

## Tesis de Posgrado

# Evaluación biológica de antígenos definidos de *Trypanosoma Cruzi*

Leguizamón, María Susana

1995

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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

**Cita tipo APA:**

Leguizamón, María Susana. (1995). Evaluación biológica de antígenos definidos de *Trypanosoma Cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2765\\_Leguizamon.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2765_Leguizamon.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Leguizamón, María Susana. "Evaluación biológica de antígenos definidos de *Trypanosoma Cruzi*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2765\\_Leguizamon.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2765_Leguizamon.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**"EVALUACION BIOLOGICA DE ANTIGENOS DEFINIDOS DE  
*TRYPANOSOMA CRUZI*"**

MARIA SUSANA LEGUIZAMON

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTORES: DR. ALBERTO CARLOS C. FRASCH  
DRA. STELLA M. GONZALEZ CAPPA

1995

A mis padres,  
Amelia y Sebastián.

A Carlita y Oscar

## AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Stella González Cappa y Carlos Frasch por haberme permitido la realización en conjunto de este trabajo de Tesis, integrando aspectos biológicos y moleculares, por sus enseñanzas y por la confianza depositada en mí.

A mis compañeros de la Facultad María Elisa Solana, Ana Celentano, Gerardo Mirkin, Valeria Tekiel, Mónica Perri, Silvina Wilkovsky, Lien Kuo, Stella Lammel, Oscar Moreno Mariana Cerioto y Omar Marin, con quienes compartí muchas horas de laboratorio y también extensas horas de docencia.

A mis compañeros del laboratorio 112, Guido Pollevick, Laura Cremona, Alejandro Buschiazzo, Daniel Sánchez, Javier Di Noia, Marcelo Guerin, Liliana Sferco y Carlos Buscaglia quienes siempre supieron brindar su colaboración.

A los doctores Berta y Juan José Cazzulo por el suministro de epimastigotes de *T.cruzi*.

A todo el personal de apoyo del Departamento de Microbiología y del Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

A los Dres. S Feldestein y M Parronchi por la desinteresada colaboración brindada.

A los Dres. Anders Örn y Lena Sporrang del laboratorio de Inmunología del Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia, por el suministro de los anticuerpos monoclonales anti-SAPA.

A mis padres por el constante apoyo y cariño que siempre me han brindado.

A mi hermana por su afectuoso apoyo, especialmente durante estos últimos tres años.

A "Oski" y Carlita quienes han debido soportar mis ausencias y cansancio.

El Trabajo de Tesis se realizó en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires y en el Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis se encuentran incluidos en los siguientes trabajos publicados.

- Bloodstream *Trypanosoma cruzi* parasites from mice simultaneously express antigens that are markers of acute and chronic human Chagas' disease.  
Leguizamón M.S., Campetella O.E., Reyes M.B., Ibáñez C.F. Basombrío M.A., Rincón J., Orn A. y Frasch A.C.C.  
*Parasitology* 102:379-385, 1991.
- Reversion of cultured-induced virulence-attenuation in *Trypanosoma cruzi*.  
Leguizamón M.S., Campetella O., Orn A y gonzalez Cappa S.M.  
*Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 88: 161-162, 1993.
- Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity.  
Leguizamón M.S., Campetella O., Gonzalez Cappa S.M y Frasch A.C.C.  
*Infection and Immunity* 62:3441-3446, 1994
- Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity in sera from human infections.  
Leguizamón M.S., Campetella O.E., Russomando G., Almiron M., Guillen I., González Cappa S.M. y Frasch A.C.C.  
*The Journal of Infectious Diseases*.170: 1570-1574, 1994.

## ABREVIATURAS

AD	Aglutinación directa.
BSA	Seroalbúmina bovina.
CMP	Citidinmonofosfato
ELISA	"Enzyme linked-immunosorbent assay
GDh	Glutamato deshidrogenasa.
IHA	"Indirect Hemoagglutination Assay"
IFA	"Indirect Immunofluorescence Assay"
i.p.	Intraperitoneal.
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
kDa	kiloDaltons
NA	Neuraminidasa
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida.
pi	Post-infección
PIPES	Piperazina-N-N'-bis(2-etansulfónico)
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
SAPA	"Shed Acute Phase Antigen"
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TBS	Buffer tris salino
TLCK	N-p-tosil-L-lisil cloro-metilcetona
Tris	Tris-(hidroximetil) aminometano.
TS	Trans-sialidasa
ufp	Unidades formadoras de placas de lisis.

## INTRODUCCION

1.- EPIDEMIOLOGIA.....	1
2.- FORMAS CLINICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. ....	2
2.1 FASE AGUDA.....	2
2.2 FASE INDETERMINADA.....	3
2.3 FASE CRONICA.....	3
2.4.- FASE AGUDA CONGENITA.....	4
3.- BIOLOGIA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
3.1.- UBICACION SISTEMATICA.....	5
3.2.- CICLO DE VIDA Y ESTADIOS PARASITARIOS.....	6
3.3.-ESTRUCTURA DEL PARASITO.....	7
4.- DIAGNOSTICO.....	8
5.- TRATAMIENTO.....	10
6.- INFECCION EXPERIMENTAL POR <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	10
7.- INFECCION HUMANA POR <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	13
8.- COMPOSICION ANTIGENICA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	15
8.1.- ANTIGENOS DE SUPERFICIE.....	15
8.2.-ANTIGENOS RELACIONADOS CON INVASION CELULAR.....	18
8.3.-ANTIGENOS RELACIONADOS CON PROTECCION.....	19
8.4.-ANTIGENOS RELACIONADOS CON DIAGNOSTICO.....	20
8.5.- ANTIGENOS CIRCULANTES.....	22
8.6.- ANTIGENOS RELACIONADOS CON PATOLOGIA.....	23
8.7.- CLONADO DE GENES QUE CODIFICAN ANTIGENOS DE <i>T. cruzi</i> .....	24
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>30</b>
9.- OBTENCION DE DIFERENTES ESTADIOS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	30
9.1- ESTADIO EPIMASTIGOTE.....	30
9.2- ESTADIO TRIPOMASTIGOTE.....	30
9.2.1.- Tripomastigotes sanguíneos.....	30
9.2.2 - Tripomastigotes de cultivos celulares.....	31

<b>10.- CEPAS Y CLONES DE <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	3 1
<b>11.- CEPAS DE RATONES</b> .....	3 2
<b>12.- PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS</b> .....	3 3
12.1.- ORIGEN DE LOS SUEROS HUMANOS.....	3 3
12.2.- DIAGNOSTICO PARASITOLOGICO.....	3 3
12.3.- TRATAMIENTO PARASITARIO.....	3 4
<b>13.- OBTENCION DE ANTIGENOS RECOMBINANTES</b> .....	3 4
<b>14.- INDUCCION Y PURIFICACION DE PROTEINAS DE FUSION</b> .....	3 5
<b>15.- OBTENCION DE ANTICUERPOS EN CONEJO</b> .....	3 6
<b>16.- SELECCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-SAPA</b> .....	3 6
<b>17.- DETECCION DE ANTIGENOS EN TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS</b> .....	3 7
<b>18.- DETECCION DE ANTIGENOS EN EPIMASTIGOTES</b> .....	3 8
<b>19.- DETECCION DE ANTICUERPOS EN SUEROS DE ANIMALES INFECTADOS O INMUNIZADOS</b> .....	3 8
19.1.- MARCACION DE PROTEINA A CON <sup>125</sup> I.....	3 8
19.2.- OBTENCION DE ANTIGENOS RECOMBINANTES SOBRE FILTROS DE NITROCELULOSA.....	3 8
19.3.- ADSORCION DE LOS SUEROS CON LISADO DE BACTERIAS.....	3 9
19.4 - ANALISIS DE SUEROS DE ANIMALES INFECTADOS O INMUNIZADOS.....	3 9
<b>20.- ENSAYOS DE BLOQUEO DE LA INVASION CELULAR</b> .....	3 9
<b>21.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE TRANS-SIALIDASA</b> .....	4 0
<b>22.-TRATAMIENTO CON NEURAMINIDASA (NA) DE <i>Clostridium perfringens</i></b> .....	4 0
<b>23.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE TRANS-SIALIDASA EN TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS</b> .....	4 0
<b>24.- ELECTROFORESIS EN PAPEL</b> .....	4 1
<b>25.- PURIFICACION DE ANTICUERPOS UTILIZANDO PROTEINA A</b> .....	4 1
<b>26.- ENSAYOS DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE TRANS-SIALIDASA</b> .....	4 2

27.- ENSAYOS DE "DOT SPOT" PARA EL ANALISIS DE SUEROS DE RATONES INFECTADOS.....	4 2
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>4 4</b>
<b>I. ANALISIS DE LA EXPRESION DE ANTIGENOS EN <i>Trypanosoma cruzi</i>.....</b>	<b>4 4</b>
<b>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS .....</b>	<b>4 4</b>
<b>I. 1.- PERMEABILIZACION DE LOS PARASITOS Y     REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS POLICLONALES Y     MONOCLONALES.....</b>	<b>4 5</b>
<b>I. 2.- EXPRESION DE ANTIGENOS EN     TRIPOMASTIGOTES SOMETIDOS A DIFERENTE     PRESION INMUNE.....</b>	<b>4 7</b>
<b>I. 2.1 Antígenos expresados por         tripomastigotes obtenidos de ratones         atómicos.....</b>	<b>4 7</b>
<b>I. 2.2 Antígenos expresados por         tripomastigotes provenientes de ratones         eutímicos.....</b>	<b>4 8</b>
<b>I. 3.- ANALISIS DE LA EXPRESION DE ANTIGENOS     EN PARASITOS CON DIFERENTE CAPACIDAD     INFECTIVA.....</b>	<b>4 9</b>
<b>I. 3.1 Expresión antigénica en         tripomastigotes de infectividad atenuada.....</b>	<b>4 9</b>
<b>I. 3.2- Expresión de antígenos en el estadio         epimastigote.....</b>	<b>5 0</b>
<b>I. 3.3.- Ensayos de inmunobloqueo de la         entrada del parásito a la célula huésped.....</b>	<b>5 1</b>
<b>CONCLUSIONES:.....</b>	<b>5 2</b>
<b>II.- ANALISIS DE LA RESPUESTA HUMORAL DEL RATON HACIA LAS PROTEINAS RECOMBINANTES.....</b>	<b>5 3</b>
<b>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS .....</b>	<b>5 3</b>
<b>II. 1.- EVALUACION DE LA RESPUESTA HUMORAL     EN DISTINTAS CEPAS DE RATONES (SENSIBLES Y     RESISTENTES) INFECTADOS CON DIFERENTES CEPAS     DE <i>T. cruzi</i>.....</b>	<b>5 4</b>

<b>II. 2.- EVALUACION DE LA RESPUESTA HUMORAL EN LA ETAPA CRONICA DE LA INFECCION MURINA.</b> .....	5 4
<b>II. 3.- ANTIGENICIDAD DE LAS PROTEINAS RECOMBINANTES PARA EL HUESPED RATON.</b> .....	5 5
<b>CONCLUSIONES:</b> .....	5 6
<b>III. ESTUDIO LONGITUDINAL DE LA ACTIVIDAD DE TRANS-SIALIDASA Y DE LA CAPACIDAD DE NEUTRALIZACION DE LA ENZIMA EN SUEROS DE DISTINTAS ETAPAS DE LA INFECCION EXPERIMENTAL POR <i>Trypanosoma cruzi</i>.</b> .....	5 7
<b>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.</b> .....	5 7
<b>III. 1.- DETECCION DE TS EN SUERO DE RATONES ALTAMENTE INFECTADOS.</b> .....	5 8
<b>III. 2.- DETECCION DE LA ACTIVIDAD DE TS EN SUEROS PROVENIENTES DE LAS FASES AGUDA Y CRONICA DE LA INFECCION MURINA.</b> .....	5 8
<b>III. 3 - DETECCION DE ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DE TS EN SUEROS DE RATONES CRONICAMENTE INFECTADOS.</b> .....	5 9
<b>III. 4.- LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DE TS EN SUEROS PROVENIENTES DE RATONES INFECTADOS CON EL CLON K-98 SE DEBE A ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES.</b> .....	6 0
<b>III. 5.- LOS ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ESTAN DIRIGIDOS CONTRA EL DOMINIO ACTIVO DE LA ENZIMA.</b> .....	6 0
<b>III. 6.- CUANTIFICACION DE ACTIVIDAD DE TRANS-SIALIDASA EN TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS OBTENIDOS DE RATONES ATIMICOS.</b> .....	6 1
<b>CONCLUSIONES:</b> .....	6 1
<b>IV. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE TS Y DE LA CAPACIDAD DE NEUTRALIZACION DE TS EN SUEROS DE PACIENTES CHAGASICOS.</b> .....	6 2
<b>OBJETIVOS</b> .....	6 2

IV. 1.- ANALISIS DE SUEROS DE PACIENTES EN LA ETAPA CRONICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	6 2
IV. 2.- ANALISIS DE SUEROS DE PACIENTES EN LA ETAPA AGUDA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	6 3
IV. 3.- LOS ANTICUERPOS SON LOS RESPONSABLES DE LA NEUTRALIZACION DE LA ACTIVIDAD DE TS EN SUEROS HUMANOS INFECTADOS.....	6 4
IV. 4.- LOS ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DE LA ACTIVIDAD DE TS ESTAN DIRIGIDOS HACIA EL DOMINIO ACTIVO DE LA MOLECULA.....	6 4
IV. 5.- ANALISIS DE SUEROS DE RECIEN NACIDOS NORMALES Y CONGENITOS Y DE SUS MADRES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	6 4
CONCLUSIONES:.....	6 6
<b>DISCUSION</b> .....	6 7
V. ANALISIS DE LA EXPRESION DE ANTIGENOS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	6 7
VI. ANALISIS DE LA RESPUESTA HUMORAL MURINA HACIA EL PANEL DE ANTIGENOS RECOMBINANTES.....	7 0
VII. ANALISIS LONGITUDINAL DE LA ACTIVIDAD DE TRANS-SIALIDASA Y DE LA CAPACIDAD DE NEUTRALIZAR LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN SUEROS OBTENIDOS EN DIFERENTES ETAPAS DE LA INFECCION EXPERIMENTAL.....	7 2
VIII. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE TS Y DE LA CAPACIDAD DE NEUTRALIZACION DE TS EN SUEROS DE PACIENTES CHAGASICOS.....	7 6
<b>CONCLUSIONES</b> .....	7 9
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	8 1

## INTRODUCCION

### 1.- EPIDEMIOLOGIA

La enfermedad de Chagas es una parasitosis ampliamente difundida en América Latina que se extiende desde el paralelo 42 norte hasta el 46 de latitud sur. Se estima que 90 millones de personas están bajo riesgo de infección en zona endémica y que hay entre 16-18 millones de infectados (WHO, 1991). En nuestro país se estima que el 10% de la población está infectada y se considera a las provincias de Tierra del Fuego, Santa Cruz y parte de Chubut libres de transmisores (WHO, 1991), mientras que las de mayor prevalencia son Santiago del Estero (40%), San Luis y Tucumán (28-36%); San Juan, La Rioja, Salta y Chaco (19-27%) (Curto de Casas, 1985).

El mecanismo de transmisión más frecuente en zona endémica es el vectorial. Los insectos hematófagos incluidos en los géneros *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius* de la familia Reduviidae son los que tienen mayor importancia epidemiológica. *Triatoma infestans* es la especie de mayor relevancia en nuestro país. La distribución de la parasitosis se superpone con la distribución geográfica del vector ya que está asociada a factores socio-económicos de pobreza que favorecen su instalación en la vivienda humana. Las viviendas precarias con paredes de adobe, techo de paja, piso de tierra, favorecieron la domiciliación del insecto y determinaron la instalación del ciclo domiciliario; éste está constituido por el hombre, perros, gatos, otros animales domésticos y vinchucas domiciliadas. Debido a los hábitos nocturnos de alimentación del vector, el ciclo domiciliario favorece la transmisión ya que permite un contacto más cercano entre huésped-vector. El ciclo selvático está constituido por insectos silvestres, comadrejas y armadillos, estos últimos señalados como los reservorios silvestres más importantes.

Hasta el momento, las medidas de profilaxis para adoptar en zona endémica son educación sanitaria, control del vector y mejoramiento de la vivienda y su entorno.

Otras fuentes de infección para esta enfermedad tanto en zona endémica como fuera de ella son las transfusiones sanguíneas, el trasplante de órganos, la vía transplacentaria y los accidentes de laboratorio. La transmisión por transfusiones sanguíneas es la segunda en importancia; está relacionada con la prevalencia de la infección y con profundos cambios sociales y económicos que obligan a la población rural a migrar a zonas urbanas. La prevalencia de dadores seropositivos en bancos de la ciudad de Buenos Aires es del 13% mientras que alcanza el 20% en zonas endémicas (Rosestein-Campanini y col., 1992).

El análisis serológico de todos los dadores en bancos de sangre y el descarte de las muestras positivas es la medida de profilaxis recomendada para combatir esta vía de transmisión. En zonas de alta endemicidad donde la exclusión de los dadores potenciales pone en riesgo el suministro de sangre, se ha implementado la quimioprofilaxis *in vitro* como método alternativo. La droga más utilizada con estos fines es el violeta de genciana (Rosestein-Campanini y col., 1992).

## **2. FORMAS CLINICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.**

En la enfermedad de Chagas se distinguen tres fases o estadios clínicos: la fase aguda que es de corta duración, la fase indeterminada llamada así porque es clínicamente asintomática y la fase crónica de larga duración y con manifestaciones clínicas diversas (WHO, 1991).

### **2.1 FASE AGUDA**

Cuando el parásito invade al huésped se genera la etapa aguda que se caracteriza por la presencia de un número elevado de parásitos circulantes y una sintomatología inespecífica que la hace de difícil detección clínica. Sólo el 1-2% de los casos son detectados (WHO, 1991). Si bien este período puede desarrollarse a cualquier edad, la mayoría de los casos en zona endémica corresponden a niños menores de 15 años y principalmente menores de 10 años. Cuanto más joven es el paciente, las manifestaciones clínicas son más severas, pudiendo ser fatales, especialmente en niños menores de dos años.

Al penetrar en el huésped, el parásito genera una inflamación local denominada "chagoma". Si la entrada del parásito se realiza a través de la conjuntiva o la piel periorbitaria se desarrolla el complejo oftalmoganglionar o signo de Romaña caracterizado por edema periocular unilateral, bipalpebral, de color violáceo, indoloro, con o sin adenopatía satélite. El signo de Romaña es patognomónico de la infección por *T.cruzi* y se detecta en aproximadamente el 90% de los pacientes con infección reciente diagnosticada (WHO, 1991). El chagoma de inoculación en otras regiones cutáneas es menos característico, forunculoide, tumoral, etc., lo cual favorece que no se lo relacione con su etiología chagásica.

En cuanto a la sintomatología ésta puede manifestarse como un cuadro seudogripal con adenopatías generalizadas acompañadas o no de hepatoesplenomegalia. Las complicaciones severas de esta fase de la enfermedad se observan principalmente en niños menores de dos años siendo la mortalidad del 2-3% por miocarditis y del 50% encefalitis (WHO, 1991).

## 2.2 FASE INDETERMINADA

Transcurrido el período agudo, aproximadamente 8-10 semanas, el paciente entra en una etapa denominada indeterminada, porque carece de manifestaciones clínicas aunque sigue siendo serológicamente positivo; en este grupo sólo entre el 20-60% es además parasitológicamente positivo cuando se lo estudia por xenodiagnóstico, ya que los parásitos circulantes son de difícil detección. Aproximadamente el 70 % de los infectados permanecen en la misma condición de curación aparente o enfermedad no progresiva por el resto de su vida.

## 2.3 FASE CRONICA

Alrededor del 30% de los pacientes en fase indeterminada desarrollan al cabo de 10-20 años algunas de las manifestaciones clínicas de la fase crónica. El compromiso cardíaco es el más frecuente (27%), se manifiesta con arritmias, bloqueo completo de rama derecha del haz de His, hemibloqueo anterior izquierdo, dilatación ventricular, aneurisma de punta, entre otros (Puigbó y col., 1992). El compromiso digestivo (10%) si

bien puede localizarse en cualquier porción, afecta preferentemente el esófago y el colón. Como consecuencia de las alteraciones del peristaltismo hay una progresiva dilatación de los órganos comprometidos. El megaesófago se acompaña de disfagia y regurgitación, mientras que en el megacolon la principal complicación es la formación de fecalomas y volvulus.

Se ha descrito una prevalencia geográfica diferente para los distintos cuadros patológicos. En nuestro país, Chile, Bolivia y Méjico, el 20% de las personas infectadas desarrollan miocardiopatía, mientras que en la zona central de Brasil alcanzan el 43% (Schmuñis, 1994). En cuanto a la prevalencia de megavísceras ésta es mayor en Brasil, mientras que en Argentina y Chile es menos frecuente y en países de América Central, Venezuela y Colombia son muy raros (De Rezende y Luquetti, 1994). No se conocen aún las causas que generan esta diversidad de formas clínicas y la distribución geográfica de las mismas. En este sentido es importante destacar la diversidad de cepas de parásitos en distintas regiones geográficas que interactúan con poblaciones humanas también heterogéneas en diversos factores tales como nutricionales, genéticos, etc.

#### 2.4.- FASE AGUDA CONGENITA

La transmisión transplacentaria puede ocurrir tanto en las etapas aguda, indeterminada o crónica de la infección materna. El 0,5-3,5% de los hijos de madres chagásicas, nacen infectados. Cuando no hay compromiso fetal, no se observan alteraciones en el crecimiento, viabilidad ni predisposición del neonato a desarrollar patología específica. Cuando hay infección fetal la mayoría de los niños nacen a término, no hay alteraciones del crecimiento intrauterino y en general no presentan enfermedad aparente. Parte de los infectados pueden presentar hepatoesplenomegalia, adenopatías, e ictericia o un cuadro más grave (miocarditis o encefalitis) que los conduzca a la muerte (Moya, 1992).

### 3.- BIOLOGIA DE *Trypanosoma cruzi*

#### 3.1.- UBICACION SISTEMATICA

La ubicación de *Trypanosoma cruzi* es, según Levine y col.(1980), la siguiente:

SUBREINO	PROTOZOA
PHYLUM	SARCOMASTIGOPHORA
SUBPHYLUM	MASTIGOPHORA
CLASE	ZOOMASTIGOPHORA
ORDEN	KINETOPLASTIDA
SUBORDEN	TRYPANOSOMATINA
FAMILIA	TRYPANOSOMATIDAE
GENERO	<i>Trypanosoma</i>
SUBGENERO	<i>Schyzotrypanum</i>
ESPECIE	<i>cruzi</i>

El género *Trypanosoma* se dividió en dos Secciones (Hoare, 1964), en base a la ubicación del estadio infectante en el insecto vector y al mecanismo de infección al huésped mamífero.

-Sección Salivaria: se incluyen tripanosomas de evolución anterior, que se transmiten por inoculación de tripomastigotes metacíclicos ubicados en las glándulas salivales o por transmisión mecánica del insecto. Ejemplos: *T. brucei*, *T. congolense*.

-Sección Estercoraria: incluye tripanosomas que se transmiten al mamífero por contaminación con las heces del insecto vector, ya que los tripomastigotes metacíclicos se encuentran en la región posterior del tubo digestivo del insecto (excepto *T. rangeli*). Ejemplos: *T. cruzi*, *T. lewisi*.

### 3.2.- CICLO DE VIDA Y ESTADIOS PARASITARIOS

El ciclo biológico de *T. cruzi* involucra un huésped invertebrado y un huésped mamífero. El invertebrado es un insecto de la Familia Reduviidae, siendo los géneros más importantes *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius*. Debido a sus hábitos hematófagos, el insecto se infecta al ingerir tripomastigotes sanguíneos cuando se alimenta de un mamífero infectado. Los tripomastigotes ingeridos se diferencian a epimastigotes que se dividen por fisión binaria y migran por el tracto digestivo hacia la ampolla rectal donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. Ambos estadios son eliminados con las deyecciones del vector. También se ha descrito la existencia de un estadio intermedio, entre la diferenciación de tripomastigote a epimastigote, denominado esferomastigote (Brack, 1968).

La forma infectante para el mamífero es el tripomastigote metacíclico que es depositado sobre él por el triatómino junto con las deyecciones, después de alimentarse. Los tripomastigotes metacíclicos penetran atravesando las mucosas o bien por lesiones previas de la piel o por aquellas que el huésped genera por rascado ya que las deyecciones del insecto provocan prurito. Cuando los metacíclicos alcanzan la circulación infectan células nucleadas donde se diferencian a amastigotes con capacidad de multiplicarse por fisión binaria (aproximadamente nueve generaciones) y posteriormente se diferencian a tripomastigotes quedando libres por ruptura celular. Los tripomastigotes en la circulación pueden invadir nuevas células extendiéndose así la infección en el organismo.

La posibilidad de reproducir *in vitro* el ciclo evolutivo de *T. cruzi* ha facilitado la realización de estudios bioquímicos, fisiológicos, etc. de los diferentes estadios parasitarios. Los cultivos celulares permiten reproducir el ciclo en el mamífero y así obtener los estadios amastigote y tripomastigote (Brenner, 1979). Los cultivos axénicos permiten reproducir *in vitro* la parte del ciclo que se desarrolla en el vector, y en ellos se obtienen los estadios epimastigote y tripomastigote metacíclico (Brenner, 1979). También se ha comunicado la obtención del estadio amastigota en cultivo axénico (Pan, 1978).

La diversidad morfológica de *T. cruzi* está basada en: a) la forma general de la célula. b) la posición del kinetoplasto respecto del núcleo. c) la región de donde emerge el flagelo desde el bolsillo flagelar (De Souza, 1984).

Siguiendo este criterio se han identificado los siguientes estadios:

- Epimastigote: la célula tiene forma elongada y mide entre 20-40  $\mu\text{m}$  de longitud. El kinetoplasto tiene localización anterior al núcleo. El flagelo emerge cercano a éste y permanece unido al cuerpo celular hasta quedar libre en el extremo anterior. Se encuentra en el tubo digestivo del insecto vector y tiene capacidad de multiplicación.

- Tripomastigote: la célula tiene forma elongada y mide entre 20-25  $\mu\text{m}$  de longitud. El kinetoplasto está ubicado por detrás del núcleo. El flagelo emerge cercano al núcleo, se mantiene unido a la membrana plasmática describiendo una membrana ondulante extensa hasta quedar libre en el extremo anterior. Está presente en la circulación del mamífero y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico). Es el estadio infeccioso y no se duplica.

- Amastigote: mide entre 2-4  $\mu\text{m}$  de forma esférica u ovalada con un corto flagelo. Tiene localización intracelular y es el estadio duplicativo en el mamífero.

### 3.3.-ESTRUCTURA DEL PARASITO

La superficie celular está constituida por la membrana plasmática y un armazón de microtúbulos submembranales longitudinales. La membrana plasmática está recubierta por el glicocálix, constituido por proteínas, lípidos y carbohidratos. Está presente en todos los estadios y tiene un espesor de 15 nm en los tripomastigotes y de 5 nm en epimastigotes y amastigotes (De Souza, 1984). El flagelo de *T. cruzi* emerge de una invaginación que se denomina bolsillo flagelar. Está constituido por nueve pares de microtúbulos periféricos longitudinales y un par central (9+2). A los costados del axonema del flagelo de los trypanosomatídeos hay una estructura filamentosa denominada complejo paraxial o paraflagelar (De

Souza, 1984). También es usual que el flagelo se mantenga unido al cuerpo celular por uniones tipo desmosomas (De Souza, 1984). Cuando el flagelo se mueve, genera en el cuerpo celular un movimiento que da la impresión visual de una membrana ondulante. No se ha detectado una estructura correspondiente a una membrana ondulante verdadera como la que sí se ha descrito en la familia Trichomonadidae (De Souza, 1984). *T. cruzi* así como otros miembros de la familia Trypanosomatidae contiene una única mitocondria que se extiende a lo largo de toda la célula, y posee una región especializada que contiene fibras de una compleja red de DNA mitocondrial denominado kinetoplasto (De Souza, 1984). Esta estructura basófila y de fácil visualización al microscopio óptico, le da el nombre al orden Kinetoplastida. Está presente en todos los estadios parasitarios aunque hay cambios de posición respecto del núcleo en cada uno de ellos. El cuerpo basal, región donde se origina el flagelo está siempre localizado cercano al kinetoplasto, aunque no hay evidencias que demuestren conexiones entre ambas estructuras. El kinetoplasto (k-DNA) constituye el 20% del DNA total y forma una única red de DNA circular catenado, constituido por dos tipos de DNA circular, los minicírculos y los maxicírculos.

#### **4-DIAGNOSTICO**

Para realizar el diagnóstico de certeza de la enfermedad de Chagas se debe discriminar en qué etapa de la infección se encuentra el paciente.

Dado que en la etapa aguda de la infección hay importantes cantidades de parásitos circulantes, el método de elección es la búsqueda de tripomastigotes en sangre periférica. Entre los métodos más usados se encuentran la gota gruesa, frotis, gota fresca, strout y microhematocrito (OMS, 1991). Los últimos dos métodos mencionados presentan mayor sensibilidad ya que hay concentración de los parásitos mediante pasos de centrifugación. La observación de los tripomastigotes vivos se ve facilitada por la gran movilidad que los caracteriza. También son de gran utilidad el xenodiagnóstico y el hemocultivo. Ambos son métodos denominados de amplificación biológica, ya que en ellos hay multiplicación del parásito. El xenodiagnóstico se basa en la alimentación

del vector no infectado con sangre del paciente. A los 20 días se inicia la búsqueda de parásitos en las deyecciones del insecto (Camargo y col., 1979). Para el hemocultivo se siembra sangre del paciente en medios de cultivo especiales y al cabo de 20 días se inicia la búsqueda de epimastigotes en los tubos sembrados (Camargo y col., 1979) El diagnóstico serológico de la fase temprana puede realizarse buscando seroconversión o IgM específica por ELISA, IFI o combinación de aglutinación directa con y sin 2-mercaptoetanol. En el caso particular de la infección transplacentaria, si la detección de parásitos circulantes y de IgM específica dan negativo, se puede realizar un seguimiento de los títulos de IgG específica, lo que permitirá discriminar entre IgG materna y del niño (WHO, 1991).

Dado que la fase aguda habitualmente no es detectada clínicamente y que los individuos infectados crónicamente que desarrollan patología lo hacen a los 10-20 años, el diagnóstico de esta fase es relevante. En dicha fase los parásitos circulantes son de difícil detección, estando la sensibilidad del xenodiagnóstico y del hemocultivo reducida a un 50% o menos. Los métodos utilizados de rutina son los serológicos, y los más comúnmente empleados son IFI, ELISA, IHA, AD y fijación de complemento (WHO, 1991). Se recomienda la realización de al menos dos ensayos serológicos diferentes para confirmar o descartar la infección.

Se ha utilizado como antígenos diversas fracciones o extractos parasitarios así como parásitos enteros fijados. El uso de antígenos parasitarios heterogéneos y no estandarizados permite la aparición de falsos positivos o reacciones cruzadas con parásitos del género *Leishmania* o con *T. rangeli*, cuyas áreas endémicas generalmente se superponen con las de *T. cruzi*. Es por tanto necesario mejorar la calidad de los antígenos a utilizar en el inmunodiagnóstico a fin de lograr optimizar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico del paciente crónico, que permita discriminar una infección congénita temprana, evaluar la eficacia de un tratamiento antiparasitario y predecir la posible evolución clínica del individuo infectado. En este sentido se han iniciado estudios con antígenos definidos (ver punto 8).

