

## Tesis de Posgrado

# Antígenos, epítopes y autoepítopes en la infección por *Trypanosoma cruzi* : Autoinmunidad en la enfemedad de Chagas vs. autoinmunidad sistemática

Kaplan, Dan

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:**

Kaplan, Dan. (1995). Antígenos, epítopes y autoepítopes en la infección por *Trypanosoma cruzi* : Autoinmunidad en la enfermedad de Chagas vs. autoinmunidad sistemática. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2787\\_Kaplan.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2787_Kaplan.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Kaplan, Dan. "Antígenos, epítopes y autoepítopes en la infección por *Trypanosoma cruzi* : Autoinmunidad en la enfermedad de Chagas vs. autoinmunidad sistemática". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2787\\_Kaplan.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2787_Kaplan.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ANTIGENOS, EPITOPES Y AUTOEPITOPES EN LA  
INFECCION POR *Trypanosoma cruzi*:  
AUTOINMUNIDAD EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS vs.  
AUTOINMUNIDAD SISTEMICA.

*DAN KAPLAN*

TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO DE DOCTOR DE LA  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

DIRECTOR: DR. MARIANO JORGE LEVIN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGIA  
MOLECULAR (INGEBI-CONICET).

1995

1027874

y2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ANTIGENOS, EPITOPES Y AUTOEPITOPES EN LA  
INFECCION POR *Trypanosoma cruzi*:  
AUTOINMUNIDAD EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS vs.  
AUTOINMUNIDAD SISTEMICA.

*DAN KAPLAN*

TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO DE DOCTOR DE LA  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

DIRECTOR: DR. MARIANO JORGE LEVIN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGIA  
MOLECULAR (INGEBI-CONICET).

1995

## APOYO INSTITUCIONAL

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires.
- Convenio de Cooperación INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale, Francia)- CONICET.
- Convenio de Cooperación CNRS (Centre Nationale pour la Recherche Scientifique, Francia)- CONICET.
- Ministere d' Affaires Etrangeres, France, Cooperation Regionale Francaise, Embajada de Francia en Argentina.
- UNDP-Banco Mundial-Organización Mundial de la Salud (OMS), Programa Especial de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR).
- UNIDO/ICGEB-ARG91-01 Collaborative Research Programme.
- Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CyTED).

## PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL PERIODO DE TESIS

1. Levin, M.J., Vazquez, M., Kaplan, D., Schijman, A.G. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein family: Classification and antigenicity. **Parasitol. Today** **9**, 381-384, 1993.
2. Kaplan, D., Vazquez, M., Lafon, S., Schijman, A.G., Levitus, G., Levin, M.J. The chronic presence of the parasite and anti-P autoimmunity in Chagas disease: The *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins, and their recognition by the host immune system. **Biol. Res.** **26**, 273-275, 1993.
3. Levin, M.J., Kaplan, D., Ferrari, I., Arteman, P., Vazquez, M., Panebra, A. Humoral autoimmune response in Chagas disease: *Trypanosoma cruzi* ribosomal antigens as immunizing agents. **FEMS Microbiol Medical Immunol.** **7**, 205-210, 1993.
4. Kaplan, D., Vazquez, M., Saunal, H., Muller, S., Levitus, G., Van Regenmortel, M.H.V., Levin, M.J. Differences in the immune response of patients with Chagas disease or systemic lupus erythematosus to human ribosomal P peptides. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **88**, 51-52, 1993.
5. Aznar, C., Lopez Bergami, P., Brandariz, S., Lafon, S., Kaplan, D., Mariette, C., Liegeard, P., de Deus Alves, M.C., Luna Barreiro, E., Carrasco, R., Levitus, G., Levin, M.J., Hontebeyrie-Joskowicz, M. Prevalence of anti-R13 antibodies in *T. cruzi* infection. **FEMS Microbiol. Med. Immunol.**, 1995, en prensa
6. Kaplan, D., Luchetti, A., Brandariz, S., Lopez Bergami, P., Arteman, P., Lafon, S., Levin, M.J. A combination of serological tests for diagnosis of severe Chagas cardiomyopathy. En preparación.
7. Kaplan, D., Saunal, H., Lopez Bergami, P., Van Regenmortel, M.H.V., Levin, M.J. Anti-P autoantibodies elicited by *T. cruzi* P antigens differ from those found in Lupus patients. En preparación.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

aa.....	aminoácido
ADN.....	ácido desoxiribonucleico
ADNc.....	ácido desoxiribonucleico copia
$\beta$ -gal.....	beta galactosidasa
BSA.....	sero albúmina bovina
D.O.....	densidad óptica
EKG.....	electrocardiograma
ELISA.....	ensayo inmunoenzimático en fase sólida
FPLC.....	cromatografía líquida de rápida resolución
HCl.....	ácido clorhídrico
hs.....	horas
kb.....	kilobase
KDa.....	kilodalton
LES.....	lupus eritematosa sistémico
MCC.....	miocarditis chagásica crónica
min.....	minutos
mg.....	miligramo
ml.....	mililitro
mM.....	milimolar
mARN.....	Acido ribonucleico mensajero
nM.....	nanomolar
nm.....	nanometro
OMS.....	Organización Mundial de la Salud
SDS.....	dodecil sulfato de amonio
TcP2 $\beta$ .....	proteína ribosomal P2 $\beta$ de <i>T. cruzi</i>
P2h.....	proteína ribosomal P2 humana
$\mu$ g.....	microgramo

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mariano J. Levin, por la experiencia y fuerza transmitida no sólo en el campo de lo estrictamente científico, por su confianza y por el primer café en el Asturiano donde me decidí por la Química Biológica.

Al Dr. Hector Torres y la Dra. Mirtha Flawiá, por permitirme realizar este trabajo en el INGEBI.

Al Dr. Wim Degrave, del departamento de Biología Molecular del Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro, Brasil, por su hospitalidad y entusiasmo que contagia.

Al Dr. Luquetti, del Laboratorio de la Enfermedad de Chagas del Instituto de Medicina Tropical en Goiania, Brasil, por su dedicación en la selección de los sueros, por sus contribuciones a través de críticas y sugerencias en el análisis del ensayo diagnóstico.

Al Dr. Mark V. H. Van Regenmortel, de la unidad de Inmunología del IBMC de la Universidad de Strasbourg, Francia, por haberme recibido en su laboratorio; por su asesoramiento en el trabajo con péptidos sintéticos y constantes de afinidad y por haberme permitido utilizar el BIAcore.

A la Dra. Sylviane Muller, de la unidad de Inmunología del IBMC de la Universidad de Strasbourg, por su ayuda en la inmunopurificación de anticuerpos.

Al Dr. Etienne Weiss, de la Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, por su generosidad en transmitirme su experiencia en el clonado de anticuerpos.

Al Dr. Juan Pedro Ballesta, del CBM de la Universidad Autónoma de Madrid, España, por el aporte del hibridoma ppA-I y su colaboración permanente.

A los Drs. Pablo Chiale, Dalia Schejman y Mauricio Rosenbaum del Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía, y la Dra. María José Svetatz, del Servicio de Hematología del Hospital Centenario de la Ciudad de Rosario, Provincia de Santa Fe, por su trabajo en la caracterización clínica de los pacientes incluidos en este estudio.

Al Grupo Chagas: Alejandro Schijman, Martín Vazquez, Alfredo Panebra, Inés Ferrari, Pablo Lopez Bergami, Pablo Arteman, Silvia Brandariz, Hernán Lorenzi, Sergio Ghío, Fernando Elías, Claudia Ben-Dov, Cecilia Medrano, Francisco Quintana, Carolina Vollert, Evelyn Mahler, Carolina Minutolo, Oscar Filevich y Miriam Rivas; por que en mayor o menor grado este trabajo fue realizado y escrito con el apoyo de todos, y por que ningún resultado se debe al esfuerzo individual (más bien todo lo contrario), aguante Exylio!

A los ex-integrantes del Grupo Chagas: Enrique Mesri, Gabriela Levitus, Patricia Levy-Yeyati, Reinaldo Rossi, Nelson Dusseti, Sonia Lafon, Cristina Michailoff y Adriana Urman, por hay cosas que dejan huella.

A los compañeros y amigos del INGEBI: (en orden de aparición desde mi lab.) Adolfo, Paula Duek, Liliana, Paulita, El Negro, Gus, Vito, Santi, Susana, Chelo, Juancho, Tom, Vero, Marcelo, Larisa, Fer, Sil, Flor, Kencho, Gaby, Rabi, Pablo, Luciana, Marianito, Albertito, Marisa, Andrea, Joaquin, Claudio, Cris, Guillermo, Rita, Eliana, Gustavo, Gabriel, Marcelita, Irma, Mariano, Mónica, Marta, Tito, Leonor, Mari, Nene, el Malandra, Hector y Gabriel.

A Alberto K. por estar siempre dispuesto a escuchar, Alejandro Paladini, por su ayuda computacional, Alejandro Mentaberry, porque independientemente de con que humor, siempre me dió una mano (cuando se la pedí), al Dr. Glikin, por su fino sentido del humor y a la Tere, porque es una fenómeno.

A los ex-Ingebianos, Diego Fraiden, Claudia Ochatt, Jorge Muschietti, Omar Coso, Horacio Martinetto, Andrés Muro, Mercedes Goin, Sandra Ogueta, Malala Gomez, Nora Paños, Anabella Srebrow, Laura Pregliasco y Marcela Ortiz.

A Xim, por todo.

A Diego, Roly y Javier, miembros fundadores del cuarteto.

A mis hermanos y a mis viejos, por bancarme y apoyarme.



# INDICE

	pag.
1.- INTRODUCCION	
1.1.- RESEÑA HISTORICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	1
1.2.- CARACTERISTICAS GENERALES DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2.1- Ubicación sistemática	2
1.2.2.- Ciclo de vida	3
1.3.- MECANISMOS DE TRANSMISIÓN	4
1.3.1.- Transmisión por el vector	4
1.3.2.- Transmisión congénita	4
1.3.3.- Transmisión por transfusión sanguínea o trasplante	4
1.4.- EPIDEMIOLOGIA	5
1.5.- FASES DE LA INFECCION	6
1.5.1- Fase aguda	6
1.5.2.- Fase crónica	6
1.6.- MIOCARDITIS CHAGASICA CRONICA	7
1.7.- PATOGENESIS EN LA MCC	9
1.8.- AUTOINMUNIDAD EN LA MCC	9
1.9.- AUTOINMUNIDAD EN LA INFECCION EXPERIMENTAL	10
1.10.- ORIGEN DE LOS AUTOANTICUERPOS	12
1.10.1.- Activación policlonal B	12
1.10.2.- Liberación de autoantígenos	12
1.10.3.- Mecanismos dirigidos por el antígeno	13
1.11.- DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	15
1.12.- PROTEÍNAS RIBOSOMALES P	17
1.13.- AUTOANTIGENOS INTRACELULARES DESCRITOS EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES	19
1.14.- ANTIGENOS DE <i>T. cruzi</i>	19
1.14.1.- Antígeno JL7	20

1.14.2.- Antígeno JL5	21
1.15.- OBJETIVOS DE LA TESIS	23
2.- MATERIALES Y METODOS	
2. 1.- COMPOSICION DE SOLUCIONES Y MEDIOS EMPLEADOS FRECUEMENTE EN EL TEXTO	25
2. 2.- PLASMIDOS	26
2.2.1.- pCJ55	26
2.2.2.- pMal-c	26
2.2.3.- pGEM-3Zf(+) y pGEM-3Zf(-)	27
2.3.- BACTERIAS	27
2.3.1.- Cepas bacterianas	27
2.3.2.- Mantenimiento de las cepas	28
2.3.3.- Preparación de bacterias competentes	28
2.3.3.2.- Preparación de <i>E. coli</i> MC101 y XL1-Blue para transformación con ADN plasmídico	28
2.4.- FAGOS	29
2.4.1.- Fagos recombinantes	29
2.4.2.- Amplificación de los fagos	30
2.4.3- Preparación del ADN del fago $\lambda$ gt11	31
2.5.- CONSTRUCCION DEL PLASMIDO DE EXPRESION pEK-JL7	32
2.6.- SUBCLONADO DE LOS INSERTOS EN EL PLASMIDO p-MAL	33
2.7.- TRANSFORMACION DE BACTERIAS COMPETENTES CON PLASMIDO	33
2.8.- LISOGENIZACION DE <i>E. coli</i> Y1089 CON FAGOS $\lambda$ gt11	34
2.9.- OBTENCION DE ADN PLASMIDICO	35
2.10.- ELECTROFORESIS EN GELES NATIVOS DE AGAROSA	36
2.11.- EXPRESION Y PURIFICACION DE LAS PROTEINAS RECOMBINANTES	36
2.11.1.- Subclonadas en pEK-JL7	36
2.11.2.- Subclonadas en p-MAL	37

2.11.2.1-Localización celular de la proteína recombinante	38
2.11.3.- Subclonadas en $\lambda$ gt11	38
2.12.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS	39
2.13.- ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	40
2.14.- TINCIÓN DE LOS GELES	40
2.14.1.- Tinción con Coomasie- Blue	40
2.14.2.- Tinción con nitrato de plata	41
2.15.- ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA	41
2.16.- DETECCION INMUNOLOGICA DE LAS PROTEINAS POR WESTERN BLOT	42
2.17.- REACTIVIDAD DE LOS SUEROS CONTRA FAGOS RECOMBINANTES	43
2.18.- PREPARACION DE LISADO DE <i>E. coli</i> Y1089 LISOGENA PARA $\lambda$ gt11 SALVAJE	44
2.19.- PREPARACIÓN DE HOMOGENATO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
2.20.- PREPARACION DE RIBOSOMAS DE <i>Trypanosma cruzi</i>	44
2.21.- PEPTIDOS SINTETICOS	45
2.21.1.- Síntesis de péptidos	45
2.21.2.- Péptidos utilizados	45
2.21.3.- Acoplado de péptidos a seroalbúmina bovina (BSA)	46
2.22.- SUEROS HUMANOS	46
2.22.1.- Sueros utilizados para el ensayo diagnóstico a ciego	46
2.22.2.- Sueros de pacientes chagásicos con cardiopatía y reactividad anti-P	48
2.22.3.- Sueros de pacientes con Síndrome Eritematoso Sistémico	48
2.23.- INMUNOPURIFICACION DE ANTICUERPOS	48
2.23.1.- Inmunopurificación de anticuerpos anti-proteína de fusión	48
2.23.2.- Inmunopurificación de anticuerpos anti-péptidos sintéticos	49
2.24.- ENSAYOS DE ELISA	50

