200 °C , H₂O bidestilada tratada con DEPC 0,2 %, material de plástico nuevo y autoclavado 3 veces y guantes descartables.

Preparación de la muestra:

La obtención de parásitos se detalla en 2.4.1 para tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* y 2.4.3 para el cultivo de promastigotes de *L. b. braziliensis*. Los mismos fueron conservados a -70°C hasta su utilización.

Al pellet de parásitos congelados se le agregó *GTC* según el siguiente criterio:

mg parásitos (peso húmedo).	GTC (ml)	CsCl (ml)	rotor Sorvall	velocidad (rpm)	tiempo de corrida(hs).
25-200	3,5	1,5	sw48	42000	12
500-1000	28,5	9,5	sw28	27000	26

Los parásitos resuspendidos en *GTC* se pasaron 30-60 veces por gerringa G-23 para romper el ADN.

Se agitó con vortex intensamente durante 5 min.

Armado del colchón:

Se colocó cuidadosamente el homogenato sobre la solución de Cloruro de Cesio constituyéndose 2 fases: el CsCl es la inferior y el homogenato la superior.

Se centrifugó en las condiciones indicadas para cada caso a temperatura no inferior a los 18 °C (este es un punto muy crítico ya

que el cesio precipita a temperaturas menores de 14°C). Al final de la corrida se visualizaron los pigmentos parasitarios y la localización de ADN a lo largo del tubo sin llegar a precipitar y el pellet de ARN.

Se extrajo la fase superior con pipeta Pasteur y luego se extrajeron 500 ul de CsCl; dejando el pellet cubierto con CsCl.

Se lavaron las paredes del tubo con 500 ul de GTC. Se volvió a extraer la fase superior. Este procedimiento se repitió 2 veces más con el objeto de arrastrar todas las impurezas remanentes en las paredes del tubo.

Finalmente, se sacó el CsCl que cubría al pellet de ARN.

El mismo se resuspendió en 200 ul de GTC con Pipetman 1000, punta azul. El ARN fue trasvasado a 1 tubo Eppendorf, y se agregaron 3 vol de Etanol. Se precipitó a -70°C durante 1 hora.

Se centrifugó a 4°C durante 30 min a 12000xg.

El pellet se lavó dos veces con 1ml de Etanol 70% evitando su resuspensión. Se secó durante 5 min con bomba de vacío y se resuspendió en 100 ul de TE, o más, cuando se partió de grandes cantidades de parásitos, de manera de llegar a una concentración final de 20µg/µl.

El ARN total fue adecuado para experiencias de *Northern blot*. Para la construcción de bibliotecas de ADN copia se utilizó ARN poli A+, preparado según se indica más abajo.

2.9) Obtención de ARN poli A+:

El RNA poly A+ (compuesto mayoritariamente por mRNA) se purificó por cromatografía en oligo dT-celulosa (Aviv y Leder, 1972)

Se utilizaron columnas de diversos volúmenes según la cantidad de RNA a procesar; básicamente se confeccionaron en puntas azules con un volumen asentado de 0,5 ml y capacidad de procesar hasta 5 mg de RNA total. Todas las operaciones se realizaron a temperatura ambiente con material libre de RNasas por tratamiento con DEPC y esterilización.

La oligo dT-celulosa se equilibró inicialmente con 5 vol (de columna) de buffer de carga (BC. Tris-HCl 20 mM pH: 7,6, LiCl 0,5 M, EDTA 1 mM y SDS 0,1%).

El RNA total en una concentración no mayor a 2,5 mg/ml se incubó por 5 min a 65°C, desestabilizando de este modo la estructura secundaria del mismo, se enfrió a 0°C y se agregó 1 vol de BC. de doble concentración, y se sembró en la columna. El percolado se volvió a calentar 5 min a 65°C, se enfrió y se volvió a sembrar en la misma columna. Esta operación se repitió una vez más.

El percolado así obtenido, que es la fracción llamada polyA menos, (constituida en su mayor parte por RNA ribosomal) se precipitó con 2,5 vol de etanol absoluto. Se dejó 10 min a -70°C y se centrifugó 10 min a 10.000 rpm. El pellet se resuspendió en el menor volumen posible de H₂O bidestilada.

A continuación, se lavó la columna con 10 vol de buffer de lavado (Tris-HCl 20 mM pH:7,6, LiCl 0,1 M; EDTA 1 mM y SDS 0,1%), luego se eluyó el RNA poly A+ con 2 ml de H₂O bidestilada. Se precipitó el RNA poly A+ con NaAcO 3 M pH:5,2 y 2,5 vol de etanol absoluto. Luego de haberse incubado toda la noche a -20°C se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 10 min. El pellet se disolvió en el menor volumen de agua posible y se guardó a -70°C hasta su posterior utilización.

Las columnas fueron regeneradas luego de cada utilización con 3 vol de H₂O destilada, 3 vol de NaOH 0,1 M; finalmente se llevaron hasta pH neutro con H₂O destilada. En caso de no utilizarse inme-

diatamente se dejaron secar y guardaron a 4°C.

El RNA polyA+ así obtenido corresponde a un 2% del RNA total y contiene aproximadamente un 30% de RNA ribosomal contaminante.

2.10) CUANTIFICACION DE ARN: (Shneider W. C. y col. 1957)

La cuantificación del RNA se realizó por el método de degradación ácida y posterior cuantificación de residuos de ribosa por la reacción de los mismos con orcinol en presencia de FeCl₃.

A 0,33 ml de cada muestra (1µg/µl aproximadamente), se agregaron 0,67 ml de reactivo de orcinol, preparado en el momento de su utilización:

orcinol	1%
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,5%
(disueltos en HCl concentrado)	

Se incubó 20 min en baño de agua hirviendo y se midió absorvancia a 660 nm. Se usó como standard poli A sintético. Una unidad de absorvancia representa 25 µg/ml de ARN y la reacción no es inter-ferida por ADN ni proteínas.

2.11) CONSTRUCCION DE LAS GENOTECAS DE ADN COPIA EN λgt11:

a) Síntesis de cADN:

Para la construcción de las genotecas se utilizaron los kits de Amersham. cDNA Synthesis System Plus (RPN 1256) para síntesis del ADN copia doble cadena a partir del ARN poli A+ ,y cDNA cloning system - λgt11 (RPN 1280) para la unión del ADN copia a linkers y brazos de λgt11 respectivamente(1).

Todos los pasos se realizaron según las indicaciones sugeridas por los catálogos comerciales.

La síntesis del ADNc se realizó incluyendo [α 32 P] dATP, de este modo se pudo estimar la eficiencia de incorporación de nucleótidos en cada uno de los pasos de síntesis.

(1) si bien los kits comerciales fueron los indicados estos cambiaron y en el caso de la biblioteca de *L. b. braziliensis* los adaptadores enviados junto con el kit eran diferentes a los utilizados anteriormente en la construcción de la biblioteca de *T. cruzi*. La secuencia de ambos se detalla a continuación:

HO-AATTCGAGGATCCGCGTACCATGG
GCTCCTAGGCCCATGGTACC-OH

Estos adaptadores se unieron a los fragmentos de ADNc sintetizados por ligación de los extremos *blunt end* generándose fragmentos de DNAc-adaptadores con extremos cohesivos listos para ligar con los brazos del vector previamente digerido con EcoRI.

Para la biblioteca de *T. cruzi* se ligaron a los ADNc un linker Eco RI clásico. Antes de la ligación se metilaron los ADNc para proteger los sitios EcoR I de los insertos.

b) Separación de los ADNc-adaptadores, de los adaptadores libres:

La separación de los adaptadores libres de los ADNc-adaptadores se hizo del mismo modo en ambos casos por pasaje a través de una columna de Sepharose-4B (kit RPN 1280). La marcación del ADNc permitió identificar las fracciones en las que eluían los fragmentos sintetizados y separarlos de los adaptadores libres (curva de elución figura 2).

Durante la construcción de la biblioteca de *L. b. braziliensis* se

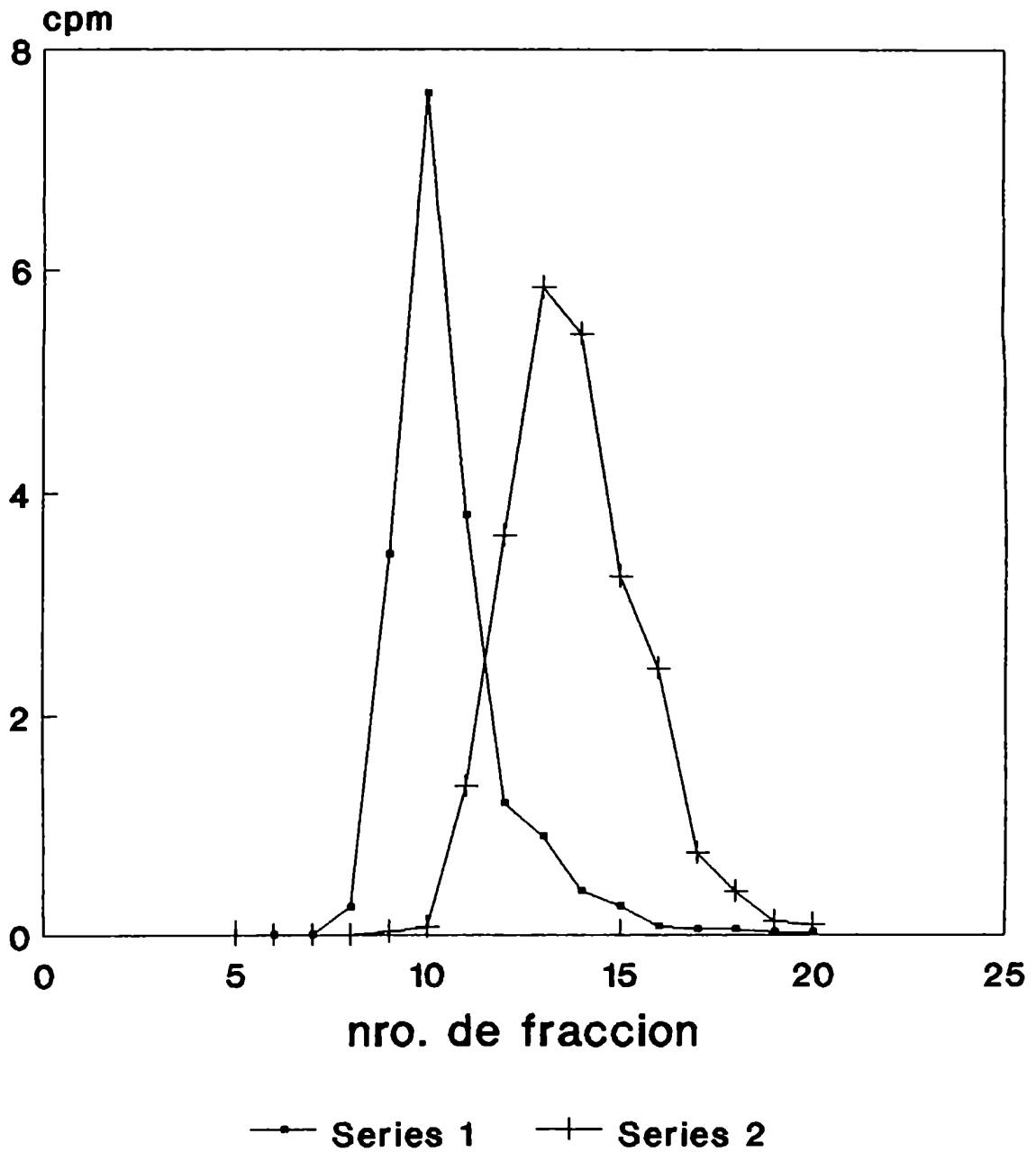


Figura 2:
 Perfil de elución de los ADNc de las columnas de sefarosa 4B: Los ADNc de *L.b.braziliensis* (serie 1) y *T.cruzi* (serie 2) se sembraron en sendas columnas de sefarosa 4B. Se colectaron fracciones de 50 ul y se determinaron los cpm en contador de centelleo.

tomaron tres alícuotas de las fracciones con mayor cantidad de cpm (determinadas por contador de centelleo). Se corrieron en un gel de agarosa para visualizar por autorradiografía la distribución de tamaño de los fragmentos sintetizados (Fig.3).

Las primeras fracciones eluidas de la columna de Sepharose-4B conteniendo fragmentos de ADNc de gran tamaño y con mayor cantidad de radioactividad (Fig.2) se ligaron a los brazos de λ gt11, y se empaquetaron con extractos comerciales como se indica a continuación.

c) Empaquetamiento y conservación de las bibliotecas:

Los fagos recombinantes se empaquetaron *in vitro* con extractos comerciales de Amersham: *in vitro* packaging kit (N. 334.2.9)

De cada fracción empaquetada se determinó el título de fagos (u.f.p./ml) para estimar el rendimiento y establecer las condiciones óptimas ADNc- λ gt11/vol de extracto de empaquetamiento.

La biblioteca de *T. cruzi* se amplificó como se detalla en la sección 2.2.3; se tituló y se fraccionó para conservar la biblioteca a 4°C con 0,3% de cloroformo, y a -70°C con 7% V/V de DMSO para conservarla durante varios años.

El ADNc de *L. b. brasiliensis* se ligó a los brazos de λ gt11 y solo se empaquetó un tercio de la fracción número 10. Los fagos resultantes se utilizaron sin amplificar. El ADNc sintetizado y ligado a los brazos de λ gt11 se guardó a -20°C para empaquetar en el momento de su utilización.

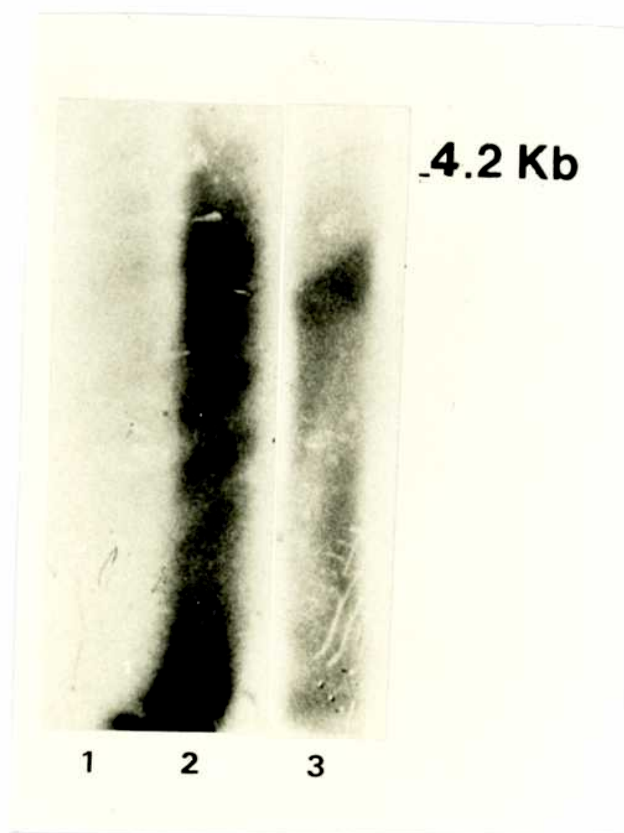


Figura 3:

Fraccionamiento por tamaño del ADNc de *L. b. braziliensis*: Autorradiografía del gel de agarosa 1% en el cual se resolvieron 3 μ l de las fracciones 8 a 12 eluidas de la columna de sefarosa 4B 1: fracción nro. 8, 2:fracción 10, 3: fracción 11, (ver Fig.3).

RASTREO DE LAS BIBLIOTECAS:

2.12) OBTENCION DE BACTERIAS COMPETENTES *E. coli* Y1090:

Se inoculó una colonia aislada crecida en medio con ampicilina, a un Erlenmeyer con 50 ml de LB y 100 ug/ml de ampicilina. Se incubó toda la noche a 37°C con agitación continua. Al día siguiente se cosecharon las bacterias por centrifugación a 4000rpm durante 6 min a 4°C, y resuspendieron en 0,4 volúmenes de MgSO₄ 10 mM estéril y frío. Las bacterias competentes así obtenida se conservan a 4°C durante 1 semana sin disminuir apreciablemente su capacidad de ser infectadas por λ gt11.

2.13) PLAQUEO DE LA BIBLIOTECA DE λ gt11 EN *E. coli* Y1090.

Se incubó durante 15 min a 37°C 100 ul de bacterias competentes con con 3.10⁴ ufp. Se mezclaron con 5ml (1) de LB-"top" agarosa fundido y mantenido a 48°C en baño termostatzado, se homogeneizó y volcó sobre placas de petri de 15 cm de diametro preincubadas a 42°C durante por lo menos 30 min.

Al cabo de tres horas de incubar la placa sembrada, a 42°C se comenzaron a visualizar pequeñas placas de lisis. A partir de este momento se puede inducir la expresión de las proteínas de fusión con IPTG y transferirlas a filtros de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham, Buckinghamshire, England) para visualizar reactividad de las proteínas de fusión con los sueros.

2.14) TRANSFERENCIA A NITROCELULOSA DE LAS PROTEINAS PRODUCIDAS POR LOS FAGOS RECOMBINANTES E INDUCCION CON IPTG: (para rastreos inmunológicos).

Se cubrieron las placas de lisis obtenidas en el paso anterior con un filtro de nitrocelulosa (BA85, Schleicher and Schuel, Dassel, Hybond C), para el caso del primer rastreo inmunológico.

El filtro fue embebido previamente con una solución 10 mM de IPTG (BRL).

Se marcó la posición del filtro en la placa por punción con alfiler embebido en tinta china.

Las cajas de Petri con los filtros se incubaron invertidas durante 2 hs a 37°C. Se retiraron los filtros de nitrocelulosa y se los lavó durante 10 min con TBS. Para obtener una réplica se colocó un nuevo filtro, tratado en las mismas condiciones anteriores y se incubó la placa por otras 2hs a 37°C.

2.15) TRANSFERENCIA DEL ADN DE PLACAS DE LISIS A FILTROS DE NYLON: (para rastreo por homología de ácidos nucleicos)

Del mismo modo descrito para el primer rastreo inmunológico; se plaquearon $3,5 \cdot 10^4$ ufp/placa de 15 cm de diámetro.

Se dejaron crecer toda la noche o 6 hs a 37°C, luego se colocaron a 4°C durante 1 hora, antes de comenzar la transferencia.

Para la transferencia se utilizaron filtros Hybond N o N+ previamente rotulados y por duplicado. Se apoyó suavemente el filtro sobre la placa durante 1 min, mientras se marcó con tinta china y un alfiler atravesando el filtro y el agar. El filtro duplicado se transfirió 2 min y se lo marcó del mismo modo y en la misma posición que el original.

Luego de la transferencia se embebieron los filtros, la cara del filtro que estuvo en contacto con los fagos se colocó hacia arriba. Los filtros se embebieron en la solución desnaturalizante: 0,5 N NaOH - 1,5 N NaCl a temperatura ambiente, durante 1 min. Los filtros se trataron con solución renaturalizante: 0,5 N Tris-HCl, ph:8, NaCl 1,5N en las mismas condiciones dos veces durante 3 min, y luego se enjuagaron con agitación muy suave en 2XSSC.

Los filtros se secaron a temperatura ambiente sobre papel Watmann y luego se fijó el ADN por exposición durante 5 min a luz ultravioleta.

Los filtros así tratados se hibridizaron con sondas radiactivas como se indica en la sección 2.39.

2.16) DETECCION INMUNOLOGICA DE LAS PROTEINAS RECOMBINANTES:

Los filtros obtenidos con la proteína de los fagos recombinantes (ver 2.14) se lavaron, bloquearon, incubaron con el suero y revelado por el sistema avidina-peroxidasa, descrito en 2.7. de materiales y métodos.

2.17) DETECCION DE FAGOS RECOMBINANTES CON SONDAS RADIOACTIVAS:

La transferencia de los ácidos nucleicos y su fijación a membranas Hybond N+ se describe en la sección 2.15. Los filtros se incubaron con sondas radioactivas obtenidas por *Random priming* como se describe en la sección 2.38. Las condiciones de hibridización y lavado de los filtros se describe en 2.39.

ANALISIS DE LOS FAGOS RECOMBINANTES:

a) Análisis inmunológicos:

2.18) 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 Lyt8, M98, RA1, RA2, HSL12, HSL13, y Lbb1, 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 µl 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⁾, se diluyó sucesivamente hasta 1:10⁵ y 100 µl de esta dilución final se inoculó a 3ml de top agar previamente fundido y mantenido a 45°C en baño de agua calefaccionado para volcarlo en 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 repicando con ansa de platino 50 colonias aisladas, sobre dos placas de LB-agar-amp. Las colonias se repicaron respetando un orden establecido mediante el dibujo de una grilla en el fondo de ambas placas de petri. 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 represor cI. La falta de supresión de la mutación Sam100 provoca una acumulación de partículas virales dentro de la bacteria, inhibiendo su crecimiento). La frecuencia de lisógenas obtenidas en las diferentes experiencias varió entre 10 y 50%. Para conservarlas, se estria-

ron separadamente sobre LB-agar-amp, se incubaron toda la noche a 30°C y 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.

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

2.19) 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 y se dejó crecer a 30°C hasta una $DO_{600} = 0,4$. (En estas condiciones, el represor cI del fago permanece activo, manteniendo el estado de lisogenia).

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, permi-

tiendo la transcripción a partir del promotor del gen de la β -galactosidasa y dando como resultado una gran producción de proteína de fusión).

2.20) EXTRACTO TOTAL DE PROTEINAS 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 2.19. 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 2.6).

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 2.6).

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 2.19 pero sin el agregado de IPTG. 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, o en su defecto 30 min a -70°C y luego agua corriente). El homogenato final se guardó a -20°C . La concentración final de proteínas fue generalmente de 5mg/ml.

2.21) PURIFICACION DE LAS PROTEINAS DE FUSION:

La purificación de las proteínas de fusión se realizó a partir de 250 ml de cultivo inducido según 2.19, 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 pro-

teínas 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 pellet, conteniendo la proteína de fusión, se resuspendió en 10 ml de 8 M urea⁽²⁾. 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 mayoritariamente la banda del peso molecular esperado. Con este protocolo se obtuvieron entre 2 y 5 mg de proteína recombinante por litro de cultivo inducido. En la Fig.4, se muestran los productos de cada paso de purificación.

(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).

(2) Cada purificación tenía un rendimiento aproximado de 10 µg de proteínas/µl de solución final.



Figura 4:

Purificación de proteínas de fusión a partir de cultivos de bacterias lisógenas inducidas con IPTG (ver MM2.19): Cultivos de bacterias lisogénicas para Lbb1 fueron termoinducidos a 44°C, se siguieron los pasos de purificación descritos en 2.21., de cada uno de ellos se tomó una fracción y se corrieron en un gel PAGE-SDS 7,5%, una calle se transfirió a nitrocelulosa para realizar el western blot. Calle 1: extracto total de los cultivos, 2: sobrenadante de sacarosa, 3: proteínas precipitadas con urea, 4: western blot de las proteínas precipitadas con urea revelado con el suero FR 1:500. M: marcadores de peso molecular preteñidos (SIGMA), 180 kda, 116 kda (β -galctosidasa de *E.coli*), 84 kda, 58 kda, 48 kda, 36,5 kda.

2.22) PURIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEINA DE FUSION:

Los anticuerpos contra las proteínas de fusión fueron inmunoseleccionados a partir de sueros de pacientes con Chagas, Leishmania o doble infectados, 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 cm² con 3 ml de proteína recombinante purificada (ver 2.21), durante 2 h⁽¹⁾. Se lavó 10 min con TBS para eliminar el exceso de proteína, se bloqueó durante 20 min (ver 2.7) 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 λ gt11 salvaje⁽²⁾. 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 μ g/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.

(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 λ gt11 salvaje, diluido 1:3 en TBS e inmovilizado como se indicó para las

proteínas de fusión. Este mismo procedimiento se utilizó para disminuir la reactividad anti-proteínas de *E. coli* en los sueros de ratones utilizados para el rastreo de la biblioteca de tripomastigotes de *T. cruzi*.

2.23) CRECIMIENTO E INDUCCION DE LOS FAGOS RECOMBINANTES PURIFICADOS E INMOVILIZACION DE LAS PROTEINAS A FILTROS DE NITROCELULOSA: (Ensayos de placas de lisis)

Para la formación del césped bacteriano, se mezclaron 500 μ l 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 en un orden preestablecido, 2 μ l 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 2.7.

(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.

2.24) *DETECCION INMUNOLOGICA DE LOS FAGOS RECOMBINANTES*

Para visualizar la reactividad de las proteínas de fusión transferidas a los filtros, se siguió el protocolo descrito en 2.7; previa incubación de los filtros con cada uno de los sueros, anticuerpos inmunopurificados o anticuerpo monoclonal a analizar.

b) **Análisis genéticos:**

2.25.) ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y MODIFICADORAS:

Enzimas de restricción:

Todas las enzimas utilizadas fueron de origen comercial (Appligene, Promega, Amersham, BRL o Pharmacia) empleadas en las condiciones recomendadas por los fabricantes.

Para las digestiones se siguieron los siguientes criterios:

Se utilizó 3-5 U de Enzima por μg de ADN a digerir, incubando durante 2-3 hs a 37 °C. En digestiones de ADN genómico se utilizó 5 U de Enzima por μg de ADN y se incubó la digestión durante toda la noche a 37 °C.

En ningún caso el volumen de Enzima agregado superó el 10% del volumen final de mezcla de reacción.

Composición del *buffer* de incubación para las enzimas de restricción utilizadas.

	MED	HIGH (a)
Tris-HCl	10	10
MgCl ₂	10	10
NaCl	50	100
Ditioeritol	1	1
pH a 37°C	7.5	7,5

(a): El término alto se define en función de la concentración de NaCl. Se expresa la concentración final del *buffer* diluido 1:10 y en mmol/l.

EcoRI: *buffer* High Utilizada para liberar los insertos clonados en λ gt11 para la visualización de su tamaño, confección de sondas radioactivas, subclonado en el vector de secuenciación y para digerir el DNA total de parásitos para *southern blots*.

PstI: *buffer* High Utilizada para digerir el DNA total de parásitos para los *southern blots*.

Enzimas de modificación:

Polinucleótido kinasa del fago T₄ (Amersham, Pharmacia): utilizada para fosforilar los extremos 5' de fragmentos de ADN.

ADN Ligasa del fago T₄: (Pharmacia, Promega) utilizada para el ligado de insertos de ADNc y genómicos en vectores de clonado y subclonado.

Enzimas de síntesis in vitro de ADN:

Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I:(Amersham): utilizado para el rellenado de extremos recesivos (*fill in*) de fragmentos de ADN. El ensayo se realiza en buffer M.

Polimerasa Taq I (Promega, Perkin Elmer Cetus): utilizada para amplificación de ADN (PCR). Se utilizó el buffer comercial provisto en el kit comercial Promega, Perkin Elmer Cetus.

Exonucleasas:

ADNasa I: utilizada para eliminar el ADN bacteriano en la amplificación del ADN de los fagos recombinantes λ gt11.

ARNasa ,libre de ADNasa: Utilizada para eliminar el ARN de las minipreparaciones de ADN.

2.26) PREPARACION DE ADN DE FAGOS λ gt11 RECOMBINANTES: (basado en el método de Yamamoto)

Se inoculó un taquito de agar conteniendo una placa de lisis o 1.10^9 ufp, del fago correspondiente a 10 ml de medio LB - Mg^{2+} -maltosa en tubos Falcon de 50 ml, con 200 ul de células Y1089 crecidas durante toda la noche en LB Mg^{2+} maltosa.

Los inóculos se incubaron a 42 °C con agitación constante a 200 rpm durante 5-6 hs.

Como control de lisis se incluyó un tubo conteniendo células sin infectar.

Concluido el tiempo necesario para la lisis bacteriana, evidenciada por la diferencia de D.O. entre los tubos infectados y el

control, se agregó 200 μ l de CHCl_3 y se incubó durante 5 - 10 min a 37 °C con el objeto de lisar las bacterias remanentes. Se centrifugó durante 5 min a 4000 rpm, para eliminar los restos celulares y una alícuota del sobrenadante fue conservada a 4°C como stock de fagos (título aproximado 10^{10} pfu/ml).

Se tomaron 8 ml de sobrenadante y se mezclaron con 8 ml de buffer TM (Tris.HCl 50 mM pH 7,4, SO_4Mg 10 mM) pasando todo el contenido a un tubo corex de 30 ml. Se agregó 320 μ l de ADNasa I/ ARNasa A (1 mg/ml de cada una en TM) y se incubó 15-30 min a temperatura ambiente.

Los fagos se concentraron por precipitación con PEG-ClNa, agregando 2 ml de ClNa 5N y, 2,2 g de PEG 6000. Se disolvió completamente el PEG mezclando por inversión. Se dejó 15 min en hielo, luego se centrifugó 10 min a 12000g a 4°C.

Descartado el sobrenadante, se resuspendió el pellet de fagos en 300 μ l de buffer TM. Se transfirió a un tubo Eppendorf. Se agregó 300 μ l de CHCl_3 , se mezcló bien y se centrifugó 5 min para separar las fases. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se realizaron 2 nuevas extracciones.

Se agregó a la fase acuosa 15 μ l de EDTA 0,5 M pH: 8,0 y 30 μ l de NaCl 5 M, 350 μ l de fenol equilibrado con Tris pH: 7,6 , se mezcló con vortex y centrifugó durante 5 min para separar las fases. Se repitió la extracción.

Finalmente a la fase acuosa se le agregó 875 μ l de etanol. Se incubó durante 20 min a -70 °C y se precipitó el ADN por centrifugación durante 15 min. Se lavó el pellet con etanol 80%. Se centrifugó por 2 min a 4°C, descartó el etanol y secó bajo línea de vacío.

El ADN fue resuspendido en 50 μ l de buffer TE.

El rendimiento fue de aproximadamente 2-5 ug de ADN/ml de cultivo. Las preparaciones resultaron adecuadas para corte de restricción y subclonado.

2.27) DETERMINACION DE LA LONGITUD DE LOS INSERTOS DE LOS FAGOS RECOMBINANTES.

Para determinar la longitud de los insertos clonados en λ gt11 se usaron dos estrategias metodológicas:

2.27.1) Purificación de los insertos a partir de fagos amplificados en medio líquido:

Amplificación de los fagos y purificación de su ADN como se detalla en 2.26.

El ADN así purificado se digirió con Eco R1 para liberar los insertos. La comprobación del corte se hizo por visualización de los brazos del fago λ . en un minigel de agarosa 0.4%.

Se rellenaron los extremos romos por *Fill-in* (reacción de rellenado) con [α^{32} P] dATP.

- Reacción de *fill-in*

Generalmente se procesaron varios clones simultáneamente por lo cual se preparó una mezcla de reactivos.

Para 10 muestras	H ₂ O	88 μ l
	buffer Med 10x	20 μ l
	dATP[α P ³²]3000 Ci/mmol	2 μ l
	fragmento Klenow(10 U)	10 μ l

Luego se agregaron 12 μ l de l mezcla a 8 μ l de ADN del recombinante tratado con EcoRI (aproximadamente 800 ng). Se incubó 30 min

a temperatura ambiente y se detuvo la reacción con 3 μ l de buffer de siembra BPB.

La longitud de los insertos se visualizó por autorradiografía del producto de cada digestión resuelto en geles nativos de poliacrilamida (4-6%). Se usó como marcador de peso molecular el ADN del fago λ gt11 digerido con Hind III-EcoRI (Pharmacia) marcado del mismo modo que los insertos.