Recientemente se ha desarrollado un método de amplificación de minicirculos de DNA kinetoplástico utilizando PCR. Del análisis de un panel de muestras sanguíneas obtenidas de pacientes en la etapa crónica,

surge que la PCR es 100% sensible comparada con las pruebas serológicas de rutina y es mucho más sensible que el xenodiagnóstico. Los autores proponen el uso de PCR en reemplazo del xenodiagnóstico y como técnica confirmatoria en los *screening* de bancos de sangre (Avila y col., 1993).

## 5.- TRATAMIENTO

El tratamiento antiparasitario en humanos ha resultado eficaz en los casos agudos, aunque se ha comunicado que en niños con infección congénita el mismo puede ser efectivo por lo menos durante los primeros 16 meses de adquirida la infección (Freilij y col., 1994). El fracaso del tratamiento en algunos casos se debe probablemente a la existencia de cepas resistentes y a la exposición del paciente a posibles reinfecciones en zona endémica.

Actualmente hay dos drogas que se emplean, el nifurtimox (Lampit, Bayer) y el benznidazol (Radanil, Roche) El primero es un dimero de nitrofuranos que actúa sobre el parásito induciendo la generación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Brenner, 1984). El Radanil es un derivado de nitroimidazoles que actúa inhibiendo la síntesis proteica y de RNA (Brenner, 1984). Ambos pueden producir severos signos de intolerancia. Se considera que el tratamiento fue exitoso cuando hay negativización parasitológica y serológica y permanecen así durante al menos un año de finalizado el tratamiento (WHO, 1991) Debe destacarse la importancia de la precocidad del diagnóstico de casos agudos ya que el tratamiento es tanto más exitoso cuanto más precozmente se realice. Aún no se ha probado que el tratamiento de la fase indeterminada evite el desarrollo de las formas crónicas.

## 6.- INFECCION EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi*

El modelo ratón ha sido ampliamente utilizado para el estudio de la infección por *T. cruzi* por diversas razones: su sistema inmunológico es el más estudiado, reproduce tanto la fase aguda como la crónica de la

infección humana, existen cepas endocriadas y el costo de producción es bajo.

El curso de la infección puede variar según la cepa de ratones, edad, sexo, cepa de parásitos, inóculo y vía de inoculación. Las cepas de ratones C3H y Balb/c son más sensibles que las cepas Swiss y C57BL/6 (Trischmann y col., 1978; De Titto, 1994). La resistencia aumenta con la edad del huésped (Culbertson, y col. 1942) y las hembras son menos sensibles a la infección que los machos (Hauschka, 1947).

En terminos generales la inoculación de cepas virulentas en ratones sensibles induce una infección aguda, con elevada parasitemia y mortalidad de hasta 100%. Mientras que la infección de cepas de ratones resistentes o sensibles con parásitos de baja patogenicidad permite que el huésped alcance la etapa crónica donde el número de parásitos circulantes es muy bajo.

Durante la etapa aguda se induce una activación policlonal B y T, temprana e inespecífica (Minoprio y col., 1986; Minoprio y col., 1988) seguida por una fase de inmunosupresión. En la activación B desarrollada en ratones resistentes (C57Bl6) y sensibles (C3H), no se ha encontrado relación entre el patrón de isotipos presentado y la resistencia a la infección, sino más bien parece ser un fenómeno general de la infección murina (D'Imperio Lima y col., 1986). La inmunosupresión se caracteriza principalmente por falta de producción de IL-2 y de la expresión de sus receptores de membrana, así como por falta de linfoproliferación de linfocitos B y T (Cunningham y col., 1980; Kierzembraum, y col. 1982; Rottemberg y col., 1993).

Estas alteraciones del sistema inmune no sólo se generan en una infección activa sino también por componentes parasitarios. En este sentido, se ha comunicado la capacidad de un péptido sintético acoplado de inducir proliferación de linfocitos murinos así como de anticuerpos dirigidos hacia el parásito y hacia antígenos no relacionados. Este péptido contiene secuencias repetitivas de una proteína de superficie de tripomastigotes de 85 kDa relacionados con protección (Pestel y col., 1992). Por otra parte, la disminución del receptor de IL-2, puede ser inducida por un factor TIF (Tripomastigote Immunosupression Factor) de peso molecular entre 30-100 kDa, secretado por tripomastigotes (Kierzembraum y col., 1990).

En la resistencia a la infección intervienen tanto la respuesta inmune humoral como celular. En ensayos realizados con ratones genéticamente atímicos la infección se exagera (Segura y col., 1981), aún con cepas de *T.cruzi* que habitualmente no son letales para el ratón (González Cappa comunicación personal). Intervienen tanto los linfocitos T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> ya que la depleción de cualquiera de estas poblaciones aumenta la sensibilidad del huésped infectado (Rottemberg y col., 1990; Tarleton, 1990). Tarleton y col. (1992) utilizando ratones deficientes en células T CD8<sup>+</sup> demostraron la importancia de esta población en la protección, ya que estos ratones desarrollan altas parasitemias y muerte más temprana. Se ha comunicado la capacidad de inducir protección mediante transferencia adoptiva de clones T (TH1) que reconocen proteínas secretadas al medio por tripomastigotes (Nickell y col., 1993).

El papel de la respuesta humoral en resistencia se pone de manifiesto mediante ensayos de transferencia pasiva de sueros de ratones infectados a normales que luego son desafiados con inóculos letales (Sánchez y González Cappa, 1983). La presencia de anticuerpos líticos (dependientes de complemento) (Krettli, 1982), opsoninas (Celentano, y González Cappa, 1992) y anticuerpos mediadores de citotoxicidad celular (Okabe y col., 1980) permite al huésped resistir el desafío. La subclase relacionada con protección es del tipo IgG2 (Krettli y Brener, 1982), siendo este mismo isotipo el que persiste a lo largo de la infección murina (Araujo y col., 1984). Si bien los mecanismos mencionados son en parte responsables del control de la parasitemia, la estimulación de dichos anticuerpos es variable dependiendo de la población parasitaria pudiendo estar ausentes en algunas infecciones (Muller y col., 1986).

El conjunto de la respuesta inmune apunta al control del número de parásitos circulantes, lo que permitiría al huésped superar la fase aguda de la infección, sin erradicar al parásito del organismo, pero alcanzando una relación huésped-parásito que conduce a la cronicidad.

## 7.- INFECCION HUMANA POR *Trypanosoma cruzi*

En la fase aguda humana también se induce una proliferación policlonal de linfocitos T y B. El cocultivo de *T. cruzi* con linfocitos humanos induce la transformación del 15% de células B y T incluyendo CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, así como la producción de citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (Van Voorhis, 1992).

También se ha comunicado durante la fase aguda de un paciente infectado accidentalmente, la detección temprana (17 días) de hipergamaglobulinemia que persistió hasta 66 días pi. Los anticuerpos específicos así generados también reaccionaron con antígenos del huésped, lo que sugiere que mecanismos de mimetismo molecular podrían estar relacionados con la generación de autoanticuerpos (Grauer y col.,1993). La proliferación policlonal contribuiría a la desregulación inmune (inmunosupresión), lo que ayudaría a alcanzar la fase crónica de la infección, ya que la inmunosupresión también se ha detectado en la infección humana. En este sentido se ha comunicado la inhibición de la expresión en linfocitos T de IL-2R, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> (Sztein y col.,1990) y del receptor T de antígenos (TCR) (Sztein y Kierzembaum,1992). Por otra parte, se ha comunicado la capacidad de un anticuerpo monoclonal, que reconoce un antígeno de 50-55 kDa de *T. cruzi* y un antígeno de 28 kD en linfocitos B y T activados humanos y murinos, de suprimir la proliferación de linfocitos B y T. En los sueros de pacientes chagásicos se han detectado anticuerpos con las mismas propiedades descritas para el anticuerpo monoclonal recién mencionado (Hernández y col., 1992).

La detección de IgM específica durante las primeras semanas de la fase aguda ha sido comunicada por diferentes autores (Vattuone y col., 1973; Schmuñis y col., 1978). En seguimientos realizados en individuos infectados accidentalmente se comunicó la aparición simultánea de IgM e IgG específicas a los 35 días pi (Israelski y col., 1988); la aparición en primer termino de IgA y posteriormente IgM e IgG (Grauer y col.,1993) y el máximo aumento de todas las clases de inmunoglobulinas a los 30-50 días pi. (Grauer y col.,1993; Israelski y col.,1988). La negativización de IgM se produjo a los 90 días mientras que los títulos de IgG específica se mantuvieron por periodos más prolongados (300 días) y sin encontrarse

diferencias en los distintos isotipos (Israelski y col.,1988). Matsumoto y col. (1993) comunicaron la detección en sueros de pacientes agudos de IgM específica en el 100% y de IgA específica en el 60 % de los casos. En los sueros de individuos crónicos se detectó IgA en el 33% e IgG en el 100% de los casos.

Durante la fase crónica de la infección se mantienen los niveles de IgG, por esta razón se utiliza la serología como método de elección en el diagnóstico de esta etapa de la infección (ver 4) y en la evaluación del tratamiento antiparasitario (WHO, 1991). En este último caso se ha propuesto como método alternativo el uso de anticuerpos líticos para la evaluación terapéutica (Krettli, 1982). Recientemente se ha comunicado la inmunoprecipitación de la proteína reguladora del complemento (CRP) por sueros humanos y se propone su uso como indicador del "clearance" de parásitos circulantes, ya que esta proteína sería el blanco de los anticuerpos involucrados en lisis parasitaria (Norris y col., 1994).

Diferentes autores han tratado de encontrar marcadores serológicos de las formas clínicas de la enfermedad de Chagas. Primavera y col. (1988) utilizando amastigotes como antígeno detectaron predominio de IgA en las formas digestivas. Cuando se compararon por ELISA y fijación de complemento los niveles de anticuerpos en individuos infectados asintomáticos y con diferentes formas clínicas de gravedad variable, no se encontraron diferencias significativas entre los diversos grupos. Contrariamente, al utilizar la aglutinación directa los pacientes con megaviscera y cardiopatía severa presentaban títulos superiores que los pacientes asintomáticos o de gravedad moderada (Gusmao y col., 1982). Ouaisi y col.(1991) emplearon un anticuerpo monoclonal, dirigido contra un epítopo presente en antígenos secretados por tripomastigotes y expresados también en los estadios epimastigote y amastigote, en ensayos de captura de complejos antígeno-anticuerpo presentes en sueros de pacientes infectados. La presencia de dicho epítopo en asociación con IgM en suero de pacientes en la fase aguda les permite sugerir al antígeno/s portador/es de ese epítopo como marcador/es de infección activa.

Además de la destrucción de tripomastigotes por lisis mediada por complemento, las diferentes formas parasitarias pueden ser destruidas por la reacción de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos específicos (ADCC). Diferentes autores han encontrado que células

mononucleares y PMN humanos son capaces de destruir tanto tripomastigotes (Nogueira y col., 1982a) como epimastigotes (Cardoni y col., 1984; Olabuenaga y col., 1979). El estadio intracelular puede ser destruido *in vitro* por PMN humanos (Villalta y Kierszenbaum, 1983) en presencia o ausencia de anticuerpos específicos, la acción tripanocida estaría ligada a la capacidad de las poblaciones involucradas de generar especies reactivas del oxígeno.

## 8.- COMPOSICION ANTIGENICA DE *Trypanosoma cruzi*.

El *Trypanosoma cruzi* presenta un ciclo de vida que involucra dos huéspedes evolutivamente tan alejados como lo son un mamífero y un insecto. En ellos pueden desarrollarse distintos estadios, comprendiendo tanto estadios circulantes como intracelulares.

El parásito ha debido desarrollar mecanismos de diferenciación para colonizar (o adaptarse) a los distintos huéspedes, de penetración para invadir las células de mamíferos así como mecanismos de escape o evasión frente a los sistemas de protección inespecífica o específicas del huésped. Esta alta complejidad hace pensar que también lo es su composición antigénica. El análisis de la composición antigénica de *T. cruzi* ha sido abordado vastamente por varios grupos de investigación.

A continuación se resumen los avances realizados hasta el momento por diversos laboratorios sobre los antígenos de *T. cruzi* y la probable funcionalidad de cada uno de ellos.

### 8.1.- ANTIGENOS DE SUPERFICIE.

El parásito interactúa con el huésped ya sea mediante los compuestos asociados a su membrana o por medio de componentes secretados a través de ella. Estudios de citoquímica revelan la presencia de macromoléculas con alto contenido de carbohidratos. La mayoría de los antígenos descritos hasta el momento son de naturaleza glicoproteica.

Empleando diversas lectinas se ha demostrado diferencias cuanti y cualitativas en la exposición de carbohidratos en la superficie de los distintos estadios parasitarios. Así por ejemplo, tanto los epimastigotes

como los tripomastigotes son aglutinados por Con-A, pero los epimastigotes presentan receptores de mayor afinidad por esta lectina (Katzin y Colli, 1983). Cuando se empleó WGA se observó que los epimastigotes aglutinaban a baja concentración, mientras que los tripomastigotes y amastigotes requerían concentraciones mayores (Pereira y col., 1980). Por su parte la lectina PNA sólo reconoció azúcares específicos en el estadio amastigote (Pereira y col., 1980).

En el estadio epimastigote se detectaron, por electroforesis en geles de poliacrilamida, cuatro bandas (A, B, C, D). La banda D fué denominada LPPG por lipopeptidofosfoglicano (Alves y Colli, 1975); es el glicoconjugado más abundante de superficie en el estadio epimastigote, está compuesto por 60 % de carbohidratos, 9.5% de proteína y 2% de fosfolipidos (Lederkremer y col., 1976) y con alta homología al anclaje por GPI (glicosilfosfatidilinositol) (Lederkremer y col., 1991).

Mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal (WIC 29.26) obtenido de ratones inmunizados con epimastigotes, se detectó una glicoproteína de 72 kDa denominada GP72 (Snary y col., 1981), construída principalmente por 49% de azúcares, 41% de proteína y 10% de fosfatos (Ferguson y col., 1983). La especificidad de este monoclonal está dirigida hacia la parte glucídica de la molécula (Ferguson y col., 1983). Ensayos realizados con diversos aislamientos y clones mostraron diferencias cuantitativas en la expresión de la GP72 medida por la reactividad con el mencionado monoclonal (Kirchoff y col., 1984a). Sin embargo, esta variación desapareció cuando se utilizó un anticuerpo monoclonal dirigido contra la glicoproteína previamente tratada con periodato (Kirchoff y col., 1984b). El reconocimiento diferencial entre ambos monoclonales se debería al distinto grado de glicosilación de la GP72 en las distintas cepas del parásito (Snary, 1985). Por otra parte, el monoclonal WIC 29.26 mostró capacidad de inhibir la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes "in vitro", lo que sugiere que la GP72 estaría involucrada en el proceso de diferenciación (Sher y Snary, 1982). También se ha propuesto a esta glicoproteína como el aceptor en epimastigotes del componente C3 del complemento (Joiner y col., 1985).

El grupo de Nogueira describió una glicoproteína de 75 kDa presente en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos (Nogueira y col., 1981). Mediante ensayos de "immunoblotting", utilizando el anticuerpo

monoclonal dirigido hacia la GP 72 y proteólisis parcial demostraron que son proteínas diferentes (Schechter y Nogueira, 1988).

Otra glicoproteína descrita es la de 90 kDa (GP90) presente en todos los estadios parasitarios (Snary y Hudson, 1972), y es detectada por sueros de pacientes chagásicos crónicos (Snary, 1983).

Mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal, que induce lisis del estadio amastigote, se identificó una proteína de 92 kDa (M4C12Ag) que está relacionada estructuralmente con el antígeno Ssp 4, presente en el mismo estadio, pero difiere en el peso molecular y el punto isoeléctrico (Ilda y Ley, 1991)

En cuanto al anclaje de las proteínas de superficie a la membrana plasmática, se ha descrito para alguna de ellas un anclaje por GPI, que es un sistema altamente conservado en la evolución de células eucariontes (Ferguson, 1994). La detección de este tipo de anclaje se basa en la acción específica de la fosfolipasa-C, cuyo tratamiento expone epitopes de naturaleza glucídica denominados CRD (Cross-Reactive Determinant). Estos epitopes pueden ser detectados específicamente por anticuerpos anti-CRD, ya sea por western blott o ensayos de inmunoprecipitación (Mc Conville, 1991). Se ha propuesto la posible relación de este tipo de anclaje con la liberación de moléculas mediante la acción de la fosfolipasa-C. Entre los antígenos que están anclados por GPI se encuentran un grupo de proteínas de 70-90 kDa presentes en tripomastigotes metacíclicos (Schenkman, y col.1988; Guther y col., 1992), la Ssp-4 (Andrews y col., 1988), la trans-sialidasa (ver punto 8.7) (Hall y col.,1992), la Tc85 (ver punto 8.) y las glicoproteínas "tipo mucinas" de 35-50 kDa (Schenkman y col., 1993b).

Para otros antígenos se ha comunicado que son eliminados al medio en vesículas que brotan de la superficie celular. Este mecanismo de "shedding" sería independiente de la acción de fosfolipasa-C sobre el anclaje por GPI (Goncalves y col., 1991).

## 8.2.-ANTIGENOS RELACIONADOS CON INVASION CELULAR

Dado que *T.cruzi* es un parásito obligado intracelular que invade tanto células fagocíticas como no fagocíticas es importante el estudio de moléculas que puedan relacionarse con la adhesión y/o penetración a la célula huésped.

Ouaissi y col. (1986b) identificaron a partir de tripomastigotes, una proteína de 85 kDa que fue propuesta como el receptor para fibronectina, proteína que está presente en sangre, tejido conectivo y superficie celular (Pearlstein y col., 1980). Mediante el empleo de péptidos sintéticos se determinó que la secuencia RGD de la fibronectina funcionaría como sitio de reconocimiento para la unión del parásito. Esta proteína actuaría como puente molecular para facilitar la unión del parásito a la secuencia RGD libre de la célula huésped (Ouaissi y col., 1986a). Péptidos contruídos con la misma secuencia de aminoácidos y un anticuerpo monoclonal dirigido hacia dicha secuencia, fueron capaces de inhibir parcialmente la invasión celular (Ouaissi y col., 1986a).

Katzin y col. (1983) describieron otra glicoproteína de peso molecular semejante, denominada Tc85, específica del estadio tripomastigote. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra ella inhibieron en un 60% la penetración celular (Alves y col., 1986).

Villalta y col. (1990; 1992) describieron una glicoproteína de 83 kDa (GP83) que fue detectada exclusivamente en la membrana de tripomastigotes. La unión del parásito a la célula huésped puede ser inhibida por incubación de monocapas de mioblastos con la GP83 o por el tratamiento de tripomastigotes con anticuerpos monoclonales específicos

El grupo de Yoshida ha descripto glicoproteínas de diferentes pesos moleculares, de 82 kDa (3F6-Ag), de 35/50 kDa (10D8-Ag) y 90 kDa (1G7Ag) que han sido relacionados con la entrada del parásito a la célula y poseen expresión estadio dependiente, ya que sólo se expresan en tripomastigotes metacíclicos y están ausentes en las formas sanguíneas (Yoshida y col.,1990 ; Ramirez y col.,1993)

Se ha comunicado la existencia de una superfamilia de antígenos de suerficie de *T.cruzi* , que contiene entre otras, varias familias de proteínas de 85 kDa (Campetella y col., 1992b). Es muy probable que las diferentes

proteínas de peso molecular semejante, descritas por distintos autores pertenezcan a esta superfamilia de antígenos (ver 8.7) (Fouts y col., 1991; Franco y col., 1993) .

Diferentes evidencias experimentales señalan la importancia del ácido siálico en el proceso de invasión celular proceso mediado por la trans-sialidasa del parásito (ver punto.8.7). En este sentido, se ha propuesto al glicoconjugado "tipo mucina" de 35/50 kDa (10D8-Ag) como el principal aceptor de ácido siálico en el tripomastigote metacíclico (Ruiz y col.,1993), mientras que en tripomastigotes de cultivos celulares se propuso al epítipo Ssp-3 (Schenkman y col.,1991).

Los anticuerpos policlonales (fracción Fab) dirigidos contra la cisteín-proteinasa principal del parásito, denominada cruzipaina (Cazzulo y col., 1990), inhibieron la penetración de tripomastigotes a cultivos de macrófagos (Souto-Padrón y col. 1990).

El papel de la trans-sialidasa y la penetrina en invasión celular se describe en 8.7.

### 8.3.-ANTIGENOS RELACIONADOS CON PROTECCION

Diversos intentos se han realizado para obtener inmunógenos capaces de generar protección contra *T.cruzi*.

Se ensayó el uso de parásitos enteros, ya sea vivos atenuados por el mantenimiento en cultivo (Basombrío y col.,1982), fracciones subcelulares (Segura y col.,1977) o inactivados por distintos procedimientos como el uso de perclorato de sodio (Kierszenbaum y Budzco,1975), tetróxido de osmio (Mc Hardy,1978), metaperiodato de potasio (Kierszenbaum, y Budzco, 1975), 8 methoxypsoralen (Andrews y col. 1985), etc. El empleo del parásito entero puede generar riesgos ya que se ha postulado para la patología de la enfermedad de Chagas, un posible origen autoinmune. Por ello se orientó el esfuerzo a la obtención y purificación de antígenos con posible uso como inmunógeno.

En los ensayos de protección que se describen a continuación ésta fue evaluada midiendo niveles de parasitemia y sobrevida respecto de los controles.

La glicoproteína de 90 kDa (GP90), que se expresa en todos los estadios parasitarios (Snary y Hudson, 1972), indujo protección sólo cuando se la combinó con saponina o adjuvante de Freund (Scott y Snary, 1979 ; Scott y col., 1984). El grupo de Yoshida utilizando también una glicoproteína de 90 kDa pero específica del estadio metacíclico, consiguió proteger ratones inmunizados sólo cuando se utilizó hidróxido de aluminio como adjuvante (González y col., 1991). La glicoproteína 72 (GP72) sólo indujo protección frente al desafío con tripomastigotes metacíclicos y no frente al desafío con tripomastigotes sanguíneos (Snary, 1983). La inmunización con péptidos sintéticos con la secuencia RGD de la fibronectina, acoplados a toxoide tetánico confirieron protección parcial a los ratones desafiados (Ouaissi y col., 1986a).

Diferentes autores han comunicado que distintos componentes de la fracción flagelar del parásito poseen propiedades protectoras. Ruiz y col. (1990) describieron dos moléculas de 15 y 48 kDa, con capacidad de conferir protección al 60 % de los animales desafiados. El uso de antígenos derivados de epimastigotes (45-68 kDa) incluidos en un nuevo sistema de entrega antigénica (QUIL-A), un derivado de la saponina, indujo una fuerte respuesta humoral y celular y una protección del 100% de los animales desafiados, mientras que el anticuerpo monoclonal que los reconoce confirió protección parcial por transferencia pasiva (Araujo, y Morein, 1990). Recientemente se ha comunicado que dos proteínas denominadas PAR1 y PAR2, presentes en el complejo paraxial del parásito, poseen capacidad de inducir protección con el 100% de sobrevida en el modelo ratón (Wrightsmann y col., 1995).

#### 8.4.-ANTIGENOS RELACIONADOS CON DIAGNOSTICO.

Según se ha discutido en 4 la importancia del diagnóstico serológico en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas es fundamental. Por ello deben mejorarse los métodos de diagnóstico con el fin de aumentar su sensibilidad y especificidad, principalmente para aquellas zonas donde coexisten las infecciones por *T. cruzi*, *T. rangeli* y *Leishmania sp.* En este sentido, diferentes laboratorios han propuesto distintas moléculas y anticuerpos monoclonales con potencial uso en el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*.

El empleo de la GP-90 en ELISA fue propuesto para realizar diagnóstico diferencial de *T. cruzi* de distintas especies del género *Leishmania* sp. (Schechter y col., 1983). El agregado de ensayos de inmunoprecipitación e inmunobloting, luego del ELISA, permitió distinguir infecciones mixtas de *T. cruzi* y *T. rangeli* de infecciones generadas por una u otra especie parasitaria (Guhl, 1990). Se propuso el uso del componente 5 (C5) antígeno de 24 kDa producto de la maduración de la GP-72 en un ensayo inmunoenzimático competitivo mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-C5 (Orozco y col., 1984 ; Lemesre y col., 1986). Esta última prueba podría diferenciar pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica o indeterminada de individuos parasitados con diferentes especies de leishmanias.

Un grupo de antígenos de epimastigotes, que se ubican entre 21-31 kDa son exclusivamente reconocidos, en ensayos de ELISA, por sueros de pacientes chagásicos y no por sueros de pacientes infectados con *L. brasiliensis* o *L. donovani* (Araujo, 1986). El mismo grupo de trabajo propuso un método para la detección rápida de la infección por *T. cruzi*, mediante el uso del sobrenadante de 10.000g de epimastigotes sonicados unido a membrana de nitrocelulosa (Araujo, 1985).

Sueros provenientes de individuos infectados con *T. cruzi* reconocen, por IFI e inmunoprecipitación, un antígeno específico del estadio amastigote denominado Ssp-4 de 70-84 kDa (Andrews y col. 1989).

Diferentes grupos coincidieron en describir un antígeno que resultó ser la cruzipaína, una cisteín proteinasa con alta capacidad inmunogénica. El grupo de Scharfstein describió una glicoproteína denominada GP-57/51 (Scharfstein y col., 1988; Murta y col., 1990) Cazzulo y col. (1990) describieron la cruzipaína de 60 kDa. Recientemente Malchiodi y col. (1993) describieron el antígeno 163B6. Este antígeno que es reconocido por sueros chagásicos crónicos y no por sueros de individuos infectados con *Leishmania* sp. fue propuesto como reactivo para diagnóstico serológico (Meirelles y col., 1990; Martínez y col., 1991; Malchiodi y col., 1993).

Se ha comunicado la estandarización de un kit de alta sensibilidad y especificidad, denominado FATALAKIT, que consiste en un ensayo inmunoenzimático con dos antígenos diferentes que se analizan independientemente. Los antígenos empleados son el Antígeno 4,

purificado por inmutaafinidad a partir de la fracción flagelar y un antígeno soluble (PS) obtenido por ultracentrifugación a partir de homogenato total (Cura y col., 1993).

Otra estrategia utilizada para mejorar el diagnóstico, principalmente para pacientes inmunosuprimidos, es la detección de antígenos específicos en fluidos corporales. Se ha propuesto la detección de antígenos circulantes libres en sueros de niños con infección congénita (Corral y col., 1992), o formando inmunocomplejos en sueros de pacientes en la etapa aguda y crónica de la infección (Khan y col., 1983; Corral y col., 1984). Freilij y col. (1987) proponen el uso combinado del microhematocrito y la búsqueda por ELISA de antígenos específicos en orina de pacientes en la etapa aguda de la infección.

#### 8.5.- ANTIGENOS CIRCULANTES.

La importancia del estudio de este tipo de antígenos radica en su potencial uso en diagnóstico (ver 8.4), así como en la posible participación en mecanismos patogénicos de la enfermedad de Chagas. Diversos autores describieron la presencia de antígenos circulantes libres o formando inmunocomplejos, en sueros de pacientes tanto en la etapa aguda como crónica de la infección (Araujo, 1981; Khan y col. 1983; Corral y col., 1987). En la composición de dichos antígenos se han comunicado moléculas de naturaleza glucídica (Martin y col., 1989) y glicoproteica. Entre estas últimas se han caracterizado en el estadio amastigote el antígeno Ssp-4 de 70-84 kDa (Andrews y col., 1988), que es secretado durante la diferenciación, y el antígeno SAPA de 130-200 kDa que se detecta tanto en sueros de pacientes como en infecciones experimentales (Afranchino y col., 1989).

La presencia de antígenos de *T.cruzi* en orina fue originalmente descrita por Bongertz (1981) en muestras de ratones y perros infectados. Posteriormente se detectaron en orina de pacientes agudos y congénitos dos glicoproteínas de 80 kDa y 55 kDa (Freilij y col., 1987). Cuando se analizaron orinas de pacientes en la etapa crónica de la infección se encontró que un anticuerpo monoclonal reconoce un polipéptido de 100 kDa (Katzin y col., 1989), mientras que un anticuerpo policlonal dirigido hacia un antígeno recombinante repetitivo reconoce

antígenos de 150-160 kDa (Umezawa y col., 1993). A partir de orina de perros infectados experimentalmente se purificó y caracterizó una glicoproteína de 80 kDa, con afinidad por Con-A, que es reconocida por sueros provenientes de diferentes especies de huéspedes infectados (Corral y col, 1989).

#### 8.6.- ANTIGENOS RELACIONADOS CON PATOLOGIA.

Durante la fase crónica de la infección se observan lesiones en músculo y sistema nervioso. Una de las teorías para explicar el origen de la patología chagásica sugiere un proceso auto-inmune por mimetismo molecular entre componentes parasitarios y del huésped.

Diversos grupos han utilizado anticuerpos monoclonales como estrategia para el estudio de epitopes compartidos. El anticuerpo monoclonal CE5 de tipo IgM reconoce determinantes antigénicos en subpoblaciones de neuronas y células de miocardio de mamíferos y componentes parasitarios. Este anticuerpo tiene capacidad citotóxica *in vitro* sobre neuronas. Reconoce en ellas principalmente una banda de 60 kDa, en células de miocardio una banda de 20 kDa, mientras que en epimastigotes y amastigotes reconoce bandas entre 50-100 kDa (Wood y col., 1982).

Petry y col. (1988) comunicaron el reconocimiento por un monoclonal (VESP6.2) de glicolípidos sulfatados presentes en la superficie de tripomastigotes y en cultivos primarios de cerebelo de ratón. Utilizando un anticuerpo monoclonal (CAK20.12) con capacidad lítica sobre el tripomastigote y que reconoce en él un antígeno de 150 kDa, se observó que presenta reacción cruzada con músculo liso y estriado humano y de ratón (Zwitner y col., 1994).

Otros autores detectaron la reactividad cruzada de un antígeno de 25 kDa entre *T.cruzi* y diferentes tejidos de mamíferos (nervio y músculo). Cuando se hicieron ensayos de transferencia pasiva, empleando un anticuerpo monoclonal (DION10.1b) dirigido contra este antígeno, se observó que tenía capacidad para inducir parálisis letal en el ratón (Petry y Van Voorhis, 1991).

También se ha descrito que *T.cruzi* compartiría epitopes antigénicamente relacionados con preparaciones de ATPasa de retículo

sarcoplasmático (enzima relacionada con los ciclos de contracción-relajación) (SRA) de músculo esquelético y cardíaco (Sadigursky y col., 1982). Se ha propuesto a un antígeno de 43-45 kDa, de naturaleza glicoproteica presente en corazón y músculo esquelético normal de ratones, como probable blanco de auto-anticuerpos de isotipo IgM e IgG2b presentes en sueros chagásicos (McCormick y Rowland, 1993).

Recientemente en ratones C57BL/6 infectados con una cepa que induce cardiomiopatía, se han detectado anticuerpos dirigidos contra miosina y desmina. Se sugiere que estas proteínas podrían ser utilizadas como marcadores, ya que los mencionados anticuerpos no son generados por cepas de *T. cruzi* que no inducen cardiomiopatía (Tibbets y col., 1994).