2.24.1.- Determinación de la reactividad contra AKJL7	50
2.24.2.- Determinación de la reactividad contra las proteínas recombinantes subclonadas en p-MAL	51
2.24.3.- Determinación de la reactividad contra las proteínas recombinantes subclonadas en $\lambda$ gt11	51
2.24.4.- Determinación de la reactividad contra péptidos sintéticos	51
2.24.5.- Ensayo de inhibición de la reactividad medida por ELISA	52
2.25.- MEDICIÓN DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DE UN ANTICUERPO. MÉTODO DE FRIGUET	52
2.26.- EL SISTEMA BIACORE	55
2.26.1.- Inmovilización de los anticuerpos inmunopurificados anti-R13 sobre la superficie sensora	55
2.26.2.- Pasaje de péptidos acoplados sobre la superficie sensora con anticuerpos inmovilizados	56
2.27.- CULTIVO DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	56
2.28.- DETERMINACIÓN DEL ISOTIPO DE LOS ANTICUERPOS SECRETADOS POR EL HIBRIDOMA	57
2.29.- OBTENCIÓN DEL ARN TOTAL DE LOS HIBRIDOMAS	57
2.30.- OBTENCIÓN DE ADN COPIA	58
2.31.- AMPLIFICACIÓN DE LA CADENA LIVIANA DEL ANTICUERPO POR PCR	59
2.32.- SUBCLONADO DE LA BANDA DE PCR EN UN VECTOR APTO PARA LA SECUENCIACIÓN	60
2.33.- SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR	61
2.33.1.- Obtención de ADN simple cadena	61
2.33.2.- Secuenciación de ADN simple cadena	61
2.34.- COMPARACIÓN DE SECUENCIA DE ADN	61
2.35.- ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS	62

3.-	RESULTADOS	
3.1.-	DESARROLLO DE UN REACTIVO DIAGNOSTICO RECOMBINANTE PARA DIAGNOSTICO DE LA INFECCION POR <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> POR ELISA	65
3.1.1.-	Construcción del plásmido pEK-JL7	65
3.1.2.-	Expresión de la proteína recombinante	66
3.1.3.-	Purificación de la proteína recombinante	67
3.1.3.1.-	Localización celular de la proteína recombinante	67
3.1.3.2.-	Test de fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	67
3.1.3.3.-	Purificación por cromatografía líquida de rápida resolución (FPLC)	68
3.1.4.-	Puesta a punto del ensayo diagnóstico AKJL7 para la infección chagásica	69
3.1.5.-	Comparación entre el ensayo de placa de lisis con el fago lambda JL7 versus ensayo de ELISA utilizando el recombinante AKJL7	69
3.1.6.-	ELISA con AKJL7 y extracto de <i>Trypanosoma cruzi</i> : Ensayo ciego de la OMS	70
3.2.-	ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD DE LOS SUEROS CHAGÁSICOS CRÓNICOS CONTRA LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES P	74
3.2.1.-	Estudio de la reactividad contra proteínas ribosomales del parásito y humanas por Western blot	74
3.2.2.-	Estudio de la reactividad contra proteínas ribosomales y ribosomales P del	75
3.2.3.-	Mapeo epitópico de la proteína TcP2 $\beta$	77
3.2.3.1.-	Comparación entre la reactividad contra S23 y 9D por parte de sueros chagásicos y lúpicos	77
3.2.3.2.-	Inhibición de la reactividad anti-TcP2 $\beta$ por R13	78
3.2.3.3.-	Mapeo epitópico de los antígenos R-13 y H-13	78
3.2.4.-	Inmunopurificación de anticuerpos contra péptidos sintéticos	81
3.2.5.-	Estudio de la reactividad de los anticuerpos anti-R13 y anti-H13 de pacientes chagásicos y lúpicos	81
3.2.6.-	Cálculo de las constantes de afinidad de los anticuerpos anti-R13 y anti-H13	83

3.2.7.-	Ensayos con el sistema BIAcore	84
3.3.-	Clonado y secuenciación de la cadena liviana de un anticuerpo monoclonal anti-proteínas ribosomales P	86
3.3.1.-	Medición de la reactividad del sobrenadante del cultivo del hibridoma frente a péptidos sintéticos. Determinación del isotipo	87
3.3.2.-	Amplificación de la cadena liviana de hibridoma	87
3.3.3.-	Secuenciación y comparación en banco de datos	88
4.-	DISCUSION	89
5.-	BIBLIOGRAFIA	108
6.-	ANEXO	



## *INTRODUCCION*

## 1.1.- RESEÑA HISTORICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS:

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

Si bien el descubrimiento de Chagas tuvo una rápida repercusión, no fue comprendida en toda su magnitud por sus contemporáneos. Kraus, quien durante su estadía en el norte argentino en 1915 no había encontrado individuos con signos de la enfermedad en áreas con vinchucas infectadas, cuestionó violentamente el descubrimiento de Chagas. Este rechazó dicha observación, pero los ataques y las dudas continuaron, al punto de catalogarlo como "un hombre que busca en la selva enfermedades que no existen" (citado por Koberle, 1968). Debido a esta controversia, por 10 años la enfermedad fue simplemente olvidada.

Su redescubrimiento se debe a la labor de Salvador Mazza y sus colegas en nuestro país. En 1934, año de la muerte de Carlos Chagas, Mazza informó la existencia de varios casos agudos en el norte argentino. Aunque fue criticado por "descubrir enfermedades nuevas en lugar de tratar las ya existentes", tanto él como sus colegas continuaron con sus investigaciones, registrando antes de 1944 más de mil casos agudos de la enfermedad (Koberle, 1968). A partir de los trabajos de este grupo, los cuales ratificaron la importancia de la enfermedad de Chagas como un problema de salud pública, se intensificaron los



estudios a lo largo de nuestro continente: Dias y Laranja en Brasil, Tállice en Uruguay, Neghme en Chile, Pifano y Torrealba en Venezuela, Renjifo, Groot y Uribe Piedrahita en Colombia, Montalbán y León en Ecuador, Romero de León en Guatemala y Torrico en Bolivia. (Romaña, 1963).

## 1.2.- CARACTERISTICAS GENERALES DE *Trypanosoma cruzi*.

### 1.2.1- Ubicación sistemática:

El agente causal de la enfermedad de Chagas es el *Trypanosoma cruzi*, cuya ubicación sistemática es la siguiente (Hoare, 1972):

Reino: Protista

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Kinetoplastida

Suborden: Trypanosomatina

Familia: Trypanosomatidae

Género: Trypanosoma

Subgénero: Schizotrypanum

Especie: cruzi (Chagas, 1909)

### 1.2.2.- Ciclo de vida:

El ciclo de vida del parásito, inicialmente descrito por Chagas (1909), comprende la alternancia de dos huéspedes: un mamífero y un insecto hematófago (huésped intermediario o vector).

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

Un gran número de mamíferos puede ser infectado por *T. cruzi*, incluyendo al hombre, animales domésticos y reservorios silvestres (Brener y col., 1979). Los tripomastigotes metacíclicos invaden las células en un proceso de endocitosis iniciando la etapa intracelular de su ciclo biológico. Se puede alojar en diferentes tipos celulares, siendo los más comúnmente infectadas las fibras musculares y las células de la glía (Brener, 1973). En el interior de la célula parasitada se produce la diferenciación a formas redondeadas, carentes de flagelo, llamadas amastigotes, que se multiplican por fisión binaria cada 12 horas aproximadamente. Algunos de estos amastigotes se diferencian en tripomastigotes sanguíneos que son liberados a la circulación por ruptura celular. Estos tripomastigotes son capaces de invadir nuevos tejidos reiniciando el ciclo amastigote-tripomastigote, o bien pueden ser ingeridos por el insecto completando el ciclo de vida.

### **1.3.- MECANISMOS DE TRANSMISIÓN:**

#### **1.3.1.- Transmisión por el vector:**

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

#### **1.3.2.- Transmisión congénita:**

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

#### **1.3.3.- Transmisión por transfusión sanguínea o trasplante:**

La transmisión por transfusión sanguínea o trasplante constituyen un grave problema de salud pública y, probablemente la principal causa de infección en zonas no endémicas (Amato Neto, 1968).

Salvo el plasma liofilizado y derivados aptos de ser esterilizados, todos los componentes sanguíneos son infectivos (Amato Neto, 1968). La infectividad de la sangre total refrigerada se mantiene hasta 18 días . Aunque la viabilidad del parásito en componentes congelados es menor que aquellos guardados a 4 °C, muchos hemofílicos son infectados después del tratamiento con productos sanguíneos previamente guardados a - 70 °C (Cerisola y col., 1972).

En la Argentina, estudios recientes indican que la prevalencia de dadores infectados oscila entre un 1,7 % para la ciudad de Buenos Aires, hasta un 23,9 % para la provincia del Chaco, dando un promedio de alrededor de un 20 % para todo el país (Perez, A y col., 1989).

En la provincia de Buenos Aires, con un promedio de 500.000 transfusiones anuales y una seroprevalencia del 3,7 % entre los donantes, se ha estimado que de no existir control de las transfusiones, existirían 3000 nuevos casos por año (Segura y col., 1989).

#### **1.4.- EPIDEMIOLOGIA:**

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

El impacto médico y social de la enfermedad es alto: se estima que 752.000 años de trabajo anuales se pierden debido a muertes prematuras causadas por la enfermedad en Latinoamérica, correspondiendo a 1208,5 millones de dólares anuales (Schofield, 1991).

En Argentina, toda la región del norte es área endémica, principalmente las provincias del Chaco, Santiago del Estero, Salta y Jujuy. Entre un millón y medio y 2 millones de personas están infectadas por *T. cruzi* y entre el 20 al 30 % presentan manifestaciones clínicas. La tasa de incidencia es alta, estimándose en 50.000 nuevos casos por año (Schofield, 1991).

## **1.5.- FASES DE LA INFECCION:**

### **1.5.1- Fase aguda:**

En la mayoría de los casos la infección tiene lugar durante la primera década de vida del individuo, encontrándose las mayores frecuencias hasta los cinco años de edad. El período agudo puede ser asintomático o presentar algunos de los siguientes signos o síntomas característicos: fiebre, temblores, parasitemia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, vómitos, diarrea. La aparición de una miocarditis, que en ocasiones puede ser fatal, es poco frecuente (Santos-Buch y col., 1985; Laranja y col., 1956; Rosenbaum, 1964). Otros signos de importancia son los edemas de puerta de entrada del parásito, dentro de los cuales el más frecuente (50% de los casos) es el edema unilateral rodeando al ojo, que también puede abarcar la glándula lacrimal, lo que se conoce como signo de Romaña. En los casos en que la piel es la vía de entrada del parásito (25% de los casos) se producen lesiones cutáneas conocidas como “chagoma”. Ambos tipos de lesiones (signo de Romaña y Chagoma) permanecen durante 30-60 días (Andrade, 1971).

### **1.5.2.- Fase crónica:**

Cuando el paciente supera el estadio agudo, ingresa en una etapa carente de síntomas y signos denominada fase Crónica de la Enfermedad de Chagas, en la cual disminuye la parasitemia pero los niveles de anticuerpos se mantienen constantes. Aún durante el período crónico, la mayoría de la población jamás presenta evidencias discernibles de enfermedad (forma Indeterminada), y a pesar de que la infección perdura toda la vida, sólo un porcentaje de hasta 30% (con grandes diferencias regionales) desarrolla al cabo de 10, 20 o más años de evolución, síntomas y/o signos de daño visceral. La manifestación clínica más frecuente e importante de la Enfermedad de Chagas Crónica es la Miocarditis Chagásica Crónica (MCC) (Rosenbaum, 1964). Otras manifestaciones de la Enfermedad de Chagas crónica observadas

con menor frecuencia son los desórdenes de tipo neurológico o las formas digestivas (megasíndromes) que son atribuidas a la destrucción de las células del sistema nervioso vegetativo (Koberle, 1968). A pesar de que hasta el momento se desconocen los factores que determinan cual será el curso de la infección se especula que el tipo de cepa infectante (Lambrecht, 1965; Peralta, 1980), la cantidad de parásitos inoculados, la existencia de reinfecciones (Santos-Buch y col., 1985), la susceptibilidad del huésped (Wrightsmán y col., 1982) entre otros, son factores de importancia en el desarrollo de los síntomas clínicos de la enfermedad crónica.

#### **1.6.- MIOCARDIOPATIA CHAGASICA CRONICA:**

La MCC aparece con mayor frecuencia en la tercer o cuarta década de vida del individuo. El pronóstico en general es desalentador, ya que aproximadamente el 90% de los pacientes con MCC mueren dentro de un lapso de 5 años luego de su diagnóstico. La cardiomiopatía es causada por una panmiocarditis, y en estadios avanzados cursa con un marcado agrandamiento de las cavidades cardíacas, hipertrofia, deterioro de la función sistólica, disturbios en la conducción y arritmias (Rosenbaum, 1964). La MCC se caracteriza por una necrosis microfocalizada y diseminada. Las cardiocitos se observan necrotizados o hialinizados, pero más frecuentemente se observa la presencia de cicatrices de tejido conectivo denso que reemplazan a las fibras necróticas. Este proceso se denomina fibrosis y se encuentra acompañado de un abundante infiltrado celular de tipo inflamatorio (mononucleares). La localización de los infiltrados es panmiocárdica y microfocalizada. En una primera etapa los focos de necrosis, fibrosis e infiltración son pocos y dispersos; no registrándose signos clínicos ni alteraciones en el electrocardiograma (ECG). Con el paso del tiempo, el proceso se agrava por la multiplicación de focos, hecho que determina los signos clínicos y electrocardiográficos típicos de la enfermedad (Rosenbaum, 1964).