En algunos casos se contaba con abundante cantidad de ADN no se marcó el inserto y se visualizó directamente en geles de agarosa teñidos con BrEt, utilizando los mismos marcadores de peso molecular.

2.27.2) Reacción de PCR:

Este procedimiento fue utilizado para determinar la longitud de los insertos clonados en λ gt11. También se amplificó para luego purificar los fragmentos y caracterizarlos.

Se utilizó el kit GENEAMP de PERKIN-ELMER CETUS. Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 100 μ l.

Una alícuota de fagos amplificados ($\approx 10^{10}$ μ fp/ml medio SM) fue centrifugada por 5 min en microcentrifuga para bajar las impurezas celulares.

Se tomaron 2 - 10 μ l de la parte superior del sobrenadante, se pasó a un tubo Eppendorff y llevó a volumen final de 50 μ l con H²Odd.

Se calentó durante 5 min a 100°C.

Luego se agregó, en el siguiente orden:

- buffer de reacción (PERKIN ELMER CETUS)	10 µl
- MgCl ₂ 25 mM	10 µl
- dATP 10 mM	2 µl
- dCTP 10 mM	2 µl
- dGTP 10 mM	2 µl
- dTTP 10 mM	2 µl
- <i>primer</i> 1218 λgt11 (<i>forward</i>) 25 µM	10 µl
- <i>primer</i> 1222 λgt11 (<i>reverse</i>) 25 µM	10 µl
-AmpliTaq ADN Polimerasa, frag Stoffel 1U	1 µl
- Aceite mineral SIGMA	50 µl

Los *primers* utilizados para la amplificación son complementarios a la porción de la β-galatosidasa del vector λgt11 flanqueante al sitio de corte EcoRI. La secuencia de los *primers* es:

1218 5´d(GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG)3´ 12pb upstream sitio EcoR1.

1222 5´d(TTGACACCAGACCACCTGGTAATG)3´ 20pb downstream sitio EcoR1.

La reacción se llevó a cabo en un aparato programable de la marca HYBAID modelo IHB101 (1989).

Se utilizó el siguiente programa de amplificación:

CICLO	PASO	TEMP.(°C)	TIEMPO	LOOPS (1)
1	1.01	92°C	7´	1
	1.02	50°C	2´	
2	2.01	72°C	1´	40
	2.02	92°C	1´	
	2.03	50°C	0.40´	
3	3.01	72°C	7´	1

(1) LOOP: es el número de veces que se repite cada ciclo.

Los ciclos para la amplificación del clon Lbb1 fueron levemente distintos:

Se reunió toda la mezcla de reacción (sin enzima), se incubó 10 min a 94°C - 2 min 55°C, luego se agregó la enzima; a partir de allí se repitieron 30 ciclos de:

- 3 min elongación a 72°C.
- 1 min denaturalización a 74°C.
- 1 min de annealing a 55°C.

Este cambio de condiciones permitió obtener grandes cantidades de una sola banda de 2,25 aproximadamente, la extensión en estas condiciones no daba productos de reacción incompletos.

Concluido el programa de amplificación (\approx 5 hs) se agregó a cada tubo de reacción 100 μ l de cloroformo para extraer el aceite mineral. Se recuperó la fase acuosa conteniendo el producto de amplificación.

Para determinar el PM del producto de PCR, se corrió una alícuota de 10 μ l en un minigel de 1,2 a 2% de agarosa con BrEt, incluyendo marcadores de PM, PHIX174/HaeIII (Pharmacia).

Los productos de amplificación obtenidos en según 2.27.1 y .2 fueron purificados en geles de agarosa de bajo punto de fusión (ver 2.35) para preparar sondas por *random priming* (2.38) o para subclonar en el fago M13 (2.28).

2.28) SUBCLONADO EN EL FAGO VECTOR M13

Para subclonar el ADNc de los recombinantes de λ gt11 se utilizó la forma replicativa (RF) del fago M13. Se utilizaron los vectores comerciales: M13RF mp18, M13 mp18/EcoR1 fosfataseado (PHARMACIA).

2.28.1) Preparación del inserto:

Como fuente de inserto se utilizaron:

Para el subclonado de insertos menores de 400 pares de bases (pb) se utilizó el producto de la digestión del ADN total de λ gt11, sin purificar el inserto liberado por el corte de restricción. Ya que debido a la diferencia de tamaño entre el fago λ gt11 y los insertos a subclonar hubiera sido necesario cortar 10 μ g de ADN del fago λ para poder eluir de un gel solo 100 ng de inserto.

Pero en los casos como Lbb1, con insertos significativamente mayores comienza a ser importante la competencia entre el inserto y los brazos de λ gt11 por el vector M13; por eso para estos casos se purificó el inserto, por geles de agaros de bajo punto de fusión (ver 2.35).

También se utilizó el ADNc amplificado por PCR. Para subclonarlos se digirieron los productos de cada amplificación con EcoRI.

2.28.2) LIGACION DEL ADNc AL VECTOR M13:

Las experiencias de ligado a ADN de M13 se llevaron a cabo en las siguientes condiciones:

Extremos	relacion molar vector:inserto	Vector	Ligasa	Temp	Tiempo
Cohesivos	1:1/1:5/1:10	10 ng	1 U	14-16°C	12-18 hs

La reacción se llevó a un volúmen final de 10 ul.

Como control de cada ligación se incluyó una reacción de ligado con vector sin inserto.

Los productos de ligación fueron utilizados para ensayos de transformación de una cepa de *E. coli* F⁺ (que le confiere un fenotipo portador de pili), JM101, llevadas a estado de competencia según el procedimiento que se describe a continuación.

2.28.3) Obtención de bacterias *E. coli* JM101 competentes

Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* JM101 seleccionada en medio mínimo (selección F[']) en 2 ml de medio 2TY, y se incubó O.N. a 37°C con agitación.

Del cultivo saturado; una parte se diluyó 1:5 en 2TY (5 ml) e incubó a 37°C para utilizar como cultivo estacionario y la otra parte, fue diluida 1:100 en 50 ml de 2TY, e incubada a 37°C hasta D.O.₅₅₀: 0,2-0,4.

El cultivo en fase exponencial fue cosechado por centrifugación durante 10 min a 3000 rpm. El pellet de bacterias se resuspendió suavemente en 0,5 vol (25 ml) de CaCl₂ 50 mM estéril frío. Se dejó 1 h en hielo.

Se centrifugó por 10 min, a 3000 rpm a 4°C. Se resuspendió el pellet en 1/10 del volumen original (5 ml). Las células así preparadas alcanzan el máximo de eficiencia de transformación recién a las 6hs, pudiendo ser guardadas en hielo hasta 24 hs, tiempo a partir del cual la eficiencia vuelve a bajar. (Maniatis et al, 1982).

2.28.4) Transformación de células competentes (JM101).

La eficiencia de transformación se determinó con ADN RF de M13 de masa conocida. Se empleó 0,3-0,5 vol de la reacción de ligación por cada ensayo de transformación.

200 μ l de bacterias competentes en frío.
0,5 vol de reacciones de ligación.
1 hora en hielo.
2 min a 42°C (*shock* térmico).
200 μ l del cultivo estacionario JM101.
35 μ l de X Gal 2%.
20 μ l de IPTG 100 mM.

Se mezcló con 3 ml de LB - *top* agarosa fundido mantenido a 48°C, y se volcó suavemente sobre placas de 9 cm de diámetro con LB y se incubó toda la noche a 37°C.

Se analizaron las placas de retardo de crecimiento de M13 obtenidas: Las placas azules corresponden a los fagos no recombinantes (M13 salvaje *lac* Z⁺) y las blancas corresponden a posibles M13 recombinantes (*lac* Z⁻).

En cada experiencia de transformación se incluyeron varios controles: a) bacterias solas sin ADN.

b) vector solo, autoligado.

c) 1 ng de ADN RF del fago M13 salvaje.

El criterio de validación de la experiencia fue el siguiente:

- No debía crecer una sola placa de retardo blanca en la transformación a.

La placa b no debía presentar, o presentar un un orden menos de placas blancas que las transformaciones no control.

La experiencia c da la eficiencia de transformación y esta debía estar en concordancia con el número de placas del control b.

Cumplidos estos tres requisitos se continuaba el análisis de las transformaciones de los subclones recombinantes. Los subclones positivos se identificaron por hibridación como se describe en 2.29 y 2.39. En el caso de insertos mayores que 800 pares de bases se picaron varias placas blancas, se preparó el ADNss y se identificaban los recombinantes por la diferencia en la migración

en gel de agarosa con respecto al fago M13mp18ss salvaje.

Una vez identificados los recombinantes, se preparó ADNsc (2.30) y se secuenciaron solo un par de subclones complementarios determinados por *C-test* como se detalla en 2.29.b.

2.29) SELECCION DE LOS SUBCLONES M13:

a) **Por rastreo con sondas radiactivas:**

La transferencia del ADN de las placas de retardo del crecimiento bacteriano se describe en la sección 2.23. La hibridización y lavado de los filtros se realizó como se describe en 2.39.

b) **Selección de los fagos complementarios, para su secuenciación:**
(Determinación de complementaridad por retardamiento en geles).

El método consiste en verificar el retardo de la migración en geles de agarosa del ADNsc de un fago recombinante M13 cuando el ADNsc de su inserto puede formar un híbrido parcial con otro fago M13 que lleva su cadena complementaria. Así se identifican pares de fagos M13 que contienen las dos orientaciones del inserto.

Se parte de la minipreparación de ADN simple cadena y se juntan de a pares las preparaciones.

- 5 ul ADNsc A (100-200 ng)
- 5 ul ADNsc B (100-200 ng)
- 1 ul NaCl 2.5 M

Se desnaturalizó 30 min a 60°C, en baño seco y se hibridizó enfriando lentamente hasta temperatura ambiente.

Luego se agregaron 2 µl de buffer de siembra (BPF). Las muestras así tratadas se corrieron en un gel de agarosa 0,7% y se seleccionaron los pares que se hayan retrasado en la corrida electro-

forética.

2.30) PREPARACION DE ADN DE SIMPLE CADENA DEL FAGO M13

Se partió de una placade inhibición de crecimiento bacteriano de fagos M13 recombinantes, aislada. Se la tomó incluida en un bloque de agar, o bien se tomó una porción con escarbadiante o con una punta para micropipeta P200.

Con este material se inoculó un tubo de 2 ml de 2TY conteniendo 10 μ l de un cultivo saturado de células JM101. Se incubó durante 5 hs a 37 °C. Se centrifugó por 10 min a 5000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf al que se le hizo una segunda centrifugación por 5 min.

Se transfirieron 1,2 ml del sobrenadante a un nuevo tubo al que se le agregó 200 μ l de una solución 20 % PEG 6000, 2,5 N ClNa. Se mezcló por inversión , se dejó 15 min a temperatura ambiente.

Se centrifugó durante 10 min y se descartó el sobrenadante, se centrifugó y se extrajo el PEG remanente en las paredes del tubo, con pipeta Pasteur afilada. Este paso es crítico porque el PEG interferiría con la reacción de secuencia.

El pellet de fagos se resuspendió en 200 μ l de TE.

Se extrajo con 100 μ l de fenol y se separaron las fases por centrifugación.

El fenol remanente en la fase acuosa se extrajo dos veces con 3 volúmenes de éter previamente saturado en H₂O^d.

La fase acuosa se precipitó con AcONa 0,3 M y 2,5 vol de etanol absoluto durante 20 min a -70°C , se centrifugó durante 15 min, descartando el sobrenadante.

El pellet fue lavado con etanol 70%, secado bajo línea de vacío y redisolto en 22 μ l de buffer TE.

Se utilizaron 5 μ l-7 μ l de cada preparación por cada reacción de secuenciación.

2.31) SECUENCIACION POR EL METODO DE SANGER:

SECUENCIACION DEL ADNc:

La secuenciación de ácidos nucleicos se llevó a cabo por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger, 1977). Para ello se utilizó el kit de secuenciación *SequenaseTM*, (USB Corp.) y el primer universal de M13 provisto por el mismo kit.

Se siguieron las instrucciones indicadas por los fabricantes con 5 μ l de ADNsc obtenido como se detalla en 2.30 (esto equivalía aproximadamente a 1 μ g).

Por cada reacción de secuencia (esto incluye las cuatro letras) se utilizaron 5 μ Ci de [-³⁵S]dATP (1250Ci/mmol). Se corrieron gels de poliacrilamida 6 u 8% según la zona a resolver y 7M urea (ver 2.32).

Para la secuenciación del recombinante Lbb1 se sintetizó un oligonucleótido a partir de la secuencia obtenida con el primer de M13. A partir de la secuencia obtenida con este primer interno se sintetizó un nuevo oligonucleótido para seguir leyendo hacia el extremo carboxi-terminal; que presentaba problemas de resolución por estructura secundaria. La secuencia de ambos oligonucleótidos se muestra en la Fig.25 de resultados.

2.31.2) Resolución de secuencias con fuerte estructura secundaria:

a) Con dITP:

Para resolver las compresiones observadas en los geles de secuencia de ADNc de Lbb1, se utilizó el análogo de dGTP (dITP) en la reacción de secuencia. Las condiciones de reacción son las mismas que se describen en 2.31. Se utilizaron los reactivos provistos por el kit *SequenaseTM*, (USB Corp.) para secuenciación con dITP. Como el dITP acentúa las pausas de la extensión y terminación de las cadenas sintetizadas durante la reacción; se corrió en paralelo con reacciones del mismo ADNc utilizando dGTP.

b) Con DMSO:

Se utilizaron los mismos reactivos del kit *SequenaseTM*, (USB Corp.), pero se cambiaron las condiciones de reacción y los primers utilizados. Se utilizó el inserto de Lbb1 y de RA2 purificados por gel de agarosa (2.35). El recombinante RA2 se utilizó como control de la reacción ya que su secuenciación no presentó problemas por estructuras secundarias. Se utilizaron los primers 1218 y 1222 utilizados para la reacción de PCR y en el caso de Lbb1 el primer interno 2 (ver secuencias de los primers en resultados Fig.24).

Annealing:

ADN (purificado, 100ng/ μ l)	5 μ l
5x reaction buffer	2 μ l
DMSO (100%)	1 μ l
primer (20 pmoles)	2 μ l

La mezcla se desnaturalizó durante 10 min a 100°C , y se agregó aceite mineral para prevenir la evaporación. Luego se colocó inmediatamente en hielo seco durante 5 min. Se llevó a temperatura ambiente y se agregaron 5,5 μ l de la siguiente solución:

DTT 0,1M	1 μ l
Reaction Mix (dGTP)	0,2 μ l
³⁵ S dATP (600Ci/mmol)	0,5 μ l
DMSO 100%	0,6 μ l
H ₂ O	3,0 μ l
Enzima (Sequenase)	0,2 μ l

Se dejó 2 min a temperatura ambiente y se alicuotó 3,2 μ l de esta racción a 4 tubos que contenían 2,5 μ l de cada una de las mezclas de dodeoxinucleótidos y 0,25 μ l de DMSO. Se incubaron todos los tubos a 37°C durante 20 min. Se paró la reacción agregando 5 μ l de Stop solution (kit USB).

En el momento de sembrar el gel se incubaron los tubos 3 min a 100°C Las condiciones de electroforesis y exposición del gel se describen en 2.32.

2.32) GELES DE POLIACRILAMIDA PARA SECUENCIAS DE ADN:

Se utilizaron geles verticales de 20 x 35 cm o 30 x 40cm, con espaciadores de 0,3 - 0,4 mm.

A partir de una solución stock de acrilamida: bisacrilamida (40:2) 40% se preparó una solución de 6 ó 8% en TBE 1X

Para la preparación de geles desnaturalizantes, se disolvieron 42 gr de urea (Sigma) cada 100 ml de solución de armado del gel. La polimerización se realizó llevando a 0,8 mg/ml de persulfato de amonio y 0,08 % V/V de TEMED.

Las electroforesis se llevaron a cabo aplicando una potencia constante de 35 W para geles de 20 x 35 cm y de 60 W para geles grandes de 30 x 40 cm.

Concluida la migración se fijó el gel en metanol 10 %, acético 10% y agua, durante 20 min. Los geles con urea luego de fijarlos

se enjuagaron con agua de la canilla para sacar la urea remanente.

Los geles se secaron en vacío a 80°C durante aproximadamente dos horas. Los filtros se expusieron sobre películas AGFA-GEVAERT Curix RP1 durante toda la noche a temperatura ambiente.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS:

2.33) PREPARACION DE ADN TOTAL DE *T.cruzi* Y *L.b.braziliensis* :

Se resuspendió 1 g (peso húmedo) de parásitos en 20 vol de buffer 1. Se agregó proteinasa K hasta la concentración final de 100 ug/ml y se incubó durante la noche a 37°C.

Se extrajeron las proteínas con fenol que luego se extrajo 3 veces con cloroformo-isoamílico.

Se recuperó la fase acuosa y precipitó el ADN en 2,5 vol de etanol absoluto y 0,1 vol de NaAcO 3M, pH: 6,0. El pellet se resuspendió en 10 ml de TE y se llevó a una concentración de 0,83 g/ml de CsCl más 0,01% de BrEt. Se realizó una ultracentrifugación en Sorvall OTD 65B con rotor de ángulo fijo 50ti a 40000 rpm durante 36 Hs a 18°C. Se recuperó la banda de ADN lineal.

Se extrajo el BrEt 7 veces con isobutanol. El ADN se precipitó en presencia de NaAcO 0,3 M y 2,5 vol de Etanol absoluto durante 15 min a -70°C, y luego se centrifugó durante 20 min a 10000 rpm a Temp amb. Se lavó 2 veces con Etanol 70% frío y se secó al vacío. Finalmente se guardó disuelto en TE a una concentración aproximada de 500 ng/ul.

2.33.1) CUANTIFICACION DE ADN:

a) Por absorvancia a 260 nm:

Para cuantificar el ADN se midió la absorvancia a 260nm, teniendo en cuenta que 1 u de DO₂₆₀ equivale a 50ug/ml de DNA.

b) Por Intensidad de fluorescencia:

Este método utilizado en la mayoría de los casos, consistió en correr en un minigel de agarosa tres diluciones seriadas de la muestra a cuantificar junto con otra muestra de DNA de masa conocida, y comparar las intensidades de la fluorescencia producida por la incidencia de luz ultravioleta sobre los ADNs previamente teñidos con BrEt.

La masa mínima detectable por banda es de alrededor de 10 ng.

2.34) SEPARACION DE ADN EN GELES DE AGAROSA:

Las concentraciones de agarosa utilizadas, en función del tamaño de las moléculas de ADN a resolver, se basaron en las descriptas por *Maniatis et al, 1982*.

Se fundió la agarosa en horno a microondas, y se agregó BrEt para llegar a una concentración final de 0,5 ug/ml.

Las corridas electroforéticas se realizaron generalmente en un campo de 5-10 V/cm a temp. amb. Se utilizó buffer de electroforesis TBE 1x y buffer de siembra 1x BPB. Los geles fueron visualizados mediante transiluminador de luz ultravioleta de 300 nm y fotografiados con una cámara Polaroid MP-4 con filtro rojo (RPC4) con película Polaroid 665 o 667.

2.35) PURIFICACION DE MOLECULAS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSION:

Para purificar el inserto liberado del vector por digestion con enzimas de restricción, se utilizó agarosa LMP de BRL o Nu Sieve GTC.

El procedimiento para armar el gel y el porcentaje de agarosa a utilizar son los descriptos para agarosa común (2.34). Los geles LMP de bajas concentraciones se corrieron a 4°C.

Se corrió el gel a 5 V/cm hasta obtener una buena resolución de las bandas. Se colocó el gel sobre un trasiluminador y se cortó el menor bloque de agarosa que contenía la banda que se quería purificar.

El bloque de agarosa fue colocado dentro de un tubo Eppendorf al que se agregó 200ul de buffer TE y 100 ul de AcONa 3 M pH 6. Luego se incubó a 65°C por 15 min para fundir la agarosa.

Se agregó un volúmen de fenol caliente y se agitó violentamente con vortex. Se centrifugó por 3 min en microcentrífuga. Se repitió la extracción con fenol y se realizaron 2 extracciones con cloroformo isoamílico.

La fase acuosa fue precipitada con 2 vol de Etanol absoluto. En los casos en que la masa de ADN era menor a 200 ng, se agregó carrier T40.

Se dejó 30 min precipitando en hielo. Se centrifugó por 15 min y se lavó el pellet con Etanol 70%, se secó y resuspendió en Buffer TE.

2.36) SOUTHERN BLOTS:

Para visualizar la hibridización de los ADNs corridos en geles de agarosa con sondas radiactivas, se transfirió el gel a membranas de nylon, del siguiente modo:

Una vez corrido el gel se lo pretrató durante 10 min con una solución de HCl 0,25N (favorece la transferencia de fragmento grandes). El gel se lavó con H₂O bidestilada durante 15 min con agitación lenta y se renaturalizó con una solución de NaOH 0,2N y NaCl 0,6N por 30 min ; posteriormente se hicieron 3 lavados de 20 min cada uno con buffer fosfato de sodio 0,025M, pH 6,5.

A continuación se transfirió el DNA a un filtro de HYbond N o Hybond N+ por capilaridad, según el método de *southern* (1975) en buffer 20 x SSC 12 hs. Antes de sacar el filtro se marcaron los lugares de siembra, se enjuagó la membrana suavemente con 2 X SSC y finalmente el ADN se fijó al filtro exponiéndolo durante 10 min a la luz ultravioleta.

Los filtros se guardaron secos entre 2 papeles wattman a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización.

Para poder reutilizarlos se sumergieron en una solución 0,1% con SDS, que se llevó a ebullición durante 30-60 min dejándose enfriar a temperatura ambiente.

2.37) ELECTROFORESIS DE ARN EN GELES DE AGAROSA-FORMALDEHIDO.

Estos geles fueron utilizados para visualizar la calidad de las preparaciones de ARN para construir las bibliotecas de expresión y experiencias de *Northern blot*.

a) Preparación de la muestra para la siembra en el gel;

Por cada carril del gel se preparó:

- 1-5 µg de ARN total (control calidad de preparaciones de ARN).
- 25 µg de ARN total o 5 µg de ARN poli A+ (*Northern blot*).

En ambos casos se agregó:

- 50%Formamida.
- 6% de Formaldehido.
- 1x de MAE (ver armado del gel).

El volúmen de la mezcla a sembrar se completó con H₂O.

Se incubó el ARN durante 15 min a 65°C , se lo pasó a hielo y se le agregó 1 µl de BrEt 0,2 mg/ml y buffer de siembra BPB 1x.

b) Preparación del gel desnaturalizante con formaldehido:

Se preparó agarosa 1,5% con el agregado de formaldehido 6% y tampón MAE 1X (Lehrach et al, 1977). El tampón MAE 10X contiene:

MOPS	0,2 M.
NaAcO	50 mM.
EDTA	10 mM.llevado finalmente a pH:7,0 con NaOH.

El formaldehido utilizado fue previamente desionizado y se controló que su pH no fuera menor que 5.

Como criterio de integridad y marcadores de peso molecular se utilizaron las bandas características de ARN ribosomal de *T. cruzi* o *Leishmania sp.* según el caso.

La corrida se realizó a temperatura ambiente a 8 V/cm y se agregó tampón de corrida hasta cubrir apenas el gel evitando la remoción del formaldehido. El ARN se visualizó directamente con lámpara de luz ultravioleta. En los casos necesarios se fotografió como se detalla en 2.34.

Las electroforesis para *northern blot* se corrieron dentro de la heladera, en Buffer MOPS 1x a 50 V durante toda la noche, hasta

que el BPB hubo migrado 18 cm aproximadamente, desde el lugar de siembra.

Para verificar la calidad de preparaciones de ARN se usaron mini-gel, adecuando las cantidades de los reactivos y condiciones de electroforesis a las dimensiones del gel.

c) Transferencia y fijación del ARN:

Finalizada la corrida electroforética, se transfirió el ARN a membranas de Nylon Hybond N+. La transferencia se realizó por capilaridad en el buffer 20 x SSC, durante 12 hs. Se marcó sobre el filtro los lugares de siembra de la muestra, para poder estimar los pesos moleculares en función de la distancia recorrida del mensajero que hibridizará con la sonda radiactiva, y la distancia recorrida por los ARN ribosomales (de peso molecular conocido). Finalmente se lavaron los filtros con 2 x SSC, para remover la agarosa, y se fijó el ARN por exposición de los filtros a luz ultravioleta durante 10 min.

2.38) PREPARACION DE SONDAS RADIOACTIVAS:

Feinberg y Vogelstein introdujeron el uso de secuencias al azar para iniciar la síntesis del ADN sobre un templado desnaturalizado en varios sitios a lo largo de su longitud. Por este método se puede marcar ADN sin necesidad de vectores específicos.

La cantidad de ADN sintetizado de NOVO generalmente excede la cantidad de ADN usado para iniciar la reacción, por lo tanto ocurre desplazamiento de hebra; así la misma región de ADN puede ser copiada más de una vez por diferentes hexanucleótidos al azar.

Se parte de bajas cantidades de ADN, permitiendo obtener sondas de muy alta actividad específica.

Reacción de marcado:

Se utilizó el kit de *Multiprime DNA labelling system* (Amersham) RPN.1601Z.

La reacción de marcado se realizó en las condiciones indicadas por el catálogo adjunto con el kit. Para la marcación generalmente se utilizó [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP 3000 ci/mmol, o [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP 3000 ci/mmol.

El ADN a partir del cual se sintetizaría la sonda se llevó a una concentración de 25 ng/ μl en no más de 10 μl de TE. Luego se desnaturalizó la muestra por calentamiento a 95°C o 100°C por 5 minutos en un baño de agua hirviendo y se enfrió rápidamente en hielo.

La reacción se dejó no menos de 5 hs a temperatura ambiente.

Precipitación selectiva del ADN :

Este procedimiento permite la precipitación de ADN de más de 20 nucleótidos de modo que los nucleótidos no incorporados quedan en el sobrenadante.

Concluida la reacción de marcado se agregó 50 μl de 4M AcoNH_4 pH: 4.5 y 200 μl de Etanol absoluto. Se incubó 15 minutos a -70°C.

Se calentó el tubo a 37°C 2 min, para resuspender los nucleótidos libres que puedan haber pellet.

Se centrifugó la muestra a 12000 rpm en microcentrifuga durante 15 min, se trasvasó el sobrenadante a otro tubo y se midió la radioactividad del pellet y el sobrenadante. La diferencia entre ambas permite estimar la eficiencia de incorporación.

Se lavó el pellet una vez en 500 μl de 0.67 M AcoNH_4 pH:4.5, 67% de Etanol y centrifugó por 1 minuto. Luego se descartó el sobre-

nadante y se lavó una vez en 90% de Etanol de la misma manera.

Finalmente se disolvió el pellet en TE pH: 8,0. Las sondas obtenidas fueron en generalmente tuvieron una actividad del orden de 10^9 dpm/ μ g.

2.39) CONDICIONES DE HIBRIDACION PARA SONDA DE ALTA HOMOLOGIA:

Las condiciones de hibridación utilizadas fueron para sondas con homología mayor del 90%.

Las hibridaciones se llevaron a cabo con 1.10^6 cpm/ml de solución de hibridación. Por cada cm^2 de Hybond N+ o nitrocelulosa se utilizó 0,05 ml de solución de hibridación.

Todas las hibridaciones se llevaron a cabo con el buffer de hibridación comercial: *Rapid hybridization system* de Amersham UK. Los tiempos de prehibridación e hibridación se llevaron a cabo según las especificaciones de los proveedores.

La prehibridación se llevó a cabo a 65°C durante 15 min, luego se inyectó la sonda radiactiva, desnaturalizada a 100°C por 5 min. La hibridación se realizó a la misma temperatura durante 2 hs.

Los filtros fueron lavados en condiciones de alta homología: Dos lavados de 20 min a temperatura ambiente durante 15 min en solución 2 x SSC con 2%SDS.

Dos veces a 65°C durante 20 min en 0,2 x SSC con 0,1% SDS.

En paralelo con los lavados se monitoreaban los filtros con un contador Geiger hasta obtener una buena relación entre la sonda hibridada específicamente y diferenciable del ruido de fondo.

Los filtros se expusieron sobre películas AGFA-GEVAERT Curix RP1 durante toda la noche a -70°C con pantalla intensificadora.

RESULTADOS

3.1) BUSQUEDA DE ANTIGENOS CON POSIBLE ACTIVIDAD LITICA:

3.1.1) Antecedentes:

Como se detalla en la introducción los anticuerpos líticos están dirigidos contra una o mas proteínas de superficie del parásito del estadio tripomastigote de T. cruzi.

Para trabajar con parásitos que reunieran todas las características de un tripomastigote infectivo, se decidió construir una biblioteca de expresión a partir de tripomastigotes sanguíneos de ratones infectados.

3.1.2) Construcción de la biblioteca en λ gt11

Para construir la biblioteca se eligió la cepa RA que desarrolla altas parasitemias en ratones, pudiendose obtener un número significativo de parásitos a partir de 50 ratones infectados.

Se extrajeron las formas sanguíneas de los parásitos de ratones infectados como se detalla en MM 2.4.1. Se obtuvo el ADNc a partir del RNA poli A+ de las formas sanguíneas de T. cruzi. Desde la síntesis del ADNc D.S. hasta el empaquetamiento *in vitro* de los genomas virales recombinantes se siguieron los pasos descritos en MM 2.11.

Se obtuvo una biblioteca con $1.5 \cdot 10^6$ fagos independientes de los cuales solo un 9% eran fagos λ gt11 no recombinantes. La biblioteca amplificada en E. coli Y1090 tuvo un título de $5 \cdot 10^9$ u.f.p./ml.

3.1.3) Estrategias de Inmunoselección:

De acuerdo con lo descripto en la introducción (1.10) los antígenos inductores de anticuerpos líticos (Ag Lit) deberían ser reconocidos por el suero de un paciente antes de iniciado el tratamiento tripanomicida pero no por suero del mismo paciente luego de la quimioterapia.

Para la realización de esta búsqueda se disponía de una serie de sueros caracterizados en función de su actividad lítica, cedidos por la Dra. Krettli (Belho Horizonte, Brasil ver MM 2.3.1; Tabla 1). La característica saliente de estas muestras era que pertenecían a un mismo paciente con seguimiento longitudinal de su capacidad lítica. Sin embargo estos sueros presentaban un muy bajo título de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Por lo tanto un rastreo inmunológico de una biblioteca de expresión debía realizarse con diluciones de suero muy bajas. Esto implicaba a) riesgo de agotar los sueros antes de la purificación total de los recombinantes y b) encarar un rastreo con alto ruido de fondo y la consiguiente dificultad en la identificación de los positivos.

Para reducir el número de recombinantes a analizar con estos sueros se buscaron estrategias alternativas de rastreo inmunológico.

Rastreo de la biblioteca con sueros de ratones:

El modelo de infección en ratón también ha sido utilizado para estudiar la inducción de anticuerpos líticos (Krettli y Brener 1982).

Para el rastreo de la biblioteca se utilizó una batería de sueros de ratones preparada por el Dr. Laguens (La Plata, Fac Medicina Cátedra de Anatomía).

El rastreo realizado producía un elevado ruido de fondo debido al alto título de anticuerpos anti-E. coli. Esto trajo aparejado una gran incertidumbre en la detección de los positivos.

Para reducir al mínimo este problema se preabsorbieron los sueros con lisado de E. coli (ver MM sección 2.22.).

El ruido de fondo no se pudo reducir más. Por lo tanto se buscó otro camino.