### 8.7. CLONADO DE GENES QUE CODIFICAN ANTIGENOS DE *T. cruzi*

El clonado de genes que codifican para antígenos de *T. cruzi* se ha realizado utilizando genotecas de expresión de ADN y sueros de infecciones humanas o experimentales.

El aislamiento de antígenos por técnicas de DNA recombinante permite la obtención de moléculas definidas en grandes cantidades, lo que facilita su utilización en el estudio de mecanismos involucrados en patogénesis y/o alteraciones inmunológicas presentes en la infección por *T. cruzi*, en el mejoramiento de los métodos serológicos de uso rutinario, y en un potencial uso en inmunoprofilaxis.

Entre los antígenos recombinantes que han sido completamente secuenciados, se encuentran la proteína ribosomal P (Schijman y col., 1990), proteínas de shock térmico (Dragon, 1987; Requena y col., 1988; Engman y col., 1989), el antígeno TSA-1 (Fouts y col., 1991), cruzipaina (Campetella y col., 1992a; Eakin et al, 1992), el antígeno 2 (Buschiazzo y col., 1992) y SAPA (Pollevick y col. 1991).

Del análisis de las secuencias de antígenos clonados surge que muchos de ellos contienen unidades repetidas en tandem. Cuando se compararon las secuencias de genes presentes en diferentes aislamientos se encontró que las unidades repetidas eran casi idénticas. Es decir, estas regiones están altamente conservadas en diferentes aislamientos de *T. cruzi* (Frasch y col., 1991) y no presentan homologías con otras especies de parásitos, a excepción de la descrita entre la región repetida de 38 aa del antígeno

36 (Ibañez y col., 1988 ; Levin y col., 1989) y la proteína asociada a microtúbulos (MAP) de *T. brucei* (Schneider y col., 1988).

En cuanto a la función de cada una de ellas es poco lo que se sabe.

Las proteínas ribosomales P han sido relacionadas con posibles procesos auto-inmunes (Levin y col.,1989 ; Skeiky y col., 1993), así como el antígeno FL-160 ubicado en superficie y flagelo del parásito, que presenta reacción cruzada con tejido nervioso (Van Voorhis y Eisen, 1989). Recientemente se ha comunicado que un exoantígeno (CEA 160-1), que induce anticuerpos sólo en la fase crónica y que permanecen por largos períodos pi (Jazin y col., 1991), pertenece a la familia FL-160 (Jazin y col., 1995; Van Voorhis y col., 1993). Los epitopes que presentan reacción cruzada con tejido nervioso humano no están presentes en el antígeno CEA 160-1, sin embargo, sí podría contener otros epitopes relacionados, ya que Van Voorhis y col. (1991) sugieren que habría más de un epítopo responsable de la reacción cruzada con proteínas de nervio.

La proteína de fusión Epl/9, que es reconocida por un anticuerpo monoclonal dirigido contra la fracción flagelar, mostró propiedades protectoras en ratón cuando fué utilizada en ensayos de protección (Porcel y col., 1992). El recombinante que codifica para un antígeno de secreción de 24 kDa, contiene epitopes T relacionados con protección (Taibi y col.,1993).

Se ha comunicado el clonado del dominio funcional del T-DAF (Trypomastigote Decay-Accelerating Factor), glicoproteína de 87-93 kDa con capacidad inhibitoria de la C3 convertasa presente en tripomastigotes (Tambourgi y col.,1993).

Algunos antígenos que fueron propuestos con potencial uso en diagnóstico serológico, presentaron características similares aunque fueron clonados y caracterizados separadamente por diferentes grupos de investigadores: Ag1/FRA/JL7 (Ibañez y col.,1988; Lafaille y col.,1989; Krieger y col.,1992; Levin y col.,1989); Ag30/CRA/JL8 (Ibañez y col.,1988; Lafaille y col.,1989; Krieger y col.,1992; Levin y col.,1989); Ag2/TCR39 (Ibañez y col.,1988; Hoft y col.,1989); GP 57/51/cruzipaína (Arnholdt y col., 1993; Campetella y col.1992a; Eakin y col., 1992). Así como los antígenos denominados SAPA (Afranchino y col,1989), H49 (Paranhos-Bacalla y col.,1994) y B12-B13 (Gruber y Zingales, 1993).

Entre las moléculas clonadas que han sido relacionadas con invasión celular se encuentran el antígeno (MTS-gp90) de 90 kDa (Franco y col.,1993), la penetrina (Pereira y col.,1991) y la trans-sialidasa (Pollevick y col.,1991): El primero también ha sido relacionados con protección en ensayos realizados con la proteína nativa (González y col., 1991)

Ortega Barria y Pereira (1991) identificaron una proteína de 60 kDa ubicada en la superficie del tripomastigote, la que fue denominada penetrina. Esta proteína promueve la invasión celular, induce la adhesión selectiva de tripomastigotes a heparina, heparan sulfato y colágeno, (componentes de la matriz extracelular) y promueve la adhesión y expansión de fibroblastos. Los mismos efectos se obtuvieron cuando se empleó la proteína recombinante expresada en *E. coli*. Más aún, las bacterias que expresaban esta proteína en superficie adquirirían capacidad de invadir células no fagocíticas.

La trans-sialidasa (TS) de *T. cruzi* es un antígeno que fue descrito independientemente como SAPA ("Shed Acute Phase Antigen") (Pollevick y col.,1991; Afranchino y col.,1991), y como una neuraminidasa (NA) (Pereira y col.,1991). Es secretado al medio y está anclado por GPI a la membrana plasmática de los tripomastigotes (Hall y col.,1992).

SAPA/TS/NA es una familia de proteínas constituidas por dos dominios, uno antigénico que contiene unidades repetitivas de 12 aminoácidos ubicados en el extremo C-terminal, y otro dominio que contiene el sitio catalítico y que carece de unidades repetidas ubicado en el extremo amino de la molécula (Pereira y col., 1991; Pollevick y col., 1991; Campetella y col., 1994). El dominio antigénico define el antígeno SAPA que induce una fuerte respuesta humoral humana (Afranchino y col., 1989; Reyes y col., 1990). Esta región (SAPA) juntamente con los antígenos 1, 2, 30 y 36 han sido postulados como posibles marcadores de la etapa aguda y crónica de la infección, respectivamente (Afranchino y col., 1989 ; Reyes y col., 1990).

Diferentes resultados han sugerido que esta enzima juega un papel importante en invasión celular. El epitope Ssp-3, ubicado en superficie del parásito e involucrado en invasión celular, requiere estar sialidado (Andrews y col., 1987; Schenkman y col., 1992). Cuando se utilizan anticuerpos monoclonales anti-Ssp3 estos inhiben la unión del parásito a la célula huésped (Schenkman y col.,1991). Por otra parte, el nivel de

infección de una línea de células mutantes Lec2, que tienen baja expresión de ácido siálico en superficie, es significativamente menor que el de las células parentales. Cuando se resialida la superficie de las células Lec2, el nivel de infección por *T.cruzi* alcanza el de las células madres (Ming y col., 1993; Shenkman y col., 1993a). La expresión de esta enzima está regulada en los distintos estadios parasitarios. En el epimastigote se expresa una molécula con actividad enzimática, que carece de la región con unidades repetidas (SAPA) (Chaves y col., 1993).

*T.cruzi* es incapaz de sintetizar ácido siálico; su fuente son los glicoconjugados del huésped. Se ha propuesto que la mayoría del ácido siálico es transferido a una glicoproteína tipo mucina de 35-50 kDa, presente en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos (Shenkman y col., 1993b). Se ha aislado un gen que codifica para el "core" proteico de una mucina, que contiene 5 unidades repetidas de once aminoácidos, ocho de los cuales son Thr y dos son Pro, secuencia que recuerda la de las mucinas humanas (Reyes y col., 1994). Se especula que la sialidación-desialidación de las mucinas (u otras moléculas) podría estar relacionada con la interacción parásito-células epiteliales del insecto vector. Esta actividad ha sido recientemente detectada en los tripomastigotes procíclicos de *T.brucei* y *T.congolense*, especies que aún conservan la transmisión vectorial, mientras que en aquellas que la perdieron, *T.evansi* y *T.equiperdum*, los tripomastigotes sanguíneos carecen de esta actividad (Frasch, 1994).

Otra función que se ha propuesto para esta molécula es su posible participación como NA en el escape de la vacuola parasitófora hacia el citoplasma. La remoción de grupos siálicos, que contribuyen a mantener la integridad de la membrana parasitófora (Hall y col., 1992), facilitaría la acción de la TcTox (posible proteína formadora de poro que ha sido involucrada en el escape al citoplasma) (Andrews y col., 1990).

También se ha estudiado la importancia de la sialidación en la resistencia a la lisis del complemento del estadio tripomastigote, y se ha concluido que el ácido siálico podría contribuir pero no sería responsable de la gran resistencia que presenta este estadio (Tomlinson y col., 1994).

La TS pertenece a una superfamilia de antígenos de superficie que contienen en el extremo amino de la región repetitiva secuencias homólogas (Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Trp) las cuales están conservadas en

neuraminidasas bacterianas. Los antígenos que los contienen son agrupados en diferentes familias según el grado de homología entre ellas. El PM varía entre 85 a 130-200 kDa y están presentes en el estadio infectivo. La familia del SAPA/TS/NA, tiene un 80% de homología y contienen miembros con o sin actividad enzimática, éstos últimos difieren en la región aminoterminal. Las familias TSA-1, Tt34cI, SA 85-1 y Tc-13, contienen miembros sin actividad enzimática. La baja homología con la familia de TS se da en la región del amino y pueden contener o no regiones con unidades repetitivas (Campetella y col., 1992b).

Lo expresado hasta aquí muestra la extrema complejidad antigénica de este parásito y el estado actual de los estudios sobre su funcionalidad.

El presente trabajo de tesis intenta analizar la funcionalidad de algunos antígenos definidos.

## OBJETIVOS

1.- Estudiar la expresión de los antígenos 1, 2, 13, 30, 36 y SAPA en:

- tripomastigotes sometidos a diferente presión inmunológica, con el fin de estudiar posibles causas del cambio de especificidad de la respuesta humoral humana desde el estadio agudo al crónico.

- tripomastigotes que poseen diferente capacidad infectiva, y epimastigotes (no infectivo) con el fin de evaluar la posible relación de estos antígenos con infectividad.

2.- Análisis de la respuesta humoral hacia los antígenos 1, 2, 13, 30, 36 y SAPA en diferentes etapas de la infección utilizando diferentes cepas de ratones y cepas de *T.cruzi*. Con el fin de relacionar el tipo de respuesta obtenida y las variables mencionadas.

Luego del análisis de los antígenos de *T.cruzi* como se menciona en 1 y 2, se seleccionó la trans-sialidasa para profundizar los estudios ya que esta actividad que está presente en la misma molécula que el antígeno SAPA ha sido relacionada con el proceso de invasión celular.

3.- Análisis de la respuesta humoral hacia el dominio enzimático (trans-sialidasa) presente en el antígeno SAPA/TS, en el modelo murino y en el humano.

## MATERIALES Y METODOS

### 9.- OBTENCION DE DIFERENTES ESTADIOS DE *Trypanosoma cruzi*.

#### 9.1- ESTADIO EPIMASTIGOTE.

El estadio epimastigote de las diferentes cepas de *T.cruzi* utilizadas RA, Y, Tulahuén, Sonia y Dm28c fue crecido a 28°C en cultivos axénicos utilizando extracto de cerebro-corazón y triptosa (BHT) (Difco) como medio de cultivo, adicionado con 5% suero fetal bovino inactivado (Gibco), 100 UI/ml penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomicina.

#### 9.2- ESTADIO TRIPOMASTIGOTE

##### 9.2.1.- Tripomastigotes sanguíneos.

Para purificar los tripomastigotes sanguíneos provenientes de ratones eutímicos o atímicos, los animales infectados fueron sangrados por punción cardíaca, durante el pico de parasitemia. La sangre heparinizada fue centrifugada a 100g durante 15 min y luego incubada a 37°C durante 1 h para permitir a los parásitos acceder al sobrenadante. Luego el plasma conteniendo los tripomastigotes se centrifugó a 12.000g durante 20 min y el sedimento se lavó tres veces con PBS-5% albúmina. El recuento de parásitos totales se realizó en cámara de Neubauer.

### 9.2.2- Tripomastigotes de cultivos celulares

Para la producción de tripomastigotes se emplearon células Vero mantenidas en MEM (Gibco) adicionado con 5% de suero fetal bovino (Gibco), 100 UI/ml penicilina, 0,1 mg/ml estreptomycin y 2 mM glutamina (Gibco). Las monocapas fueron infectadas con  $10^6$  tripomastigotes (cepa RA). Luego de 16 h de interacción se lavaron y posteriormente se agregó medio de cultivo adicionado de 5% de suero fetal bovino. Al cabo de 5-6 días se cosecharon los tripomastigotes a partir del medio que los contenía centrifugándolos a 12.000 g y luego incubando el precipitado a 37°C durante 1 h para permitir el pasaje de los tripomastigotes al sobrenadante. Este se centrifugó a 12.000 g y los parásitos contenidos en el sedimento se lavaron dos veces con MEM-5% albúmina bovina. El procesamiento posterior de los parásitos dependió de los ensayos a realizar.

El seguimiento de los niveles de parásitos circulantes en ratones, se realizó analizando 10  $\mu$ l de sangre periférica en 90  $\mu$ l de solución de lisis para glóbulos rojos. La lectura obtenida en cámara de Neubauer se multiplicó por un factor ( $10^4$ ) y por la dilución utilizada.

## 10.- CEPAS Y CLONES DE *T. CRUZI*

Se utilizaron las siguientes cepas y clones:

RA: cepa aislada de un paciente en la etapa aguda de la enfermedad (González Cappa y col., 1981). En el modelo murino se comporta como una cepa letal. Los ratones Rockland de 21 días inoculados con  $2 \times 10^5$  parásitos, mueren a los 7 días pi., mientras que los ratones C3H/HeN (sensibles) de 2 meses de edad, inoculados con 50 parásitos, mueren a los 18-20 días pi. En cuanto al tropismo tisular, se la define como pantrópica. Esta cepa se mantiene por pasajes seriados en ratones eutímicos.

K-98: este clon deriva de la cepa CA-I, aislada de un paciente en la etapa crónica de la infección (González Cappa y col, 1980a). Los ratones infectados con este clon desarrollan cronicidad, alcanzando un 80% de

sobrevida. Se la define por su tropismo como miotrópica (Celentano y col., 1992). Tanto el clon como la cepa madre se mantienen por pasajes seriados en ratones eutímicos.

Tulahuén 2: línea de la cepa Tulahuén (Pizzi, 1956), obtenida en el Instituto Fatale Chabén.

Las cepas Y (Silva y Nussenweig, 1953) y Sonia fueron obtenidas del Instituto Fatale Chabén.

El clon Dm28c fue suministrado por el Dr. A. Morello de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Contreras y col., 1985).

Los sueros de ratones Swiss infectados con los aislamientos G1, G2, G8, G9, TCC y Tulahuén fueron gentilmente proporcionados por el Dr. Miguel A. Basombrío de la Universidad Nacional de Salta.

## 11.- CEPAS DE RATONES.

Las cepas Rockland y C3H son mantenidas en el bioterio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, UBA.

Las cepas C57BL/6J, C57BL (*nu/nu*) y Balb/cJ son mantenidas en el bioterio del Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia.

La cepa NIH (*nu/nu*) fué obtenida de la Comisión Nacional de Energía Atómica, Ezeiza, Buenos Aires.

La cepa Swiss es mantenida en el bioterio del Laboratorio de Patología Experimental, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta.

El esquema de infección de las diferentes cepas de ratones con distintas cepas de *T. cruzi* se describe en la sección correspondiente del capítulo Resultados.

## **12.- PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS.**

### **12.1.- ORIGEN DE LOS SUEROS HUMANOS.**

Se estudiaron 6 casos de pacientes en la etapa aguda de la enfermedad de Chagas. La edad osciló entre 6 y 21 años. Todos presentaron signo de Romaña con diferentes tiempos de evolución (entre 5 y 30 días) al momento de la toma de la primer muestra de sangre. Luego de iniciado el tratamiento anti-parasitario se tomaron, en todos los casos, muestras a diferentes tiempos post-tratamiento. Estos sueros provienen del Instituto de Investigaciones de la Salud (I.I.C.S.), Asunción, Paraguay. También se analizaron 6 casos de niños con infección congénita y de sus madres infectadas y 10 casos de niños normales y de sus madres chagásicas. La primera muestra se tomó el día del nacimiento o 5 días después de nacidos. En los casos de infección congénita se realizaron seguimientos post-tratamiento, hasta obtener la negativización parasitológica y serológica para las pruebas de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e IFA (Indirect Immunofluorescence Assay). En los casos de niños no infectados se realizó seguimiento serológico de las inmunoglobulinas maternas hasta su negativización. Estos sueros fueron obtenidos de la Maternidad del Hospital de Clínicas, Asunción, Paraguay. Los 37 sueros de pacientes crónicos y los 17 de individuos normales estudiados provienen de diferentes bancos de sangre de la ciudad de Buenos Aires.

### **12.2- DIAGNOSTICO PARASITOLOGICO**

El diagnóstico de pacientes agudos y congénitos se realizó mediante la detección de tripomastigotes, ya sea por microhematocrito (Freilij y col., 1983) y/o hemocultivo (Camargo y Takeda, 1979). El diagnóstico de pacientes en la etapa crónica se realizó por hemoaglutinación indirecta, ELISA o IFA. Los ELISA se realizaron mediante el uso de un kit desarrollado en el I.I.C.S.(Kaspar y col., 1988) utilizando lisado de epimastigotes y como segundo anticuerpo anti-IgG o anti-IgM humanas. Los IFA se realizaron empleando epimastigotes enteros de acuerdo a lo descripto por Camargo y col. (1966) y anti-IgG o anti-IgM humanas conjugadas con fluoresceína.

### 12.3- TRATAMIENTO PARASITARIO.

Los pacientes con infección congénita ó aguda fueron tratados con Benznidazol (7mg/kg/día durante dos meses) en la Maternidad del Hospital de Clínicas o en el I.I.C.S., Asunción, Paraguay. Durante las primeras 48 h de tratamiento los pacientes recibieron la mitad de la dosis mencionada.

### 13.- OBTENCION DE ANTIGENOS RECOMBINANTES.

Los antígenos recombinantes analizados fueron obtenidos a partir del *screening* inmunológico de una genoteca de expresión construída con DNA genómico de *T. cruzi* en  $\lambda$  gt11 (Ibáñez y col., 1987). Los productos de los genes clonados se expresan como proteínas de fusión con  $\beta$ -galactosidasa. Algunos insertos fueron subclonados en el vector pGEX1 (Pharmacia) que produce una proteína de fusión con glutatión-S-transferasa de *Schistosoma mansoni* (GST).

Para realizar el *screening* de la biblioteca de expresión, se adsorvieron los fagos a bacterias *E. coli* Y1090 durante 20 min a temperatura ambiente las que luego se plaquearon contenidas en un "top" de medio LB-0.75% agarosa-10mM SO<sub>4</sub>Mg a 50°C sobre cajas de Petri con LB-1.5% agar-100 ug/ml ampicilina. Las cajas de Petri fueron incubadas a 42°C hasta la aparición de placas de lisis momento en el que se colocó un filtro de nitrocelulosa impregnado con 10mM IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranósido) continuándose la incubación por 2h más a 37°C. Luego de orientar el filtro con marcas de tinta china, se lo retiró y se colocó otro en las mismas condiciones que antes pero continuando la incubación durante toda la noche. Los filtros fueron luego lavados en TBS (ClNa 150 mM Tris-ClH 50mM pH 7,6) y bloqueados en TBS-3% BSA incubándoselos por una hora en una solución de TBS-3% BSA conteniendo el antisuero a ensayar. Luego de tres lavados de 10 min en TBS, los filtros fueron sumergidos durante una hora en una solución de TBS-3% BSA conteniendo 10<sup>6</sup> cpm/ml de <sup>125</sup>I-proteína A. Luego de lavar tres veces con TBS se los trató durante 10 min con TBS-0.1% NP40 y se los lavó dos veces más en TBS. Luego de secarlos se los expuso a -70°C con película radiográfica (Kodak X-Omat) en presencia de pantallas intensificadoras.

#### 14.- INDUCCION Y PURIFICACION DE PROTEINAS DE FUSION.

##### 1).- Vector $\lambda$ gt11.

Se emplearon bacterias *E.coli* Y-1089 crecidas durante 16 h en medio LB adicionado con ampicilina (100  $\mu$ g/ml),  $\text{SO}_4\text{Mg}$  10 mM y maltosa 0,2%. Luego fueron incubadas con fagos recombinantes ( $10^9$  ufp/ml) durante 20 min a 37°C para permitir su adsorción y sembradas en 300 ml de LB conteniendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y  $\text{SO}_4\text{Mg}$  10mM. Después de incubar con agitación durante 3 h a 35°C, se indujo la lisis bacteriana a 45°C durante 20 min. A continuación se indujo la proteína recombinante mediante el agregado de 5mM final de IPTG y se continuó la incubación a 37°C durante 3 h más. Las bacterias fueron centrifugadas y el sedimento se resuspendió en 50 mM Tris-ClH pH 7,6; 100 mM NaCl; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 0,2 mM PMSF (fluoruro de fenil-metil-sulfonilo). Luego fueron sometidos a dos ciclos de congelamiento y descongelamiento a -70°C o nitrógeno líquido y posteriormente fueron tratadas con DNAasa.

Para purificar las proteínas de fusión inducidas, se realizaron electroforesis preparativas en geles de SDS-poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1990). Finalizada la corrida electroforética se cortó el gel a la altura donde se encontraba la proteína de interés y luego extraída por electroelución. Posteriormente fueron cuantificadas por el método de Bradford (1976) previo tratamiento con KCl 100 mM para precipitar el SDS.

##### 2).- Vector pGEX

Se transformaron bacterias *E. coli* HB101 las que fueron cultivadas 16 h a 37°C con agitación, y luego inoculadas a un litro de medio de cultivo. Posteriormente durante 2 h a 37 °C con agitación, se indujo la síntesis de la proteína de interés con IPTG 0,1 mM final, continuándose la incubación 3 h más. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación y el sedimento sonicado y tratado con lisozima y DNAasa previa adición de PMSF 0,1 mM.

El lisado fué centrifugado 10.000g durante 1 h y el sobrenadante se aplicó en una columna de Glutación-Sepharosa (Pharmacia) de donde se eluye la proteína de fusión con glutatión reducido (Sigma).

#### **15.- OBTENCION DE ANTICUERPOS EN CONEJO.**

Para la obtención de anticuerpos policlonales se inyectaron conejos por vía subcutánea, con 100  $\mu$ g de proteína recombinante purificada y emulsionada en adyuvante de Freund completo. A los 15 días se inoculó la misma cantidad de antígeno pero emulsionado en adyuvante incompleto de Freund. A los 30 días de la primera inoculación se realizó una sangría exploratoria para buscar anticuerpos específicos siguiendo lo descrito en el punto 19 de esta sección. Previa verificación de su reactividad los conejos fueron sangrados a blanco por punción cardíaca a los 45 días. Los antígenos recombinantes utilizados son los denominados 1, 2, 13, 30, 36 y SAPA (Ibañez y col., 1987).

#### **16.- SELECCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-SAPA.**

De una serie de anticuerpos monoclonales anti-SAPA murinos, obtenidos en el Instituto Karolinska (Estocolmo, Suecia) por el Dr. Anders Orn, se seleccionaron los dos que presentaron mayor reactividad anti-SAPA: Mab-SAPA1 y Mab-SAPA2, utilizando el antígeno SAPA recombinante, de acuerdo a lo descrito en 19.

Los hibridomas fueron mantenidos en D-MEM (GIBCO 430-2100), adicionado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO), glutamina 2 mM (GIBCO), estreptomycin (0,1 mg/ml), penicilina (100 UI/ml).

## 17.- DETECCION DE ANTÍGENOS EN TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS.

La expresión de los antígenos 1, 2, 13, 30, 36 y SAPA se estudió empleando gamma-globulinas obtenidas por precipitación de los inmunosueros con sulfato de amonio. Los parásitos sanguíneos se obtuvieron a partir del pico de parasitemia de ratones eutímicos o *nude* infectados con la cepa RA de *T. cruzi*. La sangre infectada fué centrifugada a 100 g durante 5 minutos y posteriormente incubada a 37°C durante 60 minutos. Los tripomastigotes fueron obtenidos a partir del sobrenadante y luego lavados dos veces con PBS-5% albúmina. La fijación se realizó con p-formaldehído 3% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Luego de dos lavados, los parásitos se permeabilizaron incubándolos en Tween-20 1% en PBS durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavados dos veces en PBS, incubados con las gamma-globulinas correspondientes y con el anticuerpo monoclonal anti-SAPA (Mab SAPA1) biotinilado. Luego de dos lavados con PBS, se adicionaron inmunoglobulinas anti-gamaglobulinas de conejo marcadas con fluoresceína obtenidas en cerdo (Dako-patts, Dinamarca) y estreptoavidina marcada con ficoeritrina-R (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA). Las células fueron nuevamente lavadas dos veces con PBS y analizadas por citometría de flujo en un FACScan Becton-Dickinson.

El anticuerpo monoclonal MAb-SAPA1 fue biotinilado utilizando N-hidroxisucinimidil biotina (10mg/ml) en dimetil sulfóxido y una solución de anticuerpo de 2mg/ml en buffer borato de sodio siguiendo lo descrito por Harlow y Lane (1988).

Los ensayos de marcación simple se realizaron siguiendo el protocolo antes descrito sin el agregado del monoclonal anti-SAPA ni la estreptoavidina marcada.

## **18.- DETECCION DE ANTIGENOS EN EPIMASTIGOTES.**

Los epimastigotes fueron cosechados de cultivos axénicos en los días 2, 4, 6, 8, 10 y 12. Posteriormente fueron lavados dos veces con PBS, fijados, permeabilizados y analizados por citometría de flujo según se describe en 17.

## **19.- DETECCION DE ANTICUERPOS EN SUEROS DE ANIMALES INFECTADOS O INMUNIZADOS.**

### **19.1.- MARCACION DE PROTEINA A CON $^{125}\text{I}$**

Para la marcación se utilizó el método del Iodogen. En tubos conteniendo Iodogen (Pierce) en sus paredes se hicieron reaccionar 50  $\mu\text{g}$  de proteína A (Sigma), 40  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato 50 mM pH 7,4 y 1 mCi de  $^{125}\text{I}\text{Na}$  durante 10 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se trasladó a un tubo conteniendo 10  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol 10% y posteriormente se pasó por una columna de Sephadex G-50 (Sigma), con el objeto de separar el  $^{125}\text{I}$  libre de la proteína iodada. La elución se realizó con PBS. Se colectaron las muestras correspondientes al primer pico conteniendo  $^{125}\text{I}$ -proteína A.

### **19.2.- OBTENCION DE ANTIGENOS RECOMBINANTES SOBRE FILTROS DE NITROCELULOSA.**

Sobre placas de Petri se sembró un césped de bacterias *E. coli* Y-1089, y posteriormente 1  $\mu\text{l}$  conteniendo cada uno de los diferentes fagos recombinantes ( $10^9$  ufp/ml.). Como control se utilizó lambda gt11 sin inserto. Luego se incubaron a 42°C hasta obtener placas de lisis y se colocaron sobre ellas filtros de nitrocelulosa previamente embebidos en IPTG 10 mM y secados. Para inducir los antígenos recombinantes, las placas fueron incubadas a 37°C durante 3 h y posteriormente, los filtros fueron retirados para ser utilizados en el análisis de los sueros de animales infectados o inmunizados.

### 19.3.- ADSORCION DE LOS SUEROS CON LISADO DE BACTERIAS.

Se utilizaron bacterias *E.coli* Y-1090 crecidas en medio LB conteniendo ampicilina. El cultivo se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 1 ml de agua por cada 100 ml de medio de cultivo. A continuación se calentó 10 min a 100°C y se congeló alicuotado a -20°C.

Para la adsorción se utilizó 1 ml de bacterias lisadas por cada 100 ml de suero diluido en TBS-3% leche descremada-2% glicina (solución de bloqueo) y se incubó durante 3h a 4°C con agitación suave. Luego se centrifugó y el sobrenadante se conservó alicuotado a -20°C.

### 19.4 - ANALISIS DE SUEROS DE ANIMALES INFECTADOS O INMUNIZADOS.

Los filtros preparados según 19.2 se lavaron en TBS durante 5 min, y luego se incubaron en solución de bloqueo durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se los incubó con los diferentes sueros (dilución 1/100), previamente adsorbidos con lisado de bacterias. Luego se realizaron cuatro lavados con TBS y posteriormente se incubó con proteína A marcada con  $^{125}\text{I}$  ( $10^6$  cpm/ml) durante 1 h. A continuación se realizaron tres lavados con TBS, un lavado con TBS-0,1% NP-40 y dos lavados con TBS. Los filtros secos se expusieron en contacto con películas radiográficas (Kodak X-Omat) a -70°C en presencia de pantallas intensificadoras (Dupont-Kronex).

## 20.- ENSAYOS DE BLOQUEO DE LA INVASION CELULAR

Los tripomastigotes ( $10^6$ ) purificados según lo descrito en 9.2.2 fueron incubados con los diferentes sueros a diluciones no aglutinantes a 37°C durante 20 min. Posteriormente fueron incubados con monocapas de células Vero durante 2 h a 37°C. Luego las monocapas fueron lavadas exhaustivamente, y la incubación se prolongó hasta las 72 h pi., para permitir la replicación del estadio intracelular, facilitando de esta manera

la posterior lectura. Esta se realizó sobre monocapas fijadas con éter-alcohol [2:1 (vol.:vol)] y teñidas con Giemsa.

## **21.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE TRANS-SIALIDASA.**

Las determinaciones se realizaron empleando 20  $\mu$ l de un lisado de parásitos o de suero entero o diluido en PBS, más sialil-lactosa 1 mM [lactosa-N-acetilneuramínico, una mezcla de 72% de isómero  $\alpha$ 2-3 y 28% de  $\alpha$ 2-6 (Sigma, St. Louis, Mo.)], 50 mM PIPES [piperazina-N,N'-bis (2-etansulfónico)] (pH 7,0); 0,4 nmol (aproximadamente 40.000 cpm.) de lactosa- $^{14}$ C (54,3 mCi/mmol Ammersham, Little Chalfont, United Kingdom). Luego de 1 h de incubación a 37°C, la reacción se detuvo con el agregado de 1 ml de agua y posteriormente se agregan 100  $\mu$ l de una suspensión densa de QAE-Sephadex A-25 (Sigma). A continuación se realizaron tres lavados con 1 ml de agua y posteriormente el material adsorbido se eluyó con formiato de amonio 1 M y se cuantificaron las cuentas por minuto.

## **22.- TRATAMIENTO CON NEURAMINIDASA (NA) DE *Clostridium perfringens***

Luego de la hora de incubación para la reacción de TS, se agregaron 0,01 U de NA de *C. perfringens* [tipoX (Sigma)] durante 30 min. En los controles se realizaron incubaciones de 90 min sin el agregado de NA. Las reacciones fueron detenidas con 1 ml de agua y posteriormente procesadas como se describe en 24.