Las características distintivas de los ECG chagasicos, que facilitan su diagnóstico diferencial, son: bloqueo de rama derecha y hemibloqueo anterior, alteraciones segmentarias de la motilidad apical y aneurisma apical, frecuencia cardíaca lenta por compromiso del nódulo sinusal, ondas Q anormales, ondas T coronarias negativas y arritmias ventriculares posteriores malignas (Rosenbaum, 1964; Laranja, 1956).

La presencia de una inflamación crónicamente activa sumada al hecho que la localización de los focos inflamatorios no coincide con la de los escasos pseudoquistes de amastigotes detectados histologicamente (Rosenbaum, 1964), condujeron a la hipótesis que involucra a la respuesta inmunológica en la generación de las lesiones cardíacas de la Enfermedad de Chagas crónica (Rosenbaum, 1964; Koberle, 1968).

A pesar de no descartarse que el parásito esté presente, muchos autores encuentran poco probable que el daño tisular se deba a una acción directa de *T.cruzi* sobre el miocardio (Rosenbaum, 1964; Koberle, 1968; Lambrecht, 1965). Además la miocarditis ocurre sin cambios aparentes en la agresividad del parásito ni en el estado general del sistema inmune del huésped. En autopsias de pacientes con MCC los análisis histológicos revelaron la presencia de formas intracelulares de *T.cruzi* en varios órganos como adrenales, útero, vejiga y esófago. En todos estos órganos la presencia del parásito fue acompañada por reacciones inflamatorias muy leves o inexistentes, interpretadas como procesos reparativos o cicatrizantes de alteraciones producidas en la etapa aguda (Santos-Buch, C. A y col., 1985)

### **1.7.- PATOGENESIS EN LA MCC:**

La participación de mecanismos autoinmunes en la patogénesis de la enfermedad no es un descubrimiento reciente. Muy por el contrario, ya en los años 40 Margariños Torres (1941) y Carlos Chagas (1934) postularon la existencia de una reacción "alérgica" del huésped contra *T.cruzi* que destruía las células cardíacas normales. Numerosas evidencias obtenidas a partir de modelos experimentales y de la infección humana consolidaron durante la última década la hipótesis autoinmune a tal punto que actualmente es la más aceptada para explicar la etiología de la MCC (Hudson, 1985; Petry, 1989).

### **1.8.- AUTOINMUNIDAD EN MCC:**

Varios investigadores han demostrado la capacidad de linfocitos o anticuerpos provenientes de pacientes chagásicos crónicos de reaccionar con diversos tejidos humanos. Se ha demostrado la existencia de linfocitos de pacientes chagásicos capaces de proliferar en presencia de extractos de corazón humano (Mosca y col., 1985, Todd y col., 1983), así como de ejercer un efecto citotóxico sobre células cardíacas fetales humanas (Teixeira y col., 1978). Además se ha descrito la presencia de anticuerpos contra retículo sarcoplasmático de músculo estriado (Santos Buch y col., 1985), vainas de Schwann de nervios periféricos (Khoury y col., 1979) y cerebelo (Ribeiro dos Santos y col., 1979) en pacientes chagásicos. Kierzembaum (1986) puntualizó que estos resultados debían analizarse con precaución, debido al carácter alogeneico de los sistemas empleados. Sin embargo, resultados similares obtenidos en sistemas animales singeneicos tienden a demostrar, al menos parcialmente, la naturaleza autoinmune de las reacciones arriba mencionadas (ver 1.9.). Más recientemente se detectó en sueros de pacientes chagásicos un significativo incremento en el nivel de



anticuerpos contra autoantígenos tales como laminina, espectrina, tubulina (Untekircher y col., 1993), adrenoreceptores (Borda y col., 1984) y miosina (Levitus, 1991b).

Levitus (1991b) no encuentra asociación entre los títulos de anticuerpos anti-miosina y daño cardíaco, sin embargo Cunha-Neto y col. (1995) describen que sólo en pacientes chagásicos con cardiopatía existen anticuerpos que reconocen un epítipo específico de la subunidad  $\beta$  de la miosina cardíaca humana y un antígeno inmunodominante de *T. cruzi*. Estos autores señalan que el idiotipo de los anticuerpos anti-miosina presentes en pacientes chagásicos crónicos con cardiomiopatía, es diferente del de los anticuerpos anti-miosina naturales que se encuentran en los pacientes chagásicos asintomáticos.

#### **1.9.- AUTOINMUNIDAD EN LA INFECCION EXPERIMENTAL:**

Los trabajos realizados utilizando el modelo experimental de ratón demostraron que es posible inducir una miocarditis similar a la chagásica en ratones normales mediante la inoculación de extractos de corazón homólogos (Cossio y col., 1984) o de células mononucleares de ratones singeneicos crónicamente infectados (Laguens y col., 1981). Acosta y Santos Buch demostraron la acción citolítica de linfocitos de ratones infectados sobre fibras miocárdicas singeneicas (Acosta y col., 1985). Hontebeyrie-Joskowicz obtuvo células T CD4+ de ratones crónicamente infectados capaces de proliferar en presencia de homogenatos de *T. cruzi* o de nervios periféricos. Se observó que la inoculación de algunas de estas líneas celulares en nervios ciáticos de animales singeneicos provocaba reacciones inflamatorias comparables a las encontradas en la enfermedad de Chagas crónica experimental (Hontebeyrie-Joskowicz y col., 1987). Más recientemente, Ribeiro dos Santos injertó corazones de ratones recién nacidos en animales singenéticos infectados crónicamente. Al cabo de 20-30 días, observaron que los injertos eran completamente rechazados y

reabsorvidos, mientras que en los receptores no infectados persistían aún más de un año. Mediante la utilización de anticuerpos monoclonales, demostraron que las células involucradas en dicha reacción eran linfocitos T CD4+ (Ribeiro dos Santos y col, 1990 y 1992).

En varios trabajos se ha mostrado la reactividad anti-corazón de los sueros de animales infectados por *T.cruzi*. Mc Cormick y Rowland señalaron la aparición de anticuerpos anti-miocardio durante la fase aguda y crónica de la infección y a través de experiencias de absorción demostraron que los antígenos reconocidos estaban presentes tanto en extractos de trypomastigotes como de miocardio y músculo estriado, pero ausentes en músculo liso (Mc Cormick & Rowland, 1989). Luego se precisó que las proteínas blanco de esta reacción eran la miosina y desmina (Tibbetts y col., 1994).

También se demostró la capacidad de los anticuerpos de sueros de ratones crónicamente infectados de unirse a la superficie de cardiocitos singeneicos e intervenir en una respuesta citotóxica (ADCC) (Laguens y col., 1988).

Ternynck y col. (1990) analizaron los autoanticuerpos producidos durante la infección experimental y los compararon con los autoanticuerpos naturales presentes en ratones normales. Observaron altos niveles de anticuerpos (IgG e IgM) anti-actina, anti-miosina, anti-tubulina, anti-mioglobina, y anti ADN en el período de mayor parasitemia. Además, se determinó que luego de un año de infección, el 50% de los animales presentaban niveles elevados de autoanticuerpos (IgG), en particular anti-tubulina. Mediante el análisis detallado de estas reactividades, concluyeron que los autoanticuerpos naturales estaban afectados durante la infección por *T.cruzi*, no sólo porque eran producidos en mayor cantidad, sino porque presentaban mayor afinidad y especificidad por sus antígenos (Ternynck y col., 1990).

Finalmente, Kahn y col. (1992) informan la existencia de autoanticuerpos en ratones infectados con *T. cruzi* que reconocen secuencias aminoacídicas ácidas de una serie de antígenos, incluyendo la tubulina. Aunque estos anticuerpos pueden ser purificados también de animales no infectados (autoanticuerpos naturales), éstos reconocen débilmente la tubulina a pH fisiológico. Por el contrario, los purificados de ratones infectados la reconocen y se unen a tubulina perfectamente a pH fisiológico. Los autores concluyen que se trata de autoanticuerpos naturales modificados (Kahn y col. 1992).

#### **1.10.- ORIGEN DE LOS AUTOANTICUERPOS:**

Existen distintas teorías acerca del origen de los autoanticuerpos en la Enfermedad de Chagas crónica.

##### **1.10.1.- Activación policlonal B:**

Esta hipótesis postula que en el curso de la primera fase de la infección se produce una alteración del sistema inmune que provoca una expansión inespecífica de linfocitos B, incluyendo los autorreactivos (D'Imperio Lima y col., 1986). Este mecanismo fue observado tanto en el período agudo como en el crónico de la infección experimental, donde sólo el 2% de los clones B activados luego de la infección eran específicos contra el parásito (Minoprio y col., 1988). Por el contrario, las evidencias acerca de la existencia de una respuesta similar en humanos son contradictorias (Santos-Buch y col., 1985).

##### **1.10.2.- Liberación de autoantígenos:**

Esta teoría propone que los autoanticuerpos se generarían contra antígenos propios que se encuentran secuestrados en el interior de la célula y se liberarían a la circulación durante el daño tisular que se observa en la MCC (Williams y col., 1985). Se ha sugerido además que

la expresión aberrante del antígeno de histocompatibilidad de clase II en ratones crónicamente infectados podría presentar las proteínas propias en un contexto diferente (Cabeza Meckert y col., 1991).

### **1.10.3.- Mecanismos dirigidos por el antígeno:**

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

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

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

b) Mimetismo molecular : el término mimetismo molecular fue introducido por Damian (1989) y se refiere a la existencia de determinantes antigénicos compartidos por el parásito y el huésped. Una consecuencia de este fenómeno podría ser la inducción de una respuesta autoinmune durante el curso de la infección (Oldstone, 1987). La existencia de epitopes compartidos por *T. cruzi* y tejidos de mamífero ha sido demostrada por diferentes autores. Wood obtuvo un anticuerpo monoclonal a partir de la inmunización de un ratón con preparaciones de ganglios de la raíz dorsal de rata. Este monoclonal reaccionaba tanto con varios tipos de células neuronales como con los diferentes estadios del parásito (Wood y col., 1982). Por otra parte, se demostró que dos monoclonales derivados de ratones

inmunizados con epimastigotes reconocían extractos de cerebro y de espina dorsal murinos (Snary y col., 1983). Más recientemente, Van Voorhis y Eisen (1989) aislaron un antígeno recombinante de *T. cruzi*, F1-160, reconocido por sueros de ratones infectados crónicamente. El suero policlonal anti-F1-160 preparado en conejo reaccionaba con una proteína de 160 kDa del parásito y con un polipéptido de 48 kDa presente en diferentes extractos de tejido nervioso murino y humano. En particular, se determinó que el epítipo común estaba definido en por un péptido de 48 aa. Este péptido fue reconocido por sueros de pacientes chagásicos crónicos, sugiriendo que la reacción cruzada observada en las experiencias anteriores, podría ocurrir en la infección humana.

Con respecto a la reacción cruzada con antígenos musculares, Sadigursky y col. (1982) demostraron la existencia de epítopes compartidos por el parásito y preparaciones de retículo sarcoplasmático de músculo estriado (SR). Empleando un suero policlonal anti-SR, se comprobó que este antígeno común (SRA) estaba presente en diferentes especies animales y varias cepas de *T. cruzi* (Acosta y col., 1983). Zwirner y col. (1994) produjeron un anticuerpo monoclonal contra una proteína antigénica de *T. cruzi* de 150 kDa capaz de provocar la lisis de los tripomastigotes, y que reconoce proteínas de músculo liso y esquelético, esófago y colon de ratones normales.

Otras proteínas que podrían originar fenómenos de mimetismo molecular son: proteínas flagelares, proteínas de choque térmico (Engman y col., 1990), tubulina (Paulin y col., 1988) y proteínas ribosomales P (Levin y col., 1989, 1993a; Schijman y col., 1992; Skeiky y col., 1992).

### 1.11.- DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS:

Durante el período agudo de la enfermedad, la presencia de tripanosomas circulantes permiten una detección del parásito por métodos parasitológicos directos, como la gota fresca, método de Strout, método de capilares o microhematócrito, o indirectos como hemocultivo o xenodiagnóstico (Ledesma Patiño y col., 1992).

La fase crónica cursa con una muy baja parasitemia y los métodos parasitológicos clásicos no son útiles para detectar parásitos circulantes. Es preciso, entonces, recurrir a métodos serológicos de diagnóstico (Wendel y col., 1992) o a la amplificación del ADN del parásito (Sturm y col., 1989, Moser y col., 1989).

El diagnóstico serológico se basa en la detección de anticuerpos que reconocen un extracto de *T. cruzi*. Los ensayos más utilizados son: fijación de complemento (FC), hemaglutinación indirecta (HI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA. Pese a la utilidad de estos ensayos, la base antigénica de los mismos origina reacciones no específicas. Así, un extracto de *T. cruzi* puede reaccionar con suero de individuos infectados con *T. rangelli* (Anthony y col., 1975) o *Leishmania sp* (Camargo y col., 1969), y con sueros de pacientes con afecciones autoinmunes (Velazquez y col., 1993). Esto origina un número importante de resultados falsamente positivos, falsos positivos.

Para solucionar los problemas originados por este tipo de reacciones inespecíficas, se trabajó con proteínas purificadas del parásito (Kirchhoff y col, 1987, Cooper y col, 1991). Sin embargo, la purificación de estos antígenos resulta laboriosa, ineficiente e implica cierto nivel de riesgo debido a la manipulación inicial del agente infeccioso. Esto motivó, en los últimos años, el avance de las estrategias de clonado y producción de antígenos en cultivos celulares que pudieran ser utilizados en ensayos diagnósticos.

Numerosos grupos han descrito antígenos recombinantes de *T. cruzi* con capacidad diagnóstica (Zingales y col., 1990, Luquetti y col., 1990, Goldenberg y col., 1991, Paranhos-Bacalla y col., 1994), sin embargo aún no existe un reactivo serológico de máxima sensibilidad y adecuada especificidad que permita su utilización tanto a nivel de bancos de sangre, y ensayos epidemiológicos (tabla 1).

Los ensayos que se basan en la detección del ADN del parásito por la técnica de PCR (Mullis y col., 1987) utilizan como blancos ya sea ADN genómico (Moser y col, 1989) ó bien ADN del kinetoplasto de *T.cruzi* (Sturm y col, 1989). Por este ensayo se puede detectar ADN del parásito en sangre, tejido de pacientes , o tracto digestivo de insectos. La sensibilidad del método es tal que detecta un parásito cada 10 ml de sangre, y es suficientemente específico como para diferenciar entre distintos kinetoplástidos. Falta aún determinar la especificidad y sensibilidad de este tipo de diagnostico en comparacion con los mejores ensayos serologicos. Esta comparacion debera realizarse por medio de estudios multicéntricos ciegos, tales como los organizados oportunamente por la OMS (Luquetti, 1990) y la red de laboratorios del CYTED (Levin y col. 1991).