Rastreo de la biblioteca con sueros humanos:

Existía la posibilidad de utilizar otros sueros humanos en los rastreos. Estos tenían pro y contras en relación con los sueros ya citados.

La diferencia fundamental era que no se poseían sueros con y sin actividad lítica (Lyt+ y Lyt- respectivamente) provenientes de un mismo paciente. Eran sueros de diversos pacientes sin actividad lítica debido a quimioterapia, y con actividad lítica. Así el rastreo diferencial de la biblioteca con sueros Lyt+ y Lyt- podría servir para acotar el número final de recombinantes a analizar finalmente con los sueros brasileros.

Con este objetivo se realizó el rastreo con las siguientes características:

Se prepararon dos filtros de nitrocelulosa por cada placa de petri con 3×10^4 fagos. Cada filtro se incubó y reveló primero con un suero Lyt- y luego con otro Lyt+.

De este modo los 30.000 fagos fueron rastreados simultáneamente con cuatro sueros distintos.

El o los fagos recombinantes elegidos debía ser positivos solo para los sueros Lyt+.

Tabla 3: Características que debería presentar el clon elegido:

	FILTRO I		FILTRO réplica	
	suero 1 Lyt-	suero 2 Lyt+	suero 3 Lyt-	suero 4 Lyt+
reacti vidad del clon LITICO.	<i>negativo</i>	<i>positivo</i>	<i>negativo</i>	<i>positivo</i>

La tabla muestra la reactividad que debería presentar el clon "lítico".

3.1.4) Resultados del rastreo inmunológico:

A partir del rastreo de $6 \cdot 10^4$ fagos se detectaron 9 clones positivos, de acuerdo al esquema anterior.

Las características de los clones positivos obtenidos en rastreo diferencial se detallan en la tabla 4.

La purificación de los recombinantes se hizo con el suero, hacia el cual presentaban mayor reactividad. Sólo el clon recombinante Lyt8 reunió todas las características enunciadas en la tabla 3 y fue considerado como lítico. Había otros fagos que reaccionaban con uno solo de los sueros Lyt+ se siguieron purificando para no omitir aquellos que pudieran ser subvaluados por su baja reactividad con el segundo suero Lyt+.

Tabla 4:

Reactividad de los clones seleccionados:

CLON	suero 1	suero 2	suero 3	suero 4
Lyt1	-	++	-	-
Lyt2	-	+	-	-
Lyt3	-	++	-	-
]Lyt4	-	+	-	-
Lyt5	-	+++	-	-+
Lyt6	-	-	-	++
Lyt7	-	-	-	-+
Lyt8	-	+++	-	+++
Lyt9	-	-+	-	-+

Los sueros utilizados en el rastreo fueron: 1: GJ 2: AG, 3: GL, 4:TM (ver MM 2.3.1 y Tabla 2).

El número de cruces indica la intensidad de reacción. (-+) dudosa, (+) débil, (++) moderada (+++) intensa.

Algunos recombinantes se perdieron después del primer rastreo. Por este motivo solo llegaron a ser purificados completamente los recombinantes: Lyt5, Lyt6, Lyt8 y Lyt2.

3.2) *CRITERIOS DE IDENTIDAD ENTRE LOS FAGOS:*

Los fagos purificados fueron clasificados para descartar aquellos que contuvieran la misma información genética. Para ello nos basamos en los siguientes criterios:

Inmunológico:

- 1- Reactividad con distintos sueros.
- 2- Reactividad inmunológica cruzada(Ensayada por reactividad de anticuerpos específicos).

Genéticos:

- 3- Tamaño del inserto del recombinante.
- 4- Hibridización cruzada.

Se consideraron idénticos aquellos fagos que cumplieran los cuatro criterios, es decir que: reaccionaran del mismo modo con todos los sueros y anticuerpos específicos, tengan el mismo tamaño de inserto e hibridizen entre sí.

Se definieron como equivalentes aquellos que solo cumplieran los requisitos 1 y 2.

3.2.1) Reactividad inmunológica de los recombinantes:

En la sección 3.1.4. de resultados se describe la reactividad inmunológica de los fagos frente a varios sueros. En este ensayo puede observarse que los cuatro recombinantes tienen diferente reactividad inmunológica para los sueros utilizados en el rastreo.

Para completar su caracterización inmunológica, los mismos fueron enfrentados con anticuerpos anti-JL5 (MM 2.2.2), anti-JL52 (MM 2.2.2), inmunopurificados por la técnica de Hall como se describe en MM sección 2.19. Además los fagos se enfrentaron al suero PM que poseía fuerte reactividad con una proteína de T. cruzi de aproximadamente 70 kDa en western blot (ver más adelante).

El resultado de esta experiencia se muestra en la Fig. 5.

Con este experimento clasificamos los fagos según su reactividad inmunológica:

- _ 2 fagos semejantes a J15:
 - Lyt 6
 - Lyt 2
- _ 1 fago reconocido por PM:
 - Lyt 8

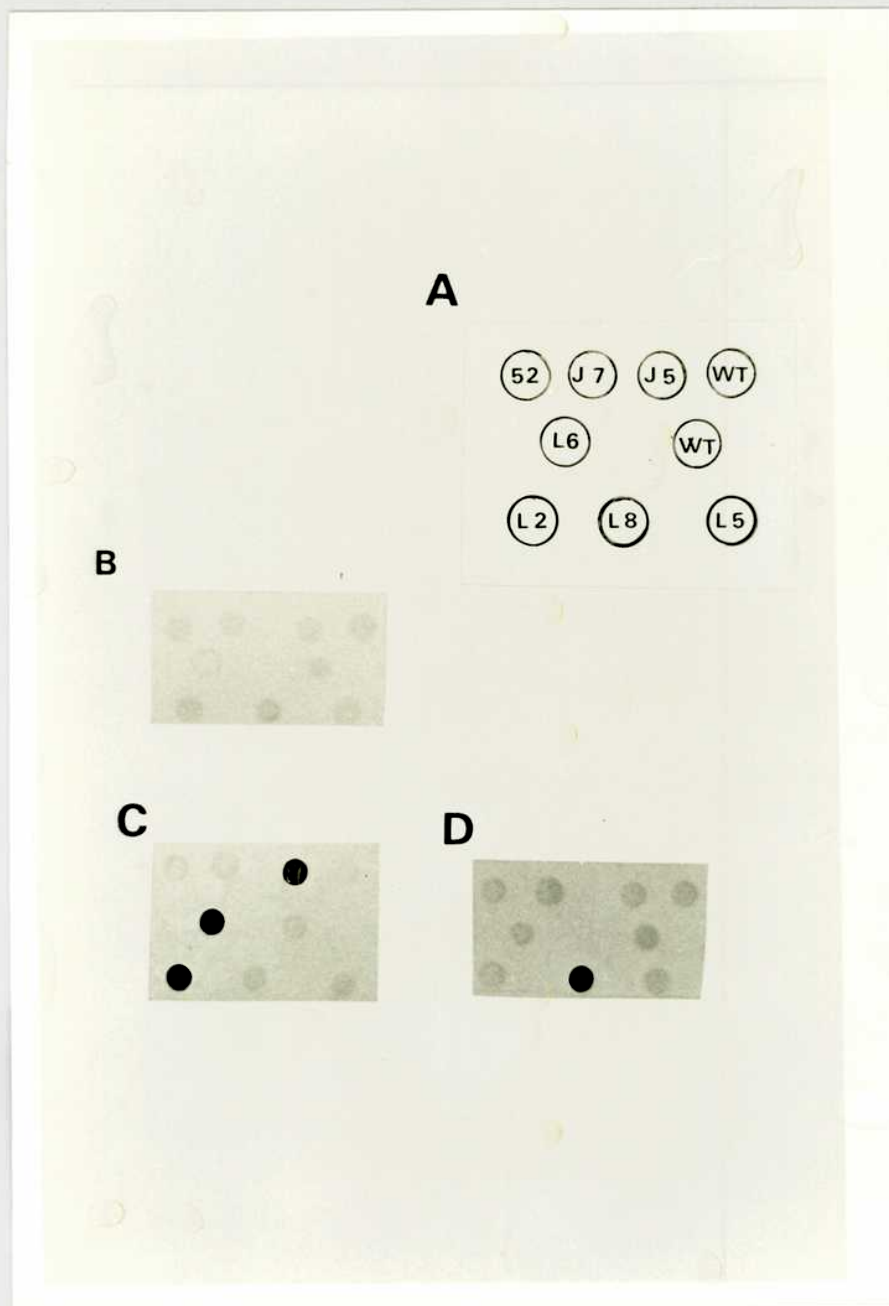


Figura 5:

Reactividad inmunológica de los fagos recombinantes purificados. Los recombinantes se sembraron sobre un césped de bacterias *E. coli* Y1090. Antes de la formación de las placas de lisis se cubrieron con un filtro de nitrocelulosa al cual se transfieren las proteínas de fusión expresadas por los fagos recombinantes (MM 2.14.4). El panel A muestra el orden de siembra de los recombinantes: WT: λ gt11 salvaje; J5: JL5; J7: JL7; 52: JL52 (ver MM 2.2.2); L6: Lyt6; L5: Lyt5; L8: Lyt8; L2: Lyt2. Los filtros de nitrocelulosa fueron incubados con: B: anticuerpos anti-JL52 inmunopurificados a partir de un suero de paciente Chagásico crónico; C: anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados a partir de un suero de paciente con Chagas crónico (MM 2.11), D: suero del paciente PM (1:3000).

Los anticuerpos anti-JL52 no reaccionaron con ninguno de los recombinantes analizados. El fago Lyt 5 tampoco fue reconocido por los anticuerpos utilizados.

Los fagos del grupo JL5 eran muy probablemente porciones de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*.

El fago Lyt8 reaccionó muy fuertemente con el suero PM diferenciándose del resto.

3.2.2) Identidad por homología de secuencias de ADN:

Ensayo de placas de lisis con sondas radioactivas.

El ADNc de los fagos estudiados en las experiencias anteriores fueron analizados por la técnica de Dot blot (ver MM 2.15).

Los insertos de los fagos Lyt2, Lyt5, Lyt6 y Lyt8 fueron utilizados para preparar sondas radioactivas (ver MM 2.38). Las hibridizaciones se llevaron a cabo en condiciones de alta rigurosidad (ver MM 2.39).

Las autoradiografías correspondientes se muestran en la Fig.6.

La sonda Lyt8 hibridizó únicamente con ADN del fago Lyt8, en coincidencia con su reactividad inmunológica (Fig. 5).

Lo mismo sucedió con la sonda Lyt5 y Lyt6, solo reaccionaron con sigo mismos. La sonda Lyt2 hibridizó con JL5, con sigo mismo pero no hibridizó con Lyt6.

El análisis de estos resultados (Fig. 5 y 6) permitió clasificar los fagos en cuatro grupos según se indica en la Tabla 5.

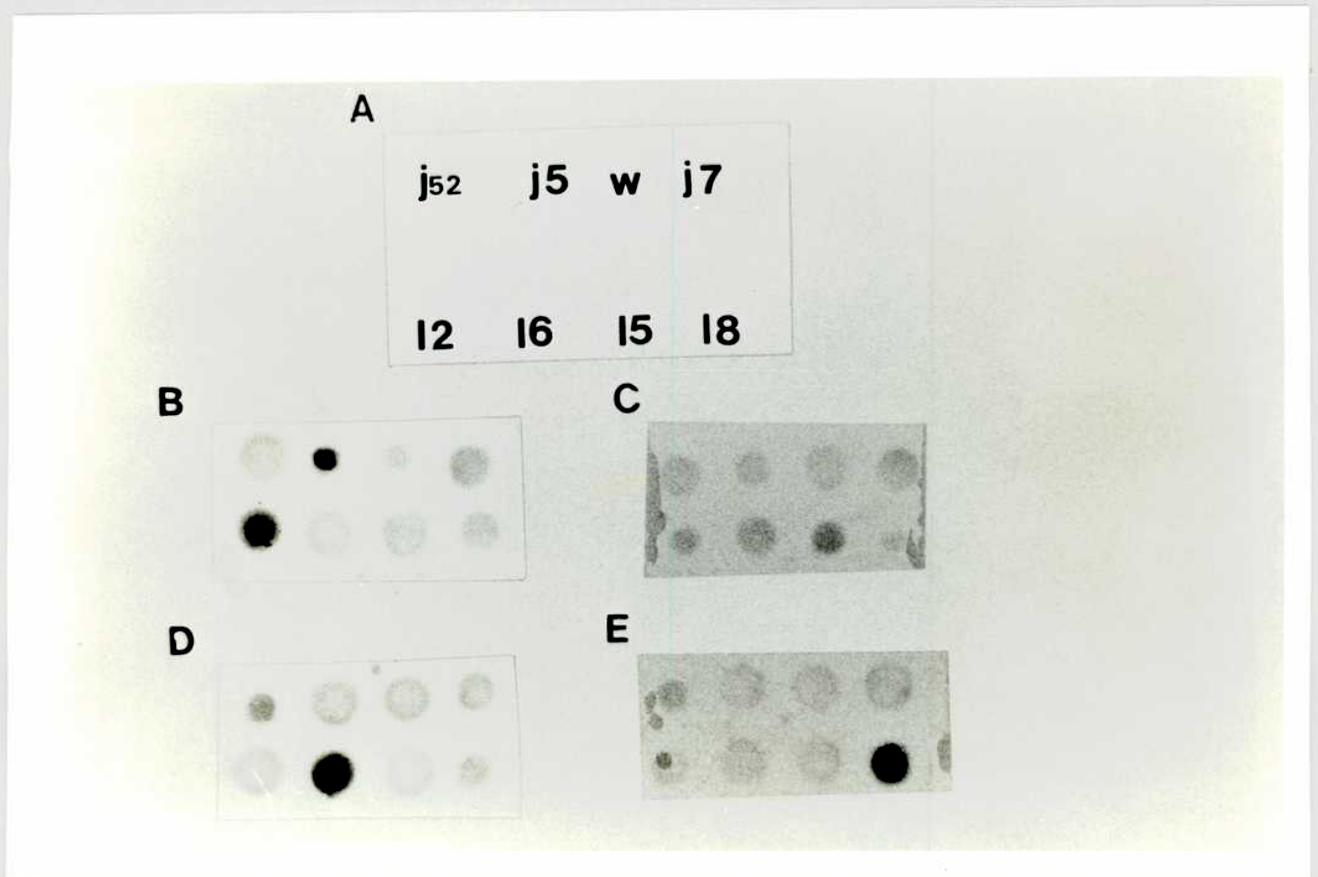


Figura 6:

Identidad de los fagos recombinantes por homología de secuencia de ADN. Los recombinantes se sembraron sobre un césped de bacterias *E. coli* Y1090 y se incubaron toda la noche a 37°C. Una vez formadas las placas de lisis se cubrieron con filtros de nylon. El ADN transferido se desnaturalizó y fijó como se detalla en MM (falta escribir esto). Los filtros se hibridizaron con las sondas correspondientes y se expusieron para obtener las autorradiografías (MM 2.38 y 2.39). Panel A: Orden de siembra de los recombinantes. B: Filtro hibridizado con la sonda Lyt2; C: sonda Lyt5; D: sonda Lyt6; E: sonda Lyt8.

TABLA 5:

GRUPOS inmunológicos	Fago	grupos por homología de secuencia nucleotídica.
PM	Lyt8	Lyt8.
(?)	Lyt5	Lyt5.
P-JL5:	Lyt2	P-JL5.
P-JL5	Lyt6	Lyt6.

El signo de interrogación para definir el grupo inmunológico de Lyt5 se debe a que este no ha podido ser agrupado en ninguno de los grupos conocidos. También se intentó resaltar la diferencia entre la reactividad inmunológica y la hibridización de sondas que se observaron para los fagos Lyt6, JL5 y Lyt2.

La reactividad inmunológica de los fagos Lyt6 y Lyt2, y la homología de secuencia de Lyt2 con JL5 señalaron a estos recombinantes como integrantes de la familia de proteínas ribosomales P. Su estudio fue encarado por Alejandro Schijman, (tesis en preparación).

Por otro lado los fagos Lyt5 y Lyt8, no eran idénticos ni podían agruparse en función de su reactividad inmunológica. Para una mayor caracterización de ambos se continuó con su estudio genético.

3.3) CARACTERIZACION GENETICA DE LOS FAGOS LYT5 Y LYT8:

La caracterización genética de los recombinantes Lyt5 y Lyt8 se realizó para:

- a) identificar la secuencia clonada.
- b) determinar el origen parasitario de los péptidos clonados.

3.3.1) Determinación del tamaño de los insertos:

Por la técnica de PCR se amplificaron los insertos de ambos recombinantes y el producto de la amplificación se purificó por gel de agarosa como se detalla en MM 2.27.2.

El recombinante LYT8 contiene un inserto de aproximadamente 1100 pares de bases, y el fago Lyt5 contiene un inserto algo menor que 100 pares de bases, por este motivo no se continuó con su estudio.

3.3.2) Caracterización del ARNmensajero que codifica para el recombinante Lyt8:

Se corrió el ARN total de *T. cruzi*, estadio tripomastigote en gel de agarosa 1,5% formaldehído y se transfirió a una membrana Hybond N+ como se detalla en MM 2.37. Los filtros fueron hibridizados con una sonda radioactiva del inserto LYT8, obtenida por *Random priming* del ADNc purificado (ver MM 2.38 y 2.39).

El análisis de *Northern blot* (Fig.7) indica que el ARN mensajero que codifica para LYT8 tiene un tamaño aproximado de 2,5 kb.

3.3.3) Southern blot del recombinante Lyt8:

El resultado de *southern blot* se visualiza en la Fig.7 panel A. La sonda Lyt8 hibridizó con una banda de mas de 25 kb luego de digerir el ADN con EcoRI, y una banda de 2,5 kb cuando el ADN total de *T. cruzi* fue digerido con SmaI. Dado que se observó una sola banda en ambos casos es probable que el ADN que codifica para Lyt8 esté localizado en un solo locus en la cepa RA. No se puede excluir la existencia de pseudogenes relacionados para lo cual debería realizarse la misma experiencia pero en condiciones de menor astringencia.

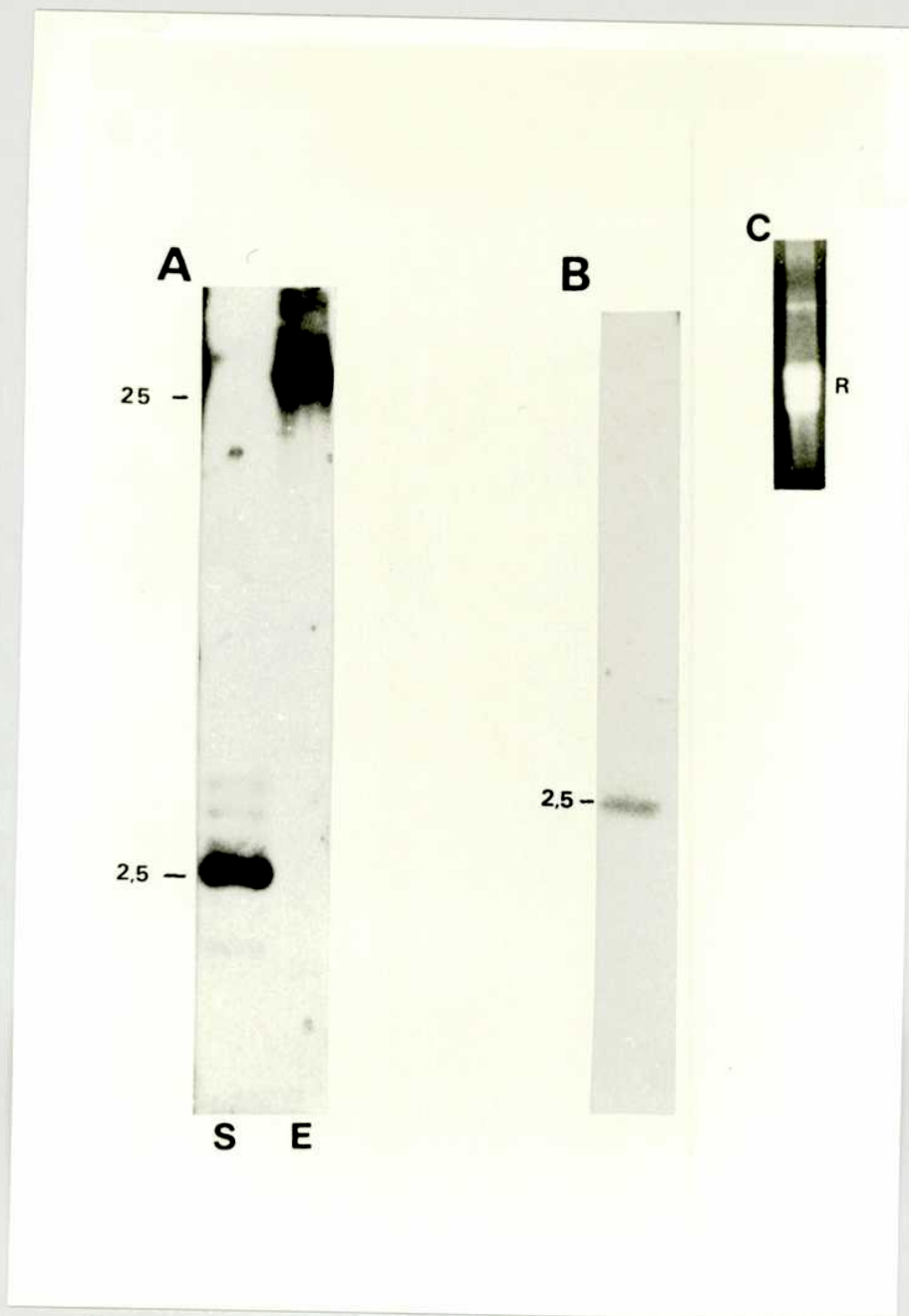


Figura 7:

Análisis de *Southern* y *Northern blot* de *T. cruzi* para el fago Lyt8. Panel A: Se corrieron 10 µg/calle de DNA genómico digerido con las enzimas de restricción E: EcoR I y S: SmaI (ver MM 2.25 y 2.37); hibridizado con la sonda del inserto Lyt8 marcado con P³² como se detalla en MM 2.38. El fago lambda digerido con HindIII fue utilizado como patrón de pesos moleculares que se expresan en kb. Panel B: Se corrieron 10 µg de ARN total de *T. cruzi* RA/calle en geles de agarosa con formaldehído (ver MM 2.37). Se transfirió a membranas de nylon. El filtro fue hibridizado con la sonda Lyt8 marcada con P³² (ver MM 2.38). Panel C: muestra el estado del ARN (tinción con Bromuro de Etidio) utilizado en las experiencias de *Northern blot*.

3.3.4) Secuenciación del clon LYT8:

Para secuenciar el ADNc Lyt8 se siguieron dos caminos. Por un lado se subclonó en M13 el producto de amplificación por PCR y por otro lado se subclonó el ADNc obtenido por digestión con EcoRI (ver MM 2.26 y 2.27) a partir del ADN total del fago lambda.

La secuencia total del ADNc se obtuvo por superposición de las secuencias obtenidas de la cadena codante y su complementaria.

En ambos casos se corrieron geles de tres depósitos para extender la lectura.

La secuencia obtenida se muestra en la Fig.8.

La comparación de la secuencia con el banco de datos EMBL/GenBank, el tamaño del mensajero y el perfil del southernblot son coincidentes: Lyt8 codifica para la región carboxiterminal de una proteína de choque térmico de 70 kd de T. cruzi descrita por primera vez por para la cepa Maracay (Requena y col. 1988) y luego para la cepa Perú (Engman y col en 1989), ver Fig.16.

3.4) CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LYT8:

La caracterización inmunológica se basa en la reactividad cruzada que debería existir entre el producto del ADNc clonado y determinantes antigénicos de proteínas parasitarias. En este caso los anticuerpos anti-Lyt8 inmunopurificados del suero PM deben reaccionar con proteínas de tripomastigotes de T. cruzi.

Para ello, los anticuerpos que reconocen secuencias del fragmento clonado, son eluidos y posteriormente utilizados para identificar la proteína parasitaria con la cual comparte determinantes anti-génicos.

AAG AAA AGC CAG ATC TTC TCG ACG TAC CCG GAC AAC CAG CCG GGC GTG
K K S Q I F S T Y P D N Q P G V
CAC ATC CAG GTC TTT GAG GGG GAG CGT GCG ATG ACG AAG GAC TGC CAC
H I Q V F E G E R A M T K D C H
CTG CTC GGC ACA TTC GAC CTG TCC GGC ATC CCG CCG GCG CCG CGC GGT
L L G T F D L S G I P P A P R G
GTG CCC CAG ATT GAG GTG ACC TTT GAC CTC GAC GCC AAC GGC ATC CTG
V P Q I E V T F D L D A N G I L
AAC GTG TCC GCG GAG GAG AAG GGC ACC GGC AAG CGC AAC CAG ATT GTC
N V S A E E K G T G K R N Q I V
ATC ACG AAC GAC AAG GGC CGC CTG AGC AAG GCG GAC ATT GAG CGC ATG
I T N D K G R L S K A D I E R M
GTG TCC GAG GCT GCC AAG TAC GAG GCG CAG GAC AAG GAA CAG CGC GAC
V S E A A K Y E A Q D K E Q R D
CGC ATT GAC GCA AAG AAC GGT CTT GAG AAC TAC GCA TTT TCG ATG AAG
R I D A K N G L E N Y A F S M K
AAC ACC GTA AAC GAG CCG AAC GTC GCT GGC AAG ATT GAG GAG GCC GAC
N T V N E P N V A G K I E E A D
AAG AAC ACG ATT ACG AGT GCC GTG GAG GAG GCA CTG CAA TGG CTG AAC
K N T I T S A V E E A L Q W L N
AAC AAC CAG GAG GCC AGC AAG GAG GAG TAC GAG CAC CGC CAG AAG GAG
N N Q E A S K E E Y E H R Q K E
CTG GAG AAC CTG TGC ACG CCC ATC ATG ACG AAG ATG TAC CAG GGC ATG
L E N L C T P I M T K M Y Q G M
GGC GCG GGC GGC GGT ATG CCC GGA GGT ATG CCT GGT GGA ATG CCC GGA
G A G G G M P G G M P G G M P G
GGT ATG CCT GGT GGA ATG CCC GGG GGC ATG CCT GGC GGC GCG AAC CCG
G M P G G M P G G M P G G A N P
TCG TCT TCG TCA GGA CCG AAG GTG GAG GAA GTG GAC TGA GAGCGCA TCC
S S S S G P K V E E V D *
CCGA AGATGTTT TCATGGC GGCCTCT GCTCGCG AACCAA TAGCCCG TTGGTTT
TCTCCCT TGTAGAGC GTAGAGGT CTGCGACA AACCCAG CTGCCA TCACTAT TTT
TATT ATTGGTT TTTTCCC TCTCCATT ATTATTAT TATTATT ATTGTT TTTCTTC
GCTCTCC ATTATTA TTATTGTT ATTATTAT TATTACGG TTGTTAA AAAAAAAAAA
AAA A AAAAAA

Figura 8:

Secuencia de nucleótidos y su traducción a aminoácidos del cADN del recombinante Lyt8. Las letras resaltadas señalan las repeticiones GGMP. (*): codón de finalización de la traducción.

3.4.1) Proteínas de *T. cruzi* reconocidas por anticuerpos anti-Lyt8:

Los anticuerpos anti-Lyt8 fueron preparados por el método de Hall (Hall y col. 1984) que se describe en MM sección 2.19.

Estos anticuerpos reaccionaron con una sola banda de 70 kDa en Western-blot de extracto total de *T. cruzi*. En la Fig.9 calle 3 puede observarse la banda de 70 kda reconocida por los anticuerpos inmunopurificados.

3.5) ESTUDIO DE LA hsp70 DE *T. cruzi*:

Para ampliar la secuencia clonada (estadio tripomastigota de la cepa RA) y estudiar las formas del estadio epimastigote de la cepa Tul 2, utilizamos dos tipos de rastreo:

3.5.1) Rastreo inmunológico de la biblioteca de tripomastigotes:

Para el rastreo de la biblioteca se utilizaron anticuerpos anti-Lyt8 inmunopurificados del suero PM. A partir de $3 \cdot 10^4$ fagos de la biblioteca amplificada. Se aisló un recombinante que se denominó: M98.

3.5.2) Rastreo con sondas radioactivas de la biblioteca de epimastigotes:

La biblioteca de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tul 2 fue construida en el laboratorio en 1987 (Mesri tesis Doctoral); El rastreo se realizó con la sonda Lyt8. Se utilizó ADN del fago Lyt8 como control positivo del rastreo. Las condiciones de hibridación utilizadas fueron de alta rigurosidad, para encontrar secuencias con alta homología como se detalla en MM 2.39.



Figura 9:

Reactividad de los anticuerpos anti-Lyt8 con proteínas totales de tripomastigotes de cultivo. Se depositaron 30 μ g/calle de homogenato total de los parásitos. El gel se corrió como se detalla en MM 2.6. Una parte se tiñó con Coomassie blue, ver 2.6.1 (calle 1) y la otra se transfirió a un filtro de nitrocelulosa (MM 2.6.2). El filtro se incubó con los anticuerpos anti-Lyt8 y reveló como se describe en MM 2.24 (calle 3). La calle 2 muestra los marcadores de peso molecular.

De este rastreo se obtuvieron 5 clones positivos y se purificaron a homogeneidad reutilizando la sonda. El proceso de purificación eliminó 3 de los 5 fagos iniciales. Los nombres de los fagos son: HSL12 y HSL13.

3.6.) *CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LOS NUEVOS CLONES:*

Se ensayó la reactividad de los fagos M98, HSL12 y HSL13 con anticuerpos anti-LYT8 inmunopurificados del suero AG (ver MM 2.3.1 y Tabla 2).

Se realizaron ensayos de placas de lisis. Solo el recombinante M98 expresó una proteína de fusión reconocida por los anticuerpos anti-Lyt8, indicando que ambos recombinantes comparten determinantes antigénicos (Fig.10).

La no reactividad de los fagos HSL podía deberse a dos motivos. Por un lado, que ninguno de los clones expresaran la proteína de fusión en fase para poder ser reconocida inmunológicamente por los anticuerpos. O bien que alguno de los recombinantes presente homología de secuencia pero no reaccione inmunológicamente por no compartir determinantes antigénicos con el ADNc de fago Lyt8. El tamaño de las proteínas de fusión obtenidas para los recombinantes HSL12 y HSL13, confirman que las secuencias no estaban en fase con el marco de lectura de la β -galactosidasa.

3.7) *CARACTERIZACION GENETICA:*

3.7.1) Determinación del tamaño de los insertos:

La determinación del tamaño fue uno de los criterios que utilizamos para discriminar los fagos ya que en este caso trabajamos con bibliotecas amplificadas.