## **23.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE TRANS-SIALIDASA EN TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS.**

Para medir la actividad de TS en lisado de tripomastigotes sanguíneos, se inocularon ip. ratones atímicos NIH (*nu/nu*) con 50 parásitos de la cepa RA o con  $10^5$  parásitos del clon K-98. Los ratones fueron sangrados en el

pico de la parasitemia, los tripomastigotes purificados de acuerdo a lo descrito en 9.2 y lisados en Tritón X-100 1%, PMSF 1 mM, TLCK (N-p-tosil-L-lisilcloro-metilcetona) 0,5 mM, O-fenantrolina 5 mM, 0,5 mM E64 [trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidin) butano] (todos obtenidos de Sigma). El lisado fué centrifugado a 10.000g durante 10 min y 20 µl del sobrenadante (equivalente a  $2 \times 10^6$  parásitos) se utilizaron para ensayar la actividad de TS según se describe en 21.

#### **24.- ELECTROFORESIS EN PAPEL**

Luego de detener las reacciones de TS con agua destilada, las muestras fueron tratadas con Sephadex G-25 (NAP-10, Pharmacia-LKB, Uppsala, Suecia) para eliminar las proteínas séricas. El volumen incluido fue secado y resuspendido en 20 µl de agua y sometido a electroforesis en papel Whatman N°1 a 25 V/cm durante 2 h. El buffer empleado fue piridina-ácido acético-agua [1:0,04:9 (vol.:vol.:vol)] pH6,5. Como marcadores se utilizaron lactosa y sialil-lactosa (Sigma).

#### **25.- PURIFICACION DE ANTICUERPOS UTILIZANDO PROTEINA A.**

Los sueros diluídos 1/40 en PBS fueron incubados con un volumen igual de una suspensión de proteína A-Sepharosa (Sigma) al 50 % en PBS. Luego de 30 min de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, el sobrenadante se descartó y la resina se lavó tres veces con 1 ml de PBS cada vez. La elución de los anticuerpos se realizó utilizando 50 µl de glicina-ClH 0,1 M pH 2,6 durante 5 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante conteniendo los anticuerpos fue neutralizado con 10 µl de Tris-ClH 1 M pH 9,5.

## **26.- ENSAYOS DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE TRANS-SIALIDASA.**

En estos ensayos se utilizó TS nativa (Afranchino y col., 1989) o recombinante (Campetella y col., 1994). La proteína nativa fué obtenida del sobrenadante de cultivos celulares y purificada por columna de afinidad, construída con un anticuerpo policlonal monoespecífico dirigido hacia la región repetitiva de la molécula, acoplado a Sepharosa 4-B activada con CNBr (Pharmacia), la elución de la proteína se realizó con glicina-HONa 0,1 M pH11 y colectada en Tris-ClH 1M pH6,8. El desalado del pico que contenía actividad se realizó en Sephadex G 50 [Columna NAP10, (Pharmacia)] equilibrada en buffer TBS. La TS recombinante fué obtenida a partir de la fracción soluble de bacterias que contenían DNA recombinante (Tc-TS1N1) que expresa el dominio enzimático de la molécula de TS (Campetella y col., 1994).

La reacción se realizó incubando suero o anticuerpos purificados según se describe en 25, más TS nativa (2  $\mu$ l) o TS recombinante (10  $\mu$ l) durante 10 min a temperatura ambiente, la actividad remanente se midió siguiendo lo descrito en 21.

## **27.- ENSAYOS DE "DOT SPOT" PARA EL ANALISIS DE SUEROS DE RATONES INFECTADOS.**

Con el fin de analizar la presencia de anticuerpos dirigidos hacia la región repetitiva (SAPA) de la molécula de TS en suero de ratones infectados, se empleó una proteína recombinante que contenía dicha región expresada en el vector pGEX (Pharmacia-LKB). Esta proteína fué purificada empleando una columna de afinidad de Sepharosa-glutación (Pharmacia).

Se sembró 1  $\mu$ l de una solución que contenía 4  $\mu$ g de SAPA-GST o bacterias transformadas con pGEX sobre filtro de nitrocelulosa, los que fueron bloqueados con PBS-leche descremada 3%. A continuación se los incubó 30 min con los sueros diluídos 1/20 o 1/50 en TBS. Luego de ser lavados con TBS se incubaron con IgG de cabra anti-ratón conjugada con

fosfatasa alcalina (1/2.000) (Promega, Chicago, Ill.). La reacción fué revelada con BCIP (Fosfato de 5-Br-4-Cl-3-indoilo) 15 mg/ml en NN'-dimetil formamida 100% y NBT (azul de nitrotetrazolio) 30 mg/ml en NN'-dimetil-formamida al 70%.

## RESULTADOS

### I. ANALISIS DE LA EXPRESION DE ANTIGENOS EN *Trypanosoma cruzi*.

#### ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Mediante el *screening* con sueros de pacientes chagásicos de una genoteca de ADN genómico de *T.cruzi*, construída en el vector de expresión  $\lambda$  gtl1, se obtuvo una serie de antígenos del parásito en forma recombinante los que fueron llamados 1, 2, 13, 30, 36 y SAPA ("Shed Acute Phase Antigen") (Ibañez y col., 1987). Todos estos antígenos proteicos contienen secuencias de aminoácidos que se repiten en tándem de distintas medidas y composición. Diferentes aislamientos de *T.cruzi* provenientes de Bolivia, Brasil y Argentina contienen los genes que codifican para estos antígenos. Sólo se encontraron variaciones en el número de unidades repetitivas de los diferentes aislados y por lo tanto los antígenos homólogos varían en tamaño (Macina y col., 1989). Sin embargo, a juzgar por la reactividad inmunológica observada, los epitopes presentes en las unidades repetitivas parecen estar altamente conservados. Estos resultados sugieren que los parásitos obtenidos en diferentes regiones geográficas expresan epitopes homólogos ya que los sueros empleados fueron colectados de pacientes provenientes de diferentes países de América Latina. El 96% de los sueros de pacientes en la etapa aguda poseen anticuerpos anti-SAPA, lo que llevó a proponer a este antígeno como un marcador de la etapa aguda de la infección humana (Afranchino y col., 1989). En menor proporción, en la etapa aguda también se detectan anticuerpos anti-13 y anti-36. Los sueros de pacientes en la etapa crónica pierden la reactividad anti-SAPA y presentan respuesta contra los antígenos 1, 2, 30 y 36 (Afranchino y col., 1989). También se ha comprobado que en recién nacidos congénitamente infectados, la respuesta está principalmente dirigida contra el antígeno SAPA (Reyes y col., 1990). Cabe destacar que ninguno de estos antígenos

es detectado por sueros de pacientes con leishmaniasis (Kala-azar), toxoplasmosis o por sueros de individuos no infectados de Argentina y Brasil.

El cambio en la reactividad de los anticuerpos circulantes del periodo agudo (reactividad con SAPA) al crónico (reactividad con los antígenos 1, 2 y 30) podría deberse a una estrategia del parásito que podría en principio incluir variación antigénica o expresión diferencial de estos antígenos a lo largo del proceso infeccioso.

Los objetivos de los ensayos descritos en este capítulo fueron analizar la expresión de los antígenos recombinantes 1, 2, 13, 30, 36 y SAPA en tripomastigotes sometidos a diferente presión inmunológica con el fin de estudiar las causas del cambio de especificidad de la respuesta inmune humoral humana y el estudio de la posible relación de los mencionados antígenos con la capacidad infectiva del parásito.

Para poder realizar los estudios de expresión antigénica en las diferentes poblaciones y estadios del parásito, debió procederse en primer lugar a la obtención de parásitos permeabilizados y a analizar la reactividad de los sueros específicos dirigidos contra los diferentes antígenos así como de los anticuerpos monoclonales anti-SAPA.

#### I. 1.- PERMEABILIZACION DE LOS PARASITOS Y REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS POLICLONALES Y MONOCLONALES.

La puesta a punto de la permeabilización de parásitos se realizó empleando Tween-20 sobre epimastigotes fijados con para-formaldehído. Como marcador interno de permeabilización utilizamos un antisuero dirigido hacia la enzima glutamato deshidrogenasa (GDh) de ubicación citoplasmática (Duschak y Cazzulo, 1991), asegurándonos de esta forma que con la metodología empleada se exponían tanto los antígenos internos como los de superficie. Los ensayos de inmunofluorescencia realizados con este antisuero se llevaron a cabo utilizando cuatro cepas diferentes de *T. cruzi*, Sonia, Tulahuén, Dm28c y RA. De las diferentes condiciones experimentales ensayadas variando las concentraciones del detergente

utilizado y tiempos de exposición al mismo, la que resulto más adecuada es la que detallamos en materiales y métodos. Brevemente, se tratan los parásitos con 1% de Tween-20 durante una hora a temperatura ambiente. Otra concentración de detergente y menor tiempo de acción no permitieron detectar un marcador interno (GDh), mientras que exposiciones más prolongadas no mejoraban la reactividad. En la Fig. 1 se puede observar que en el análisis por FACS todas las cepas fueron positivas para el antígeno empleado.

Cuando se evaluaron los sueros obtenidos en conejo dirigidos hacia los antígenos recombinantes 1, 2, 13, 30, 36 y SAPA, éstos reaccionaron específicamente sólo con los antígenos utilizados en la inmunización, a excepción del antígeno SAPA que presentó reacción cruzada con el antígeno 36 (Fig. 2).

Los anticuerpos monoclonales de ratón Mab-SAPA1 y Mab-SAPA2, fueron ensayados frente al panel de antígenos recombinantes, siguiendo la metodología descrita en 19. Ambos Mab reaccionan específicamente con el antígeno SAPA y no presentan reacción cruzada con el antígeno 36, a diferencia de los anticuerpos policlonales anti-SAPA (Fig. 3).

Seguidamente se probó la reactividad de estos anticuerpos monoclonales con tripomastigotes obtenidos de cultivos celulares. Con el fin de seleccionar el de mejor reactividad, los parásitos fueron fijados y permeabilizados según se describió. El análisis realizado por FACS se puede observar en la Fig. 4. El histograma obtenido con el Mab-SAPA1 fue similar al obtenido con el suero proveniente de ratón BALB/C infectado, mientras que la reactividad del Mab-SAPA2 fue menor. Los controles negativos empleados, gammaglobulina normal de ratón y un anticuerpo monoclonal murino no relacionado, no registraron reactividad. A partir de estos resultados, se seleccionó el anticuerpo Mab-SAPA1 para ser utilizado en ensayos posteriores.

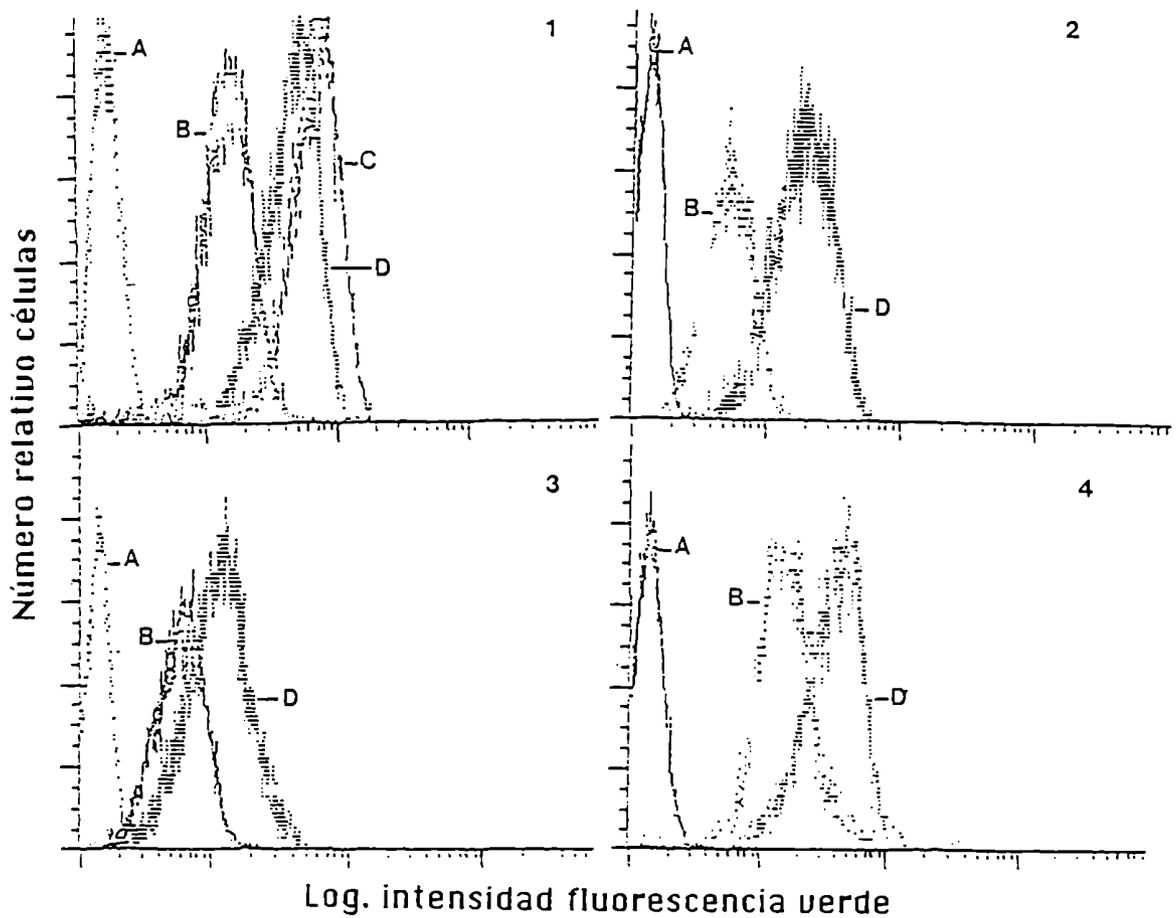


FIGURA N° 1

Análisis por FACS de la reactividad de epimastigotes Cepa RA (1); Clon Dm28c (2); Cepa Sonia (3); Cepa Tulahuén (4) con anticuerpos anti-glutamato deshidrogenasa (D); anti-*T.cruzi* (C); gamma-globulina normal (B); sin primer anticuerpo (A).

Los parásitos obtenidos el día 10 pi de cultivos axénicos, fueron fijados con paraformaldehído y permeabilizados con Tween 20. El revelado se realizó empleando gama-globulina de cerdo anti conejo marcada con fluoresceína.

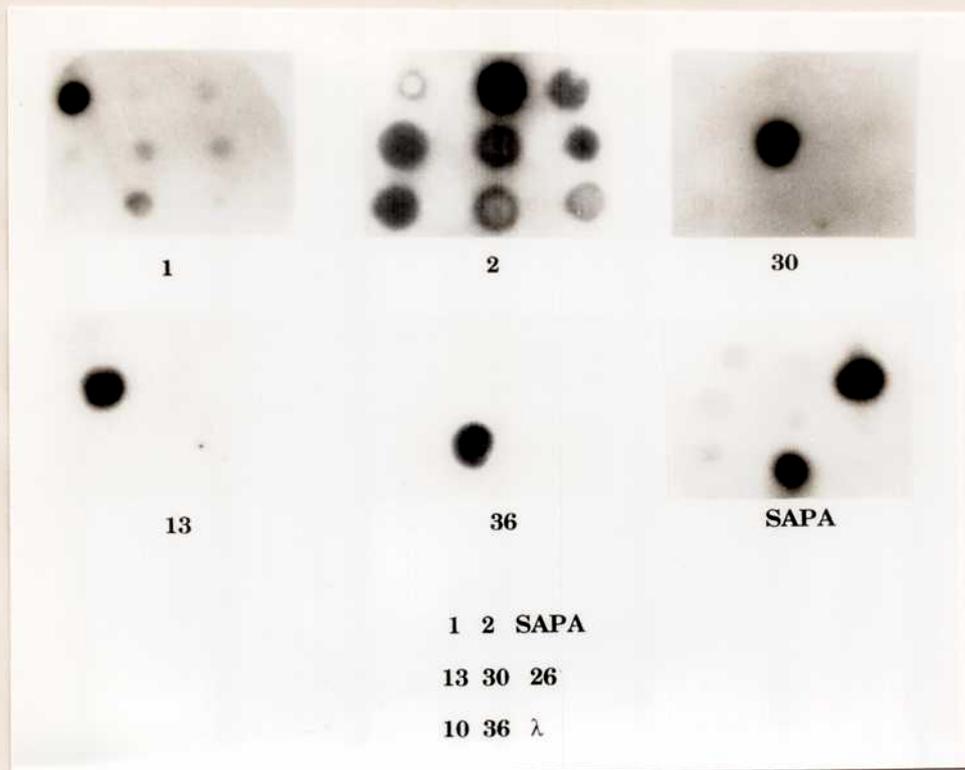


FIGURA N° 2

Reactividad de sueros de conejos inmunizados con antígenos recombinantes frente al panel completo. Los numeros debajo de cada filtro indican el antígeno utilizado para la obtención del antisuero empleado en cada caso. La disposición de las proteínas de fusión se indica al pie de la foto. Lambda gt11 sin inserto se indica como λ El revelado se realizo con  $^{125}\text{I}$ -proteína A

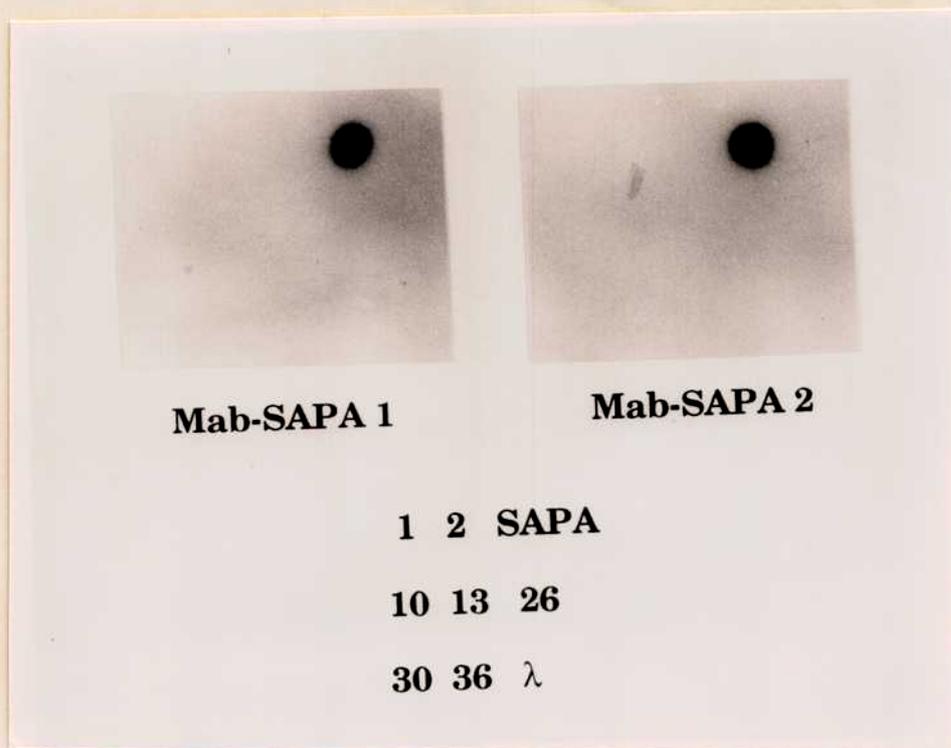


FIGURA N° 3

Reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-SAPA (Mab-SAPA1 y Mab-SAPA2) con el panel de antígenos recombinantes. El revelado se realizó utilizando  $^{125}\text{I}$ -Proteína A. La disposición de los antígenos se indica al pie de la foto. Lambda gt11 se indica como  $\lambda$

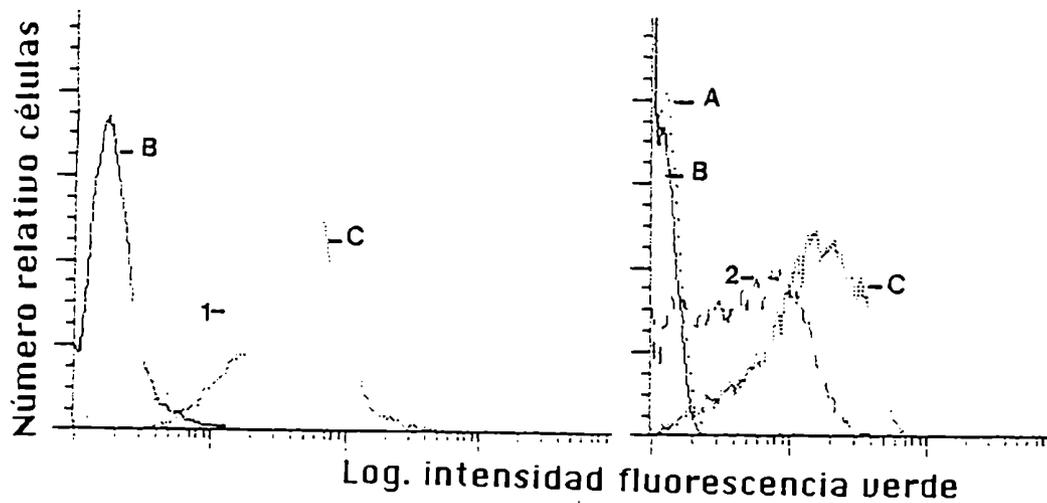


FIGURA N° 4

Análisis por FACS de la reactividad de los tripomastigotes (cepa RA) obtenidos de cultivos celulares con: anticuerpos monoclonales Mab-SAPA1 (1); Mab-SAPA2 (2); sin primer anticuerpo (A); gamma globulina normal (B); inmunoglobulinas de ratón infectado (C) Los parásitos fueron fijados con paraformaldehído y permeabilizados con Tween 20. El revelado se realizó utilizando gamma-globulina anti-ratón marcada con fluoresceína.

## I. 2.- EXPRESION DE ANTIGENOS EN TRIPOMASTIGOTES SOMETIDOS A DIFERENTE PRESION INMUNE.

Con el fin de comprender las causas del cambio en la especificidad de la respuesta humoral humana desde la etapa aguda hacia la crónica se analizó la expresión en el parásito de los antígenos marcadores de las diferentes etapas de la infección humana. Surgen diferentes alternativas:

-que la composición heterogénea que *T.cruzi* presenta en la naturaleza determine que subpoblaciones parasitarias expresen diferentes antígenos que serían seleccionados por la presión inmune del huésped.

-que la existencia del mecanismo de variación antigénica determine el cambio de la expresión antigénica desde la etapa aguda hacia la crónica.

-que el parásito exprese ambos grupos de antígenos desde la etapa temprana de la enfermedad y que el cambio en la especificidad de anticuerpos se deba a una respuesta diferencial del huésped frente a estos antígenos

A continuación se describen los distintos modelos utilizados para analizar las alternativas planteadas.

### I. 2.1 Antígenos expresados por tripomastigotes obtenidos de ratones atímicos.

A fin de evitar la posible alteración del patrón de expresión de antígenos por la presión de la respuesta inmune, se utilizaron parásitos de la cepa RA obtenidos de ratones *nude*. Con el objeto de estudiar la expresión simultánea de diferentes antígenos en una misma célula parasitaria realizamos ensayos de doble marcación inmune. Obtuvimos tripomastigotes sanguíneos de la cepa RA del pico de parasitemia (7-10 días pi), los que fueron fijados y permeabilizados tal como se describió en 17. El ensayo de doble marcación se realizó empleando el Mab-SAPA1 biotinilado y gamma-globulinas específicas para los antígenos 1, 2, 13, 30 y 36 obtenidas de conejos inmunizados. La reacción fue revelada con estreptoavidina marcada con ficoeritrina y con anticuerpos anti-IgG de conejo preparadas en cerdo y conjugados con fluoresceína.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 5 donde puede observarse que los antígenos 1 y 30 fueron claramente positivos juntamente con el antígeno SAPA. Los antígenos 2, 13 y 36 no fueron detectados. Estos resultados demuestran que los parásitos sanguíneos expresan simultáneamente el antígeno SAPA (marcador de la etapa aguda de la infección humana) y los antígenos 1 y 30 (marcadores de la etapa crónica), al menos en condiciones de baja presión inmune.

### **I.2.2 Antígenos expresados por tripomastigotes provenientes de ratones eutímicos.**

Para conocer los posibles efectos de la selección del sistema inmune humoral sobre la expresión del panel de antígenos bajo análisis, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con tripomastigotes sanguíneos, también de la cepa RA pero obtenidos de ratones Balb/c eutímicos.

Como el 100% de los tripomastigotes expresan el antígeno SAPA, se realizó un ensayo de marcación simple. Se emplearon tripomastigotes obtenidos del pico de parasitemia, que fueron fijados y permeabilizados como se describió anteriormente, tratados con gamma-globulinas específicas para los antígenos recombinantes y posteriormente con inmunoglobulinas anti-conejo marcadas con fluoresceína. Se pudo demostrar que estos parásitos también expresan los antígenos 1, SAPA y 30 (Fig. 6) al igual que los obtenidos de ratones *nude*. No detectamos la expresión de los antígenos 2 y 13. Paralelamente se realizaron ensayos utilizando F(ab)<sub>2</sub> de conejo anti-ratón marcado con fluoresceína con el fin de descartar el posible enmascaramiento de antígenos por los anticuerpos del huésped infectado. Este ensayo dio negativo.

Dado que nuevamente sólo los antígenos SAPA, 1 y 30 fueron detectados en los tripomastigotes provenientes de ratones eutímicos, se decidió emplear otros métodos de fijación para descartar posibles resultados negativos que pudieran depender de la metodología empleada. Para ello se utilizaron tripomastigotes obtenidos de ratones eutímicos que fueron fijados con eter-alcohol, metanol o metanol-ácido acético y luego fueron incubados con los correspondientes anticuerpos y visualizada la

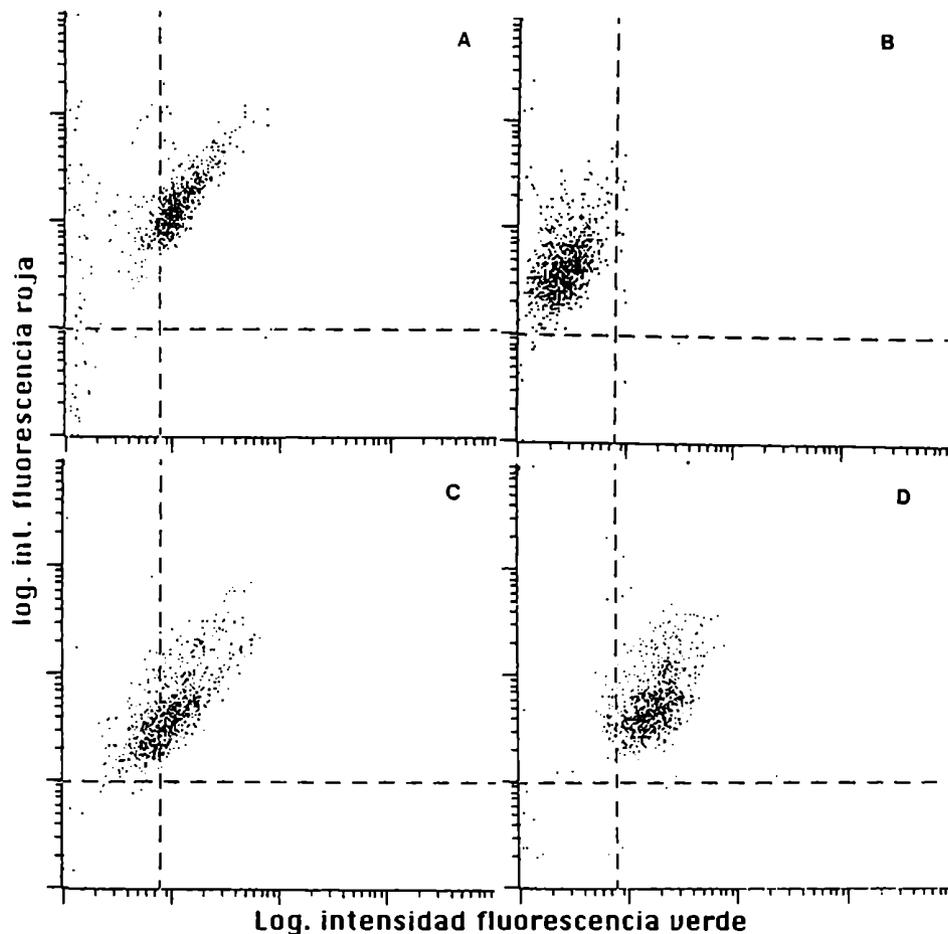


FIGURA Nº 5

Análisis por FACS de ensayos de doble marcación de antígenos expresados por tripomastigotes sanguíneos obtenidos de ratones atímicos. La fluorescencia roja indica reactividad del monoclonal Mab-SAPA1 biotinilado. La fluorescencia verde indica reactividad de las diferentes gama-globulinas de conejo empleadas: (A) anti- lisado de *T.cruzi*; (B) anti-Antígeno2; (C) anti-Antígeno 1; (D) anti-Antígeno30. El fondo de fluorescencia roja se determinó empleando un anticuerpo monoclonal no relacionado. El fondo de fluorescencia verde se estableció empleando gamma-globulina normal de conejo. El revelado se realizó usando estreptoavidina marcada con ficoeritrina-R e inmunoglobulinas de cerdo anti-conejo conjugadas con fluoresceína.

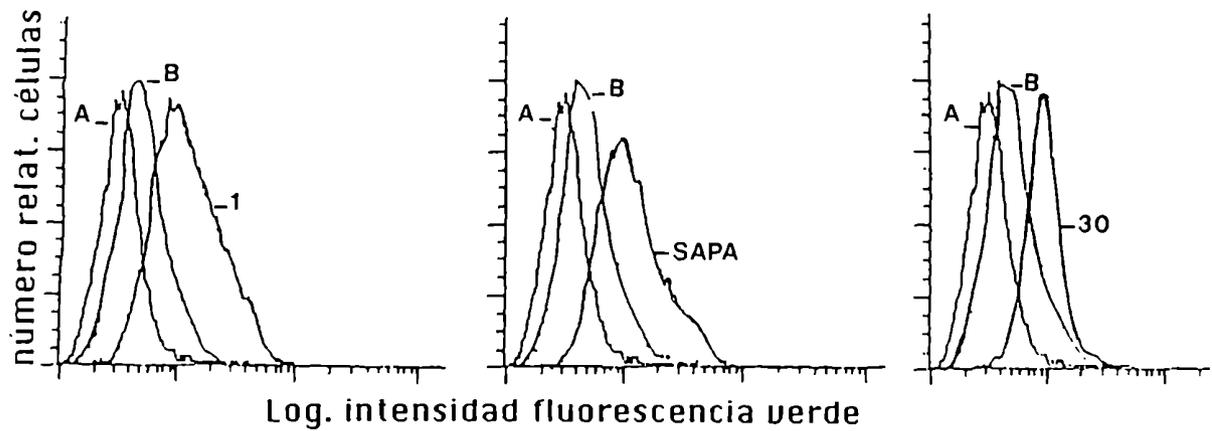


FIGURA N° 6

Análisis por FACS de antígenos expresados por tripomastigotes sanguíneos (cepa RA) obtenidos de ratones eutímicos. Los parásitos fueron fijados con paraformaldehído y permeabilizados con Tween 20. Posteriormente tratados (A) sin primer anticuerpo; (B) gamaglobulina normal de conejo y con inmunoglobulinas de conejo dirigidas contra los antígenos 1, SAPA y 30. La reacción se reveló con inmunoglobulinas de cerdo anti-conejo marcada con fluoresceína.

fluorescencia por microscopía óptica. Se empleó gamma-globulina normal de conejo como control negativo. Los parásitos fueron claramente positivos en la expresión de los antígenos 1, SAPA y 36 mientras que fueron débilmente positivos para el antígeno 30. Los antígenos 2 y 13 en ningún caso fueron detectados.