**TABLA 1:**

Descripción de antígenos recombinantes diagnósticos de la Enfermedad de Chagas.

ANTÍGENO	METODOLOGÍA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	OBSERVACIONES	REFERENCIA
CRA + FRA	ELISA DIRECTO, ELISA INDIRECTO	100 %	95 % DOS FALSOS POSITIVOS	POSITIVO PARA INFECTADOS POR MALARIA	GOLDEMBERG, 1992
B13	RIA, ELISA DIRECTO	97 % 2 FALSOS NEGATIVOS	96 % 2 FALSOS POSITIVOS	POSITIVO PARA UN NORMAL Y UN INFECTADO CON <u>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</u>	ZINGALES, 1990
H49	ELISA DIRECTO	84 % 24 FALSOS NEGATIVOS	100 %		PARANHOS-BACALLA, 1994

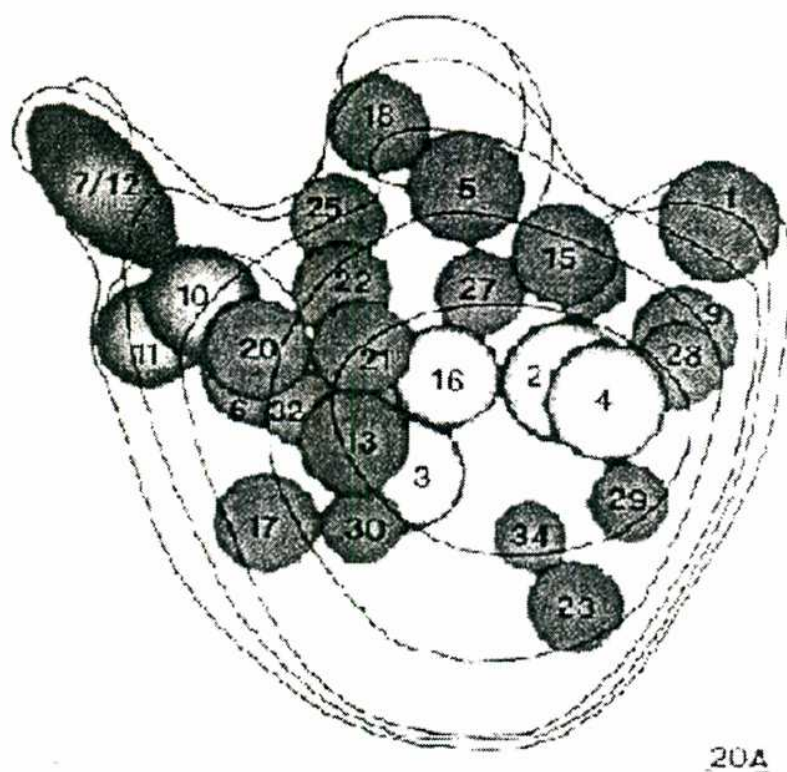


## 1.12.- PROTEÍNAS RIBOSOMALES P

Las proteínas ribosomales P forman parte del pedúnculo (stalk) de la subunidad mayor de todos los ribosomas (fig. 1). Estas fosfoproteínas constituyen una familia compuesta por tres polipéptidos, P0, P1 y P2. P0 de 38 kDa es neutra mientras que P1/P2, con pesos moleculares que oscilan entre 10 y 18 kDa, son ácidas. Estas proteínas son muy particulares con relación a los restantes componentes ribosomales, debido a que son las únicas que se encuentran en más de una copia. Debido a su función y a sus propiedades fisicoquímicas, P1 y P2 son consideradas análogas a las proteínas L7/L12 de *E.coli*. Al igual que L7/L12, P1 y P2 interactúan con los factores de elongación eucariotes EF1 y EF2, y son requeridas para la unión del aminoacil-ARNt y para la actividad GTPasa dependiente de EF2. Si bien la función de P0 aún no ha sido esclarecida, se cree que es equivalente a la proteína L10 de *E. coli* (Levin y col., 1993a). Los análisis de homología de secuencia de ADNc y la existencia de reactividad inmunológica cruzada confirmaron que estas proteínas están presentes en todas las especies eucariotas analizadas y que el epítipo C-terminal se encuentra altamente conservado. En bacterias, esta región de la proteína L12 muestra una gran movilidad, permitiendo libertad para rotar y exponiéndolo como epítipo (Moller y col, 1991).

Las proteínas ribosomales P están fosforiladas en eucariontes (Amons y col, 1979; Zinker y Warner, 1976). El blanco de la fosforilación es una serina ubicada en un entorno ácido de reconocimiento para casein kinasas (Chan y col., 1989).

Además de los complejos de proteínas P en ribosomas se han detectado complejos P citosólicos (140 kDa) (Elkon y col, 1986). Estos complejos citoplasmáticos presentan menor grado de fosforilación que los complejos incorporados a ribosomas. La fosforilación parece aumentar la actividad de las proteínas ácidas (Mac Connell y Kaplan, 1982). A partir de estos hallazgos se ha propuesto que la fosforilación podría desencadenar la integración de estas proteínas al ribosoma.



**Figura 1:**

Ubicación de la familia de proteínas ribosomales P de *E. coli* en la subunidad ribosomal mayor (vista interna). Los círculos indican las posiciones de las proteínas en proyección tridimensional de la subunidad.

Las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* presentan aspectos distintivos en la región C-terminal con respecto a las proteínas ribosomales P de otros eucariontes (ver tabla 2). P1 y P2 se desvían del consenso C-terminal, ya que la típica serina es reemplazada por un glutámico, mientras que la región C-terminal de P0 difiere completamente de este consenso y se parece a la proteína ribosomal L10 de *archaeobacteria* (Levin y col., 1993a).

A nivel antigénico, la región C-terminal conservada de las proteínas P humanas a sido definida como uno de los autoepítopes en el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (Elkon y col., 1985) encontrándose que entre un 10 a un 18 % de los sueros de los pacientes lúpicos presentan autoanticuerpos. Estos sueros reconocían también a las proteínas P de diferentes especies eucariontes. El análisis de la reactividad anti-P mostró que el epítipo reconocido por los sueros lúpicos estaba restringido a los últimos 11 aminoácidos C-terminales de las proteínas ribosomales P (Elkon y col, 1988). Experiencias con péptidos sintéticos demostraron que la fosforilación no es requerida para el reconocimiento por parte de los pacientes lúpicos (Elkon y col, 1988).

En la enfermedad de Chagas, las proteínas ribosomales son muy antigénicas. En particular, P1 y P2 que son reconocidas por sueros de una mayoría de individuos infectados por *T. cruzi* (ver 1.12.2).

**TABLA 2:**

Comparación de las secuencias aminoacídicas C-terminales de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* (TcP0, TcP1 y TcP2 $\beta$ ) y humana (HuP2).

TcP0	P A A A A E P E E E D D D D D F G M G A - L F -
TcP1	P A A A A A K K - E E E E E D D D M G F G L F D
TcP2 $\beta$	P A A A D A K K - E E E E E D D D M G F G L F D
HuP2	E E K K D E K K E E S E E S D D D M G F G L F D

### **1.13.- AUTOANTIGENOS INTRACELULARES DESCRIPTOS EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES:**

Una característica de ciertas enfermedades autoinmunes es la existencia de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos intracelulares. Estos son generalmente conservados, como en el caso de ADN, histonas, y enzimas presentes en todos los tipos celulares (Tan y col., 1982). La caracterización molecular e inmunoquímica de estos autoantígenos permitió el empleo de determinados autoanticuerpos como marcadores diagnósticos de algunas enfermedades autoinmunes. Así, los anticuerpos anti-ADN nativo, anti-Ro, anti-La, anti-P y anti-Sm son específicos de LES, los anticuerpos anti-aminoacil ARNt sintetasa son marcadores de dermatopoliomelitis, los anticuerpos anti-centrómero y anti-ADN topoisomerasa I son propios de escleroderma (Tan y col., 1988).

### **1.14.- ANTIGENOS DE *T. cruzi*:**

El desarrollo de las técnicas de ADN recombinante y de anticuerpos monoclonales permitió, durante los últimos quince años, la identificación y caracterización de un gran número de antígenos de *T. cruzi*. Se han descrito proteínas aparentemente relacionadas con la interacción parásito-célula hospedadora (Zingales y col., 1985, De Arruda y col., 1989), con capacidad de conferir protección frente a la infección (Ruiz y col., 1990, Taibi y col., 1993) o con potencialidad diagnóstica (Levin y col., 1991). Finalmente se identificaron antígenos que podrían ser empleados en el pronóstico y diagnóstico diferencial ya que son reconocidos preferentemente por pacientes en la etapa aguda de la infección (Affranchino, 1989) o por pacientes chagásicos con compromiso cardíaco (Levin y col., 1989, Schejtman y col., 1990).

En nuestro laboratorio, utilizando bibliotecas de expresión en  $\lambda$ gt11, se han podido aislar dos tipos de antígenos recombinantes de *T. cruzi*:

a) antígenos capaces de reaccionar frente a sueros de pacientes con infección por *T. cruzi*, como JL7 y JL8 (Levin y col., 1989) y,

b) antígenos que reaccionan predominantemente con suero proveniente de pacientes con miocardiopatía chagásica crónica (MCC), como JL5, JL9 (Levin y col., 1989) y RA1, un antígeno recombinante que codifica para la región C-terminal de una HSP70 de *T. cruzi* (Levin y col., 1990; Levy-Yeyati y col., 1990).

#### **1.14.1.- Antígeno JL7:**

El antígeno recombinante JL7 codifica para una secuencia repetitiva de 68 aminoácidos, similar a la presente en el antígeno 1 (Ibañez y col., 1988), al antígeno FRA (Lafaille y col., 1989) y el recombinante H49 (Cotrim y col., 1990).

Se trata de un fragmento de una proteína flagelar de *T. cruzi* de aproximadamente 300 kD (Lafaille y col., 1989), asociada al citoesqueleto, e involucrada en la unión del flagelo al cuerpo celular del parásito (Cotrim y col., 1990).

La capacidad diagnóstica del antígeno JL7 fue evaluada mediante dos estudios multicéntricos utilizándose para ello un ensayo inmunodiagnóstico de placa de lisis, basado en la detección de una proteína de fusión beta-galactosidasa-JL7 producida "in situ" por bacterias (Moncayo & Luquetti, 1990, Levin y col., 1991). En ambos, JL7 obtuvo valores de índice Kappa mayores que 0,80, demostrando ser un excelente reactivo diagnóstico (Levin y col. 1991).

### 1.14.2.- Antígeno JL5:

Este fago recombinante se obtuvo al rastrear con suero de un paciente con MCC (paciente JL) una biblioteca de *Trypanosoma cruzi* construida en  $\lambda$ gt11. El recombinante JL5 fue reconocido por una mayoría de sueros pacientes chagásicos con cardiomiopatía, mientras que no reacciono con sueros de pacientes chagásicos sin evidencias de compromiso cardíaco (Levin y col., 1989).

El antígeno recombinante JL5 fue identificado como un péptido de 35 aminoácidos correspondiente a la porción C-terminal de una proteína ribosomal P de *Trypanosoma cruzi* (Levin y col., 1989). Levitus y col. (1991a) demostraron que la reactividad anti-JL5 de los sueros chagásicos crónicos está restringida a los últimos 13 aminoácidos de este polipéptido, denominado R-13 (EEEDDDMGFGLFD), y que esta respuesta es específica para la infección chagásica ya que anticuerpos anti-R13 prácticamente no se detectan en individuos con otras parasitosis. Este tridecapéptido tiene una homología de más del 95% con respecto al péptido correspondiente de las proteínas ribosomales P humanas, denominado H-13 (EESDDDMGFGLFD). Experimentos posteriores demostraron la naturaleza autoinmune de los anticuerpos anti-JL5, ya que reaccionaban con la proteína ribosomal P humana de 17 KDa. Sin embargo, los niveles de autoanticuerpos contra las proteínas P humanas, medidos como reactividad anti-R10 nunca fueron tan elevados como los medidos para los anticuerpos contra R-13 (Mesri y col. 1990; Levitus, 1991b).

Por otra parte, trabajos de nuestro laboratorio determinaron que en pacientes chagásicos, niveles elevados de actividad sérica anti-R13 correlacionaban la existencia de inflamación miocárdica activa (Schejtman y col., 1990). En consecuencia, los anticuerpos anti-R13 podrían constituir un excelente marcador inmunológico de daño miocárdico con inflamación activa, hecho de suma importancia ya que, de confirmarse, será el primer marcador serológico de miocarditis chagásica (Levin y col, 1993b).

Hasta la realización de la presente tesis, muchos de los resultados obtenidos y las correspondientes conclusiones fueron determinados por análisis de la respuesta anti-R13. Falta un análisis pormenorizado de los autoanticuerpos *per se* (anti-H13) en la enfermedad. Por lo tanto, para estudiar la autorreactividad anti-P y determinar su origen, se hace necesario profundizar el análisis de la respuesta autoinmune utilizando diferentes péptidos sintéticos correspondientes a la secuencia de las proteínas P humanas y del parásito.



### 1.15.- OBJETIVOS DE LA TESIS:

Como se desprende de la introducción, resulta indispensable mejorar el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas. Este mejoramiento deberá pasar por un aumento de la sensibilidad y especificidad del ensayo serológico, sin aumentar su complejidad ya que se concibe como un ensayo para uso en bancos de sangre, ensayos de campo y/o diagnóstico clínico de rutina. El ensayo podría maximizar el aprovechamiento de la información proveniente del suero de un paciente chagásico brindando datos que den información sobre el estado clínico del paciente. Con respecto a este último punto, el péptido R13 ha demostrado ser indicador de miocarditis chagásica activa y podría ser incorporado a un ensayo diagnóstico de rutina (ver 1.14.2).