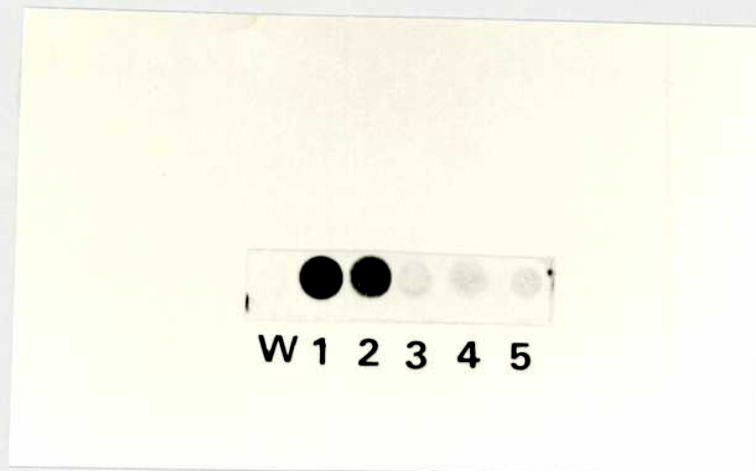


Figura 10:

Reactividad cruzada de los anticuerpos anti-Lyt8 purificados del suero PM con las proteínas de fusión producidas por los recombinantes Lyt8, M98, HSL12 y HSL13. Los fagos se sembraron sobre el césped de *E. coli* Y1090. Antes de visualizarse la lisis bacteriana, se cubrieron con un filtro de nitrocelulosa impregnado en IPTG hasta la formación de las placas de lisis (MM 2.13.4). 1: recombinante Lyt8, 2: recombinante M98, 3: recombinante HSL12, 4: recombinante HSL13, 5: recombinante JL7 (ver MM 2.2.2); W: fago λ gt11 salvaje.

El tamaño de los recombinantes M98, HSL12 y HSL13 se determinó por PCR (MM 2.27.c), en el mismo ensayo también se amplificó LYT8 como control y se corrió junto con todas las muestras mas los marcadores de Peso molecular.

El recombinante M98 contenía un inserto de 1300 pares de bases, HSL12: aproximadamente 600 y HSL13: 300 de pares de bases.

3.7.2) secuenciación del ADNc de los recombinantes:

El ADNc de los tres recombinates se subclonó en M13-mp18 y se-
cuenció como se detalla en MM 2.28 y 2.31.

Con respecto al ADNc de Lyt8 la secuencia del recombinante M98 se
extiende 96 pares de bases hacia el extremo 5' del mensajero. El
resto de la secuencia es idéntica (Fig.11).

Este nuevo recombinante dió un patrón de *Southern* y *Northern blot*
iguales a los de LYT8 confirmando la identidad determinada por la
secuencia.

Las secuencias de los recombinantes HSL12 y HSL13 presentaron di-
ferencias de secuencias con respecto a Lyt8 (Figs.12 y 13). Algu-
nas podrían atribuirse a la diferencia entre cepas, como el caso
de HSL12 (Fig.12), sin embargo en el caso del recombinante HSL13,
hay extensas diferencia en la región 3' no codante que no pueden
ser explicadas del mismo modo, ver Fig.14.

La comparación de las secuencias traducidas del ADNc de los re-
combinantes HSL con la de los recombinantes Lyt8 y M98, muestra
que ambas proteínas son idénticas excepto en el número de repeti-
ciones del terapéptido GGMP que son cuatro para la cepa Tul 2 y
seis para la cepa RA (ver Figs.16 y 27).

CCG CTG ACG CTT GGC ATC GAG ACG GCG GGT GGC GTC ATG ACG TCG CTG
 P L T L G I E T A G G V M T S L
 ATC AAG CGC AAC ACG ACG ATT CCG ACC AAG AAA AGC CAG ATC TTC TCG
 I K R N T T I P T K K S Q I F S
 ACG TAC CCG GAC AAC CAG CCG GGC GTG CAC ATC CAG GTC TTT GAG GGG
 T Y P D N Q P G V H I Q V F E G
 GAG CGT GCG ATG ACG AAG GAC TGC CAC CTG CTC GGC ACA TTC GAC CTG
 E R A M T K D C H L L G T F D L
 TCC GGC ATC CCG CCG GCG CCG CGC GGT GTG CCC CAG ATT GAG GTG ACC
 S G I P P A P R G V P Q I E V T
 TTT GAC CTC GAC GCC AAC GGC ATC CTG AAC GTG TCC GCG GAG GAG AAG
 F D L D A N G I L N V S A E E K
 GGC ACC GGC AAG CGC AAC CAG ATT GTC ATC ACG AAC GAC AAG GGC CGC
 G T G K R N Q I V I T N D K G R
 CTG AGC AAG GCG GAC ATT GAG CGC ATG GTG TCC GAG GCT GCC AAG TAC
 L S K A D I E R M V S E A A K Y
 GAG GCG CAG GAC AAG GAA CAG CGC GAC CGC ATT GAC GCA AAG AAC GGT
 E A Q D K E Q R D R I D A K N G
 CTT GAG AAC TAC GCA TTT TCG ATG AAG AAC ACC GTA AAC GAG CCG AAC
 L E N Y A F S M K N T V N E P N
 GTC GCT GGC AAG ATT GAG GAG GCC GAC AAG AAC ACG ATT ACG AGT GCC
 V A G K I E E A D K N T I T S A
 GTG GAG GAG GCA CTG CAA TGG CTG AAC AAC AAC CAG GAG GCC AGC AAG
 V E E A L Q W L N N N Q E A S K
 GAG GAG TAC GAG CAC CGC CAG AAG GAG CTG GAG AAC CTG TGC ACG CCC
 E E Y E H R Q K E L E N L C T P
 ATC ATG ACG AAG ATG TAC CAG GGC ATG GGC GCG GGC GGC GGT ATG CCC
 I M T K M Y Q G M G A G G G M P
 GGA GGT ATG CCT GGT GGA ATG CCC GGA GGT ATG CCT GGT GGA ATG CCC
 G G M P G G M P G G M P G G M P
 GGG GGC ATG CCT GGC GGC GCG AAC CCG TCG TCT TCG TCA GGA CCG AAG
 G G M P G G A N P S S S S G P K
 GTG GAG GAA GTG GAC TGA GAGCGCA TCCCCGA AGATGTTT TCATGGC GGCCTCT
 V E E V D *
 GCTCGCG AACCAA TAGCCCG TTGGTTT TCTCCCT TGTAGAGC GTAGAGGT CTGCGACA
 AACCCAG CTGCCA TCACTAT TTTTATT ATTGGTT TTTTCCC TCTCCATT ATTATTAT
 TATTATT ATTGTT TTTCTTC GCTCTCC ATTATTA TTATTGTT ATTATTAT TATTACGG
 TTGTTAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 11:

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del recombinante M98. Las letras resaltadas señalan las repeticiones GGMP. (*): Codón de finalización de la traducción. El ADNc del fago M98 tiene una longitud de 1016 pares de bases (pb).

AAG	GAA	CAG	CGC	GAC	CGC	ATT	GAC	GCA	AAG	AAC	GGT	CTT	GAG	AAC	TAC
K	E	Q	R	R	D	I	D	A	K	N	G	L	E	N	Y
GCA	TTT	TCG	ATG	AAG	AAC	ACC	GTA	AAC	GAG	CCG	AAC	GTC	GCT	GGC	AAG
A	F	S	M	K	N	T	V	N	E	P	N	V	A	G	K
ATT	GAG	GAG	GCC	GAC	AAG	AAC	ACG	ATT	ACG	AGT	GCC	GTG	GAG	GAG	GCA
I	E	E	A	D	K	N	T	I	T	S	A	V	E	E	A
CTG	CAA	TGG	CTG	AAC	AAC	AAC	CAG	GAG	GCC	AGC	AAG	GAG	GAG	TAC	GAG
L	Q	W	L	N	N	N	Q	E	A	S	K	E	E	Y	E
CAC	CGC	CAG	AAG	GAG	CTG	GAG	AAC	CTG	TGC	ACG	CCC	ATC	ATG	ACG	AAG
H	R	Q	K	E	L	E	N	L	C	T	P	I	M	T	K
ATG	TAC	CAG	GGC	ATG	GGC	GCG	GGC	GGC	GGT	ATG	CCC	GGA	GGT	ATG	CCT
M	Y	Q	G	M	G	A	G	G	G	M	P	G	G	M	P
GGT	GGA	ATG	CCC	GGA	GGT	ATG	CCT	GGC	GGC	GCG	AAC	CCG	TCG	TCT	TCG
G	G	M	P	G	G	M	P	G	G	A	N	P	S	S	S
TCA	GAC	CCG	AAG	GTG	GAG	GAA	GTC	GAC	TGA	GAG	CGC	ATC	CCC	GAA	GAT
S	G	P	K	V	E	E	V	D	*						
GTT	CTC	ATG	GCG	GCG	CGG	CGT	CTG	CTC	GCG	AAC	CAA	TAG	CCC	GTT	GGT
TTT	CTC	CCT	TGT	AGA	GCG	TAG	AGG	TCT	GCG	ACA	AAC	CCA	GCT	GCC	ATC
ACT	ATT	TTT	ATT	ATT	GGT	TTT	TTC	CCC	TCT	CCA	TTA	TTA	TTA	TTA	TTA
TTG	TTT	TTC	TTC	GCT	CTC	CAT	TAT	TAT	TAT	TGT	TAT	TAT	TAT	TAT	TAC
GGT	TGT	TAA	AAA	AAA	AAAAAA										

Figura 12:

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del recombinante HSL12. Las letras mayúsculas resaltadas señalan las repeticiones GGMP. (*): codón de finalización de la traducción.

1	CGC	AAG	AAG	GAG	CTG	GAG	AAC	CTG	TGC	ACG	CCC	ATC	ATG	ACG	AAG
	R	K	K	E	L	E	N	L	C	T	P	I	M	T	K
56	ATG	TAC	CAG	GGC	ATG	GGC	GCG	GGC	GGC	GGC	GGT	ATG	CCT	GGC	GGT
	M	Y	Q	G	M	G	A	G	G	G	G	M	P	G	G
111	ATG	CCT	GGT	GGA	ATG	CCC	GGG	GGC	ATG	CCT	GGC	GGC	GCG	AAC	CCG
	M	P	G	G	M	P	G	G	M	P	G	G	A	N	P
166	TCG	TCT	TCG	TCA	GGA	CCG	AAG	GTG	GAG	GAA	GTT	GAC	TGA	GAG	CGC
	S	S	S	S	G	P	K	V	E	E	V	D	#		
221	CCT	GAA	GAT	GTT	CTC	ATG	GCG	GCG	TCT	GTT	CGC	GAA	CGA	ATA	ACC
276	CGT	TGG	TTT	TGG	TTG	TTC	TTG	AGT	TGA	ATT	ATT	TAC	TTT	AAA	ACC
331	CAA	ACC	TTA	ACC	CAA	AAA	AGA	CAA	ATA	TAA	AAC	ACA	TGC	TGC	ATA
366	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA														

Figura 13:
 Secuencia nuclotídica y su traducción a aminoácidos del ADNc del inserto HSL13. Las letras resaltadas señalan las repeticiones GGMP. (#) codón de finalización de la traducción.

```

RA   P L T L G I E T A G G V M T S L I K R N T T I P T K K S Q I
Peru . . . . .
Mara
Tul 2

RA   F S T Y P D N Q P G V H I Q V F E G E R A M T K D C H L L G
Peru           A
Mara           A
Tul 2

RA   T F D L S G I P P A P R G V P Q I E V T F D L D A N G I L N
Peru
Mara
Tul 2

RA   V S A E E K G T G K R N Q I V I T N D K G R L S K A D I E R
Peru
Mara           L           R   E
Tul 2

RA   M V S E A A K Y E A Q D K E Q R D R I D A K N G L E N Y A F
Peru           .           S .           . E .
Mara           R           A E           D   V R Q
Tul 2           R D

RA   S M K N T V N E P N V A G K I E E A D K N T I T S A V E E A
Peru           .           .
Mara           A           D
Tul 2

RA   L Q W L N N N Q E A S K E E Y E H R Q K E L E N L C T P I M
Peru           .           .
Mara
Tul 2

RA   T K M Y Q G M G A G G G M P G G M P G G M P G G M P G G M P
Peru
Mara           .           A           - - - -
Tul 2           .

RA   G G M P - - - - - G G A N P S
Peru - - - - - G G A N P S
Mara . . . . G G M P G G M P G G M P G G M P G G M P . .
Tul 2 - - - - -

RA   S S S G P K V E E V D *
Peru           .           *
Mara           E           *
Tul 2           *

```

Figura 16:
Comparación de las secuencias de aminoácidos de las regiones carboxiterminales de las hsp70 de *T. cruzi*. Cepas RA (recombinante M98); Tul 2 (recombinante HSL12); Maracay (Requena, J.M., y col. 1989); Perú (Engman, D.M., y col. 1989).

Las secuencias de nucleótidos no difieren en la región codante, pero sí en el extremo 3' no codificante. HSL12 presenta solo 6 repeticiones TTA y la secuencia no codificante de HSL13 es solo un 31% homóloga a Lyt8. (ver Fig.14). Luego del codón de terminación (STOP) las secuencias difieren al punto que no son comparables con ninguna de las hsp70 reportadas hasta el momento para T. cruzi. (Engman D.M. y col 1989; Requena J.M. y col. 1989).

3.8) CORRELACION ENTRE EL TITULO ANTI-HSP70 Y ACTIVIDAD LITICA:

Para determinar la correlación entre el nivel de anticuerpos anti-hsp70 y la actividad lítica de diferentes sueros de pacientes argentinos y pacientes brasileros se utilizó la técnica del ensayo de placas de lisis.

Los resultados se visualizan en las Figs.17 y 18.

El ensayo con sueros brasileros demuestra que en 1 de 4 pacientes tratados, el nivel de anticuerpos anti-hsp70 disminuye luego del tratamiento, simultáneamente con la conversión del suero Lyt+ a Lyt-.

Los ensayos con los sueros argentinos son menos concluyentes porque las muestras de sueros Lyt+ y Lit- no provienen del mismo individuo. No se observa una clara correlación entre la reactividad de los recombinantes y la actividad lítica de los distintos sueros.

La dificultad de encontrar sueros de un mismo paciente antes y después de la quimioterapia impidió seguir este tipo de estudio.

En paralelo a la búsqueda de antígenos relacionados con la respuesta lítica, se estudió la reactividad de los sueros de cinco pacientes bolivianos con infección mixta T. cruzi - L. b. brazi-

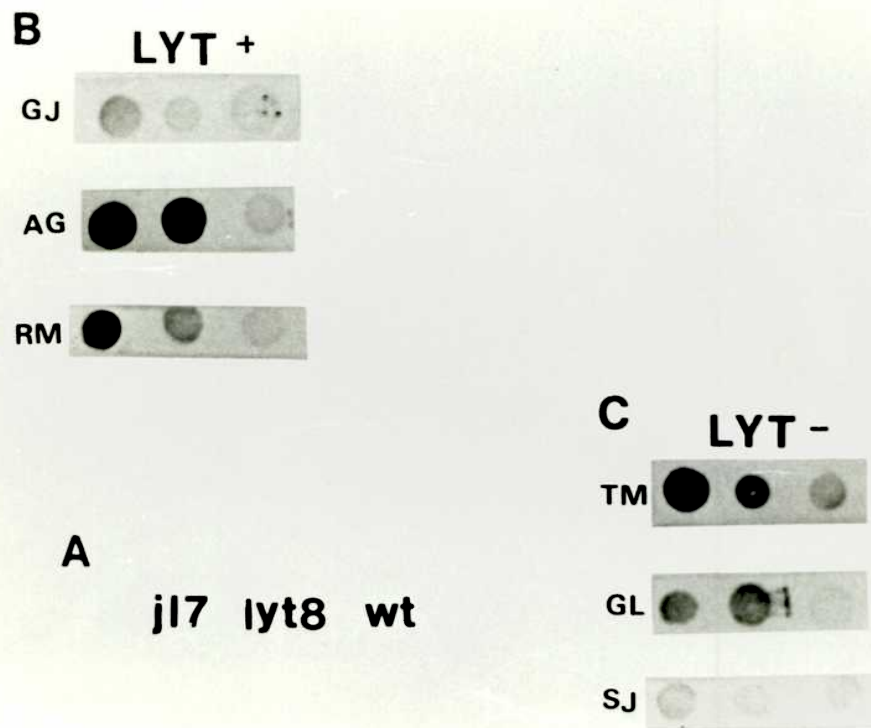


Figura 18:

Correlación entre la reactividad anti-*T.c.hsp70* y la actividad lítica de sueros de pacientes argentinos. El ensayo se realizó como se describe en la Fig.17 (ver MM 2.3.2; tabla: 2); los sueros se utilizaron diluidos 1:500. Panel A: Orden de siembra de los recombinantes utilizados en el ensayo. Panel B: Reactividad de los sueros con actividad lítica, pacientes GJ, AG, RM. Panel C: Reactividad de los sueros sin actividad lítica, pacientes TM,

liensis. Los estudios realizados y los resultados obtenidos se detallan a continuación.

3.9) CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE SUEROS DOBLE INFECTADOS:

Los sueros fueron obtenidos de pacientes con enfermedad de Chagas crónica y lesiones activas de espundia en la mucosa nasofaríngea, las características y procedencia de los mismos se detalla en MM 2.3.3.

Se ensayó la reactividad de estos sueros con proteínas totales de T. cruzi y L.b.braziliensis.

En la Fig.19 se muestra el reconocimiento de proteínas parasitarias por los sueros PM y FR.

Ambos sueros reaccionaron con una serie de polipéptidos del extracto de L.b.braziliensis (panel A calles 2 y 4) y más intensamente con la región de 70 kda.

La reactividad con proteínas de T.cruzi es diferente, si bien el suero FR (Fig.19, panel A calle 5) reconoce débilmente algunos polipéptidos de bajo peso molecular, la banda más reactiva es de 70 kda. El suero PM reacciona solo con la región de 70 kda de T.cruzi. Es notable la diferente reactividad con proteínas de T.cruzi observada en un paciente Chagásico crónico (Fig.19 Panel:B, calles 1-3) con respecto a la reactividad observada para el suero del doble infectado (Fig.19 panel:B, calle 4).

Para identificar las proteínas de T.cruzi y L.b.braziliensis reconocidas por los sueros de los pacientes doble infectados se rasteraron sendas bibliotecas de tripomastigotes sanguíneos de T.cruzi y de promastigotes de cultivo de L.b.braziliensis.

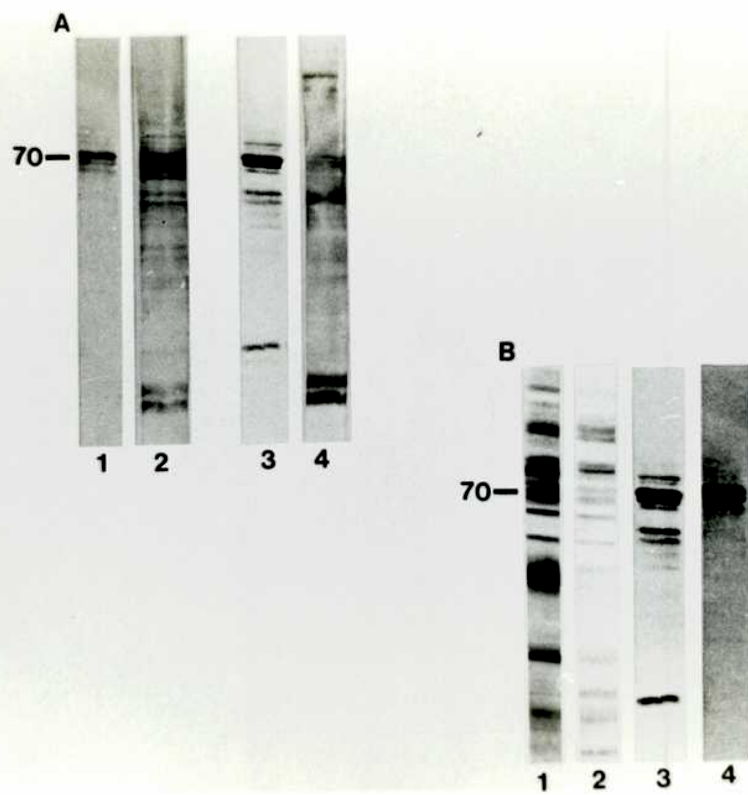


Figura 19:
 Reactividad de sueros de pacientes doble infectados con *T. cruzi* y *L. b. braziliensis*. Homogenatos totales de ambos parasitos fueron corridos en geles de poliacrilamida y electrotransferidos a filtros de nitrocelulosa (ver MM 2.6). Cada calle contiene aproximadamente 30 µg de proteínas totales. Panel A: calles 1 y 3: extractos de trypomastigotes de *T. cruzi* ensayados con los sueros PM, 1:500 (calle 1); FR, 1:500 (calle 3); calles 2 y 4: extractos de promastigotes de *L. b. braziliensis* ensayados con los mismos sueros (calle 2: PM 1:500; calle 4: FR 1:500). B: Comparación de la reactividad de sueros de pacientes con Chagas crónico diluidos 1:500 (calles 1; 2; y 3) y suero del paciente doble infectado PM 1:500 (calle 4).

3.10) RASTREO INMUNOLOGICO DE LA BIBLIOTECA DE TRIOMASTIGOTES DE T. cruzi:

Para identificar la proteína de T. cruzi reconocida mayoritariamente por los sueros de individuos doblemente infectados, se rastreó la biblioteca amplificada de tripomastigotes sanguíneos de la cepa RA con una inmunosonda apropiada.

Así, el rastreo se realizó con el suero PM a una alta dilución (1:3000), ya que en estas condiciones reconocía solo una banda de 70 kDa en el Westerns de T. cruzi. En estas condiciones el suero tampoco reconocía los recombinantes JL8, JL7 y JL5 empleados como reactivos diagnósticos de enfermedad de Chagas (Moncayo 1990).

De los $5 \cdot 10^4$ recombinantes rastreados solo dos fueron reactivos. Estos recombinantes se purificaron a homogeneidad y se los denominó RA1 y RA2.

3.10.1) Caracterización del cDNA de los fagos RA1 Y RA2:

Los ADNc de los recombinantes RA1 y RA2 fueron subclonados en el vector M13mp18 como se detalla en MM 2.28.

El recombinante RA1 contiene un inserto de 939 pares de bases y su secuencia nucleotídica y de aminoácidos es idéntica a la del recombinante Lyt8. Teniendo en cuenta su longitud y secuencia podemos afirmar que se trata del mismo recombinante aislado por distintas estrategias.