Los resultados obtenidos muestran que los parásitos sanguíneos recuperados de ratones eutímicos expresan, al igual que los provenientes de ratones atímicos, los antígenos SAPA, 1 y 30 así como el 36, es decir, tanto los marcadores de la fase aguda como los de la fase crónica de la infección humana. Estos resultados sugieren que la expresión de los antígenos por parte del parásito es independiente de la presión inmune del huésped y que la diferente respuesta humoral detectada no se debe a la expresión secuencial de los antígenos por parte del parásito, sino más bien a la respuesta inmune del huésped hacia el conjunto de antígenos presentados.

### I. 3.- ANALISIS DE LA EXPRESION DE ANTIGENOS EN PARASITOS CON DIFERENTE CAPACIDAD INFECTIVA

El objetivo fue evaluar la posible relación de los antígenos bajo estudio con la capacidad infectiva del parásito. Para ello se analizó, en primer lugar, la expresión de los antígenos de interés en el estadio no infectivo (epimastigote) y en tripomastigotes con capacidad infectiva disminuída y, en segundo lugar en ensayos *in vitro*, la capacidad de antisueros específicos de inhibir la invasión celular

#### **I.3.1 Expresión antigénica en tripomastigotes de infectividad atenuada**

Con el fin de estudiar si existe una expresión antigénica diferencial en parásitos de infectividad atenuada, se procedió en primer lugar a la obtención de dichos parásitos y posteriormente al análisis de los antígenos por ellos expresados.

Para inducir la atenuación de la infectividad de la cepa RA (letal para el ratón) se utilizaron cultivos de células Vero infectados con tripomastigotes sanguíneos. La infectividad de los tripomastigotes de cultivo (obtenidos a diferentes tiempos pi) se comparó con la presentada por tripomastigotes sanguíneos por inoculación en ratones. La curva de parasitemia de los ratones inoculados con tripomastigotes de 17 días en cultivo (c-trip-17) presentó un desplazamiento con respecto a la descrita por los sanguíneos (b-trip) y un retardo de 7 días del pico de parasitemia, aunque los valores fueron semejantes ( $7 \times 10^6$  parásitos/ml) (Fig. 7). Si bien la mortalidad fue del 100% en ambos casos, los ratones infectados con b-trip murieron entre los días 8-12 pi, mientras que los inoculados con c-trip-17 mostraron un atraso de mortalidad (13-18 días pi). En contraste, los ratones inoculados con tripomastigotes obtenidos a los 144 días de cultivo (c-trip-144) presentaron una curva de parasitemia con total tendencia a la negativización y con valores máximos de  $10^5$  parásitos/ml. La mortalidad disminuyó hasta un 20% y este porcentaje que muere mostró un importante atraso (18-34 días pi) en relación a los controles (Fig. 7).

Estos tripomastigotes de actividad atenuada fueron utilizados para analizar la expresión antigénica mediante ensayos de doble marcación sobre parásitos permeabilizados. En la Fig. 8 se puede observar que los tripomastigotes de cultivo expresan simultáneamente los antígenos SAPA y 1, mientras que sólo parte (30%) de la población expresa simultáneamente los antígenos SAPA y 30. Si comparamos estos resultados con los obtenidos con tripomastigotes de la misma cepa (RA) que conservan el comportamiento biológico característico (letalidad), vemos que en éstos hay una expresión homogénea de los antígenos 1, 30 y SAPA, ya sea que provengan de ratones atímicos o eutímicos (Fig. 5 y 6).

### **I. 3.2- Expresión de antígenos en el estadio epimastigote.**

Se analizaron parásitos fijados y permeabilizados según 18, de las cepas RA e Y obtenidos los días 2, 4, 6, 8, 10 y 12 de cultivo. Ambas cepas fueron positivas para el antígeno 30, sin encontrarse diferencias en su expresión en los diferentes puntos ensayados de la curva de crecimiento.

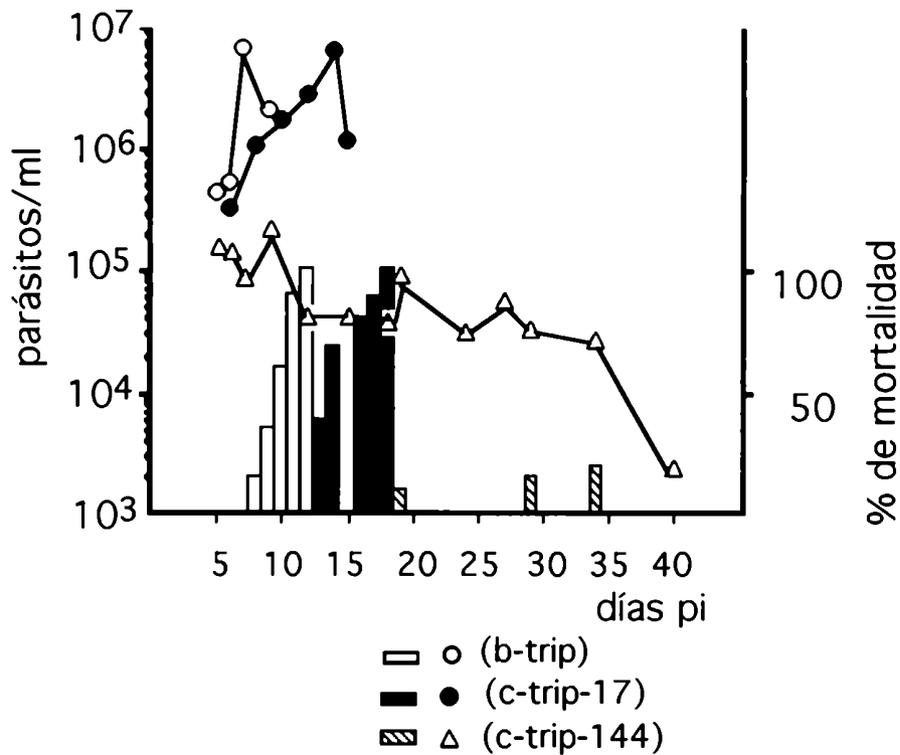


FIGURA N° 7

Atenuación de la virulencia de *T.cruzi* por el mantenimiento en cultivos.

Se utilizaron tripomastigotes sanguíneos (b-trip) o mantenidos en cultivos celulares 17 días (c-trip-17) o 144 días (c-trip-144) para inocular ratones por vía intraperitoneal.

Los valores de parasitemia de los días 7 y 9 pi obtenidos con c-trip-144 son significativamente menores a los obtenidos con b-trip ( $P < 0.001$ ), así como el porcentaje de mortalidad de c-trip-144 versus b-trip ( $P < 0.001$ ) empleando el test "t" de Student.

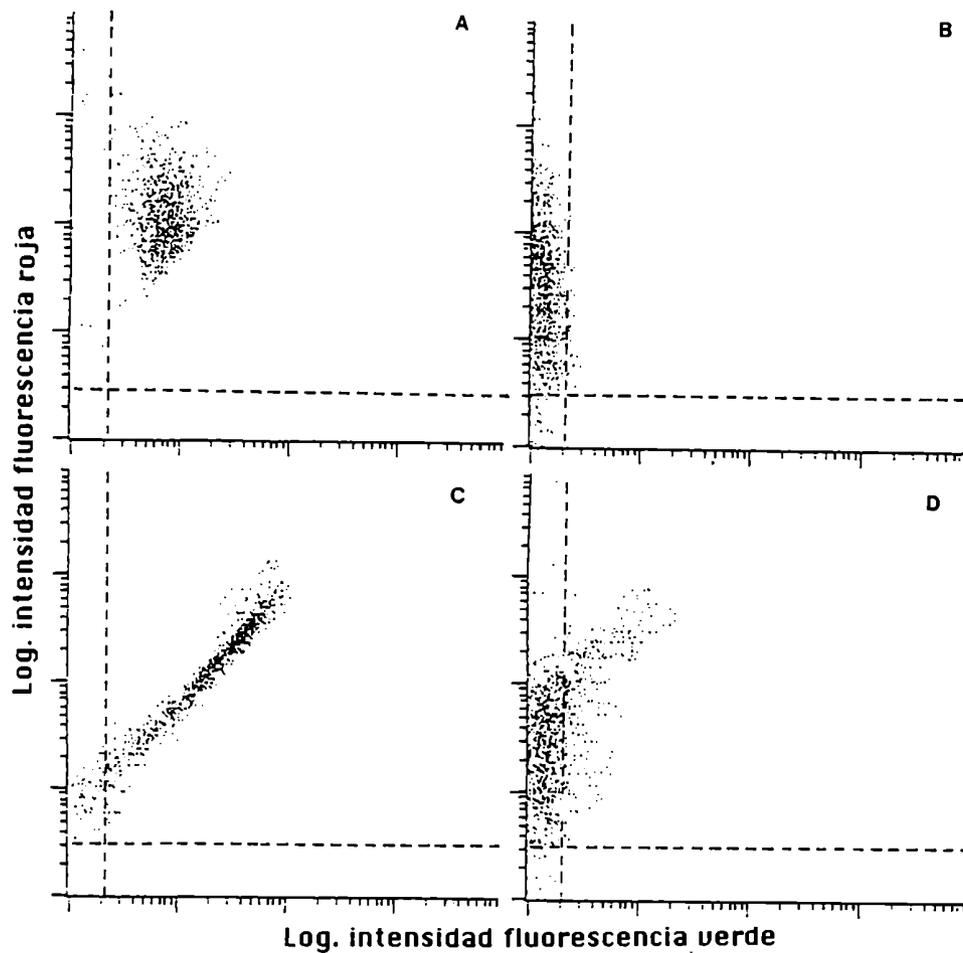


FIGURA N° 8

Análisis por FACS de antígenos expresados por tripomastigotes obtenidos de cultivos celulares, en ensayos de doble marcación. La fluorescencia roja indica reactividad del monoclonal Mab-SAPA1 biotinilado. La fluorescencia verde indica reactividad de las diferentes gama-globulinas de conejo empleadas: (A) anti-lisado de *T.cruzi*; (B) anti-Antígeno 2, (C) anti-Antígeno 1; (D) anti-Antígeno 30. El fondo de fluorescencia roja se determinó empleando un anticuerpo monoclonal no relacionado y el de fluorescencia verde empleando gamma normal de conejo. El revelado se realizó usando estreptoavidina marcada con ficoeritrina-R e inmunoglobulinas de cerdo anti-conejo conjugadas con fluoresceína.

En la Fig. 9 (1) se muestran los resultados obtenidos con la cepa RA en el día 10 pi.. La reacción fue negativa para los antígenos 1, 2, 13, 36 y SAPA. Se decidió entonces estudiar la expresión de esos antígenos en la fase logarítmica de crecimiento de las cepas Sonia y Tulahuén-2 y el clon Dm28c. Se encontró que estas poblaciones también expresan sólo el antígeno 30 y eran negativas para el resto de los antígenos analizados. Ver Fig. 9 (2,3 y 4).

### **I.3.3.- Ensayos de inmunobloqueo de la entrada del parásito a la célula huésped.**

En el punto I.3.1 se mencionó que los antígenos 1, 30 y SAPA estaban presentes en tripomastigotes de cultivo. Además por ensayos previos de inmunofluorescencia (Ibáñez y col., 1988) se había demostrado que los antígenos 2 y 13 también están presentes en tripomastigotes vivos de cultivo. Para analizar la posible participación de los antígenos en estudio en el proceso de invasión celular se realizaron ensayos de inhibición de penetración utilizando antisueros dirigidos contra los antígenos 1, 2, 13, 30, 36 y SAPA.

Los sueros empleados poseían títulos entre 1/2000 y 1/3000. Los parásitos fueron incubados con los diferentes sueros a diluciones no aglutinantes (1/60 y 1/100). La interacción parásito-célula se realizó durante 1 h a 37°C y en presencia del anticuerpo específico correspondiente, luego se lavó exhaustivamente la monocapa. Se continuó la incubación durante 72 h para permitir la división intracelular del parásito y de este modo facilitar la posterior lectura, la que se realizó sobre monocapas teñidas contando el número de células infectadas y el número de células totales por campo. Se leyeron 500 células por pocillo. Los resultados se analizaron estadísticamente por el test "t" student.

En todos los ensayos realizados, ningún anticuerpo mostró capacidad para bloquear la invasión celular.

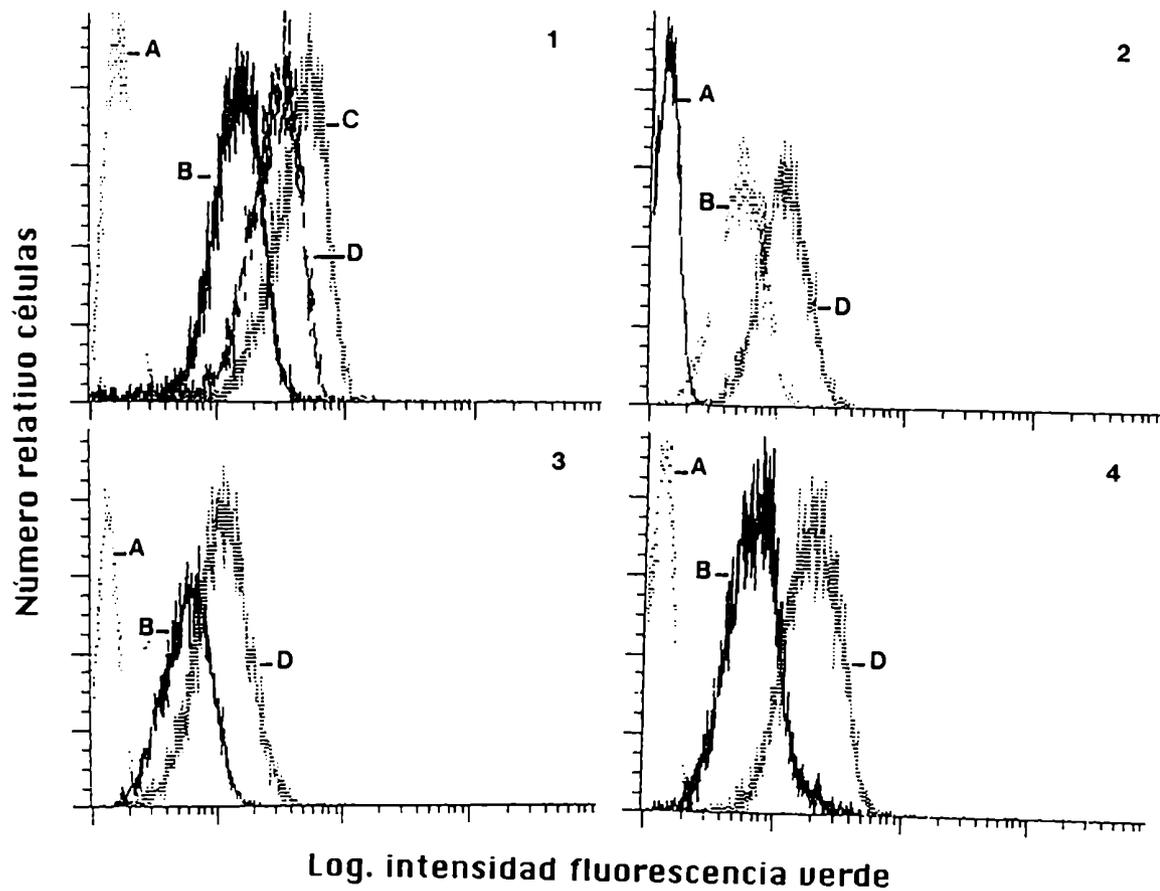


FIGURA N° 9

Análisis por FACS de la reactividad de epimastigotes Cera RA (1); Clon Dm28c (2); Cera Sonia (3); Cera Tulahuén (4) con anticuerpos anti-antígeno 30 (D); anti-*T. cruzi* (C); gamma-globulina normal (B); sin primer anticuerpo (A). Los parásitos obtenidos el día 10 de cultivos axénicos, fueron fijados con paraformaldehído y permeabilizados con Tween 20. El revelado se realizó empleando inmunoglobulinas de cerdo anti conejo marcada con fluoresceína.

**CONCLUSIONES:**

Los antígenos recombinantes estudiados no estarían relacionados con infectividad y el cambio en la especificidad de la respuesta humoral humana hacia estos antígenos no se debería a una expresión diferencial en el tripomastigote, sino más bien a la respuesta inmune montada por el huésped hacia ellos.

Una vez conocida la expresión antigénica en la forma circulante nos pareció de interés conocer la respuesta humoral hacia los mismos antígenos en el modelo murino y compararla con la respuesta humana, ya que el ratón es ampliamente utilizado como modelo en la infección con *T.cruzi*.

## II.- ANALISIS DE LA RESPUESTA HUMORAL DEL RATON HACIA LAS PROTEINAS RECOMBINANTES.

### ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El modelo murino es el más utilizado en estudios inmunológicos, patológicos y clínicos. Tanto el sistema inmune como el *background* genético de esta especie han sido muy estudiadas. En él se pueden reproducir tanto la fase aguda como la crónica de la enfermedad de Chagas. La evolución de la infección dependerá de la interacción de diversos factores entre huésped y parásito. La diferente composición genética del huésped induce variabilidad en la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* (De Titto, 1994). La composición heterogénea de las poblaciones de *T. cruzi* puede también ser responsable de la diversa patogenicidad y virulencia de los diferentes aislamientos del parásito. Por ello es importante cuando se encara un estudio experimental con *T. cruzi*, utilizar cepas de ratones con diferente susceptibilidad a la infección y cepas del parásito con comportamiento biológico diferente. En este capítulo se estudió la respuesta humoral, en la infección experimental murina, hacia un panel de antígenos recombinantes.

Distintos grupos han clonado genes que codifican diferentes antígenos de *T. cruzi* pero hasta el momento poco es lo que se sabe respecto de la función biológica que desempeñan. La importancia del uso de moléculas recombinantes radica en la posibilidad de obtener grandes cantidades de antígenos y en la utilización de antígenos definidos lo que permitiría profundizar los estudios inmunológicos, optimizar el diagnóstico serológico, comprender los mecanismos autoinmunes como posibles responsables de la patología chagásica y su eventual uso en inmunoprofilaxis.

## II. 1.- EVALUACION DE LA RESPUESTA HUMORAL EN DISTINTAS CEPAS DE RATONES (SENSIBLES Y RESISTENTES) INFECTADOS CON DIFERENTES CEPAS DE *T.cruzi*

Con el fin de analizar la respuesta inmune humoral del ratón hacia las proteínas recombinantes, se emplearon diferentes cepas de ratones: Rockland, Swiss, Balb/c, C57Bl/6 y C3H/HeJ y diferentes cepas de *T.cruzi*: Tulahuén, RA, TCC, CA-1. También se ensayaron aislamientos recientes G1, G2, G8, G9 (Tabla I).

Se analizaron sueros obtenidos de diferentes cepas de ratones (incluidas resistentes y sensibles a la infección), inoculados con distintas cepas de parásitos. Se incluyeron desde cepas de *T. cruzi* altamente virulentas (RA) para el ratón hasta cepas atenuadas que inducen cronicidad en el huésped infectado (TCC). El estudio se realizó siguiendo la metodología descrita en 19. En todos los casos se obtuvieron los mismos resultados. En el 85 % de los sueros se detectaron anticuerpos anti-SAPA y en el 15% anti-SAPA y anti-antígeno 13. En ningún caso se detectaron anticuerpos dirigidos contra los antígenos 1 y 30 a pesar de ser expresados por el parásito (ver punto I.2.2). Estos resultados muestran que, independientemente de las cepas de parásitos o de ratón utilizadas, la respuesta humoral de este huésped está principalmente dirigida hacia el antígeno SAPA y en segundo término al antígeno 13. Los sueros empleados fueron obtenidos entre los días 15 y 90 pi.

## II. 2.- EVALUACION DE LA RESPUESTA HUMORAL EN LA ETAPA CRONICA DE LA INFECCION MURINA.

Para estudiar la respuesta humoral en las distintas etapas de la infección experimental, se inocularon ratones Swiss con las cepas Tulahuén y TCC. Se realizó un seguimiento hasta el día 547 pi para la primera cepa y hasta el día 371 pi para la segunda. En todos los ratones infectados con Tulahuén se detectaron anticuerpos anti-SAPA, en sólo dos sueros (390 días pi y 547 días pi) anticuerpos anti-antígeno 13 y en sólo un suero (390 días pi) anticuerpos anti antígeno-1. En todos los sueros de ratones infectados con TCC se detectaron anticuerpos anti-SAPA y en sólo

TABLA 1

Especificidades de anticuerpos presentes en suero de diferentes cepas de ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*.

Cepa de ratón	Cepa de parásito	Días pi	Antígeno					
			1	2	SAPA	13	30	36
Rockland	RA	21	-	-	++	++	-	-
	RA	90	-	-	++	-	-	-
SWISS	Tul	15	-	-	+	-	-	-
	Tul	27	-	-	+	-	-	-
	TCC	15	-	-	+	-	-	-
	TCC	30	-	-	+	-	-	-
	G8	15	-	-	-	-	-	-
	G8	30	-	-	+	-	-	-
	G9	15	-	-	+	-	-	-
	G9	30	-	-	+	-	-	-
	G1	15	-	-	-	-	-	-
	G1	30	-	-	+	-	-	-
	G2	15	-	-	-	-	-	-
	G2	30	-	-	+	+	-	-
	CAI	21	-	-	+	+	-	-
	RA	15	-	-	+	+	-	-
RA	60	-	-	+	-	-	-	
Balb/c	RA	26	-	-	+	-	-	-
	RA	90	-	-	+	-	-	-
C57BL/6J	RA	30	-	-	+	+	-	-
C3H/HeJ	RA	50	-	-	+	+	-	-
	CAI	8	-	-	+	-	-	-
	CAI	15	-	-	+	-	-	-

Los sueros se incubaron con filtros de nitrocelulosa que contenían los antígenos. La reactividad se reveló con  $^{125}\text{I}$ -proteína A. Las + indican que las señales eran más fuertes que el fondo obtenido con  $\lambda\text{gt}11$  sin inserto utilizado como control.

TABLA 2

Especificidad de anticuerpos presentes a diferentes tiempos post-infección en el modelo murino

Cepa de parásito	Días pi	Antígeno					
		1	2	SAPA	13	30	36
Tul	15	-	-	+	-	-	-
	27			+			
	49			+			
	97			+			
	150			+			
	157			+			
	187			+			
	360			+	-		
	390	+		+	+		
	547	-	-	+	+	-	-
TCC	15	-	-	+	-	-	-
	30			+			
	60			+			
	136			+	-		
	180			+	+		
	371	-	-	+	-	-	-

Se infectaron ratones Swiss con las cepas Tulahuén (Tul) y TCC de *T. cruzi* y se obtuvieron muestras de suero en los distintos días post-inoculación (pi) según se indica. Los sueros fueron procesados tal como se indica en la Tabla anterior.

un suero también anticuerpos anti-13 (Tabla II). Estos resultados indican que SAPA es la proteína antigénicamente predominante entre los antígenos ensayados en el modelo murino, independientemente de la cepa de ratón o tripanosoma utilizada y del periodo de infección.

### II. 3.- ANTIGENICIDAD DE LAS PROTEINAS RECOMBINANTES PARA EL HUESPED RATON.

La ausencia de anticuerpos dirigidos contra algunos de los antígenos ensayados podría deberse a la incapacidad del ratón de montar una respuesta inmune apropiada. Para examinar esta posibilidad se inmunizaron ratones con las proteínas recombinantes emulsionadas en adyuvante de Freund y luego se evaluó la presencia de anticuerpos.

En los sueros provenientes de ratones inmunizados simultáneamente con: - antígenos 2 y 13, -antígenos 2 y SAPA, - antígenos 13 y SAPA, - antígeno 1, - antígenos 1, 2, SAPA, 13 y 30 se detectaron anticuerpos contra las correspondientes proteínas de fusión empleadas (Fig. 10).

Estos resultados muestran que el ratón es capaz de generar anticuerpos no sólo contra el antígeno SAPA sino también contra los antígenos 1 2 13 y 30 cuando son inmunizados con las proteínas recombinantes parcialmente purificadas, y que SAPA no impide la producción de anticuerpos anti-1, anti-2, anti-13 o anti-30.

Los experimentos mencionados no descartan la presencia de otras moléculas antigénicas no incluidas en nuestro panel. Por ello se realizó el *screening* de una biblioteca genómica, utilizando un pool de sueros obtenidos a los 30 días pi de ratones infectados con la cepa TCC. Del *screening* de 200.000 placas de fagos se obtuvieron 8 clones positivos. Estos ocho clones dieron reacción positiva al enfrentarlos con una sonda de DNA específica para SAPA. Nuevamente SAPA fue el antígeno recombinante más frecuentemente detectado con sueros obtenidos de ratones infectados.

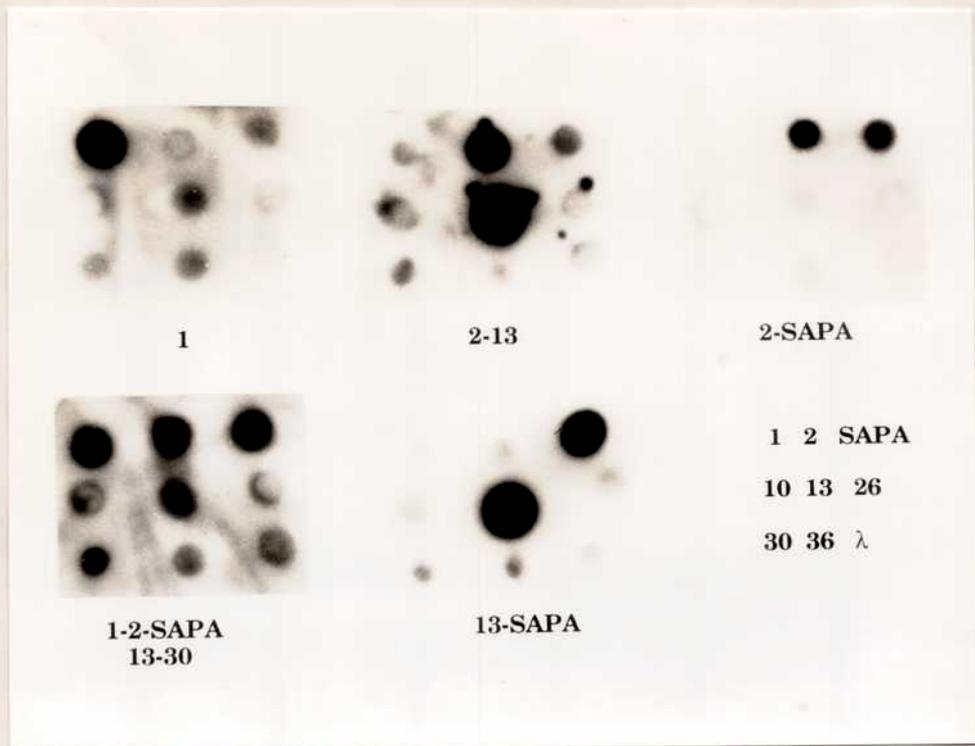


FIGURA N °10

Reactividad de sueros de ratones inmunizados con proteínas de fusión frente al panel de antígenos recombinantes. Los números debajo de cada filtro indican los antígenos empleados para la obtención del inmunosuero empleado en cada caso. La disposición de los antígenos se indica en el ángulo inferior derecho de la foto. Lambda gt11 se indica como λ. El revelado se realizó con  $^{125}\text{I}$ -proteína A.

**CONCLUSIONES:**

Del estudio de la expresión de antígenos en el estadio tripomastigote sanguíneo surge que cada célula es capaz de expresar simultáneamente los antígenos SAPA y 1, SAPA y 30, es decir tanto marcadores de la etapa aguda como de la etapa crónica de la infección humana, mientras que la respuesta humoral del ratón está dirigida principalmente contra el antígeno SAPA en las diferentes etapas de la infección.

El antígeno SAPA fué inicialmente descrito por su capacidad antigénica, posteriormente se encontró que en la misma molécula que lo contiene está presente la actividad de trans-sialidasa. Dado que esta enzima ha sido relacionada con el proceso de invasión celular decidimos completar el estudio, analizando la respuesta humoral hacia este dominio de la molécula.

### **III. ESTUDIO LONGITUDINAL DE LA ACTIVIDAD DE TRANS-SIALIDASA Y DE LA CAPACIDAD DE NEUTRALIZACION DE LA ENZIMA EN SUEROS DE DISTINTAS ETAPAS DE LA INFECCION EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi*.**

#### **ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.**

La TS es una enzima descrita en tripanosomatídeos. Difiere de otras sialil-transferasas en que utiliza como dadores de siálico tanto glicolípidos como glicoproteínas y no CMP-siálico (Parodi y col., 1992). Se ha demostrado que esta enzima está constituida por dos dominios funcionalmente independientes (Cazzulo y Frasch 1992; Campetella y col., 1994): uno enzimático localizado en el extremo amino-terminal y otro antigénico ubicado en el extremo carboxilo, formado por 12 unidades repetidas y que constituye lo que conocemos como antígeno SAPA. La TS está localizada en la superficie celular del parásito (Souto-Padron y col., 1989) y es secretada (Frevort y col., 1992). La actividad de neuraminidasa se pone de manifiesto sólo cuando no hay aceptores adecuados de ácido siálico (Parodi y col., 1992).

Diferentes evidencias experimentales sugieren que esta enzima podría estar relacionada con invasión celular. El epitope Ssp-3 que está involucrado con la penetración celular requiere estar sialidado para ser funcional (Andrews y col., 1987 ; Schenkman y col., 1992). La incubación de tripomastigotes con compuestos sialidados aumenta la infección (Piras y col., 1987). La muy baja infección de las células Lec 2, línea mutante con baja expresión de ácido siálico, aumenta significativamente cuando se sialida experimentalmente la superficie de las células huéspedes (Ming y col., 1993).

El antígeno SAPA induce una fuerte respuesta humoral en infecciones humanas agudas y congénitas (Afranchino y col., 1989; Reyes y col., 1990) siendo estos anticuerpos incapaces de inhibir la actividad de TS.

La fase crónica de la infección por *T. cruzi* se alcanza cuando el huésped puede controlar de alguna manera el crecimiento del parásito,

momento en que éste es difícilmente detectable en sangre. Dada la posible relación de la TS con invasión celular, decidimos estudiar la actividad de TS en suero y la presencia de anticuerpos inhibidores de la actividad enzimática en el modelo experimental murino.

Para ello se empleó un modelo agudo y otro crónico. El primero, utiliza ratones C3H/HeN infectados con la cepa RA (González Cappa. y col, 1981) y el segundo emplea la misma cepa de ratones pero infectada con K-98 (clon de la cepa CA-I), que permite la sobrevivencia del huésped (Celentano y González Cappa, 1992).