En base a lo anterior, los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

1) Mejorar los ensayos serológicos existentes basándose en los resultados ya obtenidos por el laboratorio; diseño de un nuevo reactivo diagnóstico para ELISA, que permita lograr una mayor especificidad diagnóstica e información sobre el estado clínico del paciente. Así, se plantea producir un reactivo diagnóstico adaptable a un ELISA, pasando de un sistema diagnóstico artesanal y de mesada de laboratorio básico (ensayo de placa de lisis) a un ensayo clínico apto para la rutina clínica, y para la cuantificación.

1a) subclonado del inserto JL7 del fago  $\lambda$ gt11 a un plásmido de expresión;

1b) producción en cultivos bacterianos del reactivo recombinante y purificación mediante cromatografía de rápida resolución;

1c) ensayo del reactivo en diversas muestras;

1d) comparación de las capacidades diagnósticas de un extracto de *T. cruzi* y del recombinante por estudios multicéntricos ciegos controlados por agencias internacionales

(como los Estudios Multicéntricos organizados por la OMS y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, en 1990 y 1991, respectivamente).

2) Estudio detallado de la reactividad anti-proteínas ribosomales P del suero de pacientes chagásicos. Comparación con la reactividad anti-P de los pacientes lúpicos P positivos. Empleo en este estudio de técnicas de medición de reacciones en tiempo real.

***MATERIALES Y  
METODOS***

## 2. 1.- COMPOSICION DE SOLUCIONES Y MEDIOS EMPLEADOS

### FRECIENTEMENTE EN EL TEXTO:

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

LB-amp: LB + 100 µg/ml ampicilina

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

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

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

PBS-leche: PBS-TW + 3 % leche descremada

SM: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,02% gelatina

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

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

TBS-leche: TBS-TW + 3 % leche descremada

Top-agarosa: LB + 0,7 % agarosa

10 x M9: 1 % NH<sub>4</sub>Cl, 3 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15,1 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O, en agua.

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

Tampón de siembra: 0.2% azul de bromofenol, 4% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 20% glicerol, en TBS.

Buffer de lisis: 50 mM Tris pH=8, 10 mM EDTA, 10% sacarosa.

## 2. 2.- PLASMIDOS

### 2.2.1.- pCJ55:

El plásmido pCJ55 fue cedido gentilmente por el Dr. N. Gridley de la Universidad de Yale. Dirige la expresión del gen que codifica para el fragmento Klenow de la enzima ADN polimerasa I de *E. coli* bajo el control del promotor termoinducible P<sub>L</sub> del fago lambda (Joyce y col., 1983).

### 2.2.2.- pMal-c:

Posee un sitio de clonado múltiple que permite producir una proteína de fusión cuya expresión está regulada el promotor “tac” (Amann y col., 1995). De esta forma las proteínas recombinantes constituyen entre el 20 y el 40% del total de proteínas celulares.

El gen foraneo queda ubicado río abajo del gen *malE-lacZα*, el cual codifica para la proteína de unión a la maltosa (MBP) y resulta en la expresión de una proteína de fusión MBP-secuencia insertada. La afinidad de la MBP por la maltosa es utilizada para purificar la proteína recombinante mediante el uso de columnas de afinidad.

Posee el gen de resistencia a ampicilina lo que permite fácilmente seleccionar las bacterias transformadas.

El inserto interrumpe la expresión de la subunidad α de la β-galactosidasa, de modo que las bacterias que llevan plásmido recombinante no dan coloración azul en presencia de x-gal.

### 2.2.3.- pGEM-3Zf(+) y pGEM-3Zf(-):

Plásmidos que pueden ser usados como vectores de clonado, templado para transcripción in vitro y para la producción de ADN simple cadena circular debido a la presencia del origen de replicación del fago filamentoso f1. Ambos plásmidos son idénticos excepto por la orientación del sitio de clonado múltiple.

Poseen el gen de resistencia a ampicilina lo que permite fácilmente seleccionar las bacterias transformadas.

El inserto interrumpe la expresión de la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa, de modo que las bacterias que llevan plásmido recombinante no dan coloración azul en presencia de x-gal.

### 2.3.- BACTERIAS:

#### 2.3.1.- Cepas bacterianas:

Y1089 (ATCC N° 37197): *E. coli*,  $\Delta$ lacU169, proA+,  $\Delta$ lon, araD139, strA, hflA150, (chr::Tn10), (pMC9).

Y1090 (ATCC N° 37197): *E. coli*,  $\Delta$ lacU169, proA+,  $\Delta$ lon, araD139, strA, supF, (trp c22::Tn 10), (pMC9). pMC9=pBR322, lacIQ.

MC1061( $\lambda$ ): *E. coli*, hsdR, mcrB, araD139,  $\Delta$ (araABC-leu)7679,  $\Delta$ lacX74,  $\lambda$  cI857, galU, galK, rpsL, thi.

XL1-Blue: *E. coli*, supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac-, F'[proAB+, lacIQ, LACZ $\Delta$ M15Tn10(tetr)]

### **2.3.2.- Mantenimiento de las cepas:**

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

### **2.3.3.- Preparación de bacterias competentes:**

#### **2.3.3.1.- Preparación de *E. coli* Y1090 para la infección con fago $\lambda$ gt11:**

Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* Y1090 en 100 ml de LB conteniendo 50 mg/ml ampicilina, 0.2 % maltosa y se incubó durante toda la noche a 37 °C con agitación. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4000 rpm durante 5 min a 4 °C y se resuspendieron en 0.4 volúmenes de MgSO<sub>4</sub> 10 mM estéril y frío. Las bacterias así preparadas fueron mantenidas a 4 °C por no más de 15 días.

#### **2.3.3.2.- Preparación de *E. coli* MC101 y XL1-Blue para transformación con ADN plasmídico:**

Se utilizó el método de transformación de alta eficiencia desarrollado por Hanahan (Sambrook y col., 1989). A partir de un cultivo conteniendo aproximadamente  $8 \cdot 10^7$  células/ml se obtuvo un “pellet” que fue resuspendido en un tercio del volumen inicial de TFB (KCl 1 M, MnCl<sub>2</sub> 45 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, HaCoCl<sub>3</sub> 3mM, K-Mes 10 mM). Se incubó 15 min en hielo y se centrifugó a 4000 rpm por 20 min a 4 °C. El “pellet” se resuspendió en 1/12 de volumen de TFB. Se agregó DnD (DTT 1 M, DMSO 90%, AcoK 10 mM) 3.5% final y se mezcló e incubó en hielo por 10 min. Luego se agregó DnD 7% final y se incubó por otros 20 min en hielo. Las células competentes fueron guardadas a 4 °C hasta el momento de la transformación. Este método permitió obtener una eficiencia de transformación de  $5 \cdot 10^7$  ufp/mg de ADN.

## 2.4.- FAGOS:

$\lambda$ gt11: lac5,  $\Delta$ shndIII $\lambda$ 2-3, srI $\lambda$ 3°, clts857, srI $\lambda$ 4°, nin5, srI $\lambda$ 5°, Sam100

### 2.4.1.-Fagos recombinantes:

$\lambda$ gt11-JL7: clon recombinante aislado a partir de una biblioteca de ADN copia de *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2, estadio epimastigote) en  $\lambda$ gt11 (Levin y col., 1989).

El recombinante JL7 presenta una secuencia repetitiva de 204 pb que codifica para 68 aminoácidos (ver anexo).

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

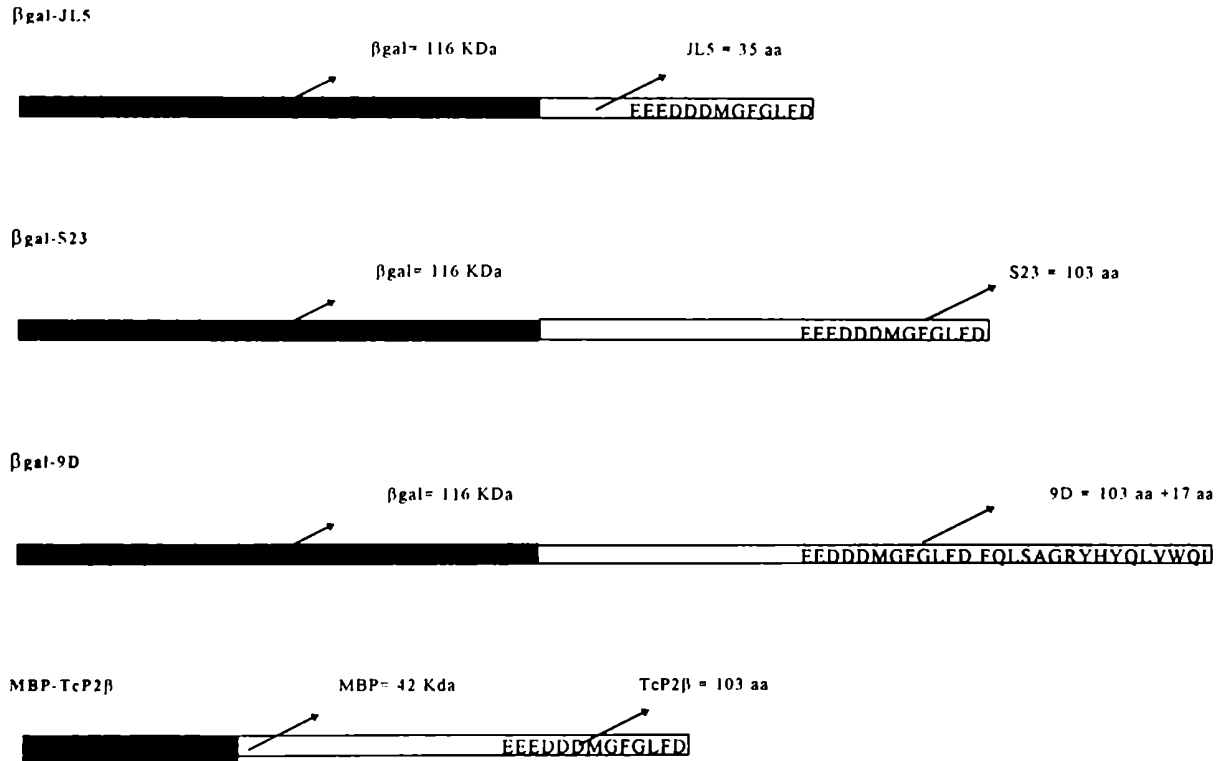
El recombinante JL5 codifica para los últimos 35 aminoácidos de la región carboxiterminal de la proteína ribosomal P2 beta de *T. cruzi* (TcP2 $\beta$ ) (fig. 2).  
 $\lambda$ gt11-S23: fago recombinante aislado a partir una biblioteca de ADN complemanentario de *T. cruzi* (cepa RA, estadio tripomastigote) en  $\lambda$ gt11 (Mesri y col., 1990).

El recombinante S23 codifica para TcP2 $\beta$  salvo por los tres primeros aminoácidos (fig. 2)

$\lambda$ gt11-9D: fago recombinante aislado de una biblioteca de ADN copia construida a partir de ARN mensajero de *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2, estadio epimastigote) utilizando oligonucleótidos complementarios a la secuencia codante del octapéptido carboxiterminal DMGFGLFD de TcP2 $\beta$ , como cebador específico de la reacción de transcriptasa reversa (Schijman, Tesis doctoral, 1992). El recombinante 9D codifica para TcP2 $\beta$ , pero dada su estrategia de clonado su extremo carboxiterminal no se encuentra libre como en el resto de los recombinantes tipo TcP2 $\beta$  o como en la proteína del parásito, sino que continua como proteína de fusión a la región C-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa por 17 aminoácidos (fig. 2)

$\lambda$ gt11-P2h: fago recombinante que codifica para la proteína ribosomal P2 humana (Rich y col., 1987).





**Figura 2:**

Representación esquemática de los antígenos recombinantes de TcP2β utilizados. Los segmentos negros corresponden a la proteína de fusión aportada por λgt11 (β-gal) ó pMAL (MBP).

#### **2.4.2.- Amplificación de los fagos:**

Para obtener una suspensión de fagos de aproximadamente 10<sup>10</sup> ufp/ml, se infectaron 200 µl de bacterias *E. coli* Y1090 preparadas como se detalla en 2.3.3.1, con 10 µl de fagos (aprox. 10<sup>6</sup> ufp/ml). Luego de 20 min. a 37 °C se mezclaron con 3 ml de top-agarosa (previamente fundida y mantenida a 50 °C) y se sembraron en una placa de Petri (96 mm) de LB-agar-ampi. Esta se colocó a 42 °C. Al cabo de 4 h se observó el crecimiento a confluencia de los fagos. Se agregaron 5 ml de SM por placa y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se pasó la suspensión de fagos a un tubo resistente al cloroformo. Los fagos remanentes se colectaron en 2 ml más de SM y se mezclaron con la preparación anterior. Se agregó cloroformo (3 % final) y se dejó agitando suavemente durante 15 min. a temperatura ambiente. Las bacterias no infectadas y los restos celulares se separaron por centrifugación a 3000g por 10 min. a 4 °C. Se colectó el sobrenadante, se agregó cloroformo (0,3 % final) y se mantuvo a 4 °C.

#### **Genotipos importantes para la comprensión del sistema:**

ΔlacU169: deleción completa del operón lac del cromosoma.

Δlon: carece de actividad proteasa responsable de la degradación de proteínas aberrantes.

hflA (high frequency lysogenization): resulta en una alta frecuencia de lisogenización del fago lambda.

supE: gen que codifica para un tRNA-glutamina supresor de mutación ámbar (UAG); requerido para el crecimiento de algunos fagos.

supF: gen que codifica para un tRNA-tirosina supresor de mutación ámbar (UAG); suprime la mutación S100 de λgt11.

lacIQ: mutación del gen lacI que provoca una sobre-expresión del represor del operón lac.

recA: la recombinación homóloga está inhibida.

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

Sam100 (S100): mutación ámbar involucrada en la lisis de la membrana bacteriana. Produce la acumulación de partículas fágicas dentro de huéspedes no supresores.