El ADNc del fago RA2 tiene una longitud de 760 pares de bases y su secuencia está contenida en la secuencia de RA1 extendiéndose desde la base 77 hasta el tracto de poliA⁺, la secuencia del recombinante RA2 se señala en la secuencia de RA1 con trazo mas intenso (Fig.20).

```

AAA AGC CAG   ATC TTC TCG ACG TAC CCG GAC AAC CAG CCG GGC GTG   CAC
ATC CAG GTC   TTT GAG GGG GAG CGT GCG ATG ACG AAG GAC TGC CAC   CTG
CTC GGC ACA   TTC GAC CTG TCC GGC ATC CCG CCG GCG CCG CGC GGT   GTG
CCC CAG ATT   GAG GTG ACC TTT GAC CTC GAC GCC AAC GGC ATC CTG   AAC
GTG TCC GCG   GAG GAG AAG GGC ACC GGC AAG CGC AAC CAG ATT GTC   ATC
ACG AAC GAC   AAG GGC CGC CTG AGC AAG GCG GAC ATT GAG CGC ATG   GTG
TCC GAG GCT   GCC AAG TAC GAG GCG CAG GAC AAG GAA CAG CGC GAC   CGC
ATT GAC GCA   AAG AAC GGT CTT GAG AAC TAC GCA TTT TCG ATG AAG   AAC
ACC GTA AAC   GAG CCG AAC GTC GCT GGC AAG ATT GAG GAG GCC GAC   AAG
AAC ACG ATT   ACG AGT GCC GTG GAG GAG GCA CTG CAA TGG CTG AAC   AAC
AAC CAG GAG   GCC AGC AAG GAG GAG TAC GAG CAC CGC CAG AAG GAG   CTG
GAG AAC CTG   TGC ACG CCC ATC ATG ACG AAG ATG TAC CAG GGC ATG   GGC
GCG GGC GGC   GGT ATG CCC GGA GGT ATG CCT GGT GGA ATG CCC GGA   GGT
ATG CCT GGT   GGA ATG CCC GGG GGC ATG CCT GGC GGC GCG AAC CCG   TCG
TCT   TCG TCA   GGA CCG   AAG   GTG GAG   GAA GTG   GAC   TGA
GAGCGCATCCCCGAAGATGTTCTCATGGCGGCGTCTGCTCGCGAACCAATAGCCCGTTGGTTTTTC
TCCCTTGTAGAGCGTAGAGGTCTGCGACAAACCCAGCTGCCATCACTATTTTTATTATTGGTTTT
TTCCCTCTCCATTATTATTATTATTATTATTGTTTTCTTCGCTCTCCATTATTATTATTGTTA
TTATTATTATTACGGTTGTTAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 20:

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos traducidos del recombinante RA1. La secuencia nucleotídica del recombinante RA2 está contenida en el inserto RA1 a partir de la base n° 63 (RA2 letras con trazo mas intenso).

3.10.2) Reactividad de los anticuerpos anti-RA1

a) *Identificación de la proteína de T.cruzi reconocida por anticuerpos anti-RA1:*

Los anticuerpos anti-RA1 reaccionaron con una única banda de 70 kda en un Western blot de proteínas totales de T.cruzi (Fig. 21 panel A calle 1). Los resultados confirman la identidad de esta banda como una hsp70 de T.cruzi.

b) *Reactividad con proteínas de L.b.braziliensis:*

Los mismos anticuerpos anti-RA1 reconocieron en Western blot de proteínas de L.b.braziliensis una banda de 71 kda levemente mas pesada que la de T.cruzi, (ver Fig.21 panel A calle 2)

c) *Reactividad con el monoclonal D4F18:*

Para corroborar la identidad de los polipéptidos reconocidos por los anticuerpos inmunopurificados, se utilizó el anticuerpo monoclonal D4F18 que reconoce un epítipo de la región C-terminal presente en todas las hsp70 conocidas (ver MM 2.3.6).

El monoclonal reconoció polipéptidos de T.cruzi y L.b.braziliensis del mismo peso molecular que los anticuerpos inmunopurificados (fig.21 panel B, calles 1 y 2). El recombinante RA1 también es reconocido por el monoclonal (Fig. 21 panel C).

Estos datos sugieren que la proteína reconocida en L.b.braziliensis es una hsp70.

En base a estos resultados se inició el rastreo de la hsp70 de Leishmania, identificada como posible antígeno con reactividad inmunológica cruzada entre L.b.braziliensis y T.cruzi.

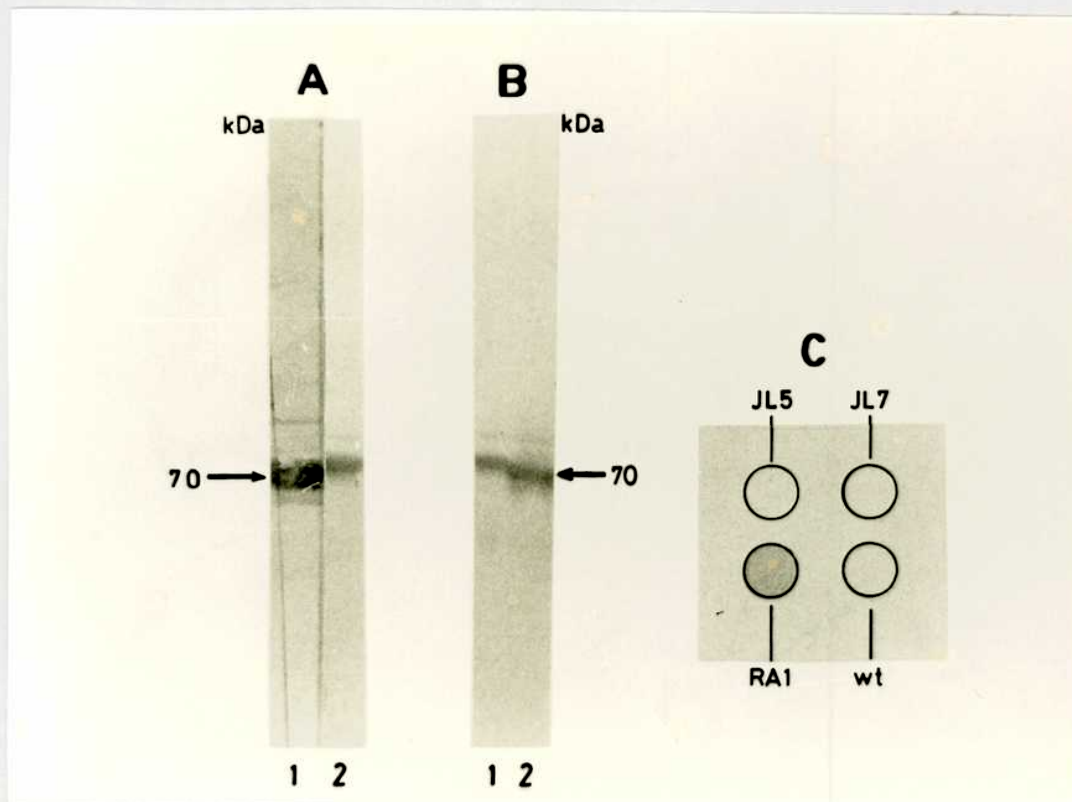


Figura 21:

Identificación de las hsp70 de *T. cruzi* y *L. b. braziliensis*. Panel A: Reactividad de los anticuerpos anti-RA1 con Western blot de lisados de tripomastigotes de *T. cruzi* (calle 1) y lisados de promastigotes de *L. b. braziliensis* (calle 2). Panel B: Reactividad del anticuerpo monoclonal D4F18 con Westerns blots de homogenato total de *L. b. braziliensis* (calle 1) y *T. cruzi* (calle 2). Panel C: reactividad del monoclonal D4F18 con los recombinantes JL7, JL5, RA1 y λ gt11 salvaje.

3.11) BUSQUEDA DEL ANTIGENO REACTIVO DE LEISHMANIA sp.:

3.11.1) Construcción de la biblioteca de *L.b.braziliensis*:

Como se menciona en MM 2.4.3, la biblioteca de expresión de *L. b. braziliensis* se construyó a partir de promastigotas de cultivo incubados a 42°C durante una hora antes de su cosecha.

Si bien la biblioteca se construyó en un vector de expresión no se descartó el rastreo con sondas radioactivas aprovechando la alta homología de ADN que existe entre las proteínas de choque térmico.

Los fagos útiles para nuestro estudio deberían ser positivos en los dos tipos de rastreo.

3.11.2) Estrategia de selección de los clones:

Se analizaron $2,5 \cdot 10^4$ fagos independientes de la biblioteca de *L.b.braziliensis* sin amplificar. La misma placa conteniendo los fagos fue utilizada para el rastreo radioactivo e inmunológico.

El primer filtro se embebió en IPTG y se colocó sobre las placas de lisis, incubándolo como se detalla en MM 2.16. El mismo fue revelado con anticuerpos anti-RA1 inmunopurificados del suero FR. Se detectaron 3 fagos positivos y otros 2 de coloración ténue pero diferenciables del ruido de fondo (Fig.22).

El segundo filtro, tratado para fijar el ADN, según se detalla en MM 2.17, se incubó con una sonda radioactiva de RA1 obtenida por *random priming* del inserto purificado a partir de un gel de agarosa (ver MM 2.37 y 2.38).

Sólo un recombinante fue positivo para ambas estrategias de rastreo. Seguimos trabajando con este fago que se denominó Lbb1.

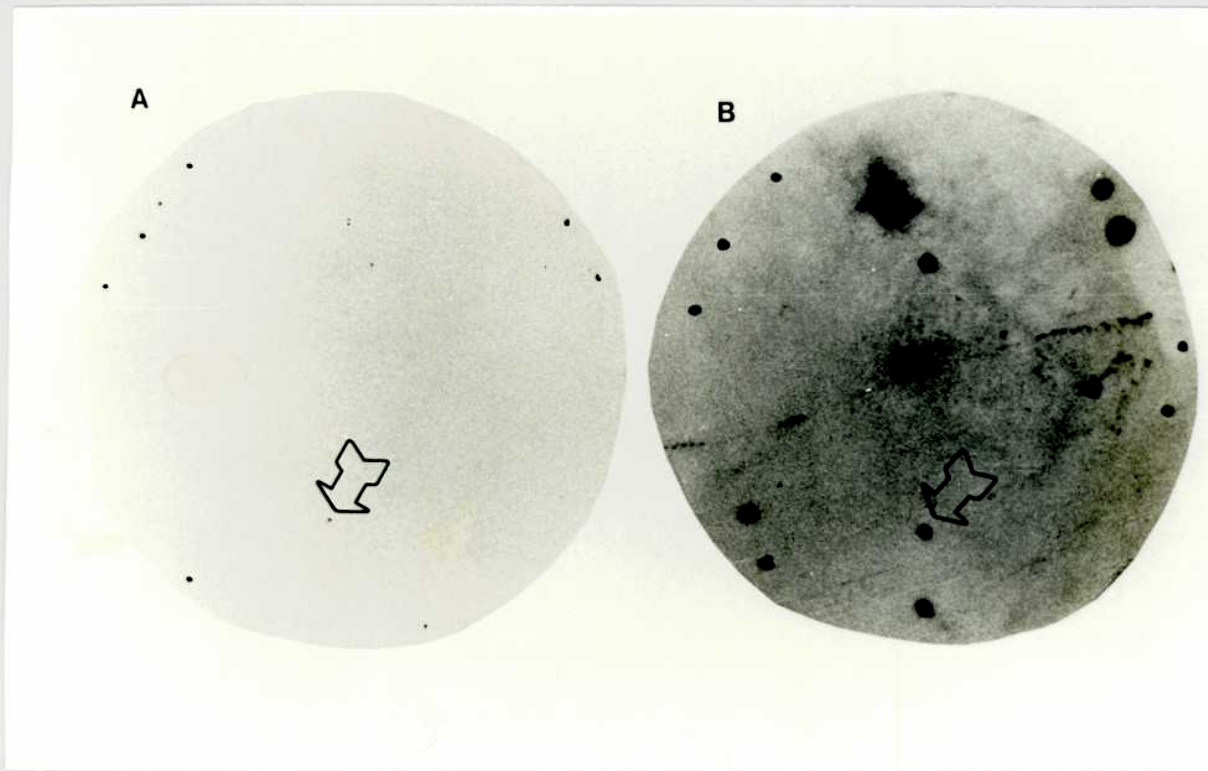


Figura 22:

Rastreo inmunológico y radioactivo de una réplica de 30.000 fagos de la biblioteca de *L.b.braziliensis*. El filtro A fue incubado con anticuerpos anti-RA1 inmunopurificados del suero FR. La réplica fue tratada para fijar el ADN transferido e hibridizada con una sonda radioactiva del inserto RA1.

El fago se terminó de purificar con la sonda radioactiva utilizada para el primer rastreo.

3.12) *CARACTERIZACION DEL RECOMBINANTE Lbb1:*

3.12.1) Identidad inmunológica de Lbb1:

Los anticuerpos anti-Lbb1 inmunopurificados del suero FR reaccionaron intensamente con los fagos RA1 y M98. Los resultados demostraron que Lbb1 compartía determinantes antigénicos con la hsp70 de *T. cruzi* (Fig.23).

3.12.2) Caracterización genética:

a) *Tamaño del inserto clonado:*

Los primeros intentos de amplificar el inserto de Lbb1 por PCR fueron negativos. Se investigó el motivo.

Se amplificó el fago recombinante por cultivo en pequeña escala (MM 2.26). Su ADN se digirió con EcoRI y se resolvió en gel de agarosa como se detalla en MM 2.34. El inserto tenía un tamaño de aproximadamente 2,2 kilo pares de bases. Por tal motivo no podía ser amplificado por PCR en las condiciones utilizadas para insertos más pequeños (generalmente se amplificaban insertos no mayores de 1 kb). Como se detalla en MM 2.27.c; se pusieron a punto las condiciones requeridas para su amplificación. Usando estas condiciones el tamaño del inserto determinado por PCR coincidió con el estimado por digestión del ADN de λ gt11 con EcoR I.

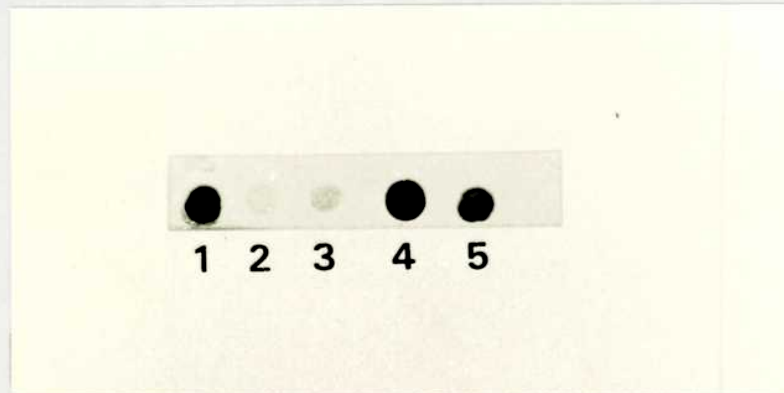


Figura 23:

Reactividad cruzada de los anticuerpos anti-Lbb1 inmunopurificados del suero FR con las proteínas de fusión RA1 y M98. Se sembraron los fagos sobre el césped de *E. coli* Y1090, antes de visualizarse la lisis bacteriana se cubrieron con un filtro de nitrocelulosa impregnado en IPTG hasta la formación de las placas de lisis (ver MM 2.23). 1: control (+), fago recombinante Lbb1; 2: control (-), fago λ gt11; 3: control de especificidad de la reacción: fago recombinante JL7; 4: Fago recombinante RA1 y 5: fago recombinante M98.

b) *Secuenciación del recombinante Lbb1:*

Se subclonó en M13mp18 el inserto del recombinante Lbb1 a partir del ADN total del fago digerido con EcoRI y a partir del inserto amplificado por PCR. La secuenciación se realizó por el método de Sanger y además se utilizaron estrategias alternativas para solucionar los problemas de lectura debido al tamaño del inserto y a su estructura secundaria (ver MM 2.31.1 y 2.31.2).

Sin embargo, pese a todos los esfuerzos, no se pudieron superar los problemas de lectura debidas a la fuerte estructura secundaria del extremo 3' del ADNc Lbb1 (Fig.24).

La secuencia de la región codante se completó con la utilización de dos *primers* sintéticos internos (Fig.25). Se llegó a secuenciar hasta 20 bases después del codón STOP.

La secuencia se muestra en las Figs.24 y 25. La comparación de su secuencia de aminoácidos demostró que el ADNc Lbb1 codificaba para una hsp70 de *L.b.braziliensis* (Fig.26).

El ADNc del recombinante Lbb1 contiene 686 pares de bases de la región codante. En base al tamaño del inserto (aproximadamente 2150 pares de bases) y, la presencia del tracto de poliadeninas secuenciados en su extremo 3' (Fig.24) se deduce que el recombinante Lbb1 contiene aproximadamente 1614 pares de bases no codantes luego del codón *stop*, estos resultados concuerdan con los demostrados por Gwo-Shu Lee y col. (1988) para *L. major*.

Entre las regiones codantes de las proteínas de fusión Lbb1 y RA1 existe un 88% de homología.

A nivel de secuencia de aminoácidos las proteínas son un 78% homólogas. Difieren principalmente en el número de repeticiones del tetrapéptido GGMP. Este motivo está repetido dos veces en *L.b.*

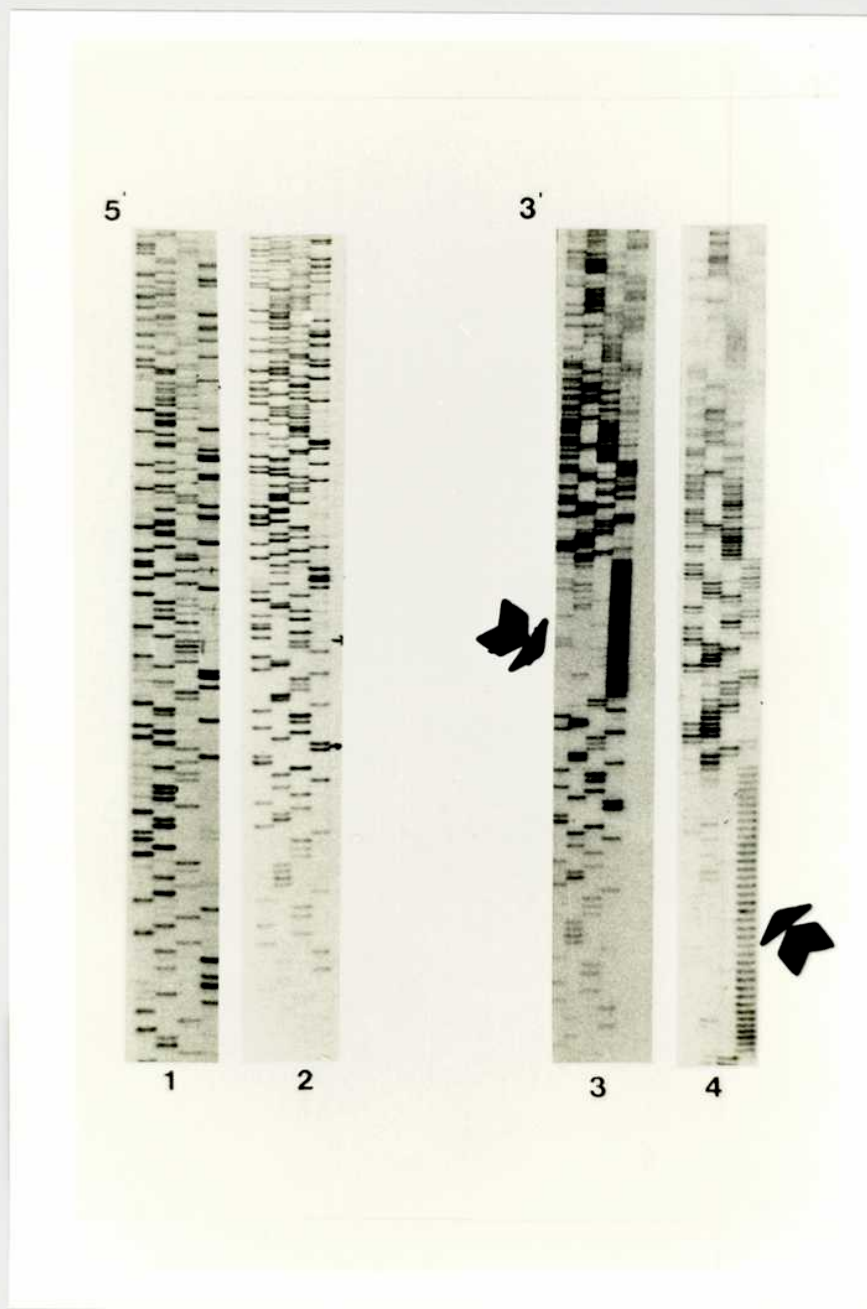


Figura 24:

Autorradiografías de los geles de secuencia del fago Lbb1. Los geles 1 y 2 muestran la secuencia del extremo 5' del inserto. Los geles 3 y 4 muestran la secuencia del extremo 3' del mismo clon. El gel 3 se realizó en presencia de DMSO (MM 2.31.b). Las flechas señalan los trectos de poliadeninas. Se observa que antes de esta zona la lectura es clara y que las dificultades comienzan luego de las poliadeninas. En estos tres casos se utilizó el primer universal de M13 (MM 2.31).

AAG	AGC	CAG	ATC	TTC	TCG	ACG	TAC	GCG	GAC	AAC	CAG	CCC	GGC	GTG	CAC
<i>K</i>	<i>S</i>	<i>Q</i>	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>S</i>	<i>T</i>	<i>Y</i>	<i>A</i>	<i>D</i>	<i>N</i>	<i>Q</i>	<i>P</i>	<i>G</i>	<i>V</i>	<i>H</i>
ATC	CAG	GTC	TTC	GAG	GGC	GAG	CGC	GCG	ATG	ACG	AAG	GAC	TGC	CAC	CTG
<i>I</i>	<i>Q</i>	<i>V</i>	<i>F</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>A</i>	<i>M</i>	<i>T</i>	<i>K</i>	<i>D</i>	<i>C</i>	<i>H</i>	<i>L</i>
CTG	GGC	ACG	TTC	GAC	TTG	TCC	GCG	ATC	CCG	CCA	GCG	CCG	CGC	GGC	GTG
<i>L</i>	<i>G</i>	<i>T</i>	<i>F</i>	<i>D</i>	<i>L</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>G</i>	<i>V</i>
CCG	CAG	ATC	GAG	GTG	ACG	TTC	GAC	CTG	GAC	GCG	AAC	GGC	ATC	CTG	AAC
<i>P</i>	<i>Q</i>	<i>I</i>	<i>E</i>	<i>V</i>	<i>T</i>	<i>F</i>	<i>D</i>	<i>L</i>	<i>D</i>	<i>A</i>	<i>N</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	<i>L</i>	<i>N</i>
GTG	TCC	GCG	GAG	GAG	AAG	GGC	ACC	GGC	AAG	CGC	AAC	CAT	ATC	ACC	ATC
<i>V</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>G</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>K</i>	<i>R</i>	<i>N</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>T</i>	<i>I</i>
ACC	AAC	GAC	AAG	GGC	CGA	CTG	AGC	AAG	GAC	GAG	ATC	GAG	CGC	ATG	GTG
<i>T</i>	<i>N</i>	<i>D</i>	<i>K</i>	<i>G</i>	<i>R</i>	<i>L</i>	<i>S</i>	<i>K</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>M</i>	<i>V</i>
AAC	GAT	GCG	TCG	AAG	TAC	GAG	CAG	GCC	GAC	AAG	ATG	CAG	CGC	GAC	GCG
<i>N</i>	<i>D</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>K</i>	<i>Y</i>	<i>E</i>	<i>Q</i>	<i>A</i>	<i>D</i>	<i>K</i>	<i>M</i>	<i>Q</i>	<i>R</i>	<i>D</i>	<i>A</i>
TTG	GAG	GCG	AAG	AAC	GGC	CTG	GAG	AAC	TAC	GCG	TAC	TCG	ATG	AAG	AAC
<i>L</i>	<i>E</i>	<i>A</i>	<i>K</i>	<i>N</i>	<i>G</i>	<i>L</i>	<i>E</i>	<i>N</i>	<i>Y</i>	<i>A</i>	<i>Y</i>	<i>S</i>	<i>M</i>	<i>K</i>	<i>N</i>
ACG	GTC	TCC	GAC	ACG	AAC	GTG	TCC	GGC	AAG	CTG	GAG	GAG	AGC	GAC	AGG
<i>T</i>	<i>V</i>	<i>S</i>	<i>D</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>V</i>	<i>S</i>	<i>G</i>	<i>K</i>	<i>L</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>D</i>	<i>R</i>
TCC	GCG	CTG	AAC	CTG	GCG	ATC	GAC	ACG	GCG	CTG	GAG	TGG	CTG	AAC	AGC
<i>S</i>	<i>A</i>	<i>L</i>	<i>N</i>	<i>L</i>	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>D</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>L</i>	<i>E</i>	<i>W</i>	<i>L</i>	<i>N</i>	<i>S</i>
AAC	CAG	GAG	GCG	TCG	AAG	GAA	GAG	TAC	GAG	CAC	CGC	CAG	AAG	GAG	CTG
<i>N</i>	<i>Q</i>	<i>E</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>Y</i>	<i>E</i>	<i>H</i>	<i>R</i>	<i>Q</i>	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>L</i>
GAG	AGC	ACA	TGC	AAC	CCG	ATC	ATG	ACC	AAG	ATG	TAC	CAG	AGC	ATG	GGC
<i>E</i>	<i>S</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>M</i>	<i>T</i>	<i>K</i>	<i>M</i>	<i>Y</i>	<i>Q</i>	<i>S</i>	<i>M</i>	<i>G</i>
GGC	GGC	GCG	GGC	GGC	ATG	CCC	GGC	GGT	ATG	CCG	GAC	ATG	AGC	GGC	ATG
<i>G</i>	<i>G</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>M</i>	<i>P</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>M</i>	<i>P</i>	<i>D</i>	<i>M</i>	<i>S</i>	<i>G</i>	<i>M</i>
GGC	GGT	GGT	CAG	GGT	CCG	GCC	GCC	GGA	GCC	TCC	TCC	GGC	CCC	AAG	GTC
<i>G</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>Q</i>	<i>G</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>G</i>	<i>P</i>	<i>K</i>	<i>V</i>
GAG	GAG	GTC	GAC	TAG	GCT	CTG	TGT	GCA	CCA	GCG	GCT	GTG	GTA		
<i>E</i>	<i>E</i>	<i>V</i>	<i>D</i>	*											

Figura 25:

Secuencia de nucleótidos del ADNc Lbb1 y su traducción a aminoácidos. Los nucleótidos en trazo resaltado indican la secuencia de los *primers* sintéticos utilizado. Se secuenciaron 716 pares de bases.

```

Lbb1  K S Q I F S T Y A D N Q P G V H I Q V F E G E R A M T K D C
RA1   * * * * * * * * P * * * * * * * * * * * * V * * * * * * * * *

Lbb1  H L L G T F D L S A I P P A P R G V P Q I E V T F D L D A N
RA1   * * * * * * * * * G * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Lbb1  G I L N V S A E E K G T G K R N H I T I T N D K G R L S K D
RA1   * * * * * * * * * * * * * * * * * * Q * V * * * * * * * * * A

Lbb1  E I E R M V N D A S K Y E Q A D K M Q R D R L E A K N G L E
RA1   D * * * * * * S E * A * * * * A Q * * E * * * * R I D * * * * *

Lbb1  N Y A Y S M K N T V S D T N V S G K L E E S D R S A L N L A
RA1   * * * F * * * * * * * N E P * * A * * I * * A * K N T I T S *

Lbb1  I D T A L E W L N S N Q E A S K E E Y E H R Q K E L E S T C
RA1   V E E * * Q * * * * N * * * * * * * * * * * * * * * * * N L *

Lbb1  N P I M T K M Y Q S M - G A A G G M P G G M P G G M P G G M
RA1   T * * * * * * * * * G * * * * * G * * * * * * * * * - - - - -