### III. 1.- DETECCION DE TS EN SUERO DE RATONES ALTAMENTE INFECTADOS.

Con el fin de estandarizar la técnica de detección de TS, se utilizaron sueros de ratones altamente infectados como fuente de actividad enzimática. Para ello se inocularon ratones Rockland de 21 días con  $2 \times 10^5$  tripomastigotes sanguíneos de la cepa RA. Los animales fueron sangrados a blanco el día 7 pi momento en que la parasitemia alcanza sus máximos valores. Se encontró que estos sueros poseen capacidad para transferir ácido siálico de una molécula dadora (sialil-lactosa) a una aceptora ( $^{14}\text{C}$ -Lactosa). En la Tabla 3 se registran los valores de parasitemia y actividad de TS.

Con el objeto de confirmar la especificidad de la reacción, el producto de la misma fue sometido a la acción de neuraminidasa (NA) de *C.perfringens*. Se realizó electroforesis en papel de las muestras tratadas y no tratadas con NA confirmándose que el producto de la reacción era sialil-lactosa (Fig. 11). El pool de 5 sueros de animales normales no presentó actividad (Tabla 3 ; Fig. 11).

### III. 2.- DETECCION DE LA ACTIVIDAD DE TS EN SUEROS PROVENIENTES DE LAS FASES AGUDA Y CRONICA DE LA INFECCION MURINA.

Para realizar un seguimiento longitudinal de la actividad de TS en las distintas etapas de la infección por *T. cruzi* se inocularon ratones C3H/HeN de tres meses de edad con 50 parásitos de la cepa RA (modelo

TABLA 3

Parasitemia y actividad de TS (en cpm) en sueros de ratones Rockland de 20 días de edad infectados con la cepa RA de *T.cruzi*

SUERO	PARASITOS/ML	CPM
1	$8.8 \times 10^6$	1228
2	$1.3 \times 10^7$	1664
3	$2.4 \times 10^7$	1885
4	$3.5 \times 10^7$	2813
5	$6 \times 10^6$	1354
6	$6 \times 10^6$	902
Normal	-	65

La actividad de TS se midió utilizando 20 ul de suero.

Normal: como control se utilizó un pool de cinco sueros de ratones no infectados.

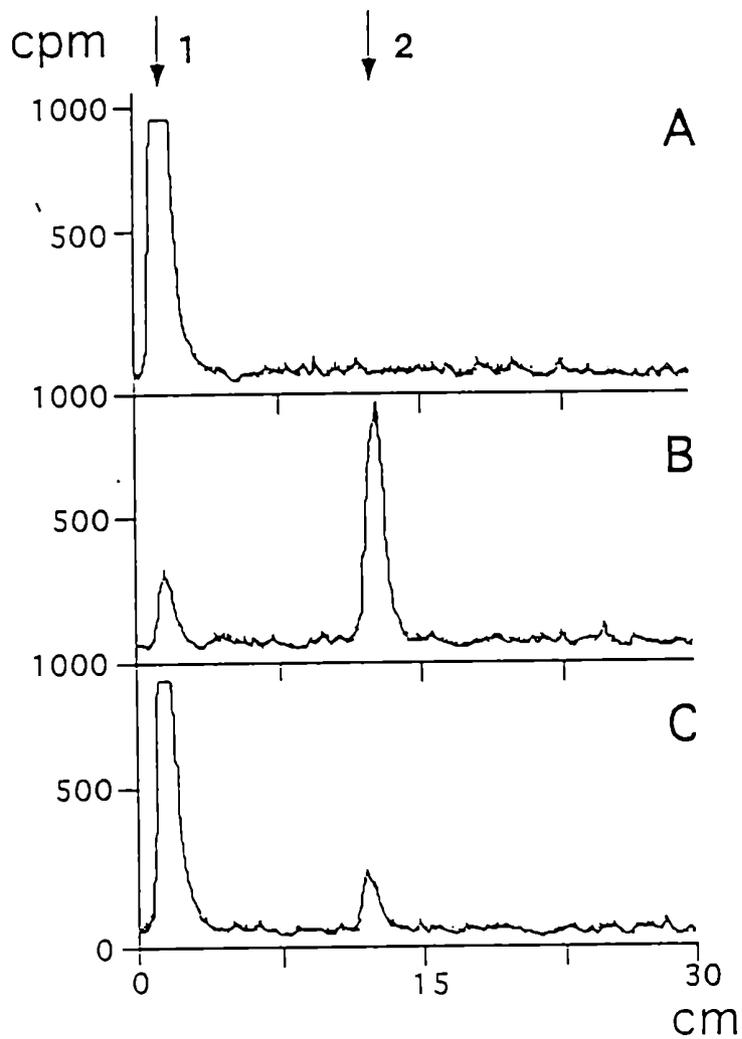


FIGURA 11

Electroforesis en papel de los productos obtenidos con la reacción de TS presente en sueros de ratones altamente parasitados. (A) Resultados obtenidos con un "pool" de sueros normales de ratones; (B) perfil obtenido empleando suero de ratones altamente infectados; (C) perfil obtenido luego del tratamiento del producto de (B) con neuraminidasa de *C. perfringens*. Como marcadores se utilizaron lactosa (flecha1) y sialilactosa (flecha2).

agudo) y 50.000 parásitos del clon K-98 (modelo crónico) de *T. cruzi*. En el primer modelo los ratones mueren dentro de los 20 días pi mientras que en el segundo los ratones sobreviven la fase aguda. Los sueros de los ratones infectados con la cepa RA se colectaron entre los días 10-17 pi, es decir, desde el momento en que se positivizaron parasitológicamente hasta que murieron. Como puede observarse en la Fig. 12 la actividad fue detectable cuando los valores de parasitemia superaron  $10^5$  parásitos/ml y se incrementó en función de la concentración de parásitos circulantes. En el modelo crónico no se detectó actividad de TS en sueros obtenidos desde los días 18 hasta 113 pi a pesar de alcanzarse valores de parasitemia superiores a  $10^5$  tripomastigotes/ml (Fig. 12). Esta falta de actividad podría deberse a una diferente expresión por este clon, ó a la neutralización de la actividad enzimática por moléculas presentes en el suero de este modelo, probablemente anticuerpos.

### III. 3 - DETECCION DE ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DE TS EN SUEROS DE RATONES CRONICAMENTE INFECTADOS.

A fin de evaluar si la ausencia de niveles detectables de TS en sueros de ratones crónicamente infectados se debía a una probable neutralización de la TS, decidimos buscar actividad inhibitoria en estos sueros. Para ello se incubaron los sueros sin diluir con TS parcialmente purificada y la actividad remanente se ensayó según lo descrito anteriormente en 26. Cuando se emplearon sueros normales sin diluir se encontró una inhibición que varió entre 10-23% y desapareció a diluciones superiores a 1/40. Se consideró como 0% de inhibición a los valores en cpm obtenidos con un pool de sueros normales. Los sueros provenientes de ratones infectados presentaron una actividad neutralizante de TS la que se incrementó en función del tiempo pi llegando a valores de hasta el 90% (Fig. 13). Los títulos neutralizantes oscilaron entre 1/160 y 1/2560.

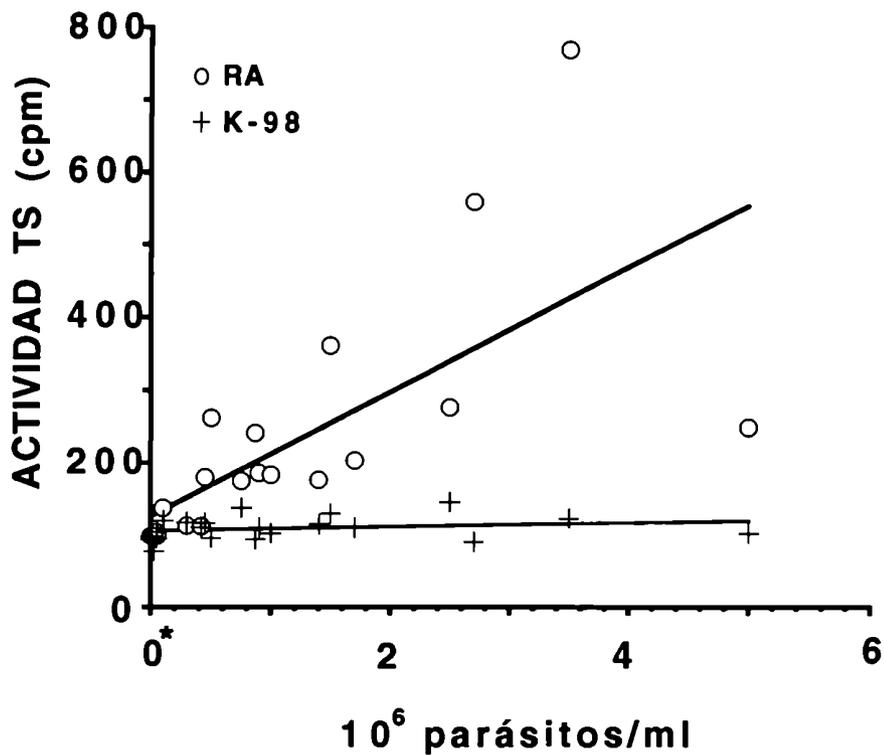


FIGURA N°12

Actividad de TS en sueros de ratones C3H/HeN infectados con la cepa RA o el clon K-98 de *T.cruzi*. Los datos fueron procesados empleando el programa KaleidaGraph 2.1 para computadoras Macintosh. Los valores de parasitemia menores que el nivel de detección (10.000 parásitos/ml) se indica con 0\*.

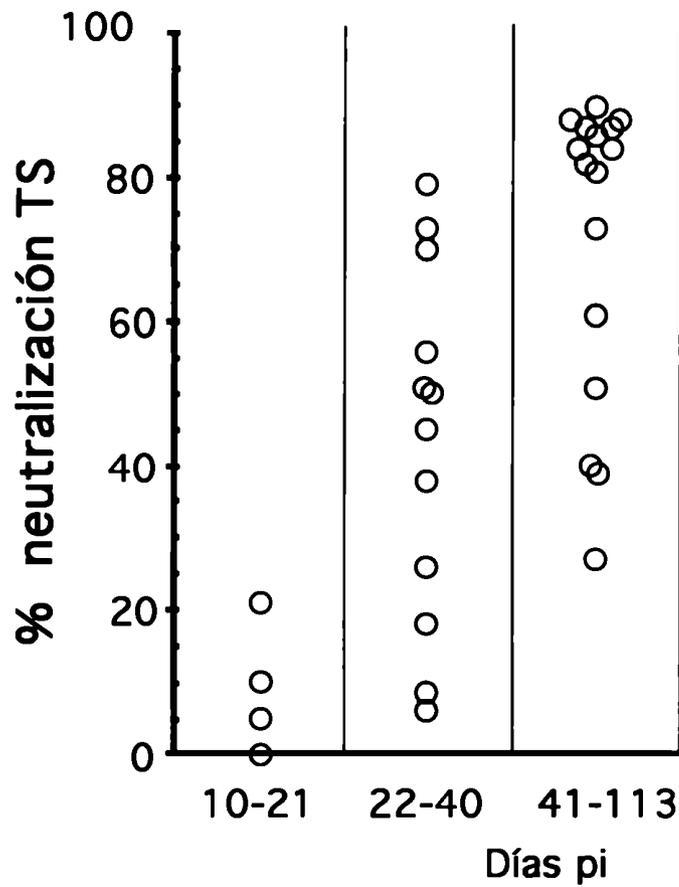


FIGURA N°13

Neutralización de la actividad de TS en sueros de ratones C3H/HeN infectados con el clon K-98 de *T.cruzi*. La enzima nativa se incubó con sueros sin diluir y luego se midió la actividad de TS remanente. Los porcentajes de neutralización están referidos a los valores obtenidos con un "pool" de sueros normales.

### III. 4.- LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DE TS EN SUEROS PROVENIENTES DE RATONES INFECTADOS CON EL CLON K-98 SE DEBE A ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES.

Con el fin de determinar si los responsables de la actividad neutralizante descrita en III.3 eran anticuerpos, se purificó IgG por cromatografía de afinidad sobre Proteína A-Sepharosa a partir de sueros obtenidos a distintos momentos pi. Luego se realizó el ensayo de inhibición de TS tanto con el material no unido como con el retenido y eluído a bajo pH. En la Tabla 4 se puede observar que la fracción no unida carece de capacidad de neutralización, mientras que en el material eluído sí se recuperó esa actividad. Estos resultados muestran la presencia de anticuerpos responsables de la neutralización de la actividad de TS.

Es interesante destacar que éstos anticuerpos se detectan aproximadamente desde el día 30 pi en el modelo crónico, mientras que los anticuerpos anti-SAPA se detectan a partir de los días 8-10 pi en los dos modelos utilizados en este capítulo.

### III. 5.- LOS ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ESTAN DIRIGIDOS CONTRA EL DOMINIO ACTIVO DE LA ENZIMA.

Con el fin de analizar si los anticuerpos neutralizantes estaban dirigidos contra el dominio catalítico, se utilizó una enzima recombinante sin repeticiones de SAPA (Campetella y col., 1994) en los ensayos de neutralización. Según puede observarse en la Tabla 5, la actividad TS fue neutralizada por los sueros obtenidos a distintos tiempos pi de ratones infectados con el clon K-98. Idénticos resultados se obtuvieron cuando los anticuerpos anti-K98 fueron eluídos de Proteína A-Sepharosa. No se detectó neutralización enzimática cuando se empleó suero normal o el Mab-SAPA1 dirigido contra las unidades repetitivas del antígeno SAPA.

TABLA 4

Neutralización de la actividad de TS por suero e IgG de ratones C3H/HeN infectados con *T. cruzi* K-98.

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE TS							
SUERO				PROTEINA A-SEPHAROSA			
RATON	DIAS PI	%	CPM	NO RETENIDO		ELUIDO	
				%	CPM	%	CPM
6258	113	88.3	172	0	1476	76	353
6264	60	86.4	200	10.2	1321	69.4	450
6267	113	79.7	298	0	1510	73.1	395
6276	86	74.1	380	30.2	1026	41.1	866
6284	60	75.8	355	7.5	1361	44.3	819
Normal	-	0	1471	8.7	1342	0	1580

Se mezcló TS obtenida de cultivos de células Vero infectadas con sueros diluïdos 1/80 o con las fracciones no retenidas o eluidas a pH 2,6 de Sepharosa-Proteïna A.

La inhibición 0% corresponde a la obtenida con un "pool" de sueros de 5 ratones control (Normal).

TABLA 5

Neutralización de TS recombinante (Tc-TS1N1) sin repeticiones de SAPA por sueros y fracción IgG de ratones C3H/HeN infectados con *T. cruzi*.

NEUTRALIZACION DE TC-TS1N1					
		SUERO		IgG PURIFICADA	
RATON	DIAS PI	%	CPM	%	CPM
6258	113	92	140	71	371
6262	63	86	235	ND	ND
6264	60	74	434	85.7	242
6267	113	82	310	ND	ND
6284	60	64	608	ND	ND
mAb				2.47	1695
Normal	-	0	1695	ND	ND

Se preincubó una fracción soluble de bacterias transformadas con Tc-TS1N1 conteniendo actividad de TS con sueros diluídos 1/80 o con una fracción IgG purificada por proteína A-Sepharosa (8 ug). Luego se midió la actividad remanente.

mAB: anticuerpo monoclonal anti-repeticiones de SAPA.

El 0% de inhibición se refiere a un control con un "pool" de 5 sueros de ratones normales.

### III. 6.- CUANTIFICACION DE ACTIVIDAD DE TRANS-SIALIDASA EN TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS OBTENIDOS DE RATONES ATIMICOS.

Dado que la actividad de TS no se detectó en sueros obtenidos de ratones infectados con el clon K-98 que sí poseen anticuerpos neutralizantes, se midieron los niveles enzimáticos en extractos parasitarios, para determinar si la falta de actividad en suero se debía a baja actividad enzimática en este clon. Para ello se utilizaron ratones atímicos que nos permitieron obtener mayor cantidad de parásitos y, además, libres de anticuerpos neutralizantes. Estos ratones se inocularon con diferentes dosis de parásitos de la cepa RA y del clon K-98. Los ratones fueron sangrados en el pico de parasitemia y se purificaron los parásitos midiéndose la actividad de TS en lisados. En ambas poblaciones los niveles de actividad de TS fueron semejantes (2920 cpm y 3158 cpm para RA y K-98, respectivamente).

Estos resultados descartan la posibilidad enunciada y sugieren fuertemente que la imposibilidad de detectar TS en sueros de ratones inoculados con K-98 se debe solamente a la presencia de anticuerpos inhibidores de la actividad enzimática.

#### CONCLUSIONES:

Los resultados presentados en este capítulo nos permiten arribar a las siguientes conclusiones: en los ratones que no superan la fase aguda, el suero contiene niveles detectables de TS, mientras que en suero de ratones que alcanzan la etapa crónica no hay actividad enzimática debido a la generación de anticuerpos neutralizantes dirigidos hacia el dominio enzimáticamente activo de la molécula SAPA/TS.

#### **IV. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE TS Y DE LA CAPACIDAD DE NEUTRALIZACION DE TS EN SUEROS DE PACIENTES CHAGASICOS.**

##### **OBJETIVOS**

A partir de los resultados obtenidos en ratón, se analizó la actividad de TS en sueros de humanos infectados y la respuesta humoral de este huésped hacia la región enzimáticamente activa de la molécula SAPA/TS. Para ello se emplearon sueros humanos de pacientes que cursaban diferentes etapas de la infección provenientes de Argentina y Paraguay.

##### **IV. 1.- ANALISIS DE SUEROS DE PACIENTES EN LA ETAPA CRONICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.**

Se emplearon sueros humanos positivos para *T. cruzi* por análisis de ELISA e IFI. En los ensayos de neutralización de la actividad enzimática (TIA), se siguió el protocolo descrito en 26, empleando 10 µl de suero puro. Se realizaron ensayos independientes utilizando sueros de humanos infectados y no infectados libres de otras parasitosis. Cuando se analizaron 17 sueros normales éstos inhibieron hasta un  $8.41 \pm 2.37\%$  la actividad enzimática mientras que de 33 sueros de infectados, 31 inhibieron un  $87.62 \pm 1.69\%$  y dos inhibieron entre el 50 y 55%. Para calcular el porcentaje de neutralización de los sueros de humanos infectados se tomó como referencia el valor obtenido con los sueros normales. El título de los sueros de infectados varió desde 1:5 hasta 1:20 en concordancia con los bajos títulos obtenidos con otras pruebas serológicas (ELISA e IFI). Los resultados pueden observarse en la Fig. 14.

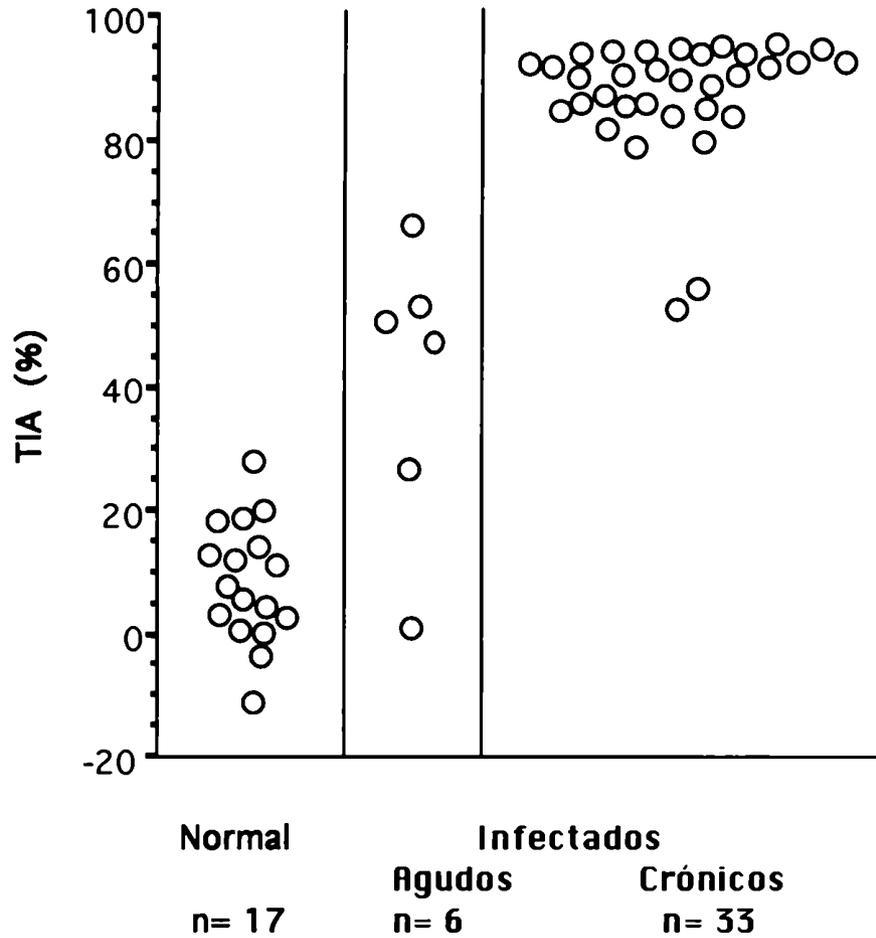


FIGURA N° 14

La enzima nativa se incubó con sueros sin diluir de pacientes infectados con *T.cruzi* o normales y luego se midió la actividad de TS remanente. Los porcentajes de TIA (trans-sialidase inhibition assay) están referidos a los valores obtenidos sin el agregado de suero. Cada punto representa ensayos por triplicados.

#### IV. 2.- ANALISIS DE SUEROS DE PACIENTES EN LA ETAPA AGUDA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Se analizaron sueros de seis pacientes que cursaban la etapa aguda de la enfermedad de Chagas. Todos los pacientes presentaban signo de Romaña y el diagnóstico se realizó detectando parásitos por microhematocrito o hemocultivo; posteriormente cada uno de estos pacientes fué sometido a tratamiento con Benznidazol. Para cada uno de los sueros se realizó serología empleando los métodos de ELISA e IFI.

Cuando se buscaron anticuerpos anti-TS antes de comenzar el tratamiento, los resultados mostraron una gran dispersión en relación con los obtenidos con sueros de pacientes con infección crónica, presentando valores que oscilaban de 0% hasta 67% de neutralización (Figura 14). En el suero del paciente \*6 que presentó 0% de neutralización, tampoco se detectó actividad de TS.

Cuando se analizaron las muestras obtenidas a diferentes tiempos post-tratamiento, sólo un paciente (\*1 Fig. 15) presentó una disminución significativa de los valores de neutralización a los ocho meses post-tratamiento coincidiendo con la negativización de la serología convencional. Sin embargo, tres pacientes (\*2,\*3,\*4, Fig. 15) que se negativizaron por IFI y ELISA no presentaron variaciones significativas de neutralización a pesar que el seguimiento se realizó hasta los 18 ó 20 meses post-tratamiento. Del paciente \*5 (Fig. 15) sólo se pudieron obtener muestras hasta los 45 días post-tratamiento, observándose valores constantes de neutralización.

Los seis pacientes analizados presentaban signo de Romaña con distinto tiempo de evolución. Coincidentemente, el suero del paciente \*6 (Fig. 15) con menor tiempo de evolución (5 días) fue el que dio 0% de neutralización, mientras que el resto tenía entre 25 y 30 días de evolución y presentaron valores entre 20 y 67% de neutralización en las muestras pre-tratamiento.

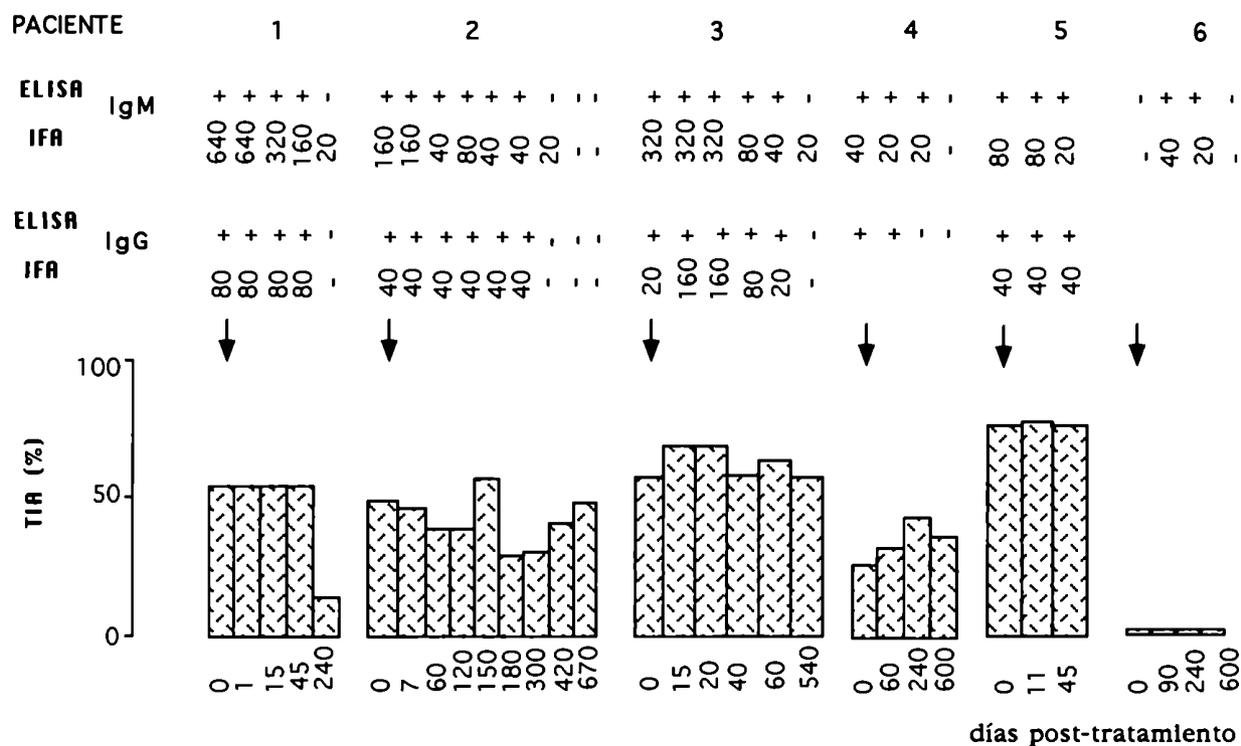


FIGURA N°15

Valores de TIA ("trans-sialidase inhibition assay") obtenidos con sueros provenientes de pacientes en la etapa aguda y a diferentes tiempos post-tratamiento. La flecha indica inicio de tratamiento con benznidazol.

Se muestran los resultados de IFA y ELISA de cada suero. Los resultados negativos se indican con (-).

#### IV. 3.- LOS ANTICUERPOS SON LOS RESPONSABLES DE LA NEUTRALIZACION DE LA ACTIVIDAD DE TS EN SUEROS HUMANOS INFECTADOS.

Se analizó si la inhibición de la actividad de TS era debida a anticuerpos. Para ello, se purificó IgG mediante cromatografía de afinidad sobre Proteína A-Sepharosa a partir de sueros de humanos infectados y sueros normales. En todos los sueros infectados la actividad neutralizante se recuperó en la fracción retenida y eluída a bajo pH que contiene IgG. La fracción no unida no presentó actividad neutralizante. Las fracciones obtenidas de sueros normales en ningún caso inhibieron la actividad enzimática. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos.

#### IV. 4.- LOS ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DE LA ACTIVIDAD DE TS ESTAN DIRIGIDOS HACIA EL DOMINIO ACTIVO DE LA MOLECULA.

Con el fin de estudiar si estos anticuerpos estaban también dirigidos contra el dominio enzimático de la TS, se enfrentaron los anticuerpos eluídos de Proteína A-Sepharosa con la enzima recombinante sin repeticiones. Cuando se emplearon anticuerpos provenientes de sueros infectados se detectó una completa inhibición de dicha actividad, mientras que la fracción obtenida a partir de sueros normales fue incapaz de inhibir la actividad de TS (Tabla 6 ).

#### IV. 5.- ANALISIS DE SUEROS DE RECIEN NACIDOS NORMALES Y CONGENITOS Y DE SUS MADRES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS.

En primer lugar se analizaron muestras de niños normales obtenidas el día del nacimiento o pocos días después, y de sus madres crónicamente infectadas. Todas las muestras fueron serológicamente positivas por IFI y ELISA. Cuando se midió la capacidad de estos sueros de inhibir la actividad de TS los valores obtenidos con los sueros de los niños fueron semejantes a los obtenidos con los sueros maternos (Fig 16 Panel I). Cuando se analizaron muestras de los mismos niños, pero obtenidos

TABLA 6

Inhibición de la actividad de TS nativa o recombinante por componentes séricos humanos fraccionados en Sepharosa-Proteína A.

	Nativa *		Recombinante†
	No unido	Fracción IgG	Fracción IgG
Suero	cpm (TIA %)‡	cpm (TIA %)‡	cpm (TIA %)‡
<b>Control</b>			
535	3293 (1.7)	2866 (14.4)	ND§
536	3217 (3.9)	3312 (1.1)	ND§
N2	3162 (5.6)	3330 (0.6)	4282 (0)
<b>Infectados</b>			
H1	3757 (0)	124 (96.2)	95 (98)
H2	3565 (0)	269 (92)	406 (90.4)
553	3060 (8.6)	229 (93)	ND§

La fracción de IgG o la fracción no retenida en Sepharosa-Proteína-A, se mezcló con la TS nativa o recombinante, según se indica arriba.

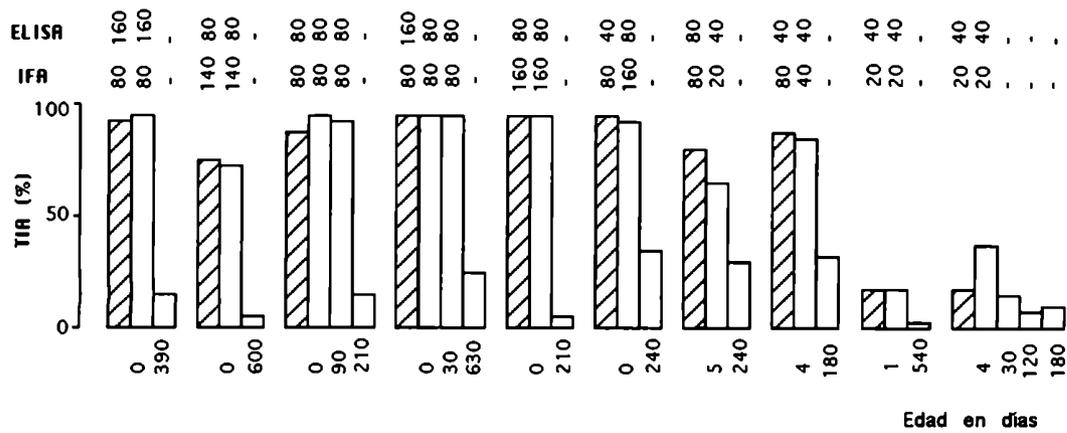
\*) Nativa: se utilizó enzima parcialmente purificada por cromatografía de afinidad, a partir de sobrenadantes de cultivos de células Vero.

†) Recombinante: se utilizó una fracción soluble de bacterias transformadas con Tc-TS1N1 activo (Campetella y col., 1994).

‡) porcentaje de inhibición de la actividad de trans-sialidasa (TIA). Los valores se refieren a la actividad enzimática sin el agregado de suero (nativa: 3349 cpm, recombinante: 4236 cpm).