#### **2.4.3- Preparación del ADN del fago $\lambda$ gt11:**

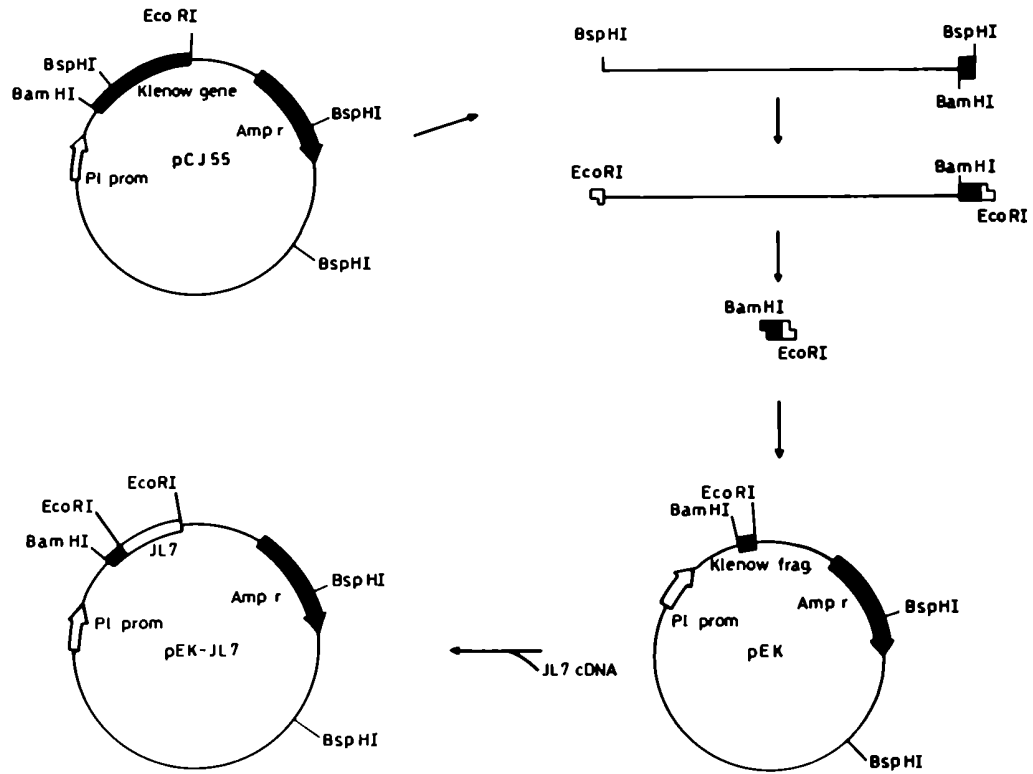
Se realizó una mezcla conteniendo 20 ml de fago amplificado, 100 ml de bacterias Y1090, 100 ml de una solución  $MgCl_2$  2 mM y  $CaCl_2$  10 mM. Se incubó 20 min a 37°C y el contenido se trasvasó a otro tubo que contenía 10 ml de LB, 200 ml de maltosa 20% y 100  $\mu$ l de  $MgCl_2$  1M. Se incubó durante 6 hs. a 42°C para inducir el ciclo lítico del fago. Posteriormente se agregó 200 ml de  $CHCl_3$  y se incubó durante 5-10 min a 37 °C con el objeto de lisar las bacterias remanentes. Se centrifugó y del SN de fagos (1010 ufp/ml) se tomaron 10 ml a los cuales se les agregó 10 ml de SM y 320 ml de DNAsa I (1 mg/ml). Se mezcló por inversión y se incubó 15 min a T.amb. Se agregaron 2 ml de NaCl 5M y 2.2 g de PEG-6000 y se incubó 15 min en hielo. Se centrifugó y el “pellet” de fagos se resuspendió en 300 ml de SM. Se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo y el ADN se precipitó con etanol absoluto a -70 °C. El “pellet” se lavó con 150 ml de etanol 70%, se secó al vacío y se resuspendió en 50 ml de TE pH: 8. El rendimiento fue de 2-5 mg de ADN/ml de lisado.

## 2.5.- CONSTRUCCION DEL PLASMIDO DE EXPRESION pEK-JL7:

El plásmido pCJ55 fue digerido con BspHI. A los fragmentos resultantes se ligaron adaptadores EcoRI (10-mer) (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Luego se digirieron con las enzimas BamHI y EcoRI.

Un fragmento BamHI-EcoRI de aproximadamente 200 pb conteniendo los primeros 192 nucleótidos del gen codificante para el fragmento Klenow fue aislado y ligado en el plásmido pCJ55 previamente digerido con BamHI/EcoRI resultando en el nuevo vector pEK.

El ADN copia JL7 obtenido a partir del fago lambda gt11 (Levitus y col., 1991, ver anexo) como un fragmento EcoRI, fue ligado al vector pEK previamente digerido con EcoRI obteniéndose el plásmido de expresión pEK-JL7 (fig. 3), donde la expresión de la proteína recombinante Klenow-JL7 (AKJL7) está bajo la dirección del promotor del fago lambda  $P_L$ . Este promotor es uno de los más activos *in vivo* (Deuschle y col., 1986). Una secuencia operadora adyacente,  $oL1$ , permite la represión de  $P_L$  mediante el represor  $\lambda$ , producto del gen  $\lambda cI$  (Ptashne y col., 1980). La proteína represora es expresada por un gen de copia única autoregulado presente en las bacterias huésped apropiadas (Gottesman y col., 1980). Cepas de *E. coli* como la MC1061( $\lambda$ ) tienen el represor termosensible  $cI187$ , por lo que la inducción de la expresión se produce a 42 °C. De esta manera es posible producir grandes cantidades de antígeno recombinante inducible por cambios de la temperatura en el medio de cultivo.



**Figura 3:**  
Esquema de la construcción del plásmido pEK-JL7.

## **2.6.- SUBCLONADO DE LOS INSERTOS EN EL PLASMIDO p-MAL**

El ADN de pMAL (0.5 mg) y el ADN del clon deseado de  $\lambda$ gt11 ( $\lambda$ gt11-S23 ó  $\lambda$ gt1-P2h) (5 mg) fueron digeridos con EcoRI. Se determinó que la digestión fuera completa analizando alícuotas de los productos cortados en un gel de agarosa 0.8%. A los digestos de la restricción se les realizó dos extracciones con fenol-cloroformo y el ADN se precipitó agregando 1/10 del volumen de NaAcO 3 M y un volumen de isopropanol. Las muestras se resuspendieron en 50  $\mu$ l de una solución conteniendo TrisCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0 y 2  $\mu$ l de plásmido digerido se mezclaron con 3, 6 y 12  $\mu$ l del fago digerido. La ligación se realizó con ligasa NEB T4 (aprox. 400 unidades) durante 2 hs. a 16 °C.

## **2.7.- TRANSFORMACION DE BACTERIAS COMPETENTES CON PLASMIDO:**

Se debe mezclar aproximadamente 10 ng de plásmido a 50  $\mu$ l de bacterias competentes. Es importante que el volumen de la solución de ADN no exeda el 5 % del volumen total de células. Agitar la mezcla e incubar por 30 min. en hielo. Paralelamente se deben preparar dos tubos control: 1) bacterias competentes con una cantidad conocida de plásmido estandar (usualmente 0,5 ng) y 2) bacterias competentes sin agregado de plásmido.

Llevar las bacterias a un baño a 42 °C, incubar por 90 seg. y rápidamente transferir a un baño con hielo. Dejar 2 min., agregar a cada tubo 800  $\mu$ l de LB e incubar por 45 min., agitando ocasionalmente, a 37 °C para permitir a las bacterias recuperarse y expresar la resistencia a antibiótico que porta el plásmido.

Precipitar las bacterias centrifugando a 3000 g por 5 min., descartar el sobrenadante y resuspenderlas en 100  $\mu$ l. Plaquear la suspensión de bacterias sobre placas con LB suplementado con el antibiótico de selección. Dejar incubando a 37 °C toda la noche.

## 2.8.- LISOGENIZACION DE *E. coli* Y1089 CON FAGOS $\lambda$ gt11:

En el presente trabajo se prepararon bacterias lisógenas para el fago  $\lambda$ gt11 salvaje y los fagos recombinantes  $\lambda$ gt11-JL5,  $\lambda$ gt11-S23 y  $\lambda$ gt11-9D, siguiendo basicamente el protocolo descrito por Huynh y col (1985).

Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* Y1089 (crecida en LB-agar-amp) en 3 ml de LB-amp conteniendo 0,2 % maltosa y se dejó crecer durante toda la noche a 37 °C con agitación. Este cultivo saturado se diluyó 100 veces en 50 ml de LB-amp-10 mM MgSO<sub>4</sub> y se incubó con agitación a 37 °C hasta una DO<sub>600</sub> = 0,25. Se infectaron 100  $\mu$ l de bacterias con un volumen igual de fagos (10<sup>8</sup> ufp/ml en SM) y se incubaron por 30 min. a 30 °C. La mezcla se diluyó sucesivamente hasta 1:10<sup>5</sup> y 100  $\mu$ l de esta dilución final se rastrilló sobre una placa de LB-agar-amp. Luego de incubar la placa toda la noche a 30 °C, se obtuvieron colonias aisladas cuya lisogenia fue comprobada tomando cada una con un escarbadiante y marcando con una cruz sobre dos placas de LB-agar-amp (esto se repitió para 25 colonias aisladas), reproduciendo el esquema de siembra en ambas. Una de las placas se incubó a 30 °C y la otra a 42 °C, a esta temperatura se induce el ciclo lítico del fago debido a la inactivación del represor cI. La falta de supresión de la mutación S100 provoca una acumulación de partículas fágicas dentro de la bacteria, inhibiendo su crecimiento. La frecuencia de lisógenas obtenidas en las diferentes experiencias varió entre 10 y 50 %. Para conservar las bacterias lisogénicas, se estriaron separadamente sobre LB-agar-amp y luego de incubarlas toda la noche a 30 °C, se las guardó a 4 °C. A partir de algunas colonias aisladas se prepararon cultivos saturados (a 30 °C) en LB-amp, se mezclaron con un volumen de glicerol esteril y se mantuvieron a - 70 °C.

## 2.9.- OBTENCION DE ADN PLASMIDICO:

Se utilizó una modificación del método de Birnboim y Doly (1979).

Se partió de 5 ml de cultivo crecido en LB-amp, con agitación (200 rpm), durante toda la noche a 37 °C. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 1000 g y resuspendidas en 100 µl de 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA y 50 mM glucosa.

La suspensión de bacterias se incubó 5 min. en hielo y posteriormente se agregaron 200 µl de una solución 1 % SDS, 0,2 N NaOH preparada en el momento. Se mezcló por inversión y se dejó 10 min. en hielo. Se agregaron luego 150 µl de 5 N KAc, enfriado previamente, se mezcló por inversión y se dejó en hielo.

Luego de 10 min. de incubación, se centrifugó en microcentrífuga durante 5 min. a máxima velocidad. Se tomó el sobrenadante (~400µl) y se hizo una extracción con un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1).

Para precipitar el ADN, se mezcló la fase acuosa con 1/10 de volumen de NaAc 3 M, pH 5,2, y 2 volúmenes de etanol. Se mezcló por inversión, y se incubó 10 min. a - 70 °C. Luego se centrifugó en microcentrífuga a máxima velocidad por 15 min.

El precipitado obtenido se resuspendió en 50 µl de agua.

El rendimiento fue de aproximadamente 1 µg de ADN por ml de cultivo.



## **2.10.- ELECTROFORESIS EN GELES NATIVOS DE AGAROSA**

La agarosa fue disuelta en tampón TBE 1X, a una concentración adecuada de acuerdo a la longitud del ADN a visualizar. Se agregó BrEt. a una concentración final de 0.5 mg/ml. El ADN se mezcló con 1/5 de volumen de tampón de siembra: glicerol 50 %, TBE 5X y azul de bromofenol 1 % (tampón de siembra 5X). La electroforesis se llevó a cabo con tampón TBE 1X, generalmente en un campo eléctrico de 5-10 V/cm, a T.amb. Los geles fueron visualizados utilizando un transiluminador de luz ultravioleta de 300 nm y fotografiados con una cámara Polaroid MP-4 con filtro rojo (RPC4) y película Polaroid 667.

El límite de detección para una banda independiente fue de aproximadamente 10 ng.

## **2.11.- EXPRESION Y PURIFICACION DE LAS PROTEINAS RECOMBINANTES:**

### **2.11.1.- Subclonadas en pEK-JL7:**

La cepa MC1061 transformada por el vector pEK-JL7, fue crecida en 1 L de medio a 28° C, y con el cultivo aún en fase logarítmica (D.O.  $_{600nm}$  = 0,2) se llevo la temperatura a 42° C, y se mantuvo la incubación por 2,5 hs. Se retiraron dos alícuotas de 500 µl cada una que se mezclaron con un volumen de fenol equilibrado con 1 % SDS/1x M9 (fenol-SDS/M9), de manera de lisar las bacterias y desnaturalizar las proteínas. El resto del cultivo se indujo para la expresión de la proteína recombinante a 42 °C. Se incubó a esta temperatura por 2,5 horas, y luego se retiraron 2 alícuotas de 500 µl y una de 10 ml. Las alícuotas de 500 µl se mezclaron con un volumen de fenol-SDS/M9. A los 10 ml y al resto del cultivo (cultivo inducido) se los cosechó por centrifugación a 4000 g, se descartó el sobrenadante y los precipitados se conservaron a - 20 °C. Luego fueron resuspendidas en 10 ml de tampón de lisis (fracción 1), sonicadas (output control: 2, duty cycle: 50 %, 6 veces de 1 min. dejando descansar 1 min. entre cada una, siempre incubándose en hielo) (fracción 2) y la suspensión

resultante centrifugada a 18000 g por 10 min. a 4° C. Se separó el precipitado (fracción 3), y al sobrenadante se le agregó lentamente  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta una concentración de 25 %. Se centrifugó a 20000 g por 10 min. a 4° C se separó nuevamente el sobrenadante (fracción 4) del precipitado (fracción 5). Las proteínas del sobrenadante fueron precipitadas con 85 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . El sobrenadante (fracción 6) se desechó y el precipitado se resuspendió en tampón A (fracción 7) (25 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 25 mM Tris-HCl pH 7), y aplicado sobre una columna de fenil sefarosa (Pharmacia XK 26/50 column, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweeden). Las proteínas se eluyeron mediante un gradiente lineal entre 0 y 100 % de tampón B (25 mM Tris-HCl pH 9, 1 M NaCl). Las fracciones conteniendo la proteína de fusión fueron concentradas y aplicadas en un columna de filtración por gel (Superose 12, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Las fracciones que contenían la proteína purificada fueron analizadas geles de poliacrilamida-SDS 10% y Western blots.