Lbb1  P G G D M S G M G G G Q G P - - G A S S G P K V E E V D
RA1   - - - M P G * * P * * A N * A A S S * * * * * * * * * *

```

Figura 26:
Comparación de las secuencias de aminoácidos de las regiones C-terminales de *L.b.hsp70* y *T.c.hsp70*. Los asteriscos (*) marcan los aminoácidos idénticos y los guiones (-) representan los espacios introducidos para mejorar la alineación de las secuencias. Las letras mayúsculas resaltadas muestran los aminoácidos diferentes.

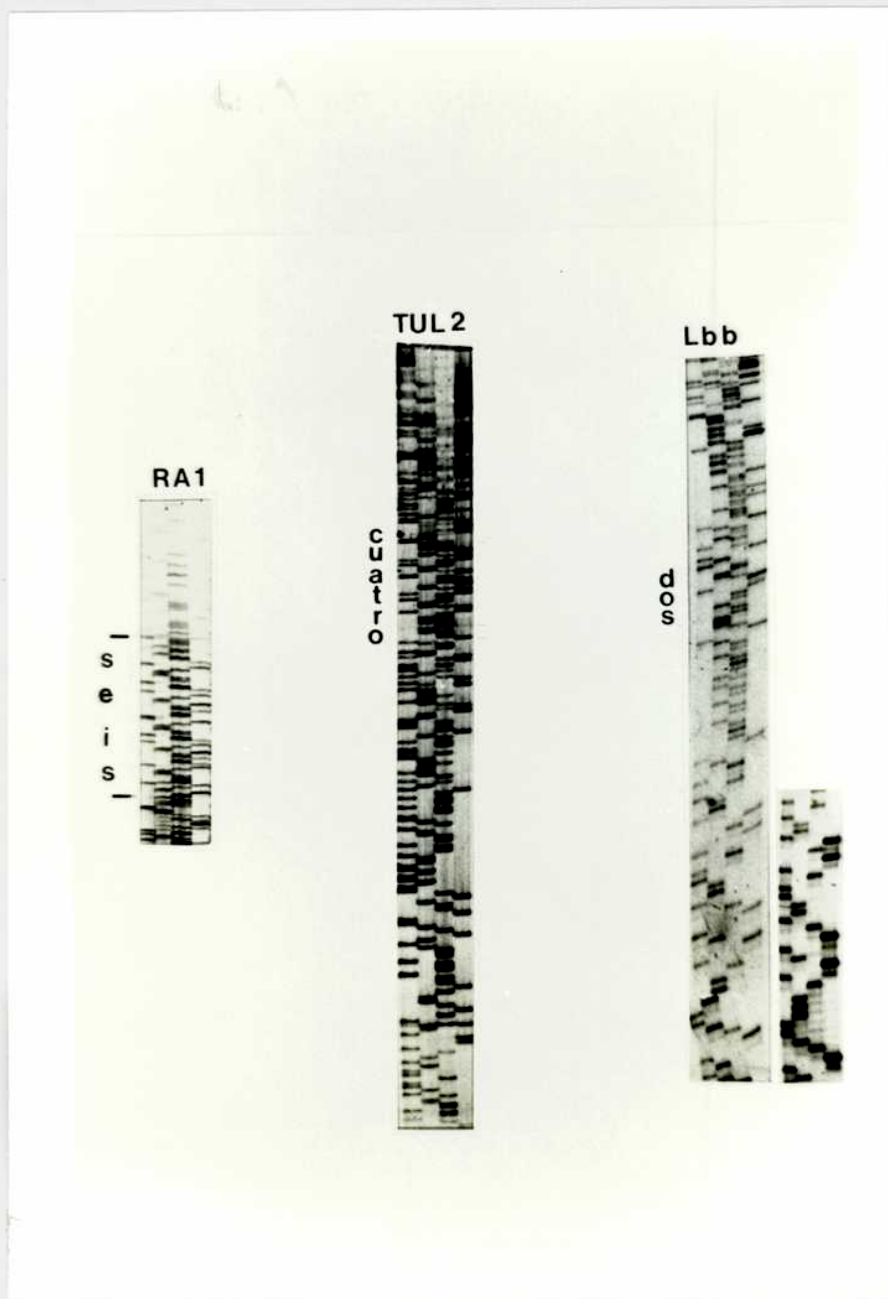


Figura 27:
 Autorradiografía de los geles de secuencia de los fagos recombinantes RA1, HSL12 y Lbb1. Seis, cuatro y dos marcan las zonas de los geles donde difieren para el número de repeticiones GGMP.

braziliensis mientras que T. cruzi RA contiene seis GGMP y T. cruzi Tul 2 contiene solo cuatro.

3.13) DISECCION DE LA RESPUESTA ANTI-hsp70 DE LOS SUEROS DOBLE-
INFECTADOS:

El objetivo de esta parte del trabajo fue mapear las zonas contra las que los pacientes doble infectados sintetizan anticuerpos para las hsp70 de T. cruzi y L.b.braziliensis.

Las experiencias se basaron en ensayos de inhibición de la reactividad anti-hsp70 por las diferentes proteínas de fusión.

a) *Comparación entre las reactividades de los sueros doble infectados contra las proteínas de fusión LBB1 y RA1 por Western blot:*

Los sueros doble infectados (n=4) se ensayaron en experiencias de Western blot con las proteínas recombinantes Lbb1 y RA1 (ver MM 2.7.1 y 2.7.2).

En la Fig.28 calle A1 y B1 se observa la reactividad de uno de los sueros frente a cada antígeno. Los otros 3 también reaccionaron con las proteínas recombinantes Lbb1 y RA1.

Las experiencias de inhibición mostraron que la preincubación de estos sueros con la proteína LBB1 anulaba totalmente la reactividad contra sí misma y la reactividad anti-RA1 (Fig.28 calle A3 y A2 respectivamente). Por el contrario cuando el suero era preabsorbido con RA1, si bien anulaba la reactividad contra sí misma (Fig.28 calle B3), no llegaba a anular completamente la reactividad anti-LBB1 (Fig.28 calle B2). Para confirmar esta inhibición parcial se hicieron cinéticas de competición llegandose a un punto donde el agregado de mayores cantidades de proteína RA1 no disminuía la reactividad anti-Lbb1.

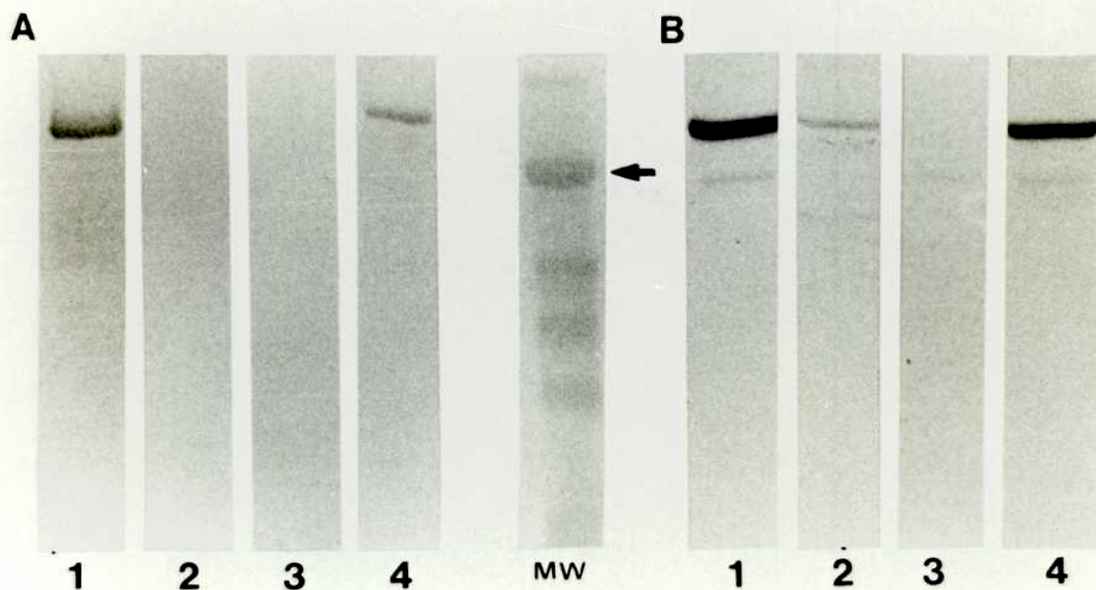


Figura 28:

Inhibición de la reactividad anti-RA1 y anti-Lbb1 del suero del paciente doble infectado FR. Las inhibiciones se realizaron utilizando las proteínas de fusión RA1 y LBB1. Las proteínas de fusión se purificaron por el método de Hall y col. 1984; las soluciones de proteínas purificadas tuvieron una concentración aproximada de 5 μ g de proteínas/ μ l, ver MM 2.19. Las proteínas se resolvieron en geles de acrilamida, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. (A): Western blots de la proteína de fusión RA1. (B): Westerns blot de la proteína de fusión LBB1. En cada calle se sembraron aproximadamente 30 μ g de proteína de fusión. Las tiras fueron enfrentadas con el suero FR, 1:1500, (Calles A1 y B1) o con la misma dilución del suero preincubada durante 1 h con: 500 μ g de la proteína de fusión RA1 (Calles A2 y B2); 500 μ g de la proteína de fusión Lbb1 (Calles A3 y B3); y 1 mg de la proteína de fusión JL5 (Calles A4 y B4). MW: marcadores de peso molecular preteñidos (ver MM 2.6.1). La flecha señala la posición de la β -galactosidasa.

Para demostrar que la inhibición por las proteínas recombinantes RA1 y Lbb1 es específica de estas proteínas de fusión, en todas las experiencias se realizaron en paralelo inhibiciones con una proteína de fusión no relacionada, JL5 (Levin M. y col 1990). Esta proteína no inhibe la reactividad de ninguno de los sueros analizados contra los recombinantes Lbb1 y RA1 (Fig.28 calles A4 y B4).

b) *Comparación entre las reactividades de los sueros doble infectados contra las proteínas totales resueltas en geles de poli-acrilamida:*

Los mismos resultados se obtuvieron empleando como antígenos extractos totales de parásitos.

Como se observa en la Fig.29 la reactividad de los sueros con las bandas de 70 y 71 kd de *T. cruzi* y *L.b.brasiliensis* respectivamente, es anulada cuando se compete con la proteína de fusión del recombinante Lbb1 (Paneles A y B; calle: 3). No ocurre lo mismo cuando se utiliza la proteína de fusión de RA1 (paneles A y C: calle: 2).

Se puede concluir además que la región mas inmunogénica de cada hsp70 es la carboxiterminal contenida en los recombinantes RA1 y Lbb1.

El recombinante RA1 se utilizó en una experiencia latinoamericana para estudiar su potencialidad diagnóstica. Para este estudio se contó con una batería de sueros de individuos con diversas patologías. Los resultados se muestran en los puntos 3.9, 3.10 y 3.12.

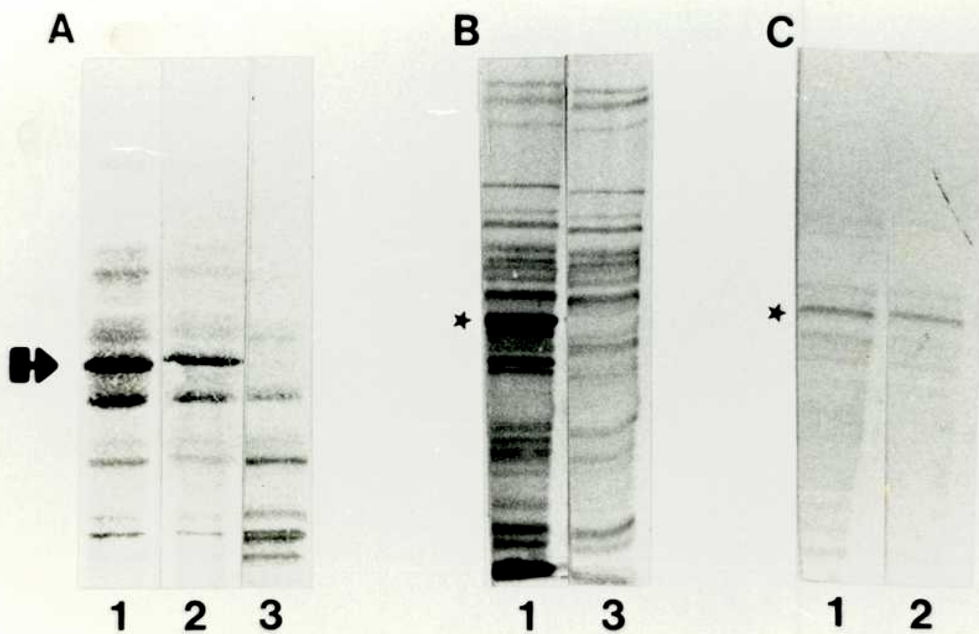


Figura 29:

Inhibición de la reactividad anti-hsp70 de sueros de pacientes doble infectados. Las inhibiciones se realizaron utilizando las proteínas de fusión RA1 y Lbb1. Homogenatos totales de *T. cruzi* (panel A) y *L. b. braziliensis* (paneles B y C) se resolvieron en geles de acrilamida y transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las tiras de nitrocelulosa de los Western blots fueron enfrentadas con el suero FR, 1:1500 (Paneles A y B, calle: 1) o con la misma dilución del suero preincubada durante 1 h con: 500 μ g de la proteína de fusión Lbb1 (calles A3, y B3); 500 μ g de la proteína de fusión RA1 (calle A2). C: Reactividad anti hsp-70 *L. b. braziliensis* del suero LCH, 1:1500 (calle 1). Inhibición de la reactividad del mismo suero con 500 μ g de la proteína de fusión RA1 (calle 2).

3.14) REACTIVIDAD ANTI-RA1 DE SUEROS DE INDIVIDUOS CHAGASICOS:

Por ensayos de placas de lisis se estudió la reactividad del recombinante RA1, con 169 sueros de pacientes chagásicos (Tabla 6).

Los sueros de los pacientes chagásicos se clasificaron en

- congénitos.
- agudos.
- crónicos asintomáticos.
- crónicos con cardiopatía.

Se incluyeron en el ensayo diversos recombinantes de *T. cruzi* que reaccionan con una gran mayoría de sueros chagásicos: (Moncayo, A. y col 1990) JL7, JL8, y JL5 (Levin M. y col 1990) y también se incluyó el recombinante RA1.

La reactividad de todos los sueros se resume en la tabla 6. En la Fig. 30 se puede observar la reactividad de algunos de los sueros. De los 12 sueros de pacientes con Chagas congénito solo 2 reaccionan con RA1 (17%), de 9 sueros de pacientes en fase aguda solo uno reacciona (11%) y de los 148 sueros de pacientes crónicos 70 reaccionan con el recombinante RA1 (47%).

La reactividad anti-RA1 detectada en los 70 sueros chagásicos parece ser de menor intensidad que la observada para otros recombinantes, por ejemplo JL7 y JL5. (ver Fig.32)

La baja reactividad del recombinante RA1 fue confirmada para algunos sueros cuantificando, por ELISA, la reactividad anti-RA1 y anti-JL5 de los sueros (Levitus 1991).

Estos resultados concuerdan con el perfil inmunológico de un paciente chagásico crónico cuando se ensaya con antígenos totales de *T. cruzi* (Fig.19 panel B calle 1, 2 y 3).

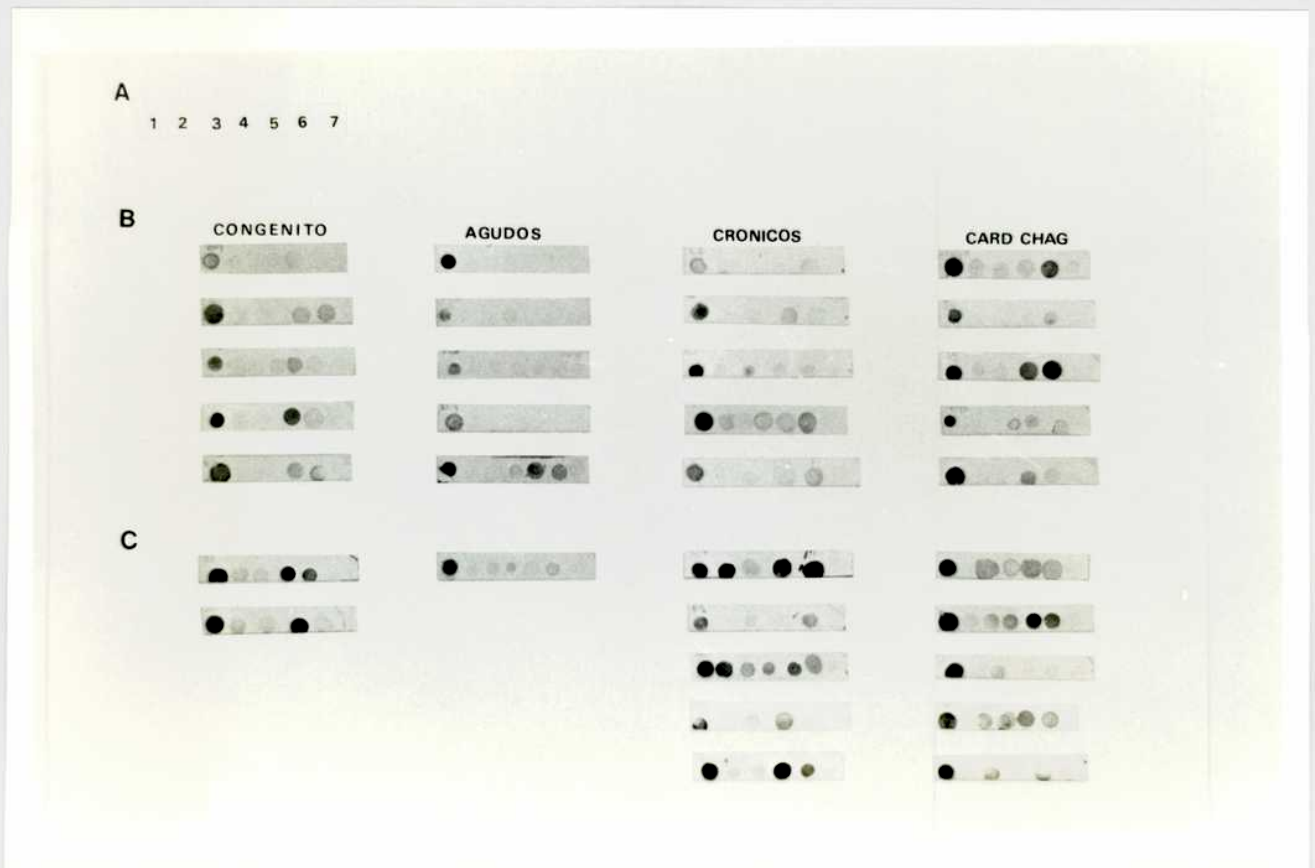


Figura 30:

Reactividad de los sueros chagásicos con extracto total de *T. cruzi* y fagos recombinantes. Los sueros de pacientes Chagásicos se dividieron en cuatro grupos: sueros de pacientes con Chagas congénito (CONGENITO), sueros de pacientes agudos (AGUDOS), sueros de pacientes en la etapa crónica sin evidencias clínicas de daño cardíaco (CRONICOS); y sueros de pacientes crónicos con cardiomiopatía Chagásica (CARD.CHAG). Por el ensayo de placas de lisis se transfirieron las proteínas de fusión de los fagos recombinantes a membranas de HybondC, ver MM 2.18.4. Los filtros de nitrocelulosa se enfrentaron con los sueros diluidos 1:500. Panel A: Orden de siembra de los recombinantes; 1: extracto de proteínas de *T. cruzi*; 2: JL8; 3: RA1; 4: JL52; 5: F2 (Ibañez y col. 1988); 6: JL7; y 7: λ gt11. Los filtros se agruparon en función de su reactividad con el recombinante RA1; Panel B: sueros que no reaccionaron con RA1; Panel C: RA1 positivos.

3.15) REACTIVIDAD DEL RECOMBINANTE RA1 CON SUEROS LEISHMANICOS;

Del mismo modo se estudiaron sueros de pacientes con distintas formas de leishmaniasis.

Se utilizaron 6 sueros de pacientes con kala-azar, 2 de pacientes con leishmaniasis mucosa selvática (forma UTA) y 5 sueros de pacientes con espundia (*L.b.braziliensis*)

En la Fig.31 se muestra la reactividad de estos sueros con una serie de recombinantes, entre ellos RA1.

Los pacientes con kala-azar muestran una intensa reactividad cruzada con el extracto total de proteína de *T. cruzi* y de reaccionan mas debilmente con RA1, también se observa reactividad con otras proteínas de fusión. Estos resultados son coincidentes con la gran producción de inmunoglobulinas contra el parásito descrita en la introducción. La reactividad del extracto total y algunos de los recombinantes estaría evidenciando la conservación de proteínas entre *T. cruzi* y *Leishmania*.

Los pacientes con UTA tienen un título de anticuerpos muy bajo, por estos motivos los ensayos deben realizarse con suero poco diluido y disminuye la sensibilidad del método. Igualmente, puede observarse reactividad con la proteína de fusión RA1.

Los sueros de pacientes con espundia muestran una fuerte reacción con RA1 y no reconocen las proteínas de fusión expresadas por los otros recombinantes de *T. cruzi*; los mismos resultados pueden observarse en la Fig.32.

El alto grado de reactividad con RA1, mostrada por los sueros de pacientes con espundia, contrasta con la baja reactividad de la misma proteína de fusión con sueros de pacientes chagásicos (ver Resultados 3.9).

En base a estos resultados se estudió la posibilidad de armar un panel de recombinantes para diferenciar las dos parasitosis (espundia y, chagas) de la doble infección.

3.16) PERFIL INMUNOLOGICO DIFERENCIAL:

Se ensayó la reactividad de sueros de paciente doble infectados, pacientes con espundia y Chagásicos, con distintos fagos recombinantes por la técnica de placas de lisis. Los resultados se muestran en la Fig. 32.

Todos los sueros doblemente infectados presentaban diversos grados de inmunoreactividad con los recombinantes de T. cruzi, JL7, JL8 y JL5, reactivos diagnósticos de la enfermedad de Chagas (Levin 1991).

Los mismos recombinantes ensayados con sueros de pacientes con Chagas crónico reaccionaron fuertemente con los recombinantes JL7, JL8 y JL5 pero débilmente con el antígeno RA1, estos resultados son a su vez coincidentes con lo mencionado en 3.9.

Por otro lado los sueros de individuos infectados por L. b. braziliensis (espundia) presentaron un alto grado de reactividad anti hsp70-RA1 pero no reaccionaron con ningún otro antígeno de T. cruzi.

El alto nivel de reactividad anti-hsp70 y la reactividad con los recombinantes de T. cruzi definen un patrón serológico característico de los pacientes doblemente infectados por T. cruzi y L. b. braziliensis.

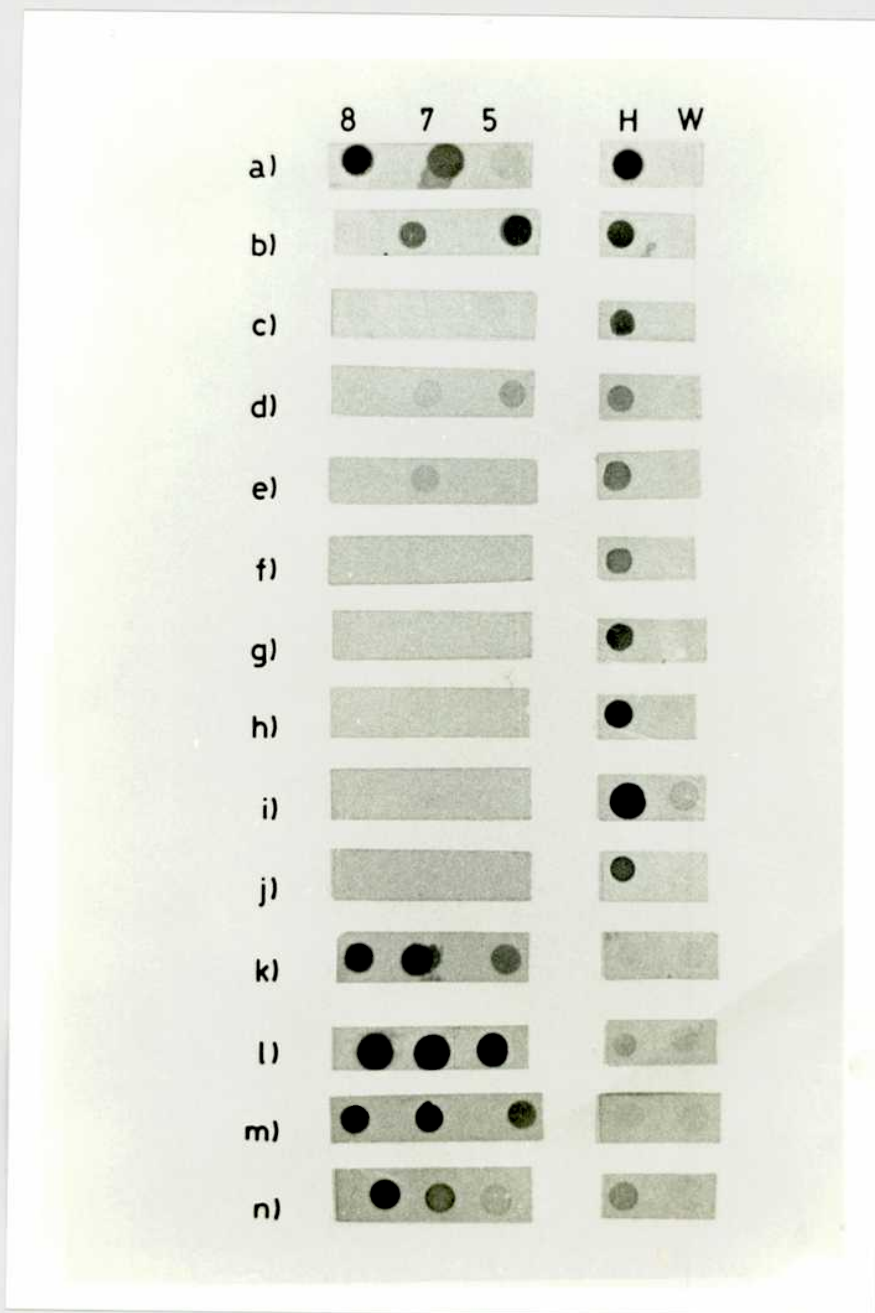


Figura 32:

Perfil Inmunológico diferencial. Ensayos de placas de lisis para los recombinantes 8: JL8, 7: JL7, 5: JL5, H: RA1 y línea W: fago λ gt11. Los sueros se diluyeron 1:500, excepto aquellos sueros que no mostraban reactividad con las proteínas de fusión analizadas, en tal caso, se diluyeron 1:250 y 1:100. Los filtros a-d: fueron incubados con sueros de pacientes doblemente infectados por T. cruzi y L. b. braziliensis, e-f: reactividad de sueros de pacientes con espondia y los filtros k-n: fueron incubados con sueros de pacientes con cardiopatía chagásica crónica.

3.17) ANALISIS DE REACTIVIDAD DEL RECOMBINANTE RA1 CON OTROS SUEROS:

Se estudió la reactividad del recombinante RA1 con sueros de pacientes con lepra, malaria, artritis reumatoidea (AR), mononucleosis infecciosa (MI) y lupus sistémico eritematoso (LES).

En la Fig.33 se muestra la reactividad de los diferentes sueros con la proteína de fusión RA1.

Este recombinante reaccionó con 3 de 8 pacientes leproso y 1 de 12 pacientes con malaria.

Además se detectaron anticuerpos anti-RA1 en 2 de 6 pacientes con AR, en 6 de 8 pacientes con MI y en 2 de 10 pacientes con LES.

Estos resultados y en particular la reactividad de los sueros LES, enfermedad autoinmune, demuestran la conservación de regiones antigénicas entre las hsp70 humanas y de *T.cruzi*, específicamente con la región contenida en la proteína de fusión RA1.

Esto se confirma al analizar la homología entre las hsp70 humana y de *T.cruzi* (ver Fig.34).

3.18) COMPARACION DE SECUENCIA DE AMINOACIDOS ENTRE *T.cruzi*, *L.b.brasiliensis* y *Homo sapiens*:

En la Fig. 34 se muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos de las regiones carboxi-terminales de las proteínas de fusión RA1 (*T.cruzi*), Lbb1 (*L.b.brasiliensis*), y las proteínas de la familia de choque térmico de 70kda humanas, la hsc70 de expresión constitutiva y hsp70 (Hunt y col. 1985), la forma inducible ((Dworniczak y col. 1987).

```

Tc P L T L G I E T A G G V M T S L I K R N T T I P T K K S Q I F
Lb
Hc      S      Y      V      Y      .      Q      T      T
Hs      L      L      A      S      Q      .      T

Tc S T Y P D N Q P G V H I Q V F E G E R A M T K D C H L L G T F
Lb .      A
Hc T      S      L      Y      N      N      K
Hs T      S      L      Y      N      N      R

Tc D L S G I P P A P R G V P Q I E V T F D L D A N G I L N V S A
Lb .      A
Hc E      T      D      I
Hs E      I      T

Tc E E K G T G K R N Q I V I T N D K G R L S K A D I E R M V S E
Lb .      .      .      H      T      D E      N D
Hc V D      S      E      K      T      E      .      Q
Hs T D      S      A      K      T      E      E      D      Q

Tc A A K Y E A Q D K E Q R D R I D A K N G L E N Y A F S M K N T
Lb S      .      Q      A      .      M      .      A      L      E      .      .      Y      .      .
Hc E      K      E      E      K      .      K      V      S      S      S      .      N      A      .
Hs E      K      E      E      V      E      V      S      A      S      M      S      A

Tc V N E P N V A G K I E E A D K N T I T S A V E E E A L Q W L N N
Lb S D T . . S      L      .      .      S      R S A L N L . I D T . . E      .      S
Hc E D E K L Q      N D E      Q K . L D K C N      I I N      D K
Hs E D E G L K      S      K K V L D K C Q      V I S      D A

Tc N Q E A S K E E Y E H R Q K E L E N L C T P I M T K M Y Q G M
Lb .      .      .      .      .      .      .      S      T      N      .      .      .      .
Hc .      T      E      .      F      Q      .      K      V      N      I      .      L      .      S      A
Hs T      L      E      D      F      K      R      Q      V      N      I      S      G      L      A

Tc G A G - G G M P G G M P G G M P G G M P G G M P G G M P G G M P G G A
Lb . G . A      - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D M S
Hc - - - - -      F      .      .      - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Hs - - - - -      F      - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