§) ND: no ensayado.

PANEL I



PANEL II

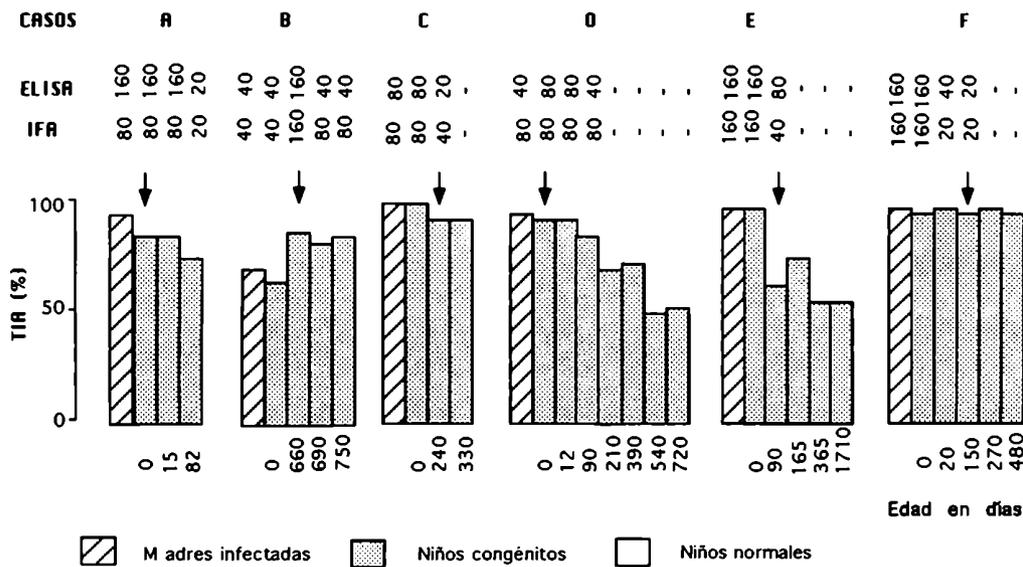


FIGURA N° 16

Valores de TIA ("trans-sialidase inhibition assay") obtenidos con sueros de recién nacidos normales, infectados y de sus respectivas madres infectadas con *T.cruzi*. Se muestran los títulos de IFA y ELISA de cada suero. La flecha indica el inicio del tratamiento con benznidazol. Los resultados negativos se indican con (-).

varios meses después del nacimiento (6 y 21 meses), los valores de neutralización disminuyeron simultáneamente con la negativización de la serología convencional (Fig. 16 Panel I). Sólo dos muestras que siempre presentaron títulos muy bajos ("borderline") por IFI y ELISA, fueron negativos por neutralización.

A continuación se analizaron muestras de niños con infección congénita y de sus correspondientes madres (Fig. 16 Panel II). La infección fué diagnosticada por la detección microscópica de parásitos e inmediatamente después fueron tratados con Benznidazol. Los valores de neutralización de los sueros extraídos el día del nacimiento fueron semejantes a los obtenidos con sueros de infectados crónicos, tanto en las muestras obtenidas de los niños como de las madres.

Al analizar los seguimientos post-tratamiento en los casos A, B y C, si bien la última muestra es muy cercana al inicio del tratamiento, nos permite comparar a igual tiempo post-infección los valores de neutralización alcanzados en los seguimientos de niños con infección congénita y normales nacidos de madres con enfermedad de Chagas. En las muestras de niños infectados los valores de inhibición alcanzados a los 3, 11 y 25 meses pi oscilaron entre 77 y 88% de neutralización (Fig. 16 Panel II), mientras que en los de niños normales lo hicieron entre 7 y 33% de neutralización entre los 6 y 20 meses pi (Fig.16 Panel I).

Los casos D, E y F sí nos permiten hacer una evaluación del tratamiento antiparasitario. En los dos primeros, los valores de neutralización mostraron tendencia a la negativización, mientras que la serología convencional se negativizó precozmente, a partir de los 7 y 2 meses post-tratamiento (7 y 5.5 meses pi). En la tercer muestra (F) los valores de neutralización permanecieron constantes aún a los once meses post-tratamiento (16 meses pi) a pesar que la serología convencional se negativizó a los cuatro meses post-tratamiento (9 meses pi.).

## CONCLUSIONES:

Los resultados comunicados en este capítulo nos permiten enunciar las siguientes conclusiones:

- los sueros de pacientes en la etapa crónica de la infección poseen anticuerpos neutralizantes de la actividad de TS que alcanzan valores de hasta el 92%, mientras que los valores alcanzados por individuos tratados en la etapa aguda de la infección son menores y muy variables.
- los sueros de niños con infección congénita contienen anticuerpos anti-TS que persisten por largos períodos post-infección.
- los anticuerpos neutralizantes de la actividad de TS están dirigidos hacia el dominio enzimático de la molécula SAPA/TS.

## DISCUSION

### V. ANALISIS DE LA EXPRESION DE ANTIGENOS DE *Trypanosoma cruzi*.

La respuesta humoral humana hacia el panel de antígenos recombinantes durante la etapa aguda de la infección se dirige principalmente hacia el antígeno SAPA y en menor proporción a los antígenos 13 y 36 (Reyes y col., 1990), mientras que en la fase crónica hay un cambio en la especificidad dirigiéndose principalmente hacia los antígenos 1, 2, 30 y 36 (Afranchino y col., 1989). Este cambio podía relacionarse con: a) una expresión diferencial de antígenos por las diversas subpoblaciones que componen la población heterogénea de *T. cruzi*, b) la existencia de mecanismos de variación antigénica, de acuerdo a lo sugerido por Peterson y col., (1989) o, c) la expresión simultánea, por los parásitos, de ambos grupos de antígenos desde etapas tempranas de la infección con una respuesta del huésped preferencial hacia alguno de ellos en los diferentes estadios de la infección.

Los resultados obtenidos en este estudio por doble marcación indican que en la misma célula parasitaria se expresan simultáneamente tanto los antígenos marcadores de la etapa aguda como los de la etapa crónica de la enfermedad humana. Por lo tanto la diferente respuesta humoral observada en los humanos no se debería a la presencia de diferentes subpoblaciones parasitarias, unas expresando el antígeno SAPA y otras antígenos marcadores de la etapa crónica, ni a un posible cambio de la expresión antigénica de un marcador de la infección aguda (SAPA) hacia marcadores presentes en la fase crónica de la enfermedad. Estos resultados a pesar de que no descartan la posibilidad de mecanismos de variación antigénica que puedan estar relacionados con otros antígenos del parásito, sugieren fuertemente que el cambio de especificidad en la respuesta humoral humana no se debe a modificaciones en el parásito sino a la propia respuesta del huésped frente a los antígenos presentados. En este sentido, se han comunicado variaciones en el patrón de reconocimiento antigénico en "Western blot" por sueros obtenidos a

diferentes tiempos pi de un paciente infectado accidentalmente (Israelski y col., 1988). Estos cambios se observaron frente a dos cepas diferentes de *T. cruzi* e involucraban principalmente a dos bandas (66 y 45 kDa) que eran bien reconocidas por el suero obtenido a los 50 días pi, mientras que el suero de 150 días pi las reconocía muy débilmente (Israelski y col., 1988).

Mediante el uso de diferentes soluciones fijadoras demostramos que los tripomastigotes sanguíneos también expresan el antígeno 36, antígeno que presenta reacción cruzada con el antígeno SAPA. Por el contrario, los antígenos 2 y 13 no se detectaron en ningún caso. Sin embargo, en ensayos previos de IFI se había observado el antígeno 13 en la superficie de tripomastigotes vivos obtenidos de cultivos celulares (Ibáñez y col., 1988). También mediante estudios de microscopía electrónica este antígeno se había encontrado tanto en los estadios epimastigote como tripomastigote de cultivo, pero la mayor intensidad de marca se comunicó para el estadio amastigote (Souto-Padrón y col., 1989). La no detección de este antígeno en nuestros ensayos quizá se deba a una combinación de baja expresión antigénica específica de estadio y a los métodos de fijación empleados. En cuanto al antígeno 2, éste sólo había sido observado en tripomastigotes vivos obtenidos de cultivos celulares (Ibáñez y col., 1988), y su no observación en los estudios por microscopía electrónica (Souto-Padrón y col., 1989), nos permite especular que la dificultad en su detección se deba a una gran labilidad del mismo. En este sentido, se ha comunicado que este antígeno es rápidamente degradado en preparaciones proteicas de extractos parasitarios o cuando la proteína es expresada en sistemas bacterianos (Buschiazio y col., 1992). Dado que la manipulación en cultivos para amplificar el número de tripomastigotes podría inducir alteraciones en la expresión de los antígenos a ser analizados, nosotros empleamos parásitos sanguíneos obtenidos a partir de ratones en el pico de parasitemia (etapa temprana de la infección) con el fin de evitar posibles modificaciones.

Cuando estudiamos la expresión antigénica en epimastigotes de cultivo, se observó que sólo expresan el antígeno 30, independientemente de la cepa de *T. cruzi* empleada y del momento de la curva de crecimiento analizada. Sin embargo, estudios de microscopía electrónica empleando la cepa Y, indican que en este estadio también se expresan los

antígenos 1 y 13. Esta cepa también fué analizada por nosotros en diferentes tiempos de la curva de crecimiento pero la falta de expresión del antígeno 1 no puede atribuirse al proceso de fijación ya que con la misma metodología dicho antígeno sí fué detectado en el estadio tripomastigote circulante. Esta disparidad de resultados podría deberse a alteraciones inducidas por el mantenimiento de la cepa en laboratorio, fenómeno que ha sido comunicado por diferentes autores (Carneiro y col., 1990; Contreras y col., 1994). Por el contrario, no podemos descartar que la no detección del antígeno 13 en nuestros ensayos se deba a la metodología de fijación empleada.

Con el fin de analizar la expresión antigénica en tripomastigotes con infectividad disminuida utilizamos el pasaje en cultivo para atenuar la virulencia de la cepa RA. Nuestros resultados concuerdan con los comunicados por otros autores sobre disminución progresiva de la virulencia con el tiempo de permanencia en cultivos (Bice y col., 1970), (Chiari, 1974). El patrón de expresión antigénica obtenida con estos tripomastigotes atenuados así como con los sanguíneos (virulentos) de la misma cepa fue semejante: 1, 30 y SAPA, aunque en el caso de la población atenuada había una subpoblación que no expresaba el antígeno 30.

Los resultados obtenidos del análisis de expresión antigénica de parásitos con diferente capacidad infectiva y de los ensayos de inhibición de penetración, indican que los antígenos mencionados no se relacionan con mecanismos de invasión celular. Es interesante destacar que los ensayos de inhibición de internalización celular se realizaron en condiciones de exceso para cada anticuerpo, tanto durante la incubación con los parásitos como en la interacción con las células huéspedes, asegurándonos así el bloqueo de moléculas específicas que pudieran ser regeneradas después del proceso de "capping" (González Cappa y col. 1980b; Schmuñis y col., 1980). Por otra parte, la falta de relación de los antígenos mencionados con invasión celular concuerda con la teoría que sostiene que las regiones repetitivas estarían involucradas con mecanismos de evasión de la respuesta inmune (Kemp y col., 1987; Schofield, 1991). En este sentido cabe recordar que todos los anticuerpos empleados, incluyendo los dirigidos hacia el antígeno SAPA/TS, reconocen la porción repetitiva de los mismos.

## VI. ANALISIS DE LA RESPUESTA HUMORAL MURINA HACIA EL PANEL DE ANTIGENOS RECOMBINANTES.

La evolución de la infección en el huésped ratón no sólo está determinado por su *background* genético sino también por las características intrínsecas del parásito. Por este motivo, empleamos tanto cepas de *T.cruzi* letales para el ratón como cepas que permiten al huésped alcanzar la infección crónica así como cepas de ratones que presentan diferente susceptibilidad a la infección por este parásito. Los resultados obtenidos muestran que independientemente de la etapa de la infección, de la cepa de parásito o de ratón empleada, el antígeno al que los ratones responden es al SAPA, a pesar de que los parásitos expresan otros antígenos, como el 1 y el 30, simultáneamente con el antígeno SAPA. La persistencia de anticuerpos anti-SAPA en seguimientos de hasta un año y medio, realizados con diferentes cepas de ratones y de parásitos, sugiere que el antígeno SAPA seguiría siendo expresado por el parásito durante largos períodos post-infección.

Los resultados aquí presentados nos permiten concluir que la ausencia de anticuerpos dirigidos contra el resto de los antígenos ensayados no se debe a la incapacidad del parásito de expresarlos. Tampoco es atribuible a la incapacidad del ratón de generar anticuerpos contra ellos, ya que éstos sí responden frente a una inmunización con antígenos recombinantes parcialmente purificados.

Si comparamos la respuesta del ratón con la generada en el humano, vemos que ambas difieren ampliamente. Los anticuerpos anti-antígeno 1 y anti-antígeno 30 que son frecuentemente detectados en la infección crónica humana, están prácticamente ausentes durante la infección murina. Los anticuerpos anti-SAPA están presentes principalmente en la etapa temprana de la infección humana, mientras que en el ratón también están presentes durante la fase crónica. Las diferencias mencionadas pueden ser relevantes ya que el modelo murino es el más frecuentemente utilizado en estudios inmunológicos y en ensayos de protección evaluando diversos antígenos.

La consistente presencia de anticuerpos anti-SAPA nos sugiere que este antígeno es una molécula inmunodominante. Está constituido por unidades repetidas en tandem al igual que el resto de los antígenos analizados. Está localizado en superficie y es secretado por el parásito, mientras que los antígenos 1 y 30 son antígenos internos (Souto-Padrón y col., 1989) lo que podría explicar la aparición tardía de sus anticuerpos específicos en la infección humana. El antígeno SAPA no sólo ha mostrado ser altamente antigénico en diferentes condiciones de infección (humano, ratón y conejo) sino que también es el antígeno más frecuentemente detectado a partir de una biblioteca genómica empleando sueros de ratones infectados. Si consideramos además que la aparición de los anticuerpos anti-SAPA es temprana (10 días pi) y que es secretado al medio, podemos especular sobre el posible papel que juega este antígeno en la infección. Podría estar actuando como molécula distractora de la respuesta inmune específica, generando una respuesta ineficaz que le permite al parásito reproducirse y difundir la infección por el organismo. Otra alternativa es que podría estar involucrado en la inducción del desorden inmunológico que se genera en la etapa aguda de la infección por *T. cruzi* favoreciendo la instalación del parásito. En este sentido, se ha comunicado que un octapéptido, derivado de un antígeno de tripomastigotes que contiene unidades repetitivas, podría estar relacionado con activación policlonal (Pestel y col., 1992) y al factor TIF, que es secretado por el tripomastigote, relacionado con mecanismos de inmunosupresión (Kierszenbaum y col., 1990). Mecanismos semejantes han sido propuestos en malaria, para algunos antígenos que también están constituidos por unidades repetitivas, ya que *Plasmodium sp.* genera el mismo tipo de desorden inmunológico que lleva a la incapacidad de establecer una respuesta eficiente (Kemp y col., 1987; Schofield, 1991).

## **VII. ANALISIS LONGITUDINAL DE LA ACTIVIDAD DE TRANS-SIALIDASA Y DE LA CAPACIDAD DE NEUTRALIZAR LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN SUEROS OBTENIDOS EN DIFERENTES ETAPAS DE LA INFECCION EXPERIMENTAL.**

El antígeno SAPA, la neuraminidasa (NA) y la trans-sialidasa (TS) fueron originalmente descritas en forma independiente por diferentes grupos de investigación. Mediante ensayos de inmunoprecipitación empleando anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra la región repetida (SAPA) y extractos totales de parásitos fue posible recuperar en el inmunoprecipitado la mayoría de la actividad de NA y TS presente en los parásitos. Estos resultados fueron confirmados al clonarse genes que contienen las tres propiedades (Pereira y col., 1991; Parodi y col., 1992; Uemura y col., 1992).

SAPA/TS/NA pertenece a una familia de proteínas codificados por diferentes genes que se expresan en el estadio tripomastigote. La estructura de estas proteínas está dada por una región que contiene unidades repetidas de doce aminoácidos ubicada en el dominio C-terminal de la molécula y por una región que carece de unidades repetitivas ubicado en el dominio N-terminal. Se ha demostrado que este dominio contiene el sitio activo de la molécula y que ambos dominios pueden funcionar independientemente uno del otro (Campetella y col., 1994; Schenkman y col., 1994).

La familia de SAPA/TS/NA está a su vez incluída dentro de una superfamilia de antígenos de superficie que contiene tres familias más. Los miembros de diferentes familias tienen entre 30-40% de homología y la estructura es semejante a la descrita para la familia de la TS pero carecen de actividad enzimática (Campetella y col., 1992b).

La obtención de una molécula recombinante con actividad de TS que no contiene unidades repetidas ha permitido demostrar que éstas no son necesarias para conferir actividad enzimática a la molécula (Campetella y col., 1994). La digestión de la proteína nativa con papaína permite arribar a la misma conclusión (Schenkman y col., 1994).

Según hemos comentado anteriormente, el antígeno SAPA es fuertemente inmunogénico tanto por inmunizaciones con parásitos o

proteínas como en infecciones experimentales y humanas, generando anticuerpos que no poseen capacidad inhibitoria de la actividad de TS. Nuestros resultados ponen en evidencia la existencia de anticuerpos capaces de neutralizar TS. Esto se vió en la infección murina crónica como en humanos y se demostró que están dirigidos hacia el dominio activo de la molécula dado que son capaces de inhibir la actividad del recombinante activo. Dicha inhibición es genuina ya que se la obtiene utilizando sustratos difusibles. Prioli y col. (1992) describieron la inactivación de la NA utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales en ensayos de aglutinación de eritrocitos, efecto que desaparecía cuando se empleaban sustratos pequeños. Por lo tanto la inhibición obtenida en estas condiciones puede deberse a un impedimento estérico, según lo sugieren los propios autores. En este contexto deben analizarse los resultados comunicados por De Titto y col. (1987;1988) que se refieren a la detección de actividad inhibitoria de NA en el suero de un caso humano agudo y en sueros de ratones infectados.

Recientemente Pereira-Chiocola y col. (1994) comunicaron la presencia de anticuerpos neutralizantes de la actividad de TS en ratones Swiss y en *Calomys callosus* que sobreviven a la infección con diferentes cepas de *T. cruzi*.

Existen evidencias de que TS podría estar involucrada en el establecimiento de la infección en el huésped; se propuso que uno de los mecanismos a utilizar podría ser la sialidación de epitopes relacionados con la invasión celular (Schenkman y col., 1991). Los resultados comunicados aquí apoyan esta hipótesis ya que en los modelos experimentales empleados sólo encontramos anticuerpos neutralizantes de TS en ratones capaces de controlar el pico de parasitemia. Por el contrario los ratones infectados con la cepa RA, incapaces de controlar el crecimiento del parásito, no se detectaron anticuerpos neutralizantes de TS. Como era de esperar en estos ratones se detectó actividad de TS. Estos resultados nos sugieren que la incapacidad de neutralizar la actividad de TS acompañaría la diseminación de la infección y muerte del huésped. La presencia de anticuerpos neutralizantes en los pocos sobrevivientes de ratones menos susceptibles a la infección con RA convalidan esta hipótesis.

Los anticuerpos anti-unidades repetitivas se detectaron muy tempranamente en la infección (8-10 días pi) tanto en el modelo agudo (RA) como en el crónico (K-98) y persistieron durante todo el período experimental, concordando con los resultados descritos en II.2 Sin embargo, los anticuerpos neutralizantes de TS comenzaron a ser detectados a partir del día 30 pi solamente en el modelo crónico ya que los ratones del modelo agudo mueren antes de haberse gatillado este tipo de respuesta.

Debido a que la TS pertenece a una superfamilia de moléculas antigénicamente relacionadas pero que carecen de actividad enzimática, los ratones infectados con RA podrían estar sumergidos en una red de moléculas antigénicamente relacionadas pero incapaces de generar una respuesta de anticuerpos neutralizantes efectiva.

Nuestros resultados nos permiten elaborar la siguiente hipótesis. En una fase temprana de la infección (alrededor del 8 día pi) (Fig.17) se generarían anticuerpos anti-unidades repetitivas que son incapaces de neutralizar la actividad enzimática, permitiendo la generación de epitopes sialidados necesarios para la invasión celular y de esta forma difundir la infección en el huésped. En una etapa más avanzada, alrededor del día 30 pi, aparecen los anticuerpos neutralizantes de la actividad de TS colaborando en el control de la parasitemia y permitiéndole al huésped alcanzar la etapa crónica de la infección. En este sentido, recientemente se ha identificado en el antígeno TSA1 un epitope inmunodominante que enmascara epitopes relacionados con protección (Wrightman y col., 1994). El antígeno TSA1 pertenece a una de las familias de proteínas relacionadas con la TS que carece de actividad enzimática (Campetella y col., 1992).

Por otra parte, Kierzembaun y col. (1994) comunicaron la presencia en suero de ratones infectados de IgG con capacidad de bloquear la actividad de TIF. Dado que estos anticuerpos sólo están presentes en sueros de infecciones crónicas y no en agudos, los autores proponen que la acción de este factor inmunosupresor durante la fase aguda ayudaría a establecer la infección, mientras que la aparición de anticuerpos que lo bloquean permitiría al huésped restaurar la respuesta inmune específica y el posterior control de la infección.

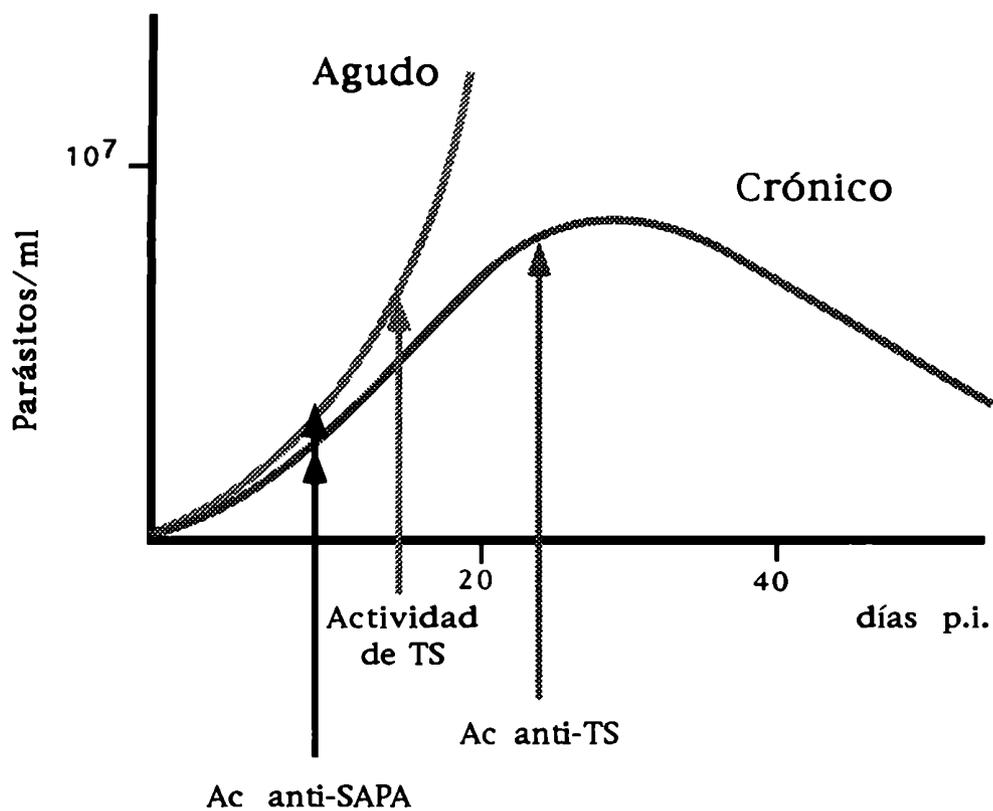


FIGURA N° 17

Diagrama de la respuesta inmune humoral de ratones infectados con *T. cruzi* frente a los antígenos SAPA y TS. Las flechas indican la aparición en suero de los anticuerpos o de la actividad TS. Se comparan los dos modelos estudiados. Para más detalle ver texto.

Vemos así que el parásito podría desarrollar estrategias similares sobre diferentes moléculas blanco a fin de regular su propio crecimiento y alcanzar una relación huésped-parásito que le permita perpetuarse. Si nuestra hipótesis se confirma, la molécula SAPA/TS se convertiría en un ejemplo concreto de una molécula presente en un parásito unicelular, que contiene dos funciones vitales para *T. cruzi*, actividad enzimática y un epítipo inmunodominante, contenidos en dominios funcionalmente independientes.

## VIII. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE TS Y DE LA CAPACIDAD DE NEUTRALIZACION DE TS EN SUEROS DE PACIENTES CHAGASICOS.

Se evaluó la actividad de TS en sueros obtenidos de pacientes chagásicos así como también su capacidad para neutralizarla. En todos los casos analizados incluyendo infecciones crónicas, agudas y congénitas, se detectaron anticuerpos neutralizantes de TS aunque con diferentes niveles de inhibición. Se pudo demostrar que estos anticuerpos están dirigidos contra el dominio catalítico, ya que neutralizan una molécula recombinante activa que carece de las unidades repetitivas. Dado que los sueros empleados provenían de individuos que residen en Paraguay y de pacientes de diferentes áreas endémicas de Argentina, podemos asumir que diferentes cepas de *T. cruzi* generan la misma respuesta de anticuerpos en una población genéticamente heterogénea como es la humana.

En los sueros de pacientes con infección aguda si bien se detectaron anticuerpos neutralizantes, los valores expresados como porcentaje de neutralización fueron muy dispares y menores comparados con los obtenidos utilizando sueros de pacientes crónicos. Esto probablemente se deba a que los pacientes en una etapa temprana de la infección recién estaban montando una respuesta inmune específica y a que paralelamente fueron sometidos a tratamiento antiparasitario lo que altera el curso de la infección en forma variable según el caso.

Es interesante destacar que en los sueros obtenidos de individuos con infección aguda que habían recibido el mismo tratamiento antiparasitario, los anticuerpos anti-SAPA desaparecieron rápidamente, luego de iniciado el tratamiento (Reyes y col., 1993). Similar respuesta se obtuvo con los sueros agudos estudiados en esta tesis, sin embargo, los anticuerpos neutralizantes de la TS persisten con valores más o menos constantes por largos períodos post-tratamiento a pesar de la negativización de la serología convencional.

En la infección humana aguda, se comunicó que a los 10-15 días pi se detecta anticuerpos anti-SAPA (Reyes y col., 1993), mientras que la respuesta dirigida hacia el dominio catalítico es más tardía ya que a los 30 días alcanza como máximo valores del 66% de neutralización de TS. Si

pensamos en términos de invasión y reproducción del parásito, estos tiempos son importantes para favorecer el establecimiento de la infección en el huésped. En una etapa avanzada de la infección humana sólo persisten los anticuerpos con capacidad neutralizante de TS, ya que los anti-SAPA se detectan sólo en un pequeño porcentaje de casos en el período crónico (Afranchino y col., 1989). Esto nos permite especular que los anticuerpos neutralizantes podrían estar relacionados con el control de la invasión celular mediante la inhibición de la transferencia o remoción de ácido siálico a partir de glicoconjugados. Nuestros resultados en el modelo murino apoyan esta hipótesis, ya que los animales que superan la fase aguda tienen anticuerpos neutralizantes, mientras que en los ratones que no sobreviven a la infección no son detectados.

La presencia de anticuerpos neutralizantes en niños no infectados, nacidos de madres con infección crónica, seguramente se debe al pasaje transplacentario de inmunoglobulinas, ya que algunos meses después del nacimiento estos anticuerpos desaparecen de la circulación.

Los resultados obtenidos con sueros de niños con infección congénita fueron muy diferentes: los anticuerpos neutralizantes post-tratamiento sólo mostraron una tendencia a la negativización, mientras que por serología convencional se negativizaron. En ningún caso los valores de neutralización alcanzaron los valores mínimos obtenidos con sueros de recién nacidos normales, a pesar de haberse realizado seguimientos por períodos más prolongados. Estos resultados podrían estar indicando una baja infección remanente post-tratamiento, a pesar que la serología convencional se mantuvo negativa durante 17 y 51 meses y los ensayos tendientes a la detección del parásito como hemocultivo y microhematocrito, arrojaron resultados negativos. Cabe recordar que en los seguimientos post-tratamiento realizados con sueros de individuos agudos, también se observó la persistencia de los anticuerpos neutralizantes de TS a pesar de la negativización de la serología convencional. Andrade y col. (1991) detectaron la presencia de antígenos parasitarios unidos a la membrana de células de centros germinales de folículos linfoides de bazo de ratones infectados tratados y parasitológicamente curados, pero serológicamente positivos. Esta persistencia antigénica también podría ser responsable de la persistencia post-tratamiento de anticuerpos neutralizantes de TS observada.

Los hallazgos obtenidos, además de contribuir al esclarecimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la infección crónica por *T. cruzi*, también pueden tener aplicaciones prácticas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. La detección de tripomastigotes durante la fase crónica de la enfermedad es muy difícil debido al bajo número de parásitos circulantes, por ello el diagnóstico se realiza por detección de anticuerpos específicos utilizando complejas mezclas de moléculas llevando a resultados falsos negativos y positivos. El diagnóstico altamente específico es importante principalmente en aquellas regiones donde se superponen zonas endémicas de *T. cruzi* con las de *Leishmania sp.* y *T. rangeli*, parásitos que comparten antígenos con *T. cruzi*. El uso de antígenos recombinantes no compartidos podría ser una alternativa para resolver este problema. La actividad de TS/NA no ha sido detectada en *Leishmania sp.* Por su parte, *T. rangeli* presenta actividad de sialidasa que no es inhibida por los anticuerpos neutralizantes de la actividad de TS de *T. cruzi* (Lic. A. Buschiazio, comunicación personal). La reacción de inhibición parece ser lo suficientemente específica como para permitirnos emplear suero sin diluir. Por lo anteriormente expuesto, la detección de anticuerpos específicos utilizando como antígeno la enzima recombinante podría contribuir a optimizar la especificidad y sensibilidad serológica en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, así como su aplicación al seguimiento de pacientes tratados con quimioterápicos.

Nos encontramos así frente a una molécula naturalmente quimérica constituida por un antígeno inmunodominante y por un dominio conteniendo la actividad enzimática de trans-sialidasa. Vemos pues que distintos dominios de una misma molécula nos permitirían diagnosticar pacientes con infección aguda o congénita y pacientes en la etapa crónica de la infección por *T. cruzi*.

## CONCLUSIONES

- Los antígenos 1, 30 y SAPA se expresan simultáneamente en tripomastigotes sanguíneos obtenidos de ratones eutímicos o atímicos. Por lo tanto se puede descartar variación antigénica y la presencia de subpoblaciones parasitarias portadoras de diferentes antígenos como responsables de la variación de la respuesta inmune observada. Se sugiere que el cambio de especificidad de la respuesta humoral humana en las etapas aguda y crónica, no se debe a la expresión secuencial de los antígenos sino a la propia respuesta del huésped.

- Los antígenos 1, 2, 13, 30, 36 y SAPA no estarían relacionados con la capacidad de invadir células.