El rendimiento final del proceso de purificación fue de 2 mg por litro de medio de cultivo, con una concentración de 330  $\mu\text{g/ml}$ .

### **2.11.2.- Subclonadas en p-MAL**

Un cultivo conteniendo aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/ml fue inducido por el agregado de IPTG (0.3 mM final). Luego de una incubación durante 2 hs. a 37°C, las células se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en 50 ml de buffer de lisis. La ruptura celular se realizó mediante un ciclo de congelamiento-descongelamiento y dos ciclos de sonicación de un minuto cada uno. Se realizó una centrifugación a 9000 x g durante 30 min obteniéndose en el sobrenadante (extracto crudo) las proteínas citoplasmáticas.

En el sistema p-Mal las proteínas de interés son sintetizadas como una proteína de fusión con la MBP. Esta característica permite la utilización de columnas de sefarosa-maltosa para su purificación. Se utilizaron columnas de 2 cm de diámetro por 9 cm de alto con 10 ml de resina. Se sembraron 10 ml de extracto crudo y se hicieron recircular durante 2 hs. utilizando una bomba peristáltica. Los lavados se realizaron con 20 ml del “buffer” con el

cual se equilibró la columna (Tris-HCl 20 mM, pH: 7.4, NaCl 0.2 M y  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM). Posteriormente, la proteína de fusión se eluyó con maltosa 10 mM. Durante los lavados y la elución se colectaron fracciones de 1.5 ml y alícuotas de las mismas fueron analizadas en geles de poliacrilamida-SDS 10%. Las fracciones en las cuales se observó la proteína recombinante libre de contaminantes fueron parcialmente liofilizadas durante 4 hs. y aquéllas en que la cantidad de proteínas observada en el gel fue similar se juntaron. Posteriormente se determinó la concentración proteica.

#### **2.11.2.1- Localización celular de la proteína recombinante:**

Se resuspendió el precipitado proveniente de los 10 ml de cultivo en 0,5 ml de tampón de lisis, se agregó 1/10 volumen de lisozima (10 mg/ml) y se incubó 15 min. en hielo. Luego se colocó PMSF para llegar a una concentración de 2 mM y 1 volumen de Tris-tritón (50 mM Tris pH 8, 0,2 % Tritón X-100). Se incubó en hielo hasta que se observó la lisis (aprox. 10 min.).

Se centrifugó a 10000 g por 10 min. y el precipitado se resuspendió en 2 ml de tampón de muestra. Al sobrenadante se lo mezcló con 2 volúmenes de acetona fría, se lo incubó por 1 h. a -20 °C y centrifugó a 10000 g por 5 min. para precipitar las proteínas, que se resuspendieron en 2 ml de tampón de muestra.

#### **2.11.3.- Subclonadas en $\lambda$ gt11**

Se realizó el método propuesto por Hall y col. (1984). Bacterias lisógenas para  $\lambda$ gt11 fueron cultivadas durante toda la noche a 30°C hasta obtener un cultivo saturado. La inducción de la replicación del fago se produjo incubando a 42°C durante 30 min. La inducción de la expresión de las proteínas de fusión se realizó mediante el agregado de IPTG 5 mM durante 2 hs. a 37°C.

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó a partir de 1 litro de cultivo inducido. Las bacterias se concentraron por centrifugación a 1500 x g durante 10 min a

T.amb., se resuspendieron en 16 ml de TNE y se agregaron 16 ml TNE conteniendo sacarosa 50%. Luego de 10 min se agregaron 32 ml de lisozima 4 mg/ml y se dejó actuar por 15 min. La lisis se completó con el agregado de 2 ml de EDTA 0.5 M y 2 ml de NP40 10%, seguido de 2 ciclos de congelamiento-descongelamiento (nitrógeno líquido-agua corriente). Para disminuir la viscosidad debida a los ácidos nucleicos, el homogenato se pasó 10 veces por una aguja 21G'. Luego se centrifugó a 13000 x g durante 30 min a 4°C y el precipitado, conteniendo la proteína de fusión, se resuspendió en 40 ml de urea 8 M. Con el objeto de eliminar las partículas insolubles, la suspensión se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y el sobrenadante se guardó a -20°C. Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS 7.5 %, obteniéndose una única banda del PM esperado. El rendimiento fue entre 2 y 5 mg de proteínas recombinantes por litro de cultivo inducido.

## **2.12.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS**

Se realizó mediante un micrométodo adaptado del protocolo original descrito por Bradford. A 10 ml de cada muestra se agregaron 20 ml de H<sub>2</sub>O y 300 ml de reactivo de Bradford (Sambrook y col., 1989). Las muestra se analizaron por duplicado en placas de poliestireno de 96 pozos y se midió la DO a 620 nm en un espectofotómetro multicanal de absorción, Immunoskan 340 BDSL .

Se utilizaron patrones de BSA para la construcción de una curva de calibración y en base a la misma se determinó la concentración proteica de las muestras.

## **2.13.- ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA**

La electroforesis de proteínas se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli y col., 1970, para geles discontinuos de poliacrilamida conteniendo dodesil sulfato de sodio (SDS), de 10x10 cm y 0,75 cm de espesor. El gel separador contenía un porcentaje variable de acrilamida:bisacrilamida (30:1) dependiendo el rango de tamaños de las proteínas a resolver, tampón Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 y SDS 0,1 %. El gel concentrador contenía 4 % de acrilamida:bisacrilamida (30:1), tampón Tris-HCl 0,13 M pH 6,8 y SDS 0,1 %. Las muestras a analizar se mezclaron con 1 volumen de tampón de siembra y se calentaron a ebullición durante 3 min. Como tampón de corrida se utilizó una solución 0,1% SDS, 190 mM glicina, 25 mM Tris, pH: 8.3. Las condiciones de corrida fueron: 20 mA corriente continua por gel durante aproximadamente 45 min a T.amb.

Como patrones de peso molecular se utilizó un kit comercial conteniendo triosafofatoisomerasa (26,6 Kd), láctico deshidrogenasa (36,5 Kd), fumarasa (48,5 Kd), piruvato quinasa (58 Kd), fructosa-6P quinasa (84 Kd),  $\beta$ -galactosidasa (115 Kd) y  $\alpha$ 2-macroglobulina (180 Kd).

## **2.14.- TINCIÓN DE LOS GELES:**

### **2.14.1.- Tinción con Coomasie- Blue:**

Finalizada la corrida, se sumerge el gel en la solución de tinción (0.05% Coomasie Brilliant Blue R (Sigma), 45% metanol, 10% ácido acético) durante 1 hora a T.amb. con agitación suave y luego fue desteñido utilizando una solución 45% metanol-10% ácido acético, hasta la visualización de las bandas. Para su conservación, el gel se secó utilizando un secador de geles a 80 °C durante 1 hora.

#### **2.14.2.- Tinción con nitrato de plata:**

Finalizada la corrida electroforética, se fijan las proteínas sumergiendo el gel en una solución 10 % etanol, 5 % ácido acético (solución A) durante 10 min. a temperatura ambiente. Se retiró la solución A y se enjuagó el gel con agua deionizada. Se descartó el agua y se agregan 100 ml de agua deionizada y se incubó el gel a nivel máximo en microondas por 90 seg. (es aconsejable agitar el gel cada 30 seg. para evitar su deshidratación). Se dejó agitando a temperatura ambiente por 5 min. y se descartó el agua. Se agregaron 50 ml de 0,2 mM DTT (solución B) y se repitió la incubación en microondas y la posterior agitación. Se descartó la solución B, y se lavó el gel con 200 ml de agua deionizada durante 30 seg. a temperatura ambiente. Se agregaron 50 ml de 0,1 %  $\text{AgNO}_3$  (solución C) y se repitió la incubación en microondas y posterior agitación. Se descartó la solución C y se lavó el gel con 300 ml de agua deionizada durante 30 seg. Se agregaron 30 ml de una solución conteniendo 3 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 0,0185 % formaldehído (solución D), y se dejó agitando a temperatura ambiente hasta que se formó un ligero precipitado. Se reemplazó la solución D por 30 ml de solución fresca, se dejó agitando por 30 seg. y se repitió. Cuando se empezó a oscurecer el fondo del gel se detuvo la reacción agregando 5 g de ácido cítrico. Finalmente se lavó el gel con agua deionizada.

#### **2.15.- ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA:**

Se utilizaron los sistemas Bio Rad (Richmond, CA, USA) "Mini-Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell" para geles pequeños.

Previamente al armado del aparato de transferencia, se recortaron dos papeles Whatman 3MM y un filtro de nitrocelulosa (Hybond-C, Ameresham, Buckinghamshire, England) del tamaño del gel y junto con las esponjas se dejaron sumergidos en tampón T (190 mM glicina, 25 mM Tris pH 8,3, 20 % metanol). Luego de la corrida electroforética, se separaron las

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

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

Finalizada la transferencia se retiró la nitrocelulosa y se sumergió TBS-leche.

## **2.16.- DETECCION INMUNOLOGICA DE LAS PROTEINAS POR WESTERN**

### **BLOT:**

Las proteínas transferidas a nitrocelulosa se detectaron según el método descrito por Huynh y col. (1985). Todas las incubaciones y los lavados luego de cada etapa se efectuaron a T.amb. y con agitación. Los sueros a analizar se diluyeron en TBS-leche-Tween. Como segundo anticuerpo se utilizaron anticuerpos anti-IgG de ratón o anti-IgG humana biotinilados, ambos preparados en cabra y diluidos 1:400 en TBS-leche (kit ABC Vecta Stain, Vector Laboratories). El revelado se realizó agregando el complejo avidina-biotina-peroxidasa de acuerdo a las instrucciones del kit ABC Vecta Stain de Vector Laboratories. Cuando fue necesario neutralizar la reactividad inespecífica de los sueros contra proteínas de *E. coli* (por ejemplo, en la detección de proteínas de fusión), se agregó a la solución del primer anticuerpo, 20% de lisado de *E. coli* Y1089 lisógena para  $\lambda$ gt11 salvaje (2.18.).

## 2.17.- REACTIVIDAD DE LOS SUEROS CONTRA FAGOS RECOMBINANTES:

Se utilizó básicamente el método descrito por Mesri y col. (1990).

Para la formación de ceped bacteriano, se mezclaron 500  $\mu$ l de bacterias *E. coli* Y1090 competentes con 3 ml de top-agarosa (previamente fundida y mantenida a 50 °C), se depositaron sobre una placa (96 mm) de LB-agar-amp y se dejaron crecer a 37 °C por 30 min. Luego se retiró la placa de la estufa y se depositaron 2  $\mu$ l de cada preparación de fagos amplificados ( $\sim 10^{10}$  upf/ml). Luego de dejar secar la placa abierta 10 min. cerca del mechero, se incubó a 42 °C por 40 min. Mientras tanto se recortó un filtro de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham, Buckinghamshire, England), se lo marcó en un extremo, se lo sumergió en una solución 10 mM IPTG, y se lo dejó secar sobre papel Whatman 3MM. El filtro así preparado se colocó sobre el cespel bacteriano encima de donde se hubieron sembrado los fagos. Se incubó la placa con el filtro boca abajo a 37 °C por 2 hs. Durante esta etapa se produce la inducción de la expresión de la proteína de fusión, que junto con las proteínas bacterianas y del fago quedan inmovilizadas sobre el filtro. Luego se retiró el filtro (debe observarse lisis confluyente en los sitios de siembra de los fagos), y se colocó directamente en TBS-leche.

Para ensayar la reactividad de los sueros contra las proteínas recombinantes, se siguió el protocolo descrito en 2.16.



## **2.18.- PREPARACION DE LISADO DE *E. coli* Y1089 LISOGENA PARA $\lambda$ gt11**

### **SALVAJE:**

El lisado de bacterias *E. coli* Y1089 lisógenas para  $\lambda$ gt11 salvaje utilizado para competir la reactividad inespecífica de los sueros, se preparó a partir de 1 litro de cultivo inducido según 2.16.- Las bacterias se centrifugaron a 1500 g por 10 min. a temperatura ambiente, se resuspendieron en 50 ml de TBS y se lisaron mediante 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento (nitrogeno líquido-agua corriente). El homogenato final se guardó a - 20 °C.

## **2.19.- PREPARACIÓN DE HOMOGENATO DE *Trypanosoma cruzi*:**

Epimastigotes de la cepa Tulahuen 2 fueron crecidos como fue descrito por Mesri y col. (1990). Se cosecharon por centrifugación a 500 g, por 5 min. a 4°C, se lavaron en PBS y se resuspendieron en 5 volúmenes de tampón de lisis (PBS, 1 mM EDTA, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,1 % SDS y 1/100 volúmenes de PMSF). Para completar la lisis se procedió a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento en nitrogeno líquido y agua. El extracto fue alicuotado y guardado a - 70°C.

## **2.20.- PREPARACION DE RIBOSOMAS DE *Trypanosoma cruzi*:**

Un gramo de homogenato de epimastigotes, cepa Tulahuen 2, (ver 2.19), se resuspendieron en 1 ml de TMK (1 mM  $MgCl_2$ , 25 mM KAcO, 10 mM Tris-HCl pH 7,4), y se purificaron por centrifugación sobre capas de 1,5 y 2 M de sacarosa en TMK a 105000 g por 2 hs. a 4 ° C (rotor Ti 50). Finalmente se lavaron en TMK y se resuspendieron en 600  $\mu$ l del mismo tampón.

## **2.21.-PEPTIDOS SINTETICOS:**

### **2.21.1.- Síntesis de péptidos:**

La síntesis de péptidos se llevo a cabo según el método descrito por Van Regenmortel y col.(1988). Se utilizó el aparato de síntesis semi-automático Neosystem NPS4000 (Neosystem, Starsbourg, Francia) que permite realizar automaticamente los protocolos de desprotección y acoplamiento, bajo constante supervisión de la integridad de estos pasos verificando la presencia de los grupos NH<sub>2</sub> libres o protegidos del extremo N-terminal de la cadena de péptido con el ensayo de ninhidrina. La pureza de cada preparación fue ensayada por HPLC. Sólo se utilizaron aquellas preparaciones con una pureza superior al 95 %.