Tc - - - - - - - - - N P S S S S G P K V E E V D
Lb G M G G G Q G P A A G A      .      .
Hc - - - - - G A P P S G G A      .      T I
Hs - - - - - A Q G P K G G      G      T I

```

Figura 34:

Comparación de secuencias de proteínas de la familia hsp70. Tc: hsp70 *T. cruzi* cepa RA. Lb: hsp70 *L. b. braziliensis*. Hc: cognate hsc70 humana (Dworniczak y col 1987) Hs: hsp70 humana, inducible (Hunt C. y col. 1985). Letras mayúsculas indican donde la secuencia de aminoácidos difiere, (*) marca la identidad de aminoácidos y (-) fueron introducidos para mejorar el alineamiento de las proteínas.

La proteína de *T. cruzi* comparte un 70 y 68% de homología con las hsc70 y hsp70 humanas, respectivamente. La proteína Lbb1 es un 71 y 69% homóloga a la hsc70 y hsp70 humanas, respectivamente.

3.19) *BUSQUEDA DE ANTICUERPOS ANTI-hsp70 AURTORREACTIVOS:*

La conservación de determinantes antigénicos entre estas proteínas y la homología de sus secuencias nos llevaron a estudiar si la respuesta anti-hsp70 en un paciente parasitado podía generar anticuerpos anti-hsp70 autorreactivos. Para ello se eligió la estrategia que se describe a continuación.

Se estudió la reactividad de anticuerpos anti-RA1 de tres sueros de pacientes doble infectados con la proteína hsp70 bovina comercial (ver MM.1). En la Fig.35 se muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos entre la hsc70 bovina y las humanas. Entre la proteína bovina y la hsc70 humana existe un 98% de homología, y un 86% con la forma inducible humana, entre las regiones C-terminal.

En la Fig.36 panel A se observa que los anticuerpos inmunoseleccionados del suero CB reaccionan con la proteína bovina mientras que los anticuerpos obtenidos de los otros sueros no.

Para confirmar la especificidad de la reacción autoinmune se preincubaron los anticuerpos anti-RA1 con la proteína de fusión RA1. Este tratamiento anuló la reactividad con la proteína bovina (Fig. 36)

Llama la atención que sólo uno de los sueros reaccionara con la proteína bovina, indicando que los diferentes sueros reconocen distintos epítopes en la proteína de fusión RA1 y que solo algunos de estos son capaces de reaccionar en forma cruzada con la hsp70 mamífera.

Hc P L S L G Y E T A G G V M T V L Y K R N T T I P T K Q T Q T F
 Bs I I I T Q T
 Hs L A S Q T

Hc T T Y S D N Q P G V L I Q V Y E G E R A M T K D N N L L G K F
 Bs
 Hs R

Hc E L S G I P P A P R G D P Q I E V T F D I D A N G I L N V T A
 Bs T V
 Hs

Hc V D K S T G K E N K I T I T N D K G R L S K E D I E R M V Q E
 Bs
 Hs T A E D

Hc A E K Y K A E D K K Q R D K V S S K N S L E S Y A F N M K A T
 Bs
 Hs E V E A M S A

Hc V E D E K L Q G K I N D E D K Q K I L D K C N E I I N W L D K
 Bs
 Hs G K S K V Q V S A

Hc N Q T A E K E E F E H Q Q K E L E K V C N P I I T K L Y Q S A
 Bs T
 Hs T L D K R Q S G

Hc - - - - G G M P G G M P G G F P G G G A G P S G G A S S G P T
 Bs G G M P G M P A Q K G
 Hs - - - - F - - A Q K G

Hc I E E V D
 Bs
 Hs

Figura 35:
 Comparación de secuencias de proteínas de la familia hsp70: Hc: cognate hsc70 humana (Dworniczak y col 1987); Bs: cognate hsc70 bovina (DeLuca-Flaherty y col. 1990); Hs: hsp70 humana, inducible. Letras mayúsculas indican donde la secuencia de aminoácidos difiere, (*) marca la identidad de aminoácidos y (-) fueron introducidos para mejorar el alineamiento de las proteínas.

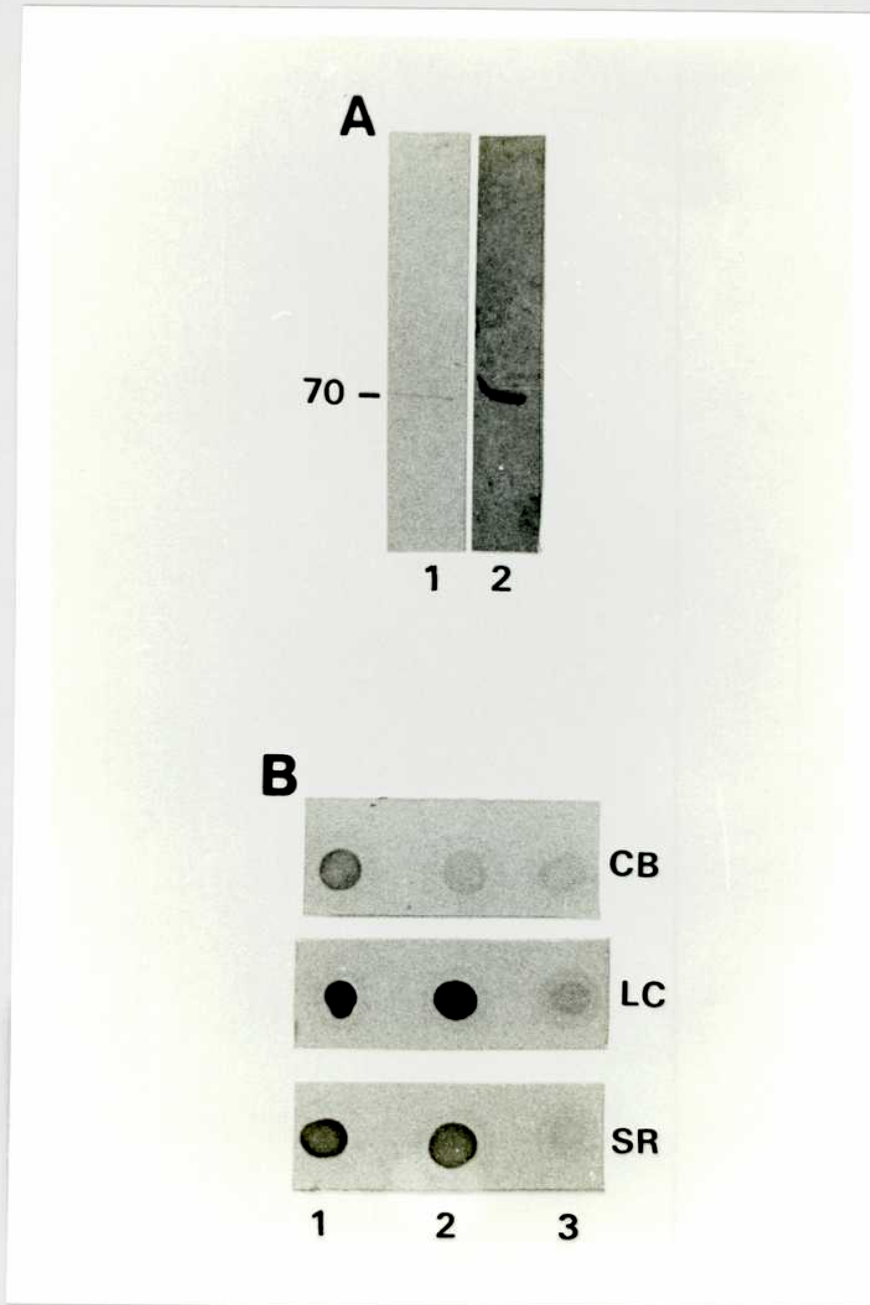


Figura 36: Reactividad cruzada de los anticuerpos anti-RA1, inmunopurificados de sueros de pacientes doble infectados, con la proteína hsp70 bovina. Panel A: La proteína bovina se corrió en geles de 7,5% de poliacrilamida una parte del gel se transfirió a filtros de nitrocelulosa y otra se tiñó con Coomassie-blue (calle 2). Calle 1: reactividad de los anticuerpos inmunopurificados del suero CB. Panel B: reactividad de los anticuerpos inmunopurificados utilizados en el ensayo del Panel A con las proteínas de fusión, 1: Lbb1, 2: RA1, 3: JL5. Los anticuerpos anti RA1 se inmunopurificaron a partir de los sueros:CB, LC y SR (ver MM 2.22).

DISCUSSION

Una de las estrategias mas utilizadas para buscar antígenos parasitarios es, desde la construcción de la primer biblioteca de expresión (Young y col. 1983), la utilización de suero de pacientes infectados como sonda inmunológica para discriminar entre los fagos recombinantes, aquellos que contengan polopéptidos parasitarios capaces de ser reconocidos por los anticuerpos del suero.

El suero de un paciente Chagásico contiene una gran variedad de anticuerpos con distintas especificidades antigénicas. Si se enfrentan proteínas de *T. cruzi* transferidas a un filtro de nitrocelulosa, con suero de un paciente, serán reconocidos polipéptidos de diversos pesos moleculares por los anticuerpos del suero.

La población de anticuerpos del suero de un paciente varía en función del estadio de la enfermedad (Krettli y col. 1982; Levin 1990). Del mismo modo, el suero de un paciente bajo tratamiento tripanomicida que disminuye y a veces elimina la parasitemia (Krettli y col. 1984), irá cambiando su población de anticuerpos durante el transcurso de la quimioterapia. Así, el suero del paciente al comenzar el tratamiento tendrá una población de anticuerpos contra el parásito distinta a la que tendrá al finalizar la terapia.

Estas diferencias se pueden visualizar en un Western blot de proteínas parasitarias enfrentadas con suero al inicio de la terapia y con suero del mismo paciente después del tratamiento.

En 1982 Krettli y col. estudiaron la variación de anticuerpos en pacientes bajo tratamiento con benznidazol. Algunos pacientes presentaban una rápida disminución de anticuerpos capaces de lisis al parásito en presencia de C (anticuerpos líticos); por el contrario los anticuerpos visualizados por ensayos de serología clásica (como IF sobre organismos fijados o aglutinación de látex) disminuían muy lentamente. Esto quiere decir que la conversión del suero del paciente de LMC+ a LMC-, se correlacionaba con

un cambio cualitativo en el perfil de anticuerpos. Los sueros LMC- perdían la capacidad de reaccionar con polipéptidos de 105, 120, 145, y 160 kda, mientras que aquellos pacientes que no respondían al tratamiento tampoco variaban su perfil de anticuerpos (Martins y col. 1985)

Dados los cambios inmunológicos descritos en los pacientes que respondían al tratamiento, se utilizó esta variación como herramienta para identificar los antígenos capaces de originar anticuerpos responsables de lisar al parásito. Esta metodología o rastreo diferencial ya ha sido utilizada por Hall R. y col. en 1985 para identificar antígenos de *Plasmodium falciparum*.

Para rastrear la biblioteca de tripomastigotes sanguíneos se utilizó el suero de pacientes que respondieron al tratamiento tripomocida (se convirtieron de CML+ a CML-). Aunque debido a los inconvenientes descritos en resultados (3.1; 3,2) se diseñó una estrategia alternativa para los primeros rastreos inmunológicos utilizando sueros CML+ y CML- pero de distintos pacientes. Esta metodología tiene la limitación de estar trabajando con distintos pacientes y que cada uno de ellos tendrá un perfil de anticuerpos característico dependiente de su sistema inmunológico, la forma y momento de infección, pese a ello es una buena aproximación para acotar el número final de recombinantes a analizar. Esto puede mejorarse aún más con un mayor número de pacientes en cada grupo (CML+ o -).

Por estos rastreos se obtuvo el recombinante Lyt8. Luego se estudió su correlación con la actividad lítica de varios sueros y su reactividad con la proteína de fusión.

Con los sueros brasileros se vió que uno de cuatro pacientes disminuía la reactividad anti-Lyt8 luego del tratamiento.

El mismo ensayo con los sueros argentinos demostró que un 50% de cada grupo reconocía Lyt8, tanto los sueros CML- como los CML+.

Los resultados no demostraron paralelismo entre conversión del suero de CML+ a CML- y la reactividad con Lyt8. No se pudo concluir entonces y se deberían realizar los mismos ensayos con un mayor número de sueros.

Recientemente Norris y col (1991) demostraron que la gp160 de *T. cruzi* se unía al componente C3b del complemento, inhibiendo la formación y estabilidad de los pasos subsiguientes de la vía alternativa. Esta es una actividad análoga a la de las proteínas regulatorias humanas, cuya función es prevenir la activación y amplificación de la respuesta C sobre células autólogas. La secuenciación parcial del gen de *T. cruzi* gp160 muestra una significativa homología con la proteína humana DAF, una de las siete conocidas hasta el momento, que regulan la activación autóloga del C en humanos.

El mismo grupo propuso el modelo esquematizado en la Fig.37.

La destrucción de células normales por una excesiva activación del C, es prevenida o controlada por una serie de proteínas regulatorias cinco de ellas plasmáticas y dos de membrana. Todas ellas actúan inhibiendo la formación y progresión de la cascada del C por inactivación de alguno de sus componentes.

Si se recuerda que los anticuerpos líticos son originados solo por parásitos vivos, lo cual sugiere que los antígenos responsables podrían ser activamente liberados al medio, porqué no buscar proteínas parasitarias que tengan homología con alguna de las cinco proteínas regulatorias presentes en el plasma?.

Con el mismo razonamiento se podrían buscar en la superficie del parásito, así como se encontró gp160. En este caso se recorrería el camino inverso; rastrear secuencias parasitarias que presenten por ejemplo homología con HFR (Homologous restriction factor) que es la segunda proteína regulatoria de superficie de células humanas.

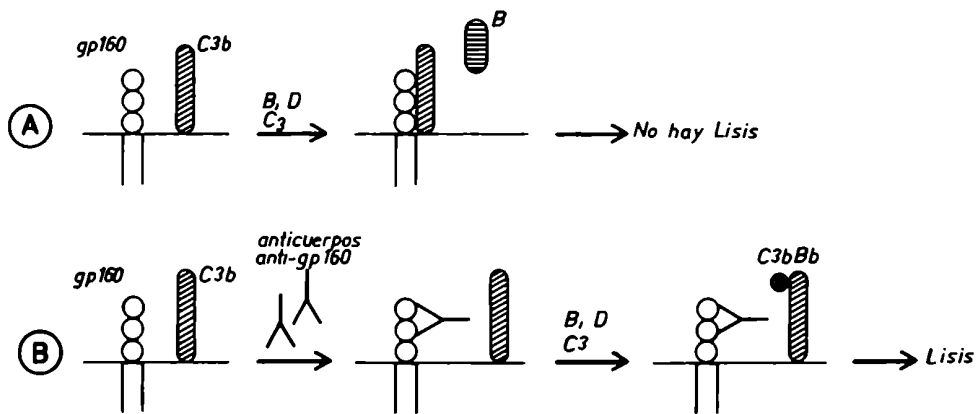


Figura 37:

Modelo de lisis de tripomastigotes de *T. cruzi* mediante la vía alternativa del C y dependiente de anticuerpos específicos. La proteína *gp160* de *T. cruzi* se muestra anclada a la membrana a través de un residuo glicolipídico. La proteína *C3b* se une covalentemente a la membrana e interactúa con la *gp160* inhibiendo los pasos subsiguientes del sistema C. Los anticuerpos anti-*gp160* impiden su interacción con *C3b* permitiendo la formación y propagación de la cascada del sistema C que finaliza con la lisis del parásito.

Así, la estrategia consiste en buscar proteínas parasitarias por homología de las mismas con los componentes regulatorios humanos. Para la búsqueda se utilizarían secuencias nucleotídicas de zonas muy conservadas de las proteínas mamíferas, con las cuales se construirían primers sintéticos para amplificar por un protocolo de ARNm-PCR las secuencias correspondientes del parásito. Es fundamental partir de ARNm del estadio tripomastigote. Los ADNc así sintetizados se ligarían a vectores de expresión cuyos productos se podrían rastrear con una sonda radioactiva comprendida entre los dos primers utilizados para la amplificación. En paralelo se se utilizarían sueros de pacientes chagásicos para un rastreo serológico.

Luego se podría estudiar la inmunogenicidad de estas proteínas y ver si existe correlación con la actividad lítica de los sueros o bien por inmunización comprobar si son capaces de conferir resistencia a reinfecciones en un estudio experimental (modelo murino).

Porqué por un rastreo diferencial llegamos a una hsp-70?:

El análisis genético del recombinante Lyt8, demostró que codificaba para la región carboxilo terminal de la hsp-70 de *T. cruzi*.

Muchos laboratorios han utilizado sueros de pacientes infectados por con diversas parasitosis, para rastrear una biblioteca de expresión de los parásitos correspondientes a cada infección (Engman 1990), y han encontrado una gran cantidad de recombinantes que codificaban para proteínas conservadas como, ubiquitina en el modelo murino (Kirchof y col. 1988), MAP (Kerner y col. 1991) y varias hsps, principalmente hsp70 (Bianco y col. 1986; Engman y col. 1989a; Hendstrom y col. 1987).

En principio la frecuencia con que se purifican estas proteínas, podría explicarse en base a la abundancia de sus mensajeros.

La abundancia por sí misma no es suficiente para explicar porqué otros ADNc muy representados como las histonas, actina y tubulina no han sido sistemáticamente identificados por rastreos inmunológicos. La inmunogenicidad de estas proteínas debe, obviamente influir en su detección.

Sin embargo, si analizamos el perfil de anticuerpos de sueros pacientes chagásicos (ver Fig.19 Panel B; calles 1,2 y 3); y aún estadísticamente los resultados con sueros de pacientes agudos, crónicos y congénitos (3.10, Fig.19), demuestran que solo un 50% de los pacientes crónicos reconocen la hsp70 de *T. cruzi* codificada por el recombinante RA1. Por tal motivo se deduce que este no es un antígeno mayoritariamente reconocido por los pacientes chagásicos, al menos la porción codificada por el rec RA1. Además, los sueros que reaccionan lo hacen con una intensidad menor si comparamos la reactividad de los mismos sueros con los recombinantes JL7 y JL5.

Por otro lado en el laboratorio se construyó, en 1987 (Mesri 1990) una biblioteca de expresión de epimastigotes que ha sido intensivamente rastreada con sueros de pacientes chagásicos. Uno de los sueros utilizados (MQ) nunca reconoció fagos hsp70 en la biblioteca de epimastigotes; sin embargo al realizar un rastreo de 50.000 fagos de la biblioteca de tripomastigotes sanguíneos con el mismo suero se encontraron dos fagos hsp70.

Si bien no se realizaron trabajos cuantitativos de los niveles de expresión del mensajero para, hsp70, en ambos estadios. Es claro que hsp70 se sintetiza en el estadio epimastigote (ver resultados recombinantes HSL12 y HSL13 Fig.16). Por lo tanto el hallazgo del suero MQ probablemente se deba a un aumento de la expresión del ARNm de hsp70 en el estadio tripomastigote.

El hecho de encontrar mayor expresión de hsp70 en tripomastigotes está de acuerdo con lo inferido en la literatura sobre la inducción de estas proteínas a 37°C.

Función de las hsp-70:

En general las proteínas denominadas de choque térmico, son inducibles por un gran número de estímulos (Lindquist 1986), también se las llama proteínas de stress.

Están agrupadas en familias según sus pesos moleculares aproximados.

También hay formas constitutivas (hsc), que realizan una serie de funciones esenciales durante el desarrollo normal de las células.

La familia de 70 K (HSPs70) está involucrada en el plegamiento de polipéptidos para facilitar su asociación y formación de complejos multiméricos (Pelham 1986) y/o su translocación a través de membranas de la mitocondria, cloroplastos y retículo endoplasmático (ver Young 1989; Deshaies y col. 1988). Uno de los ejemplos más estudiados es el de la *heavy chain binding protein* (BiP) que interviene en el ensamblado de las inmunoglobulinas (Haas y col 1988).

También intervienen en la preparación de proteínas para su degradación (Rothman y col. 1986).

En condiciones de stress los niveles de transcripción aumentan y se sintetizan las formas inducibles (HSP). En estas condiciones la inestabilidad de los complejos proteicos aumenta, en su renaturalización intervienen las hsp70 siendo este quizás una de las funciones más importantes de estas proteínas. Cuando el daño es irreversible promueven la remoción de las proteínas desnaturalizadas (Anathan y col. 1986; Rothman y col. 1986).

Muchos patógenos, entre ellos leishmanias y tripanosomas tiene en su ciclo de vida un cambio brusco de temperatura al pasar del vector al huésped mamífero, cambian de un medio a 25°C a 37°C. En

L. major se ha demostrado *in vitro*, que el simple cambio de temperatura de 25 a 37°C induce la diferenciación del parásito (Van der Ploeg y col. 1985; Shapira y col. 1988).

Además, los parásitos en sangre están expuestos a los metabolitos oxidativos liberados durante el proceso inflamatorio que desencadena la misma infección, esto contribuye a inducir la síntesis de hsp70 en los parásitos (Polla 1991).

En base a estos resultados consideramos que el aislamiento de una hsp70 a partir de un rastreo inmunológico diferencial, se debe a la abundancia de ARNm para hsp70 en el estadio de tripomastigotes sanguíneos utilizado para la construcción de la genoteca.

Los distintos niveles de un mismo mensajero se pueden deber simplemente a la diferencia de estadios. Es importante notar que la cepa RA 1 es más virulenta que la cepa Tul 2, por lo tanto se podría inferir que la gran cantidad de ARNm hsp70 detectado en los tripomastigotes RA podría estar relacionado con su virulencia.

Se ha reportado para *Salmonella typhimurium*, patógeno intracelular, que mutaciones que aumentan los niveles de expresión de hsp70, aumentan su resistencia al H₂O₂ y que por el contrario la producción deficiente de estas proteínas se correlaciona con una marcada disminución de la supervivencia de la bacteria dentro de macrófagos activados (Fields y col. 1986; Christman y col. 1985). También, para *L. braziliensis panamensis* se vió que la preincubación de los promastigotes a 34°C no solo induce un cambio morfológico en los parásitos sino que además, aumentan su infectividad cuando se determina por el tamaño de las lesiones en la piel de hamsters inoculados con los parásitos pretratados (Smejkal y col. 1988).

En *T. cruzi* se plantea la hipótesis de que la ubiquitina, considerada una hsp de bajo peso molecular, podría ser o estaría relacionada con proteasas que se liberan al citoplasma de las células infectadas, contribuyendo a la nutrición del amastigote y su supervivencia (Polla 1991).

Dado que las hsps están directamente involucradas en la adaptación y supervivencia del parásito en mamíferos; cabe investigar la importancia de la hsp70 de *T. cruzi*, sus efectos en la supervivencia en el hospedador y su relación con la virulencia.

Por otro lado, no solo las hsps de los parásitos se inducen durante la infección; en respuesta a su entrada el hospedador aumenta drásticamente la síntesis de estas proteínas.

El huésped responde a la infección. Se ha demostrado que macrófagos infectados por virus, bacterias y parásitos aumentan la síntesis de hsps (para review ver Kaufmann 1990). Se describió además, que tanto macrófagos como linfocitos, aumentan la producción de hsps luego de su estimulación por diferentes linfoquinas (Spector y col. 1989).

Así en el foco infeccioso y la inflamación desencadenada, no solo el parásito sino también su huésped producen una gran cantidad de hsps (Polla 1991).

La antigenicidad de hsp70 de parásitos protozoarios se atribuye a su abundancia en el foco infeccioso (Kaufmann 1990a). Probablemente algunas hsps sean antigénicas por su forma de presentación al sistema inmunológico. Además la memoria inmunológica originada por infecciones anteriores pueden reestimular la respuesta anti-hsp70 del huésped (Young 1989). La consecuencia es que el sistema inmunológico del huésped reacciona frente a estos antígenos de todas las formas posibles.

Hay respuesta humoral, celular, y hasta se encontró cuales son los antígenos que estimulan los linfocitos τ (O'Brien y col. 1989; Haregewoin y col. 1989; Holoshits y col. 1989).

Lo dicho haría pensar que por ejemplo se podrían detectar anticuerpos anti-hsp70 en la fase aguda de la enfermedad chagásica.

En efecto, Engman y col. en 1990 reportaron que ratones infectados por *T. cruzi* tienen anticuerpos anti-hsp70 en la fase aguda de la infección. Sin embargo, si bien trabajamos con humanos, en el presente trabajo se demuestra que solo 2 de 12 sueros de pacientes con chagas congénito y 1 de 9 sueros de pacientes en la fase aguda de la enfermedad, reaccionan con la región carboxiterminal de la hsp70 de *T. cruzi*. Solo en la fase crónica de la infección un 47% de los sueros reacciona con la proteína de fusión RA1. Una crítica a esta aceveración podría ser que no se trabajó con la proteína completa, pero en la Fig.29 se ha demostrado que la región mas antigénica de esta proteína es la carboxiterminal, si no la única.

Engman y col. 1990 no solo describe anticuerpos anti-hsp70 en ratones agudos sino que informan que hsp70 es un antígeno mayoritario en la infección chagásica crónica, también concluyen que los anticuerpos anti-hsp70 no son autoreactivos.

Características de la respuesta inmunológica humoral contra hsp70:

a) Estudio con sueros de pacientes Chagásicos:

En los resultados sección 3.14 se vé que de los 12 sueros de pacientes con Chagas congénito solo 2 reaccionan con RA1 (17%), de 9 sueros de pacientes en fase aguda solo 1 reacciona (11%) y de los 148 sueros de pacientes crónicos 70 reaccionan con el recombinante RA1 (47%).

La reactividad anti-RA1 detectada en los 70 sueros chagásicos parece ser de menor intensidad que la observada para otros recombinantes, por ejemplo JL7 y JL5. (ver Fig.32).

La baja reactividad del recombinante RA1 fue confirmada para algunos sueros cuantificando, por ELISA, la reactividad anti-RA1 y anti-JL5 de los sueros (Levitus 1991).

Estos resultados concuerdan con el perfil inmunológico de un paciente chagásico crónico (Fig.19). El mismo suero reacciona con una gran variedad de proteínas del extracto total de *T. cruzi* sin observarse una reacción de mayor intensidad en la zona de 70Kda (Fig.19 panel B calle 1, 2 y 3).

La reactividad de los sueros de pacientes Chagásicos con el fago recombinante RA1 (ver resultados, Tabla 6, y Fig.30) demuestra que no es un antígeno mayoritario para esta infección.

b) Estudio con sueros de pacientes con Kala-azar, Uta y Espundia:

La reactividad de los sueros de estos pacientes con la proteína de fusión RA1 demuestra por un lado la reactividad inmunológica cruzada entre las regiones C-terminal de la hsp70 de *T. cruzi* y *Leishmania*.

Pero lo más importante es que, a diferencia de los pacientes chagásicos, la intensidad de reacción con RA1 de los sueros de pacientes con espundia, demuestran que en esta infección la hsp70 sí es un antígeno mayoritario. Estos datos concuerdan con lo reportado por Amorin y col. 1991 para leishmaniasis mucocutánea.

c) Estudio con sueros de pacientes doble infectados:

La comparación del perfil de anticuerpos de estos sueros con respecto al de pacientes Chagásicos o con espúndia es lo primero que llama la atención. Como se observa en la figura 19 y figura 29, es notable la diferencia que existe en la composición de anticuerpos de cada uno de estos tres grupos de pacientes.

Con ello se concluye que la respuesta humoral de los pacientes doble infectados es distinta y característica de este tipo de infección.

En base a estos resultados se construyó el panel de recombinantes (JL7, JL5 y RA1 de la fig.32) que permite diferenciar serológicamente las tres infecciones.

Este panel diferencial que permite identificar los pacientes doble infectados es importante porque el tratamiento con antimonioles, frecuentemente empleados para las Leishmaniasis, tienen efectos cardiotóxicos que podrían ser mas peligrosos aún en pacientes con cardiopatía chagásica.

La respuesta inmunológica humoral no es la sumatoria de la respuesta frente a *T. cruzi* y *L.b.braziliensis* observada en los pacientes chagásicos y con espundia respectivamente, sino que es el resultado de la interacción de las dos parasitosis en un mismo paciente.

En base a lo discutido anteriormente sería interesante estudiar el efecto de el alto nivel de anticuerpos anti-hsp70 en la evolución de la infección chagásica de estos pacientes. Por un lado los ensayos de las inhibiciones (Figs.28 y 29) demuestran que la reactividad de la hsp70 de los doble infectados estaría ligada a la infección con *Leishmania*. También, dado que hay reactividad

inmunológica cruzada entre las dos hsp70 (ver Figs.28 y 29, y sección 3.13 de resultados) y que la respuesta inmunológica contra *T.cruzi* cursa con bajos niveles de estos anticuerpos, cabe preguntarse si la respuesta anti-hsp70 generada por la infección de *Leishmania* no tendría algún efecto sobre la parasitemia de *T.cruzi* en estos pacientes.

Hemos confirmado que existe respuesta humoral contra hsp70 en Chagas y espundia, y demostrado que también existe en pacientes doble infectados. Además que en este grupo de pacientes la hsp70 es un antígeno mayoritario. Estas evidencias plantean otro interrogante. Cómo puede el sistema inmunológico del hésped responder a estas proteínas foráneas y conservar la tolerancia a las propias?:

Comparaciones del los aminoácido de las Hsp70 clonadas y con cepas reportadas de *T.cruzi*, *L.b.brasiliensis* y humanas:

La comparación de la secuencia de aminoácidos no da diferencias entre las regiones codantes de ambas cepas, solo varía el número de repeticiones GGMP. También varía la secuencia nucleotídica del extremo 3' no codante del recombinante HSL13 con respecto a M98, HSL12 y Lyt8 (ver Fig.16).

La secuenciación del ADNc del fago recombinante Lbb1 (Fig.25) demuestra que entre ambas proteínas hay un 88% de homología y que el motivo GGMP está repetido solo dos veces en *L.b.brasiliensis*.

Teniendo en cuenta las secuencias reportadas para Maracay y Preú y para *L.major* (Lee y col. 1988) y *L.donovani* (McFarlane y col. 1990) el motivo GGMP está presente en todas las hsps reportadas para estos parásitos, también se han informado variaciones en el número de estas repeticiones entre distintas hsp y entre distintas subespecies de leishmania y plasmodium. Si bien puede variar el número de repeticiones de este motivo está siempre presente.

Teniendo en cuenta que esta es la región mas variable de la proteína, sugiere que podría tener un papel importante para el parásito.

En la Fig.34 se observa la comparación entre la secuencias de aminoácidos de la región C-terminal de las hsp70 humanas inducible y constitutiva. El porcentaje de homología entre la proteína de *T. cruzi* y *L.b.braziliensis* con respecto a ambas formas de las hsp70 humanas es de 70% aproximadamente.

La gran homología entre ambas secuencias nos llevaron, entre otros motivos, a estudiar la existencia de anticuerpos anti-hsp70 autorreactivos. También, se ha hablado mucho de la antigenicidad del tetrapéptido GGMP, la especificidad que confiere a la respuesta inmunológica frente a las hsp humanas. Pero curiosamente no se ha tenido en cuenta que la hsc70 humana tiene este motivo repetido dos veces. Este motivo podría ser también blanco de una reacción inmunológica cruzada.

Autoinmunidad en pacientes doble infectados:

La proteína de *T.cruzi* comparte un 70 y 68% de homología con las hsc70 y hsp70 humanas, respectivamente. La proteína Lbb1 es un 71 y 69% homóloga a la hsc70 y hsp70 humanas, respectivamente.

La conservación de determinantes antigénicos entre estas proteínas demostrada por la reactividad de sueros lúpicos con el fago recombinante RA1, y del anticuerpo monoclonal D4F18 con el mismo fago junto con la homología de sus secuencias, nos llevaron a estudiar si la respuesta anti-hsp70 en estos pacientes podía generar anticuerpos anti-hsp70 autorreactivos. Para ello se eligió la estrategia que se describe a continuación.

Se estudió la reactividad de anticuerpos anti-RA1 de tres sueros de pacientes doble infectados con la proteína hsp70 bovina comercial. En la Fig.35 se muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos entre la hsp70 bovina y las humanas. Entre la hsc humana y la hsc bovina empleada en estos ensayos existe una homología del 98%, esto nos permite extrapolar los resultados de auto-reactividad con la proteína bovina a la humana.

En la Fig.36. panel A se observa que los anticuerpos inmunoseleccionados del suero CB reaccionan con la proteína bovina mientras que los anticuerpos obtenidos de los otros sueros no.

La especificidad de la reacción se confirmó por experiencias de inhibición.

Esto nos lleva a plantear que hay anticuerpos anti-hsp70 auto-reactivos en pacientes doble infectados.

Paralelamente:

En la sección 3.10 y Fig.21 panel C de resultados, se demuestra con el monoclonal D4F18 que la proteína RA1 comparte determinantes antigénicos con proteínas mamíferas.

Se sintetizó un péptido con el epítoto humano (ANGILNVTAVDKSTGK) reconocido por el monoclonal D4F18 y se vió que el suero de un paciente chagásico crónico reaccionaba por ensayo sobre filtros de nitrocelulosa, muy fuertemente con este epítoto sintético humano (estos resultados no se muestran en las figuras).

Esta evidencia nos permite decir que habría autoanticuerpos anti-hsp70 en Chagas.

Estos resultados también son diferentes a lo informado por Engman y col. en 1990 para la infección por *T. cruzi*.

Este estudio plantea la metodología necesaria para continuar la caracterización de la respuesta anti-hsp70 autorreactiva en estas parasitosis.

CONCLUSIONES

- 1) Pese a que detectamos que en un suero de paciente chagásico bajo tratamiento, había disminución de anticuerpos anti-hsp70 luego de finalizado el mismo, no podemos generalizar que los anticuerpos anti hsp70 estén involucrados en el perfil inmunológico diferencial de ambos grupos de pacientes.
- 2) Del análisis de diferentes sueros chagásicos pertenecientes a diferentes individuos tratados o no, tampoco podemos concluir que en el perfil diferencial participen los anticuerpos anti-hsp70.
- 3) En pacientes Chagásicos, en pacientes con diferentes formas de leishmaniasis, y pacientes doble infectados, hay respuesta humoral anti-hsp70.
- 4) Se comprobó que para los sueros de pacientes con leishmaniasis la respuesta anti-hsp70 está dirigida hacia la región C-terminal.
- 5) Los resultados indican que en la Enfermedad de Chagas la hsp 70 no es un antígeno mayoritario; sí lo es para pacientes con espundia y para pacientes con la doble infección.
- 6) La respuesta humoral anti-hsp70, en Chagas es diferente de acuerdo con la etapa de la infección: en pacientes agudos y congénitos casi no se detectan sueros con anticuerpos anti-hsp70. En pacientes crónicos aproximadamente un 50% de los sueros los presentan.
- 7) Se determinó que la respuesta humoral de los pacientes doble infectados es característica y esto permitió diseñar un panel de recombinantes para diferenciar serológicamente la doble infección de las infecciones simples por *T. cruzi* y *L. b. braziliensis*.

- 8) Se observó que la hsp-70 de *T. cruzi* es un reactivo diagnóstico útil para dosar anticuerpos anti-hsp70 en infecciones como Malaria, *Leishmania* y Lepra.
- 9) Se demostró que autoanticuerpos anti-hsp70 presentes en LSE, AR, y MI reconocen la hsp70 de *T. cruzi*.
- 10) Que en la doble infección por *T. cruzi* y *L. b. braziliensis* existen autoanticuerpos anti-hsp70. Evidencias preliminares indican que podría ocurrir lo mismo en Chagas. Esto está en contradicción con lo informado por otros autores.

BIBLIOGRAFIA

- Abreu Salgado, A., & Pellegrino, J., (1968) Distribuição geográfica. En: Doença de Chagas, Cancado, R., (Ed.) Bello Horizonte, pp. 143-162.
- Affranchino, J.,L., Ibáñez, F.,C., Luqueti, A.,O., Rassi, A., Reyes, M.,B., Macina, R.,A., Aslund, L., Petterson, U., and Frash, 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.
- Amorim, A., G., Carrington, M., Miles, M., A., Mendoza, A., Barker, D., C. and Cardoso de Almeida, M., L. (1991) Identification of the C-terminal domain of 70KD heat-shock protein from Leishmani (V) braziliensis as a potential antigen for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **86**: BQ57.
- Ananthan, J., Goldberg, A., L. and Vollemy, R. (1986) Abnormal proteins serve as eukariotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science.* **232**: 522-528.
- Andrade, S.G., Freitas, L.A.R., Peyrol, S., Pimentel, A. & Sadigursky, M. (1990). Experimental chemotherapy of Trypanosoma cruzi infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. *Bull. Org. mond. Santé* (accepted for publication).
- Andrade, Z.,A., & Andrade, S. (1979) Patología en Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Brener, Z. & Andrade, Z. (eds.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp: 199-248.
- Andrade, Z.,A., (1991). Pathogenesis of Chagas' disease. *Res. Immunol.* **142**: 126-130.
- Andrews N.W., Charles, K.,A., Slatin, S.,L., and Griffiths, G., (1990). A T. cruzi-Secreted protein immunologically related to the complement component C9: Evidence for Membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* **61**: 1277-1287.
- Andrews, N.,W., Hong, K.,S., Robbins, E.,S., and Nussenzweig, V. (1987). Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of Trypanosoma cruzi. *Exp. Parasitol.* **64**:474-484
- Aviv, H. y P. Leder (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligo-thymidilic acid cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 1408-1412).
- Badaró R.J Jones T.C. Lorenzo R. Cerf B.J. Sampaio D. Carvalho E.M. Rocha H. Teixeira R. Johnson W.D. (1986) A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J. Infect Dis.* **154**: 639-649)
- Barral-Netto M. et al (1991) *J. Immunol.* **147**: 281-284.

- Bianco, E., Favaloro, J., M., Burkot, T., R., Culvenor, P., E., Crewther, P., Brown, G., Anders, F., Goppel, R. and Kemp, D. J. (1986) A repetitive antigen of Plasmodium falciparum that is homologous to heat shock protein 70 of Drosophila melanogaster. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA.* 83: 8713-8717.
- Blackwell, J. M., Ezekowitz, R. A. B., Roberts, M. B., Chanon, J. Y., Sini, R. B., Gordon, S. (1985). Macrophage complement and lectin-like receptors bind Leishmania in the absence of serum. *J. Exp. Med.* 162: 32431.
- Blisnick T. Lema F. Mazie J.C. and Pereira da Silva, (1988) *Exp. Parasitol.* 67:244.)
- Bonfa, E., S. J. Golombek, L., D. Kaufman, S., Skelly, H., Weissbach, N. Brot, and K. B. Elkon. (1987). Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N. Engl. J. Med.* 617:265-271.)
- Bordier, C. (1987). The promastigote surface protease of Leishmania. *Parasitol. Today.* 3: 151-53.
- Bouvier, J., Etges, R., Bordier, C. (1987). Identification of the promastigote surface protease in seven species of Leishmania. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24: 73-79
- Brener, Z. & Kretzli, A. (1990), Immunology of Chagas' disease. "Modern parasite biology. Cellular, immunological and molecular aspects " (D. J. Wyler). W. H. Freeman & Co., New York.
- 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.
- Burnet F.M. (1959) *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*, Cambridge University Press.
- Burnet, F.,M. and White, D.,O. (1972) Natural History of Infectious Diseases, *Cambridge University Press*.
- Carvalho E. M. Johnson D.W. Barreto E. Marsden P.D. Costa J.L.M. Reed S. and Rocha H. (1985) Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J. Immunol.* 135: 4144-4148.
- Carvalho E. M. Teixeira R.S. and Johnson D.W.. (1981) Cell mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. Infect. Immunol. 33: 498-502.
- Castes, M., A. Agnelli, O. Verde, and A. J. Rondon (1984) Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 57:279-286)

Castes, M., Agnelli, O., Verde, O. and Rondon, A. (1983) Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 27: 176-186.