-. La respuesta humoral murina hacia los antígenos recombinantes 1, 2, 13, 30, 36, y SAPA difiere de la presentada por el humano: en el modelo murino está dirigida principalmente hacia el antígeno SAPA y en menor proporción al antígeno 13, ya sea en infecciones de cepas de ratones resistentes o susceptibles inoculadas con cepas virulentas o atenuadas de *T. cruzi*. La misma respuesta se obtiene al analizar las etapas aguda y crónica de la infección.

- La falta de respuesta hacia los antígenos 1, 2 y 36 durante la infección; no es debida a vacíos en el repertorio de células B dado que el ratón tiene capacidad para montar una respuesta humoral efectiva cuando se lo inmuniza con los antígenos recombinantes.

- La actividad de trans-sialidasa solo se detecta en sueros de ratones que no superan la etapa aguda de la infección (inoculados con la cepa RA), no se detecta en sueros de ratones que alcanzan la etapa crónica (inoculados con K-98) y que sí desarrollan anticuerpos neutralizantes dirigidos hacia el dominio enzimático de la molécula.

- Los niveles de TS en extractos parasitarios de la cepa RA y el clon K-98 son semejantes, por lo que las diferencias en su detección en suero no

se debe a diferencias de expresión en las poblaciones parasitarias empleadas.

- La aparición temprana de anticuerpos anti-SAPA (no neutralizantes) y de actividad de TS permitiría la diseminación del parásito hasta la aparición de anticuerpos con capacidad neutralizante de la actividad enzimática que colaborarían en el control de la infección y pasaje a la cronicidad.

- Los pacientes en la etapa crónica de la infección poseen anticuerpos séricos capaces de neutralizar la actividad de TS hasta en un 92%, mientras que los valores alcanzados por los anticuerpos obtenidos de individuos tratados en la etapa aguda de la infección son menores y muy variables.

- Los niños congénitamente infectados poseen anticuerpos anti-TS que persisten por largos tiempos post-infección, a pesar del tratamiento antiparasitario. Los niños normales nacidos de madres infectadas poseen en los primeros días de vida igual capacidad de neutralización por anticuerpos séricos a la detectada en su madre. Este nivel desciende significativamente aproximadamente a los 6 meses de vida.

- El dosaje de anticuerpos neutralizantes de TS, puede ser de utilidad diagnóstica ya que la actividad de trans-sialidasa no está presente en *Leishmania sp.* y *T. rangeli* lo que permite proponer el uso de la enzima recombinante activa para el diagnóstico de la fase crónica de la infección. Vemos entonces que diferentes dominios de una misma molécula SAPA/TS, nos permitiría diagnosticar pacientes en la etapa aguda (SAPA) y pacientes en la etapa crónica (TS) de la infección.

**BIBLIOGRAFIA**

- Affranchino J.L., Ibañez C. F., Luquetti A. O., Rassi A., Reyes M.B., Macina R.A., Aslund L., Petterson U. and Frasch A.C.C. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34: 221, 1989.
- Affranchino J.L., Pollevick G. and Frasch A.C.C. *FEBS Lett* 280: 316, 1991.
- Alonso J. M. Pividori S and Guilleron C. *Medicina (B. Aires.)* 46: 69, 1986.
- Alves M.J. and Colli W *FEBS Lett* 52: 188,1975.
- Alves M.J., Abuin G., Kuwaijima V. Y. and Colli W. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21: 75, 1986.
- Andrade S.G., Freitas L.A.R., Peyrol S., Pimentel A.R. and Sadigursky M. *Bull. WHO* 69: 191, 1991.
- Andrews N.W., Abrams C.K., Slatin S.L. and Griffiths G. *Cell* 61: 1277, 1990.
- Andrews N.W., Alves M.J.M., Schumacher R.I. and Colli W. *Exp. Parasitol.* 60: 255, 1985.
- Andrews N.W., Einstein M and Nussenzweig V. *Am. J. Trop. Med.* 40: 46, 1989.
- Andrews N.W., Hong K.S., Robbins E.S. and Nussenweig V. *Exp. Parasitol.* 64: 474, 1987.
- Andrews N W., Robbins E.S., Ley V., Hog K.S. and Nussenzweig V. *J. Exp. Med.* 167: 300, 1988.
- Araujo F. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34: 242, 1985.
- Araujo F. and B. Morein *Infect. Immun.* 59: 2909, 1990.
- Araujo F. *Infect. Immun.* 53: 179, 1986.
- Araujo F.G., Heilman B. and Tighe L. *Transc. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78: 672, 1984.
- Araujo J. *Lancet* 1: 246, 1981.
- Arnholdt A.C.V., Piuvezam M.R., Russo D.M., Lima A.P.C., Pedrosa R.C., Reed S.G. and Scharfstain J. *J. Immunol.* 151: 3171, 1993.
- Basombrío M. A., Besuschio S., Cossio P. *Infect Immun* 36: 342, 1982.
- Bice D.E. and Zeledón R. *J. Parasitol.* 56:663, 1970.

- Bongerts V. Mem. Inst. Osw.Cruz 76: 71, 1981.
- Brack C.I. Acta Trop (Basel) 25: 289, 1968.
- Bradford M. Anal. Biochem. 72: 248, 1976.
- Brener Z. En: "*Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas". Brener Z. y Andrade Z., Editores. Rio de Janeiro Guanbara Koogan, Brasil. P. Cap 1. (1979).
- Brener Z. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79: 149, 1984.
- Buschiazzo A., Campetella O.E., Macina R., A., Salceda S., Frasch A.C.C. and Sánchez D.O. Mol. Biochem. Parasitol. 54: 125, 1992.
- Camargo M.E. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 8: 227, 1966.
- Camargo M.E. and Takeda G.F.K. Diagnostico de laboratorio. En: "*Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas". Brener Z. y Andrade Z., Editores. Rio de Janeiro, Guanbara Koogan, Brasil. Cap. 5, 1979.
- Campetella O.E., Henrinksson J. Aslund L. Frasch A.C.C. Petterson U. and Cazzulo J.J. Mol. Biochem. Parasitol. 50: 225, 1992b.
- Campetella O.E., Sánchez D.O., Cazzulo J.J. and Frasch A.C.C. Parasitol. Today 8: 378, 1992a.
- Campetella O.E., Utaro A.D., Parodi A.J. and Frasch A.C.C. Mol. Biochem. Parasitol. 64:337, 1994.
- Cardoni R., Rimoldi M.T. and Bracco M.M.E. Cell Immunol.86: 518, 1984.
- Carneiro M., Chiari E., Goncalves A.M., da Silva Pereira A.A., Morel C.M. and Romanha A.J. Acta Tropica 47: 35, 1990.
- Cazzulo J.J. and Frasch A.C.C. FASEB J. 6: 3259, 1992.
- Cazzulo J.J., Cazzulo Franke M., Martinez J and Franke de Cazzulo B.M. Biochim. Biophys. Acta 1037:186, 1990.
- Celentano A.M. and González Cappa S.M. Parasite Immunol. 14: 155, 1992.
- Chaves L.B., Briones M.R.S. and Schenkman S. Mol Biochem. Parasitol.61: 97, 1993.
- Chiari E. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo16: 61, 1974.
- Contreras V.T., Araque W. and Delgado V.S. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 89: 253, 1994.
- Contreras V.T., Salles J.M., Thomas N. Morel C.M. and Goldemberg S. Mol. Biochem. Parasitol. 16:315, 1985.

- Corral R., Freilij H. and Grinstein S. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 29: 26, 1987.
- Corral R., Montemayor A., Freilij H and Grinstein S. *IRCS Med. Science* 12: 949, 1984.
- Corral R., Orn A. Freilij H. Bergman T. and Grinstein S. *J. Clin. Microbiol.* 27:145, 1989.
- Corral R., Orn A. and Grinstein S. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46:1, 1992.
- Culbertson, J.T., Kessler W.R. *J. Parasitol.* 28:155, 1942. Citado en: "Enfermedad de Chagas" Cap.6, 1994.
- Cunningham D.S. and Kuhn R. *J. Immunol.* 124:2122, 1980.
- Cura E., Ruiz A., Velazquez E., Malagrino N., Orn A. y Segura E. *Medicina (B.Aires.)* 53: 82, 1993.
- Curto de Casas S.I. En: "Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas" Tomo I Epidemiología-Vectores. Carcavallo R.U., Rabinovich J.E., Tonn R.J. Ed. 1985. O.P.S., Servicio Nacional de Chagas Ministerio. de Salud y Acción Social.
- D'Imperio Lima M. R., Eisen H., Minoprio P., Joskowicz M. and Coutinho A. *J. Immunol.* 137: 353, 1986.
- De Rezende M.J. y Luqueti Ostermayer A. En: "Enfermedad de Chagas" Doyma Argentina S.A., Cap. 20, 1994.
- De Souza W. *Int. Rev. Cytol.* 86: 197, 1984.
- De Titto E. H. En: " Enfermedad de Chagas" Doyma Argentina S.A., Cap.6, 1994.
- De Titto E.H. and Araujo F.G. *Acta Tropica* 44: 273, 1987.
- De Titto E.H. and Araujo F.G. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 46: 157, 1988.
- Dragon E. A., Sias S. R., Kato E.A. and Gabe J.D. *Molec. Cell. Biol.* 7: 1271, 1987.
- Duschak V.G. and Cazzulo J.J. *FEMS Microbiol. Lett.* 67: 131, 1991.
- Eakin A.E., Mills A.A., Harth G., McKerrow J.H. and Craig C.S. *J. Biol. Chem.* 267: 7411, 1992.
- Engman D.M., Sias S.R., Gabe J.D., Donelson J.E. and Dragon E.A. *Mol Biochem. Parasitol.* 37:285, 1989.
- Ferguson M., Allen A. and Snary D. *J. Biochem.* 213: 313, 1983.
- Ferguson M.A.J. *Parasitol. Today* 10: 48, 1994.

- Fouts D.L., Ruef B.J., Ridley P.T., Wrightsman R.A., Peterson D.S. and Manning J.E. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46:189, 1991.
- Franco F., Paranhos-Bacalla G.S., Yamauchi L.M., Yoshida N. and Da Silveira F.J. *Infec. Immun.* 61: 4196, 1993
- Frasch A.C.C. *Parasitol. Today* 10: 170, 1994.
- Frasch A.C.C., Cazzulo J.J., Aslund L and Petterson U. *Parasitol. Today* 7: 148, 1991.
- Freilij H., Altech J. y Storino R. En "Enfermedad de Chagas" Doyma Argentina S.A., Cap.15, 1994.
- Freilij H., Corral R., Katzin A. and Grinstein S.J. *Clin. Microbiol.* 25: 33, 1987.
- Freilij H., Muller L. and González Cappa S.M. *J. Clin. Microbiol.* 25: 133, 1983.
- Frevort U., Schenkman S. and Nussenzweig V. *Infec. Immun.* 60: 2349, 1992.
- Gazzinelli R.T., Leme V.M., Cancado J.R., Gazzinelli G. and Scharfstein J. *Infec. Immun.* 58: 1437, 1990.
- Goncalves M.F., Umezawa E.S., Katzin A.M., de Souza W., Alves M.J., Zingales B. and Colli W. *Exp. Parasitol.* 72: 43, 1991.
- González Cappa S.M., Bijovsky T., Freilij H., Muller L y Katzin A. *Medicina (B. Aires)* 41: 119, 1981.
- González Cappa S.M., Chiale P., Del Prado G.E., Katzin A.M., Martini G. W., Isola E.D., Abramo O.L. y Segura E.L. *Medicina (B. Aires)*40: 63, 1980a.
- González Cappa S.M., Kloetzel J., Katzin A. and dos Santos R. *Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo* 22: 275, 1980b.
- González J., Araguth M. Y. and Yoshida N. *Infec. Immun.* 59:863,1991.
- Grauer M.R., Houdayer M. and Hontebeyre-Joskowicz M. *Clin. Exp. Immunol.* 93:85, 1993.
- Gruber A. and Zingales B. *Exp. Parasitol.* 75:1, 1993.
- Guhl F. *Mem. Inst. Osw. Cruz* 85:531, 1990.
- Gusmao R., Rezende J.M., Rassi A., Gam A.A. and Neva F. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 452, 1982.
- Guther M.L.S., Cardoso de Almeida M.L., Yoshida N and Ferguson M.A. *J. Biol. Chem.* 267: 6820, 1992.

- Hall B.F., Webster P., Ma A.K., Joiner K. and Andrews N. J. *Exp. Med.* 176: 313, 1992.
- Harlow E. and Lane D. "Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Hauschka T.S., *J. Parasitol.* 33:399, 1947. Citado en "*Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas" Brener Z. y Andrade Z., Editores Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, Brasil Cap. I, 1979.
- Hernández-Munain C., De diego J.L., Alcina A. and Fresno M. J. *Exp. Med.* 175: 1473, 1992.
- Hoare C.A. J. *Protozool.* 11: 206, 1964.
- Hoft D. F., Kim K.S., Otsu K., Moser D.R., Yost W.J., Blumin W.J., Donelson J. E. and Kirchoff J.V. *Infec. Immun.* 57: 1959, 1989.
- Ibañez C. F., Afranchino J.J. and Frasc A.C.C. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25: 175, 1987.
- Ibañez C. F., Afranchino J.L., Macina R. A., Reyes M.B., Leguizamón M.S., Camargo M.E., Aslund L., Petterson U and Frasc A.C.C. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30: 27, 1988.
- Ilda K. and Ley V. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45: 619, 1991.
- Israelski D., Sadler R. and Araujo F. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39: 445, 1988.
- Jazin E., Luquetti A. O., Rassi A and Frasc A.C.C. *Infec. Immun.* 59: 2189, 1991.
- Jazin E., Sánchez D.O., Aslund L., Henriksson J and Petersson U. *Parasitology*, 110: 61, 1995.
- Joiner K., Hienny S., Kirchoff L and Sher A. J. *Exp. Med.* 161:1196, 1985.
- Kaspar P., Velazquez G., Monzon M.I., Meza T., Vera M.E., Pozzol L., Guillen I., Merlo R., Samudio M. and Rodríguez A. *Mem. Inst. Osw. Cruz* 83 (Suppl.I): 125, 1988.
- Katzin A.M. and Colli W. *Biochim Biophys Acta* 727: 403, 1983.
- Katzin A.M., Alves M.J., Abuin G. and Colli W. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:341, 1989.
- Kemp D.J., Coppel R.L., and Anders R.F. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 181, 1987.
- Khan T., Corral R., Freilij H and Grinstein S. *I.R.C.S. Med. Science* 11:670, 1983.

- Kierzembaum F. and Budzko D. *Infec. Immun.* 12:461, 1975.
- Kierzembaum F. and Budzko D. *Parasite Immunol.* 4:441, 1982.
- Kierzembaum F., Cuna W.R., Beltz L.A. and Szein M.B. *J. Immunol.* 144: 4000, 1990.
- Kierzembaum F., Mejia Lopez H. and Szein M.B. *Immunology* 81: 462, 1994.
- Kirchoff L.V., Engel J.C., Dvorak J.A. and Sher A. *Mol. Biochem. Parasitol.* 11: 81, 1984 a.
- Kirchoff L. V., Hieny S., Shiver M., Snary D and Sher A. *J. Immunol.* 133:2731, 1984 b.
- Krettli A. U. and Brener Z J. *Immunol.* 128: 2009, 1982.
- Krettli A.U. *Afr. J. Clin. Exp. Immunol.* 3: 327, 1982.
- Krieger M.A., Almeida E., Oelemann W., Lafaille J.J., Borges Pereira J., Krieger H., Carvalho M.R. and Goldemberg S. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 427, 1992.
- Laemmli U.K. *Nature* 227:680, 1970.
- Lafaille J.I., Linss J., Krieger M.A., Souto Padron T., De Souza W. and Goldemberg S. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35: 127, 1989.
- Lederkremer R.M., Alves M.J.M., Fonseca G.C. and Colli W. *Biochim. Biophys. Acta* 444: 85, 1976.
- Lederkremer R. M., Lima C., Ramirez M.I., Ferguson M.A.J., Homans S.W. and Thomas-Oate J. *J. Biol. Chem.* 266: 23670, 1991.
- Lemesre J.L., Afchain D., Orozco O., Loyens M., Breniere F.S., Desjeux P., Carlier Y., Martin U., Nogueira-Queiroz J.A. , Le Ray D. and Capron A. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 86, 1986.
- Levin M.J., Mesri E., Benarous R., Levitus G., Schijman A., Levy-Yeyati P., Chiale P.A., Ruiz A.M., Khan A., Rosenbaum M., B., Torres H. and Segura E.L. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41: 530, 1989.
- Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E.G., Devoux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Polzansky G., Spragne V., Vassa J. and Wallace F. *J. Protozool.* 27:37, 1980.
- Macina R.A., Affranchino J.J., Pollevick G.D., Jazin E. and Frasch A.C.C. *FEBS Lett.*, 257:365, 1989.
- Malchiodi E., Chiaramonte M., Martínez J.A., Zwirner N. W., Margni R.A. and Cazzulo J.J. *Immunol. Lett* 35:59, 1993.

- Martin V.O., Afchain D., Loyens M., Maidana C and Capron A. *Medicina (B.Aires.)* 49:33, 1989.
- Martinez J.A., Campetella O.E., Frasc A.C.C. and Cazzulo J.J. *Infec. Immun* 59:4275, 1991.
- Matsumoto T.K., Hoshino-Shimizu S., Nakamura P.M., Andrade H.F. Jr and Umezawa E.S. *J. Clin. Microbiol.* 31:1486, 1993.
- Mc Conville M.J. En: *Biochemical Protozoology* (G.H. Coombs and M.J. North, Eds) Taylor and Francis Ltd., London, 1991.
- Mc Cormick T.S., Rowland E.C. *Exp. Parasitol.* 77:273, 1993.
- Mc. Hardy N. *Tropenmed. Parasit.* 29:215, 1978.
- Meirelles M.N.L., Juliano L., Carmona E., Costa E.M., Silva S.G., Lima A.T.V.C., Arnholdt A.V., Leme V.M.C., Guimaraes E.S.P. Berro O.J. and Scharfstein J. *Mem. Inst. Osw. Cruz* 85: 533, 1990.
- Ming M., Chuenkova M., Ortega-Barria E. and Pereira M.E. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59: 243, 1993.
- Minoprio P., Burlen O., Pereira P., Guilbert B., Andrade L., Hontebeyre-Joskowicz M. *Scand. J. Immunol.* 28: 553, 1988.
- Minoprio P., Eisen H., Forni L., D'Imperio Lima M.R., Joskowicz M. and Coutinho A. *Scand. J. Immunol.* 24: 661, 1986.
- Moya P. En: "Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas". Madoery R., Madoery C. y Camera M.I. Editores, p.229, 1992.
- Muller L. A., Añasco N. and González Cappa S.M. *Exp. Parasitol.* 61: 284, 1986.
- Murta A.C.M., Persechini P.M., Souto-Padrón T., De Souza W., Guimaraes J., and Scharfstein *Mol. Biochem. Parasitol.* 43:27, 1990.
- Nickell S.P., Keane M and So M. *Infec. Immun.* 61: 3250, 1993.
- Nogueira N., Chaplan S., Reesnik N., Tydings J and Cohn Z.A. *J. Immunol.* 128:2142, 1982a.
- Nogueira N., Chaplan S., Tydings and Cohn Z. *J. Exp. Med.* 153: 629, 1981.
- Nogueira N., Unkeless J. and Cohn Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79: 1259, 1982b.
- Norris K.A., Galvao L.M.C., Schrimpf J. E. Cançado J. R. and Kretlli A. *Infec. Immun.* 62: 4072, 1994.
- Okabe K., Kipnis T. L., Calich V.L. and Dias Da Silva W. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 16: 344, 1980.

- Olabuenaga S.E., Cardoni R., Segura E.L. Riera N.E. and Bracco M.M.E. *Cell. Immunol.* 45:85, 1984.
- Orozco O., Afchain D., Dissous C., Rodriguez C., Ovlaque G., Lemesre J.L., Loyens M. and Capron A. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 33: 560,1984.
- Ortega-Barría E. and Pereira M.E.A. *Cell* 67: 411, 1991.
- Ouaissi M.A., Cornette J., Afchain D., Capron A., Gras-Masse H. and Tartar A. *Science* 234:603, 1986 a.
- Ouaissi, M.A., Cornette J. and Capron A. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19: 201, 1986 b.
- Ouaissi A.M., Taibi A., Loyens M., Martin U., Afchain D., Maidana C., Caudioti C., Cornette J., Martelleur A., Velge P., Marty B. and Capron A. *Am.J. Trop. Med. Hyg.* 45: 214, 1991.
- Pan S.C. *Exp. Parasitol* 45: 215, 1978.
- Paranhos-Bacalla G.S., Santos M.R., Cotrim P.C., Rassi A., Jovilet M., Camargo M.E. and Da Silveira J.F. *Parasite Immunol.* 16: 165, 1994.
- Parodi A.J., Pollevick G.D., Mautner M., Buschiazzo A., Sánchez D.O. and Frasch A.C.C. *EMBO J.* 11: 1705, 1992.
- Pearlstein E.L., Gold L.I. and Garcia Pardo A. *Mol. Cell. Biochem.* 29: 103, 1980.
- Pereira M.E.A., Loures M.A., Villalta F. and Andrade A.F.B. *J. Exp. Med.* 152: 1375, 1980.
- Pereira M.E.A., Santiago Mejia J., Ortega-Barría E., Matzilevich D. and Prioli R.P. *J. Exp. Med.* 174: 179, 1991.
- Pereira-Chioccola V.L., Schenkman S. and Kloetzel J.K. *Infec. Immun.* 62: 2973, 1994.
- Pestel J., Deffort J.P., Gras-Masse H., Afchain D., Capron A., Tartar A. and Ouaissi A. *Infec. Immun.* 60: 715, 1992
- Peterson D.S., Fouts D.L. and Manning J.E. *EMBO J.* 8: 3911, 1989.
- Petry K. and Van Voorhis W. C. *Research Immunol.* 142: 125, 1991.
- Petry K., Nudelman E., Eisen H. and Hakomori Sen-itiroh. *Mol. Biochem. Parasitol.*30: 113, 1988.
- Piras M.M., Henriquez D. and Piras R. *Mol. Biochem. Parasitol.*22: 135, 1987.
- Pizzi T. *Inmunología de la Enfermedad de Chagas.* Universidad de Chile (ed.) p 183, 1956.

- Pollevick G.D., Afranchino J.L., Frasc A.C.C. and Sánchez D.O. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47: 247, 1991.
- Porcel B., Bua J., Esteva M., Bontempi E., Segura E.L. and Ruiz A.M. *An. Asoc. Quim. Arg.ent.* 80: 271, 1992.
- Primavera K.S.C., Hoshino-Shimizu, Umezawa E., Peres B.A., Manigot D.A. and Camargo M.E. *J. Clin. Micobiol.* 26: 2101, 1988.
- Prioli R.P., Ortega-Barria E., Santiago Mejia J. and Pereira M.E.A. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52: 85, 1992.
- Puigbó J.J., Giordano H., Suárez C., Acquatella H., Combellas I. En: *Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas*. Madoery R., Madoery C. and Cámara M.I. Editores, p. 27,1992.
- Ramirez I., De Cassia Ruiz R., Araya J.E., Da Silveira Franco J. and Yoshida N. *Infec. Immun.* 61: 3636, 1993.
- Requena J. M., López M.C., Jimenez-Ruiz A., de La Torre J.C. and Alonso C. *Nucl. Acids Res.* 16: 1393, 1988.
- Reyes M.B., Luquetti A.O., Rassi A. and Frasc A.C.C. *An. Asoc. Quím. Argen.* 81:101, 1993.
- Reyes M.B., Pollevick G.D. and Frasc A.C.C. *Gene* 140: 139, 1994.
- Reyes M.P., Lorca M., Muñoz P., and Frasc A.C.C. *Proc. Natl Acad Sci (USA)* 87: 2846, 1990.
- Rosestein-Campanini A., Blanco S., Alvarez M., de Rissio A.M., Lansetti J.C. and Segura E.L. En: "*Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas*". Madoery R., Madoery C. y Camera M.I. Ed, p.237, 1992.
- Rottemberg M.E., Cardoni R.L. and Segura E. L. *Int. J. Parasitol.* 20: 397, 1990.
- Rottemberg ME., Sunnemark D., Leandersson T. and Orn A. *Scand. J. Immunol.* 37:559, 1993.
- Ruiz A., Esteva M., Subias E., Moreno M. Rosestein-Campanini A., Velazquez E. and Segura E.L. *Mol. Biochem. Parasitol.*39:117, 1990.
- Ruiz R. de C., Rigoni V.L., González J. and Yoshida N. *Parasite Immunol.* 15:121, 1993.
- Sadigursky M., Acosta A. and Santos Busch Ch. A. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31:934, 1982.
- Sánchez D. O and González Cappa.S.M. *Medicina (Bs Aires)* 43: 41, 1983.

- Scharfstein J., Luqueti A., Murta A.C. Sinna M., Rezende J., Rassi A and Mendonça Previato L. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34: 153, 1985.
- Scharfstein J., Schechter M., Senna M., Peralta J.M., Mendonça-Previato L and Miles M.M. *J. Immunol.* 137: 1336, 1988.
- Schechter M, Flint F.E., Voller A., Guhl F., Marinkelle C.J and Miles M.A. *Lancet* 11: 939, 1983.
- Schechter M. and Nogueira N. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29: 37, 1988.
- Schenkman R.P.F., Vandekerckhove F. and Schenkman S. *Inf. Immun.* 61 : 598, 1993 a.
- Schenkman S., Chaves L.B., Pontes de Carvalho L. and Eichinger D. *J. Biol. Chem.* 269: 7970, 1994.
- Schenkman S., Ferguson M.A., Heise N., Cardoso de Almeida M.L., Mortara R. and Yoshida. N. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59: 293, 1993 b.
- Schenkman S., Jiang M., Hart G. and Nussenweig V. *Cell* 65: 1117, 1991.
- Schenkman S., Kurosaki T., Ravetch J.V. and Nussenweig V. *J. Exp. Med.* 175: 1635, 1992.
- Schenkman S., Yoshida N. and Cardoso de Almeida M.L. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29: 141, 1988.
- Schijman A.G., Dusetti M.J., Vázquez M.P., Lafon M., Levy-Yeyati P. and Levin M.J. *Nucleic Acids Res* 18:3399, 1990.
- Schmuñis G.A. En: "La Enfermedad de Chagas y Sistema Nervioso", OPS, Cap.1, 1994.
- Schmuñis G.A., Szarfman A., De Souza W. and Langembach T. *Exp. Parasitol.* 50:90, 1980.
- Schmuñis G.A., Szarfman A., Coarsa L and Vainstok C. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27:473, 1978.
- Schneider A., Hemphill A., Wyler T. and Seebeck T. *Science* 241:459, 1988.
- Schofield L. *Parasitol. Today* 7: 99, 1991.
- Scott M.T. and Snary D. *Nature* 282:73, 1979.
- Scott M.T., Bahr G. Moddaber F., Afchain D. and Chedid L. *Int. Arch. All Appl. Immun.* 74:373, 1984.
- Segura E.L., Esteva M., Quintans C.J., Montoro L.S. and Weissenbacher. *Medicina (B Aires)* 41:328, 1981.

- Segura E.L., Vázquez C., Bronzina A., Campos J.M., Cerisola J.A. and González Cappa S.M. *J. Protozool.* 24:540, 1977.
- Sher A. and Snary D. *Nature* 300: 639, 1982.
- Silva L.H. and Nussenzweig V. *Folha Clin. Biol. Sao Paulo* 20:191, 1953.
- Skeiky Y.A., Benson D.R., Guderian J.A., Sleath P.R. Parsons M. and Reed S.C. *J. Immunol.* 151: 5504, 1993.
- Snary D. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 126, 1983.
- Snary D. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 587, 1985.
- Snary D., Ferguson M., Scott M and Allen A.K. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3: 343, 1981.
- Snary D. and Hudson L. *FEBS Lett.*, 100: 166:, 1972
- Souto-Padrón T., Campetella O.E., Cazzulo J.J. and De Souza W. *J. Cell. Sci* 96: 485, 1990.
- Souto-Padrón T., Reyes M.B., Leguizamón M.S., Campetella O.E., Frasch A.C.C. and De Souza W. *Eur. J. Cell. Biol.* 50:272, 1989.
- Sztein M. B. and Kierzembraum F. *J. Immunol.* 77: 277, 1992.
- Sztein M., Cuna W.R. and Kierzembraum F. *J. Immunol.* 144: 3558, 1990.
- Taibi A, Plumas-Marty B., Guevara-Espinoza A., Schonek R., Pessoa H., Loyens M., Piras R., Aguirre T., Gras-Masse H., Bossus M., Tartar A., Capron A. and Ouaiissi A. *J. Immunol.* 151: 2676, 1993.
- Tambourgi D.V., Kipnis T. L., da Silva W.D., Joiner K., Sher A., Heath S., Fenton Hall B. and Ogden G. B. *Infec. Immun.* 61: 3656, 1993.
- Tarleton R. *J. Immunol.* 144: 717, 1990.
- Tarleton R., Koller B.H., Latour A. and Postan M. *Nature* 356: 338, 1992.
- Tibbets R.S., Mc Cormick T.S., Rowland E.C., Miller S.D. and Engman D.M. *J. Immunol.*, 152: 1493. 1994.
- Tomlinson S., Pontes de Carvalho L.C., Vandekerckhove and Nussenweig V. *J. Immunol.* 153: 3141, 1994.
- Trischmann T., Tanowitz H., Wittner M y Bloom B. *Exp. Parasitol.* 45: 160, 1978.
- Uemura H., Schenkman S., Nussenzweig V. and Eichinger D. *EMBO J.* 11:3837, 1992.

- Umezawa E.S., Shikanai-Yasuda M.A. da Silveira J.F., Cotrim P.C., Paranhos G. and Katzin A.M. *Exp. Parasitol.* 76:352, 1993.
- Van Voorhis W. C., Barret L., Koelling R and Farr A.G. *J. Exp. Med.* 178: 681, 1993
- Van Voorhis W. J. *Immunol.* 148: 239, 1992.
- Van Voorhis W. and Eisen H. J. *Exp. Med.* 169: 641, 1989.
- Van Voorhis W.C., Sclekewy L. and Le Trong H. *Proc. Natl.Acad.Sci. (USA)* 88: 5995, 1991.
- Vattuone N.H., Szarfman A. and González Cappa S.M. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76:45, 1973.
- Villalta F. and Kierzembaum F. J. *Immunol.* 131: 1504, 1983.
- Villalta F., Lima M.F. and Lin Z. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 925, 1990.
- Villalta F., Lima M.F., Ruiz-Ruano A. and Lin Z. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182:6, 1992.
- WHO Technical Report Series N°811. "Control of Chagas Disease", 1991.
- Wood J.N., Hudson L., Jessell T. M. and Yamamoto M. *Nature* 296: 34, 1982.
- Wrightsmann R.A., Dawson B.D., Fouts D.L. and Manning J. J. *Immunol.* 153:3148, 1994.
- Wrightsmann R.A., Miller M., Saborio J.L. and Manning J.E. *Infect. Immun.* 63: 122, 1995.
- Yoshida N., Blanco S.A., Araguth M.F., Ruso M. and González J. *Molec. Biochem. Parasitol.* 39: 39, 1990.
- Zwitner N., Malchiodi E., Chiaramonte M.G. and Fossatti C.A. *Infect. Immun.*, 62: 2483, 1994.