Castes, M., Cabrera, M., Trujillo, D. and Convit, J. (1988) T-Cell subpopulations, Expression of interleukin-2 receptor, and production of interleukin-2 and gamma interferon in Human American cutaneous Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1207-1213.

Castes, M., D. Trujillo, D. Scott, and A.J. Rondon. (1987) Demonstration of an indomethacin-sensitive mechanism regulating immune reactivity in American cutaneous leishmaniasis patients. *Clin. Exp. Immunol.* 69:280-290.

Certa, U., Ghera, P., Dobeli, H. (1988) *Science* 240: 1036-1038.

Chagas, C., (1909). Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* N. Gen., N. sp., o agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1: 159-218.

Chang, K. P. (1983). Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 14: 267-305.

Chaudhuri, G., Chaudhuri, M., Pan, A., Chang, K.P. (1989). Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J. Biol. Chem.* 264: 7483-89.

Chaudhuri G. and Chang K.P. (1988) Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol. Biochem. parasitol.* 27: 43-52.

Chiale, P., and M., B. Rosebaum. (1989). Clinical and pharmacological characterization and treatment of potentially malignant arrhythmias of chronic chagasic cardiomyopathy, p. 601-620. E.M. Vaughan Williams and T. J. Campbell (ed.) Handbook of experimental pharmacology. Springer-Verlag KG, Berlin.

Chirgwin et al. *Biochemistry* 18:5294 (1979).

Christman, M., F., Morgan, R., W., Jacobson, S., F. and Ames, B., N. (1985) Positive control of regulon for defences against oxidative stress and some heat shock protein in *Salmonella typhimurium*. *Cell.* 41: 753-762.

Cohen, I., R. and Young, D., B. (1991) Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol. Today* 12: 105-110.

Convit, J., M. E. Pinardi, and A.J. Rondon. (1972). Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66:603-610.

- Cooper N. and Nemerow G. (1986) Complement-dependent Mechanism of Virus Neutralization in *Immunobiology of The Complement System*. Ross, ed. Academic Press, Orlando. FL. p: 139.
- D'Imperio Lima, M. R., H. Eisen, P. Minoprio, M. Joskowicz, and A. Coutinho. (1986). Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas disease. *J. Immunol.* 137:353-356.
- Da Silva, R. P., Hall, B. F., Joiner, K. A., Sacks, D. L. (1989). CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J. Immunol.* 143: 617-22.
- Dedet JP, Pradinaud R, Desjeux P, Jacquet-Viallet, P., Girardeau, I., Esterre, P., Gotz W., (1985). The 2 first cases of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania mexicana amazonensis* in French Guiana. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 48: 64-70.
- Dedet, J., P., (1976) La leishmaniose viscérale dans le monde: étapes des connaissances, repartition biogéographique et fréquences. *Bull. Inst. Pasteur.* 74: 413-434.
- Dedet, J., P. (1986) Les leishmanioses. *Encycl. Méd. Chir.* (Paris, France) Maladies Infectieuses, 8094 A¹⁰, 4-1986, 8 p.
- Dedet, J., P. (1990) Cutaneous Leishmaniasis in French Guiana: A Review J.P., Dedet. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 43: 25-28.)
- Dedet, J., P., Pradinaud R., Gay F., (1989). Epidemiological aspects of human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Trans R Soc Trop. Med. Hyg.* 83: 616-620.)
- DeLuca-Flaherty, C., and McKay, B., D. (1990) Nucleotide sequence of the cDNA of a bovine 70 kilodalton heat shock cognate protein. *Nucl. Acid Res.* 18: 5569.
- Deshashies, R., J., Koch, B., D., Werner-Washburne, M. Craig, E. and Scheckman, R. (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polipeptides. *Nature.* 322: 800-805.
- Dragon E.A. Stacey R. Sias, Kato E.A., and Gabe J.D. (1986) The genome of *T. cruzi* Contains a Constitutively Expressed, Tandemly Arranged Multicopy Gene Homologous to a Major Heat Shock Protein *Mol. Cell Biol.* 7: 1271-1275.

- Dubois P., Dedet J.P., Fandeur T., Roussilhon C., Jendoubi M., Pauillac S., Puijalon O.M. and Da Silva P.L. (1984) Protective immunization of the squirrel monkey against asexual blood stages of Plasmodium falciparum by use of parasite protein fractions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:229-232.
- Dworniczak B. and Mirault M.E. (1987) Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock cognate protein. *Nucl. Acid Res.* 15:5181-5197.
- El-On J., Bradley D.J. and Freeman J.C. (1980) *Exp. Parasitol.* 49: 167-174.
- Elias, D., C., M., Markovits, D., Reshef, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1576-1580.
- Elkon, K. B., S. Skelly, A. P. Parnassa, W. Moller, W. Danho, H. Weissbach, and N. Brot. (1986). Identification and chemical synthesis of a ribosomal protein antigenic determinant in systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7419-7423.
- Engman, D.M., Dragon, E.A. and Donelson, J.E. (1990) Human humoral immunity to hsp70 during Trypanosoma cruzi infection. *J. Immunol.* 144: 3987-3991.
- Engman, D., M., Kircoff, V., L., and Donelson, J., E. (1989a) Molecular cloning of a mitochondrial member of the hsp70 family. *Mol. Cell. Biol.* 9: 5163.
- Engman, D.M., Sias R.S., Gabe J. D., Donelson J.E., and Dragon E. (1989b) Comparison of HSP70 genes from two strains of T. cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 32: 285-288.)
- Etges, R., Bouvier, J., Bordier, C. (1986). The major surface protein of Leishmania promastigotes is a protease. *J. Biol. Chem.* 261: 9098-9101.
- Fenton Hall, B., H. and Joiner, K., A., (1991) Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. *Immunoparasitology Today* A22.
- Fields, P., I., Swanson, R., V., Haidaris, C., G. and Heffron, F. (1986) Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within macrophage are avirulent. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 83: 5189-5193.
- Fiorentino, D., Bond, M. and Mossman, T. (1989). Two types of helper T cells. - IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170: 2081-2092.
- Franke, E., D., McGreevy, P., B., Katz, S., P. and Sacks, D., L. (1985) Growth cycle dependent generation of complement resistant Leishmania promastigotes. *J. of Immunol.* 134:2713-2718.

- Frasch, A., C., C., (1989) Specific Antibody Response during the Acute Period of Chagas Disease. *Parasitol. Today*. 5: 355.
- Gentilini, M., and Dulfo, B., (1986). *Medicine Tropicale. Flammarion Médecine-Sciences*. France. pp125-130.
- Giannini, S., H. (1992) Effects of ultraviolet B irradiation on Cutaneous Leishmaniasis. *Parasitol. Today* 8: 44-48.
- Glew R.H. Saha A.K. Das S. and Remaley A.T. (1988) Biochemistry of Leishmania species. *Microbiol. Rev.* 52: 412-432.
- Grimaldi G. David J.R. and McMahon Pratt D. (1987) Identification and distribution of new world Leishmania spp characterised by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 270-287)
- Haas, I., G. and Wabl, M. (1983) Immunoglobulin Heavy chain binding protein. *Nature*. 306: 380-389.
- Gwo-Shu Lee, M., Atkinson, B., L., Giannini, S., H. and Van der Ploeg, L., H. (1988) Structure and expression of the hsp 70 gene family of L. major. *Nucl. Acid Res.* 16: 9567-9584.
- Hall, R., Hyde, J., Goman, M., Simmons, D., Hope, I., Mackay, M., Scaife, J., Merkli, B., Richele, R. and stocker, J. (1984) Major surface antigen gene of human malaria parasite cloned and expressed in bacteria. *Nature*. (Lond.) 311: 379-382.
- Hammer, C., Wirtz, G., Renfer, L., Greshan, H. and Tack, B. (1981) Large-scale isolation of functionally active components of human complement system. *J. Biol. Chem.* 256: 3995.
- Haregewoin, A., Soman, G., Hom, R., C. and Finberg, R., W. (1989) Human α T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. *Nature*. 340: 309-312.
- Harel-Bellan A. Joscowicz M. Fradelizi D. & Eisen H. (1983) Modification of T cell proliferation and IL-2 production in mice infected with T. cruzi. *Proc. Nat. Acad. Sci.*(wash). 80: 3466.
- Hedstrom, R., Culpepper, J., Harrison, A., Agabian, N. and Newport, C. (1987) A major immunogen in Schistosoma mansoni infections is homologous to the heat shock protein HSP70. *J. Exp. Med.* 165: 1430-1435.
- Hohare, C., A., (1964) Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision and Systematics. *J. Protozool.* 11: 200-207.
- Holers V., M., Cole J., L., Lublin D., M., Seya T., Atkinson J., M., (1985) Human C3b- and C4b- regulatory proteins: A new multigene family. *Immunol Today* 6: 188

- Holoshitz, J., Koning, F., Coligan, J., E., DeBruyn, J. and Strober, S. (1989) Isolation CD4- CD8- mycobacteria reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature*. 339: 226-229.
- Hontebeyrie-Joskowicz, M., Saïd, 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. *Europ. J. Immunol.* 17: 1027-1033.
- Howrd J.G. (1986) Immunological regulation and control of experimental leishmaniasis. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 28: 79-116.
- Hunt, C. and Morimoto, R, I. (1985) Conserved features of eukariotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6455-6459.
- Hyunt, T. V., Young, R. A., Davis, R. W. Constructing and sceening cDNA libraries in gt10 and λ gt11. In: D.M.Glover ed. DNA cloning techniques: a practical approach. Oxford: IRL Press, 1985: 45-79.
- Ibañez, C.,F., Affranchino, J.,L., Macina, R.,A., Reyes, M.,B., Leguizamon, S., Camargo, M.,E., Aslund, L.; Pettersson, U., and Frasch, A.,C.,C., (1988). Multiple Trypanosoma cruzi antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30:27-34.
- Jindal S. Dudani A.K. Singh B. Harley C.B. and Gupta R.S. (1989) Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to bacterial and plant chaperonins and to 65KD mycobacterial antigen. *Mol. Cell Biol.* 9: 2279-2283.
- Joiner K.A., Brown E.,J., Frank M.,M., (1984) The role of complement in infectious diseases. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 461-500
- Joiner,K.,A., (1986) Evassion of alternative complement pathway by T. cruzi results from inefficient binding of factor B. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*.83: 6593-6597.
- Katzenelenbogen, I., et Levy I., (1968) Prevention of leishmaniasis in a kibbutz by inoculation. *Harefuah* 75: 177-179.
- Kaufmann, H., E. (1990) Heat shock proteins and the immune response. *Immunol. Today.* 11: 129-136.
- Kemp, D. J. Coppel, R.,L., and Anders, R. (1987) Repetitive proteins and genes of malaria. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 181-208.
- Kerner, N., Liégeard, P., Levin, M. and Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1991) Trypanosoma cruzi: Antibodies to a Map-Like protein in Chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton. *Exp. Parasitol.* 73: 451-459.

Khoury, E.,L., Ritacco, V., Cossio, P.,M., Laguens, R.,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.

Kierszenbaum F. Cuna, G.,R., Beltz, L. and Sztejn M.B. (1990) Trypanosoma cruzi reduces the number of high-affinity IL-2 receptors on activated Human lymphocytes by suppressing the expression of the p55 and p70 receptor components. *Parasitology Today* 6: 261-264.

Kink, J. A., Chang, K. P. (1988). N-glycosylation as a biochemical basis for virulence in Leishmania mexicana amazonensis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27: 181-90.

Kink, J. A., Chang, K.,P. (1987). Biological and biochemical characterization of tunicamycinresistant Leishmania mexicana: Mechanism of drug resistance and virulence. *Infect. Immun.* 55 : 1692-1700.

Kipnis T.L.,Tambourgi, D., Sucupira, M., and Dias da Silva W., (1986) Effect of T. cruzi membrane components the formation of the classical pathway C3 convertase. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 19: 271-278)

Kipnis, T., Krettli, A., and Da Silva, D., (1985) Transformation of trypomastigote forms of T. cruzi into activators of alternative complement pathway by immune IgG fragments. *Scand. J. Immunol.* 22: 217.

Kirchof, L., V., Kim, K., S., Engman, D., M. and Donelson, J., E. (1988) Ubiquitin genes in trypanomastidae. *J. Biol. Chem.* 263: 12698.

Koberle, F., (1968) Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* 6: 63-116.

Kotwald, G., and Moss, B. (1988). Vaccinia virus encodes a secretory polypeptide structurally related to complement control proteins. *Nature.* 355: 176.

Kress, Tanowitz, H., Bloom, B., and Wittner, M. (1975) T. cruzi infection of normal and activated macrophages. *Nature* 257: 394.

Krettli A. Cancado J. and Brener Z. (1984) Criterion of cure of Human Chagas disease after specific chemotherapy: recent advances. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz.* 79: 157.

Krettli A. and Brener Z. (1976) Protective effects of specific antibodies in T. cruzi infections. *J. Immunol.* 116: 755.

Krettli, A. and Brener, Z. (1982). Resistance against T. cruzi associated to antiliving trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* 128: 2009.

- Krettli, A. Cancado, J. and Brener, Z. (1982) Effect for specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas Disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76: 334.
- Kweider, M., Lemesre, J. P., Darcy, F., Kusnierz, J. P., Capron, A., Santoro, F. (1987). Infectivity of *Leishmania brasiliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000-dalton surface antigen. *J. Immunol.* 138: 299-305.
- Lainson, R., and J. J. Shaw. (1978). Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. *Nature*(London) 273:595-600.
- Laranja, F., S., Dias, F., Nobreg, G. and Miranda, A., (1956) Chagas' disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation.* 14: 1035-1060.
- Lee, M., Atkinson, G., Gianinni, S. and van der Ploeg, L., H. (1988) Structure and expression of the hsp70 gene family of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res.* 16: 9567-9585.
- Levin, M. J., E. A. Mesri, R. Benarous, G. Levitus, A. Schijman, P. Levy-Yeyati, P. Chiale, A. Ruiz, A. Kahn, M. B. Rosebaum, H. N. Torres, and E. L. Segura. (1989). Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41:530-539.
- Levin, M., J., Levitus, G., Kerner, N., Lafon, S., Schijman, A., Levy Yeyati, P., Finkielsten, C., Chiale, P., Schejtman, D. and Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1990) Autoantibodies in Chagas' Heart disease: Possible Markers of severe Chagas' Heart Complaint. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 85: 539-543.
- Levitus, G., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Van Regenmortel, M., H., Levin, M., J. (1991) Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas' heart disease. *Clin. Exp. Immunol.* 85: 413-417.
- Ley, V., Robbins, E. S., Nussenzweig, V., and Andrews, N. W. (1990). The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J. Exp. Med.* 171: 401-413.
- Lichtenheld, M., G., Olsen, K., J., Lu, P., Lowrey, D., M., Hameed, A., Hengartner, H., and Podack, E., R., (1988). Structure and function of human perforin. *Nature* 335: 448-451.
- Lindquist, D. (1986) The heat shock response. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 1551-1591.
- Maniatis, T., y col. Molecular cloning. A laboratory manual (ed. 1989). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Manson-Bahr, P.E.C. and Bell D.R. (1987) *Manson's tropical disease* Balliere Tindall. (Eds.)

- Mc Farlane, J., et al. (1990) *Eur. J. Biochem.* 190: 377-384.
- Marston, F. (1987) The purification of eukariotic polipeptides expressed in *E. coli*. En: DNA cloning: a practical approach. Vol. III, cap.4. Glover, D.M. (Ed.). IRL Press, Oxford.
- Martins S.M. Hudson L. A. Krettli Cancados J.R. Brener Z. (1985) Human and mouse serum recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *T. cruzi* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 61; 343-350.
- Mattei D. Scherf A. Bensaude O. and Pereira da Silva (1989) *Eur. J. Immunol.* 19: 1823)
- Mayrnick, W., Williams, P., Costa C., A., et col. (1985) An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*
- Mazza, S. (1943) Comprobaciones de *Triatoma platensis*, *Eutriatoma oswaldoi*, *Psatrongylus 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.
- Mazza, S., (1934) Casos agudos benignos de enfermedad de Chagas comprobados en la provincia de Jujuy. *MEPRA* 28: 41-46.
- Melby P.C. Sacks D.L. (1989) Identification of antigens recognized by T cells in human leishmaniasis: Analysis of T-cell clones by immunoblotting. *Infect. Immun.* 57: 2971-2976.
- Mesri, E. (1990) Clonado y caracterización genética de antígenos de *T. 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.
- Mifess M.A., R. Lainson, J.J., Shaw, M. Povoá, and A.A. de Souza. (1981) Leishmaniasis in Brazil. XV. Biochemical distinction of *Leishmania mexicana amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis* and *L. braziliensis guyanensis*-aetiological agents of cutaneous leishmaniasis in the Amazon basin of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75: 524-529.
- Minoprio P. Eisen H. Joscowicz M. Pereira P. & Coutinho A. (1987) Suppression of polyclonal antibody production in *T. cruzi* infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *J. Immunol.* 139: 545-550.
- Minoprio P. Itohara S. Heusser C. Tonegawa S. & Coutinho A. (1989) Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific response and the activation of TcRI T cells. *Immunol. Rev.* 112-183.

- Minoprio, P. (1991). Chagas' Disease: CD5 B-Cell-dependent Th2 pathology?. *Res. Immunol.* 142: 137-140.
- Minoprio, P., Andrade, L., Lembezat, M., P., Ozaki, L., S. and Coutinho, A. (1989a). Indiscriminate representation of VH-genes families in the murine B lymphocyte responses to Trypanosoma cruzi. *J. Immunol.* 142: 4017-4020.
- Minoprio, P., Bandeira, A., Pereira, P., Santos, M., T., and Coutinho, A. (1989b). Preferential expansion of Ly-1-B and CD4-CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. *Intern. Immunol.* 1: 176.
- Minoprio, P., Burlen, O. Pereira, P., Guilbert, B., Hontebeyrie Joskowicz, M. and Coutinho, A. (1988) Most B cells in acute Trypanosoma cruzi infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* 28: 513.
- Minoprio, P., Eisen, H., Forni, L., D'Imperio Lima, M. R., Joskowicz, M. & Coutinho, A. (1986). Polyclonal lymphocyte responses to murine T. cruzi infection. Quantitation of both T and B responses. *Scand. J. Immunol.* 24:661-668.
- Minoprio, P., Eisen, H., Joskowicz, M., Pereira, P. & Coutinho, A. (1987). Suppression of polyclonal antibody production in Trypanosoma cruzi-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *J. Immunol.* 139: 545-550.
- Minota, S., Cameron, B., Welch, J. and Winfield, J., B. (1988) Autoantibodies to the constitutive 73Kda member of the hsp70 family of heat-shock proteins in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 168: 1475-1480.
- Mitchel, G., F., (1991) Co-evolution of parasites and adaptative immune responses. *Immunoparasitology Today.* 12: A2-A5.
- Moncayo, A. and Luqueti 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. and Bilezikian, J., P. (1990) Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation.* 82: 1909-1990.
- Mosman, T., and Coffman, R., (1989). Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 112: 183-187.
- Mosser, D. M., Edelson, P. J. (1984). Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: Parasite lysis and attachment to macrophages. *J. Immunol.* 132: 1501-5.

- Mosser, D. M., Edelson, P. J. (1985). The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania promastigotes*. *J. Immunol.* 135: 2785-89.
- Mosser, D. M., Edelson, P. J. (1987). The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*. 327: 329-31.
- Mosser, D. M., Wedgwood, J. F., Edelson, P. J. (1985). *Leishmania amastigotes*: Resistance to complement mediated lysis is not due to a failure to fix C3. *J. Immunol.* 134: 4128-31.
- Murray, H., B. Rubin, S. Carreiro, and A. Acosta. (1984). Reversible defect in antigen-induced lymphokine and interferon generation in cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* 133: 2250-2254.
- Nacy C.A. Meltzer M.S. Leonard E.J. and Wyler D.J. (1981) Intracellular replication and lymphokine-induced destruction of *L. tropica* in C3H/HeN mouse macrophages. *J. Immunol.* 127: 2381-2386.
- Naggan L. Gunders A., E. and Michaelis D. (1972) Follow up study of a vaccination programme against cutaneous leishmaniasis. II. Vaccination with a recently isolated strain of *L. tropica* from Jericho. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66: 239-243.
- Nogueira N. Bianco C. and Cohn Z. (1975) Studies on selective lysis and purification of *T. cruzi*. *J. Exp. Med.* 142: 224-232.
- Norris, K.A., Bradt, B., Cooper, N.R. and So, M. (1991) Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J. Immunol.* 147: 2240-2247.
- Norris K. et al (1989) *Compl. Inflamm.* 6: 378.
- O'Brien, R., L., Culpepper, J. and Agabian, N. (1989) Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor α by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell.* 57: 667-674.
- Oppenheim, J., J., and S.S. Cohen. (1983). Interleukins, lymphokines, and cytokines. *Academic Press, Inc., New York*.
- Ortega-Barria E. and M.E.A. Pereyra (1991) A novel *T. cruzi* Heparin-binding protein Promotes Fibroblast Adhesion and Penetration of Engineered Bacteria and Trypanosomes into Mammalian Cells. *Cell.* 67: 411-421)
- Ouaisi, M., A., Cornette, J., Afchain, D., Capron, A., Gras-Masse, H., and Tartar, A. (1986). *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science* 234: 603-607.

Pangburn, M.,K., Muller-Eberhard, H.,J. (1984) The alternative complement pathway. *Springer. Semin. Immunol.* 7: 164.

Passwell J.H. Shor R. Trau H. Shohan J. and Jaffe L.(1987) Antigen-stimulated lymphokines from patients with cutaneous leishmaniasis induce monocyte killing of L. major intracellular amastigotes. *J. Immunol.* 139: 4208-4212.

Pelham, R., B. (1986) Speculations on the functions of the major heat shock an glucose-regulated proteins. *Cell* 49: 959-961.

Pessoa, S., B., et Pestana B., R., (1940) Ensalo sobre vaccinacao preventiva na leishmaniose tegumente americana, com germens mortos. *Rev. Biol. Hig.* 10:112-118.

Petry, K., and Eisen, H., (1989). Chagas' disease: A model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol. Today.* 5: 111 -116.

Petry, K., Voison, P., Baltz, T., and Labouesse, (1987) Epitopes common to trypanosomes (T. cruzi, T. dionisii, and T. vespertilionis [Schizotrypanum]): astrocytes and neurons. *J. neuroimmunol.*16:237.

Plata, F., Garcia-Pons, F. & Wietzerbin, J. (1987). Immune resistance to Trypanosoma cruzi: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. *Ann. Inst. Pasteur/ Immunol.* 138:397-415.

Polla, S., B. (1991) Heat shock proteins in host-parasite interactions. *Immunoparasitology Today* A38-A41.

Puentes, S.,M., Dwyer, D.,M., Bates, P.,A. and Joiner,K.,A. (1990) Binding and release of C3 from L. donovani promastigotes during incubation in normal serum. *J. Immunol.* 143:3743-3749.

Puentes,S.,M.,Sacks,D.,L.,DaSilva,R.,P.,and Joiner,K.,A.(1988) Complement binding by two developmental stages of L. major promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J. of Exp. Med.*167:887-902.

Ranque, s., Quilici, m., Dunan S., et Ranque, P., (1975) Diagnostic Immunologique de la leishmaniose viscérale. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*55: 579-584

Reid K.,B.,, PorterR.,R.,(1981) The proteolytic activation systems of complement. *Ann. Rev. Biochem.* 50:433.

Reid, K.,B.,M. (1986) Activation and control of the complement sistem. *Essays. Biochem* 2:69-75.

Reiner,N.,E., Winnie,NG.,Tosca,M.,A., and MasterMc. R.,W., (1988) Kinetics of τ interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in Leishmania-infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*85: 4330-4334.

- Requena, J.M., López, M.C., Jimenez-Ruiz, A., Morales, G., Alonso, C., (1988) A head to-tail tandem organization of hsp70 genes in *T. cruzi*. *Nucl. Acid Res.* 16: 1393-1406.
- Requena, J.M., López, M.C., Jimenez-Ruiz, A., Morales, G., Alonso, C., (1989) Complete nucleotide sequence of the HSP70 gene of *T. cruzi*. *Nucleic. Acid. Res.* 17: 797.)
- Res, P., C., Schaar, C., G., van Eden, W., van Embden, J., D., Cohen, I., R., and de Vries, R., R. (1988) Synobial fluid T cell reactivity against the 65KD heat-shock protein of mycobacteria in early onset of chronic arthritis. *Lancet* ii: 478-480.
- Ribeiro, J. M.C., Vachereau, A., Modi, G. B., Tesh, R. B. (1989). A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Science.* 243: 212-14.
- Richard G. Sherry B. Cerami A. (1991) The involvement of TNF,IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. *Immunoparasitology Tod.* 12: A13-A17).
- Rizvi, F. S., Ouaiissi, M. A., Marty, B., Santoro, F., Capron, A. (1988). The major surface protein of Leishmania promastigotes is a fibronectin-like molecule. *Eur. J. Immunol.* 18: 473-76.
- Romaña, C., (1963) Enfermedad de Chagas. López Libreros Ed., Buenos Aires.
- Roseman, S. (1970). The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in intercellular adhesion. *Chem. Phys. Lipids* 5: 270-297.
- Rosenbaum, M., B., (1964). Chagasic myocardopathy. *Progr. Cardiovasc. Dis.* 1:199-225.
- Ross G., D., Medof M., (1985) Membrane complement receptors for bound fragments of C3. *Adv. Immunol.* 37: 217-220.
- Rothman, J., E. and Kornberg, R., D. (1986) An unfolding story of protein translocation. *Nature.* 322: 209-210.
- Rucha, R., Sampaio, R., Guerra, M., Magalhaes, I., Cuba, A., Barreto, C. and Marsden, P. (1983). Apparent glucantime failure in five patients with muco-cutaneous leishmaniasis. *J. Trop. Med. Hyg.* 83:131-134.
- Russel D.G. and Chang K.P. (1986) The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J. Immunol.* 138:1596
- Russell, D. G., Talamas-Rohana, P. (1989). Leishmania and the macrophage: A marriage of inconvenience. *Immunol. Today.* 10: 328-33.

- Russo M. Starobinas N. Minoprio P. Couthinio A. & Hontebeyrie-Joskowicz M. (1988) Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in T. cruzi infected mice after the inactivation of helper cells. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* 139:225-234.
- Sacks D, L. and Perkins, P.V. (1984) Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes. *Science* 223: 1417-1419)
- Sacks, D., Da Silva, R., (1987) The generation of infective stage Leishmania major promastigotes is associated with cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. *J. Immunol.* 139: 3099-3106.
- Sacks, D., L. (1989) Metacyclogenesis in Leishmania promastigotes. *Exp. Parasitol.* 69:100-103.
- Sadigursky, M., Acosta, A., M., and 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), Neuropathy associated with experimental Chagas' disease. *Ann. Neurol.* 18: 676-683.
- Sanger, F., Nickelen, S. and Coulson, A., R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Santos busch 1985 Acosta, A.M. & Santos Busch, C.A. (1985), Auto-immune myocarditis induced by Trypanosoma cruzi. *Circulation*, 71: 1255- 1261.
- Saraiva, E. M. B., Vannier-Santos, M. A., Silva-Filho, C., De Souza, W. (1989). Anionic site behavior in Leishmania and its role in the parasite macrophage interaction. *J. Cell. Sci.* 93: 481-89.
- Schenkman ,S., Diaz,C., and Nussenzweig,V. (1991). Attachment of Trypanosoma cruzi trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. *Exp. Parasitol.* 72:76-86)
- Schenkman,S., Jiang, M-S., Hart,G.,W., and Nussenzweig,V. (1991). A novel Cell surface Trans-sialidase of T. cruzi generates a stages-specific Epitope required for invasion of Mammalian Cells. *Cell.* 65:1117-1125.
- Schreiber R.,D., (1984) Complement receptors. *Springer Semin. Immunopathol.* 7: 221.
- Schmuñis, G., (1987). Autoimmunity in Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82: 287-310.

- Segura, E.,L., Vasquez, C., Bronsina, A., Campos, J.,M., Cerisola, J.,E., and Gonzales-Cappa (1977) Antigens of the sub-cellular fractions of T. cruzi II. Flagelar and membrane fraction. *J. Protozool.* 24: 540.
- Shapira, M., McEwen, J., G. and Jaffe, C. (1988) Temperature effects on molecular processes wich lead to stage differentiation in Leishmania. *EMBO J.* 7: 2895-2901.
- Shneider W. C. (1957) Methods in Enzimology 3, pg 680.
- Smejkal, R., Wolff, R., Olenick, J., G. (1988) Leishmania braziliensis panamensis: Increased infectivity resukting from heat shock *Exp. Parasitol.* 65: 1-9.
- Spector, N., L., Freedman, A., S., Segil, J., Whiteman, J., F., Welch, J., W. and Nadler, L., M. (1989) Activation primes human B limphocytes to respond to heat shock. *J. Exp. Med.* 170: 1763-1768.
- Spinella, S., Milon, G. & Hontebeyrie Joskowicz, M. (1990). A CD4+ TH2 cell line isolated from mice chronically infected with Trypanosoma cruzi induces IgG2 polyclonal response in vivo. *Europ. J. Immunol.* 20:1045-1051.
- Sprent, J.F.A. (1962) The evolution of living organisms. pág: 149-165. *Melbourne University Press.*
- Stanley, K., K., and Herz, J. (1987). Topological mapping of complement component C9 by recombinant DNA techniques suggests a novel mechanism for its insertion into target membranes. *EMBO J.* 6:1951-1957.
- Strobel, M., Marchand, J., P., et Dedet, J., p., (1979) Le traitement des leishmanioses cutanées de l'Ancien Monde. *Revue critique. Med. Mal. Infect.* 9: 360-368
- Szarfman, A., Terranova, V., P., Renard, S., L., Foidart J., M., Lima, F., M., Scheinman, J., I. and Martin, G., R., (1982) Antibodies to laminin in Chagas' disease. *J. Exp. Med.* 155:1161-1171.
- Tarleton, R., L. (1990). Depletion of CD8+ T cells increase susceptibility and reverses vaccine induced immunity in mice infected with Trypanosoma cruzi. *J. Immunol.* 144: 717-724.
- Tarleton, R., L. (1991) The role of T-cell subpopulations in experimental Chagas' disease. *Res. Immunol.* 142: 130-134.
- Titus, R. G., Ribeiro, J. M. E. (1988). Salivary gland lysates from the sandfly Lutzomyia longipulpis enhance Leishmania infectivity. *Science* 239: 1306-8.

Titus, R., G., Sherry, B., and Cerami, A., (1991) The involvement of TNF, IL-1, and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. *Immunoparasitology Today*. A13-A15.

Towbin H, Rosenfelder G, Wieslander J, Avila JL, Rojas M, Szarfman A, Esser K, Nowack H, Timpl R. (1987) Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl(α 1-3)-galactose epitopes. *J. Exp. Med.* 166:419-432.

Trischmann, T.,M. (1983). Non-antibody mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas disease. *J. Immunol.* 130: 1953-1957.

Ulisses de Carvalho, T. M., and de Souza, W. (1989). Early events related with the behavior of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct. Funct.* 14:383-392.

Van der Ploeg, L., H., Giannini, H., T. and Cantor, C., R. (1985) Heat shock genes: Regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science*. 228: 1443-1446.

Van Eden, W., Thole, J., E., van der Zee, R., Noordzij, A., van Embden J., Hensen, E., J. and Cohen, I., R. (1988) Cloning of the *Mycobacterial* epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331: 171-173.

Van Vooris, W.C., and H. Eisen. (1989) A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. Exp. Med.* 169:641-652.

Von Boehmer H. (1990) *Annu. Rev. Immunol.* 8: 531-556. (citado en Cohen y col 1991).

Walsh, J.,A. (1988) Establishing health priorities in the developin World. United Nations, Development Programe, New York.

Wilson M.e. Hardin K.K. and Donelson J.E. 1988. The major concavalin A-binding surface glycoprotein of *L. d. chagasi* promastigotes is involved in attachment to human macrophages. *J. Immunol.* 141: 265)

Wyler, D. J., Sypek, J. P., McDonald, J. A. (1985). In vitro parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: Possible role of fibronectin in parasite attachment. *Infect. Immun.* 49: 305-11.

Young, R. A. and Elliott, T. J. (1983) Efficient isolation of genes by using antibodies probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 1194-1198.

Young, R., A., and Elliott, T. (1989) Stress proteins and immune surveillance. *Cell* 59: 5-8.

Bibliografía

Zeldón, R., & Rabinovich, J., E., (1981) Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Ann. Rev. Entomol.* 26: 102-111.

Zingales, B., and Colli, W. (1985). *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 117:129-152.

TABLAS

TABLA 6:

Reactividad de sueros de pacientes chagásicos con las proteínas de fusión producidas por los fagos recombinantes y con proteínas totales *T. cruzi*.

a) Antígenos reconocidos por sueros de pacientes agudos.

	JL5	JL7	JL8	JL9	RA1	Tc
1	-	-	-	-	-	+
2	-	+	-	-	-	+
3	-	-	-	-	-	+
4	-	-	-	+	-	+
5	-	-	-	-	+	+
6	-	+	-	-	-	+
7	-	+	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-	+
9	-	+	-	-	-	+

b) Antígenos reconocidos por sueros de pacientes con chagas congénito.

	JL5	JL7	JL8	JL9	RA1	Tc
1	+	+	-	-	-	+
2	+	+	-	-	-	+
3	-	+	+	-	-	+
4	+	+	+	+	+	+
5	-	+	+	-	-	+
6	-	+	+	-	-	+
7	+	+	-	-	-	+
8	+	+	+	+	+	+
9	-	+	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-	+
11	-	+	-	-	-	+
12	-	+	-	-	-	+

c) Antígenos reconocidos por sueros de pacientes con chagas crónico.

	JL5	JL7	JL8	JL9	RA1	Tc
Tot. Pos.(C)	114	142	125	123	87	156
Tot. Neg.(D)	101	73	90	92	128	59

Leyenda: Los recombinantes usados en el ensayo son: JL5; JL7; JL9 (JL52); RA1 y Tc: extracto total de *T. cruzi*.

TABLA 7:

Fagos recombinantes purificados en los rastreos realizados durante el presente trabajo.

a) Fagos recombinantes purificados a partir de rastreos inmunológicos de la biblioteca de tripomastigotes sanguíneos de la cepa RA 1 *T. cruzi*.

fago	suero utilizado	tamaño del ADNc(pb)	codifica para
M9.1	MQ	300	ND
M9.2	MQ	400	ND
M9.3	MQ	600	ND
M9.5	MQ	100	ND
M9.6	MQ	300	ND
M9.7	MQ	350	ND
M9.9	MQ	300	ND
M9.10	MQ	1000	ND
M9.21	MQ	650	HSP 70
M9.31	MQ	700	HSP 70
G11	PM-/MQ+	ND	ND
G12	PM-/MQ+	ND	ND
G13	PM-/MQ+	200	p. ribos.P*
G14	PM-/MQ+	250	ND
S16	PM-/MQ+	200	p.ribos.P*
S18	PM-/MQ+	200	p.ribos.P
S23	PM-/MQ+	250	p.ribos.P
LYT6	(a)	350	p.ribos.p
CH6	TM	200	ND

ND: no se continuó su estudio genético. (*): codifica para una proteína ribosomal P. (a): fago purificado por rastreo inmunológico diferencial ver Fig. 5. PM-/MQ+: rastreo diferencial, luego de transferidas las proteínas de fusión a los filtros de nitocelulosa, estos se incubaron y revelaro pimero con el suero PM, Calcando sobre un acetato los fagos reactivos con ese suero; luego, el mismo filtro se reveló con el suero MQ, finalmente se tomaron los recombinantes negativos para PM y positivos para MQ.

b) Fagos recombinantes purificados de la biblioteca de epimastigotes de la cepa Tul 2 de *T. cruzi*, por rastreos radioactivos con la sonda Lyt8.


Fago	tamaño del ADNc (pb)
HSL5	350
HSL6	800
HSL8	200
HSL14	400
HSL16	300

c) Fagos recombinantes purificados por rastreos inmunológicos de la biblioteca de *L. b. brasiliensi* cepa boitrón.

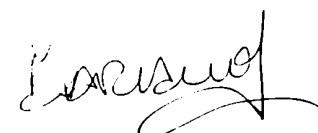
Fago	suero	tamaño del ADNc (pb)
Lbb2	Ac-RA1	350
Lbb3	Ac-RA1	750
Lbb8	Ac-RA1	ND
Lbb10	Ac-RA1	800
Lbb11	Ac-RA1	700

Ac-RA1: anticuerpos anti RA1 inmunopurificados del suero FR.

AUTOR


Patricia Lewy yeyahi.

DIRECTOR


Mariano J. Levin