### **2.21.2.- Péptidos utilizados:**

Los péptidos sintetizados utilizados en este trabajo fueron:

**R13:** EEEDDDMGFGLFD

**H13:** EESDDDMGFGLFD

**R11:** EDDDMGFGLFD

**H11:** SDDDMGFGLFD

**R10:** DDDMGFGLFD

**R7:** MGFLFD

**IE:** EEEDDDMG

**IS:** EESDDDMG

**IA:** EEADDDMG

**TMVP:** RNRIIEVENQ

### **2.21.3.- Acoplado de péptidos a seroalbúmina bovina (BSA):**

Se acoplaron los péptidos a BSA de acuerdo a la técnica descrita por Mesri y col. (1990). A una solución de BSA 5 mg/ml se le agregó péptido sintético disuelto en agua hasta llegar a una relación molar péptido/BSA 30/1. Sobre esta solución se debe agregar gota a gota un volumen de una solución recientemente preparada de glutaraldeído 2 %, y se deja incubando a 4 °C durante 1 hora. La reacción se detiene mediante el agregado de NaBH<sub>3</sub> sólido hasta una concentración de 10 mg/ml. Finalmente se dializa la solución contra PBS 10 mM pH 7,5. Se determinó la relación péptido-BSA mediante degradación específica de aminoácidos y análisis por HPLC.

## **2.22.- SUEROS HUMANOS:**

### **2.22.1.- Sueros utilizados para el ensayo diagnóstico a ciego:**

Los sueros fueron seleccionados del banco de sangre del Laboratorio de la Enfermedad de Chagas del Instituto de Medicina Tropical en Goiania, Brasil, de pacientes bien caracterizados y donantes normales. Todos los sueros fueron ensayados utilizando las técnicas serológicas clásicas: hemaglutinación indirecta (HAI), aglutinación directa con 2-mercaptoetanol (AD2ME) e inmunofluorescencia indirecta (IIF). De cada uno de los grupos seleccionados, se recogieron al menos 54 sueros, y 20 % de los sueros de cada grupo fueron reelegidos al azar por un programa de computación para ser duplicados internos del ensayo. A todos los sueros y sus respectivos duplicados se les asignó un código al azar, y una alícuota de cada uno de ellos fue enviada al INGEBI. Los códigos fueron enviados a la secretaria del Comité de la Enfermedad de Chagas de la Organización Mundial de la Salud (OMS/TDR) en Ginebra, Suiza. Los resultados obtenidos en el INGEBI fueron enviados a dicha secretaria, donde los códigos fueron decifrados y el ensayo analizado.

El total de sueros analizados fue de 344 muestras. Doscientos veintiocho correspondientes a pacientes chagásicos, y 116 a individuos no chagásicos. Ambos sexos fueron incluidos, y el rango de edades oscilo entre 1 y 57 años.

Los pacientes infectados con *T. cruzi* (CC) fueron divididos en 4 grupos:

**Grupo CS:** cincuenta y cuatro pacientes con cardiopatía chagásica severa, con electrocardiograma (EKG) alterado: frecuentes latidos ventriculares prematuros, bloqueo atrio-ventricular, fibrilación atrial. Con manifestaciones clínicas de problemas cardíacos y cardiomegalia visualizada por rayos X de torax. Pacientes de este grupo pueden o no tener problemas digestivos.

**Grupo CL:** cincuenta y siete pacientes con cardiopatía chagásica leve, con alteraciones de su EKG tales como bloqueo de la rama derecha, bloqueo fascicular anterior izquierdo, latidos ventriculares prematuros y alteraciones en la polarización ventricular. Las radiografías de rayos X de torax fueron normales, así también como los análisis con bario que descartan una patología digestiva.

**grupo CD:** cincuenta y nueve pacientes con enfermedad digestiva chagásica (megaesófago y/o megacolon) con EKG y radiografía de torax normales.

**Grupo CI:** cincuenta y ocho pacientes chagásicos crónicos en fase indeterminada, con EKG y radiografía de torax normales, como así también los análisis con bario.

**Grupo NO:** cientodieciseis individuos no chagásicos divididos en dos subgrupos:

Subgrupo NE: cincuenta y nueve individuos sanos con EKG normales y serología negativa para *T. cruzi*.

Subgrupo NC: cincuenta y siete individuos no chagásicos afectados con otras enfermedades: quince leishmánicos, 19 con enfermedades autoinmunes, 19 con cardiopatías no chagásicas y finalmente 4 con otras enfermedades (diabetes juvenil, esquistosomiasis, megaesófago idiopático y blastomycosis Sudamericana). Todos lo pacientes presentaban serología negativa para *T. cruzi*.

En la tabla 3 se resume la clasificación de las muestras.

**TABLA 3:**

Clasificación de los sueros utilizados en el ensayo diagnóstico por ELISA.

CONDICION	CODIGO	NUMERO DE MUESTRAS	SEXO M/F	LIMITES DE EDAD
CARDIOPATIA SEVERA	CS	54	40/15	14-57
CARDIOPATIA LEVE	CL	57	29/31	24-55
FORMA DIGESTIVA	CD	59	34/25	12-55
FORMA INDETERMINADA	CI	58	25/31	12-51
<b>SUBTOTAL CHAGASICOS</b>	<b>CC</b>	<b>228</b>	<b>128/102</b>	<b>12-57</b>
ENFERMOS AUTOINMUNES	LU	19	3/16	15-54
LEISHMANICOS	LV	15	8/7	1-49
CARDIOPATIA NO CHAGASICA	JL	19	14/5	20-54
OTRAS ENFERMEDADES	O	4	4/0	20-51
NO CHAGASICOS	NC	57	29/27	1-54
SUEROS NORMALES	NE	59	35/23	19-55
<b>SUBTOTAL NO CHAGASICOS</b>	<b>NO</b>	<b>116</b>	<b>64/50</b>	<b>1-55</b>
<b>TOTAL</b>		<b>344</b>	<b>192/152</b>	<b>1-57</b>

### **2.22.2.- Sueros de pacientes chagásicos con cardiopatía y reactividad anti-P:**

Los sueros de pacientes chagásicos utilizados en el presente trabajo fueron diagnosticados reactivos contra *T. cruzi* por los ensayos de fijación de complemento, hemoaglutinación pasiva e inmunofluorescencia. Un suero se consideró chagásico cuando fue positivo al menos para dos de dichos ensayos.

Los pacientes fueron evaluados clínicamente en el Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía. Este estudio consistió en electrocardiograma en reposo, teleradiografía de torax, ecocardiograma bidimensional y ventriculograma en reposo con tecnecio 99m.

La dilución utilizada fue de 1/400 en todos los casos, salvo que se indique lo contrario.

Todos los sueros presentaban altos títulos contra JL5.

### **2.22.3.- Sueros de pacientes con Síndrome Eritematoso Sistémico:**

Los sueros lúpicos fueron gentilmente cedidos por la Dra. M.J. Svetatz, del Servicio de Hematología del Hospital Centenario de la Ciudad de Rosario, Provincia de Santa Fe.

Sólo se utilizaron sueros que presentaron actividad anti-proteínas ribosomales P.

## **2.23.- INMUNOPURIFICACION DE ANTICUERPOS:**

### **2.23.1.- Inmunopurificación de anticuerpos anti-proteína de fusión:**

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

La proteína de fusión se inmovilizó sobre nitrocelulosa incubando un filtro de Hybond-C (Amersham, Buckinghamshire, England) de 5 cm<sup>2</sup> con 3 ml de proteína recombinante purificada (ver 2.11.3) durante 2 hs. Se lavó 10 min, con TBS para eliminar el exceso de proteína, se bloqueó durante 20 min con TBS-leche y se incubó durante toda la noche a 4 °C

con 5 ml de suero diluido 1:10 en TBS-leche conteniendo 30 % de lisado de *E. coli* Y1089 lisógena para  $\lambda$ gt11 salvaje.

Los anticuerpos no unidos se removieron con 3 lavados de 10 min. en TBS-Tween. La elución ácida se llevó a cabo incubando el filtro durante 30 min. a 4 °C con 5 ml de tampón E (0,2 M glicina, 0,15 M NaCl, 10  $\mu$ g/ml BSA, 1 mM PMSF (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,05 % Tween 20, pH 2,8). El material eluido se pasó a un tubo plástico y, manteniéndolo en hielo, se neutralizó rápidamente con 5 ml de 1 M Tris-HCl pH 8 y 2 ml de TBS-leche. Esta preparación de anticuerpos se alicuotó en tubos eppendorf y se guardó a - 20 °C.

### **2.23.2.- Inmunopurificación de anticuerpos anti-péptidos sintéticos:**

Se siguió el protocolo descrito por Plaué y col. (1989) en donde se inmoviliza el péptido por su grupo amino a una resina pre-activada Act-Ultrigel AcA 22 (Sepracor, Villeneuve La Garenne, Francia).

Dos ml. de resina se incubaron por 30 min. con agitación con 40 ml de tampón fosfato 10 m M pH 7,5. Luego se agregó 1 mg de péptido libre y se continuó la incubación por 2 hs.

Finalizada la inmovilización del péptido se rellenó una columna de plástico de 20 ml de capacidad, con un robinete en uno de sus extremos que permite el control del flujo del eluido, con la resina y se remueve el péptido no retenido lavando con 20 ml del mismo tampón.

Para saturar la resina y bloquear aquellos sitios no ocupados por el péptido, se hicieron pasar 5 ml de 0,1 M etanolamina pH 8,5, se cerró el robinete y se dejó la columna por 3 hs. a 4 °C, cuidando que quede solución de etanolamina por encima de la resina.

Se lava el exeso de etanolamina de la columna con 20 ml de tampón fosfato.

Se colocó 200  $\mu$ l de suero encima de la resina y se dejó que entren lentamente. Para evitar que la resina se seque, se colocaron 500  $\mu$ l de tampón fosfato con el robinete cerrado para evitar que entre en la resina y se diluya el suero. Se dejó la columna de esta manera, por 3 hs. a temperatura ambiente.

Se lavó la columna de las proteínas séricas y de los anticuerpos no retenidos con tampón fosfato hasta que la absorbancia del eluato medido a 280 nm fuese la misma que la del tampón. Para eluir los anticuerpos retenidos, se pasó una solución de glicina 0,2 M pH 2,6. Se recogieron 20 fracciones de 500 µl desde el momento del agregado de la solución ácida, sobre 500 µl de Tris 0,1 M pH 8,8.

Para determinar en que fracciones se eluyeron los anticuerpos específicos, se ensayó con 50 µl de cada una de ellas un ELISA contra los péptidos correspondientes (ver 2.24.3).

## **2.24.- ENSAYOS DE ELISA:**

Las determinaciones por ELISA se realizaron basicamente como fue descrito por Mesri y col. (1990), salvo modificaciones puntuales dependiendo el antígeno a evaluar. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Cada valor informado resultó del promedio de por lo menos tres ensayos independientes.

### **2.24.1.- Determinación de la reactividad contra AKJL7:**

Placas de poliestireno (E.I.A. II Plus Microtitration plate, Flow Laboratories, Inc.) fueron recubiertas con 50 ng/pocillo de proteína recombinante o de homogenato de *T.cruzi* en tampón fosfato pH 7,4 (PBS) e incubadas toda la noche a 4°C.

Luego de lavar las placas con PBS se incubaron con una dilución 1/400 de suero en solución de bloqueo. Nuevamente se lavan con PBS y se incuban con anticuerpos anti IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina. Finalmente, después de un último lavado con PBS, se revelaron incubando la placa con p-nitofenil fosfato (Sigma, St. Louis, MO, USA). Todas las incubaciones fueron por 1 hora a 37°C.

Los valores de absorbancia fueron leídos a 415 nm representando a las IgG unidas al recombinante. Valores por sobre tres veces la desviación estandard de la media para 10 individuos sanos (línea de corte) fueron considerados positivos.



#### **2.24.2.- Determinación de la reactividad contra las proteínas recombinantes**

##### **subclonadas en p-MAL:**

Se siguió el protocolo descrito en 2.24.1 salvo que la cantidad de recombinante a depositar fue de 100 ng por pocillo. Por otro lado, y debido a la reactividad por parte de los sueros de pacientes chagásicos contra la proteína MBP, fue necesario al mismo tiempo depositar la misma cantidad de esa proteína obtenida de bacterias transformadas con p-MAL. La reactividad contra los recombinantes se calculó restando al valor obtenido para cada proteína de fusión, el valor obtenido por ese mismo suero para MBP.

#### **2.24.3.- Determinación de la reactividad contra las proteínas recombinantes**

##### **subclonadas en $\lambda$ gt11:**

Se siguió el protocolo descrito en 2.24.1 salvo que la cantidad de recombinante a depositar fue de 500 ng por pocillo. Nuevamente se depositó la misma cantidad de  $\beta$ -galactosidasa obtenida de bacterias lisógenas con fago sin inserto. La reactividad contra los recombinantes se calculó restando al valor obtenido para cada proteína de fusión, el valor obtenido por ese mismo suero para  $\beta$ -galactosidasa.

#### **2.24.4- Determinación de la reactividad contra péptidos sintéticos:**

Para lograr que el pegado del péptido a la placa fuera reproducible, se trabajó en todos los casos con péptido acoplado a BSA. Cada pocillo se recubrió con 50  $\mu$ l de una solución 2  $\mu$ M en péptido. El resto del protocolo fue igual que en el punto 2.24.1.

#### **2.24.5.- Ensayo de inhibición de la reactividad medida por ELISA:**

Se siguió el protocolo descrito en 2.23.3 salvo que los sueros diluidos 1/400 se preincubaron con cantidades crecientes de péptido sintético libre (desde 0 a 120  $\mu\text{M}$ ) durante toda la noche a 4 °C. Como control negativo de la inhibición se utilizó la misma concentración punto a punto del péptido TMVP, cuya secuencia no muestra ninguna relación con la de los péptidos utilizados. Los porcentajes de inhibición se definieron como:

$$\% \text{ inhib.} = [1 - (\text{D.O.o} / \text{D.O.c})] \times 100$$

donde D.O.o es la densidad óptica sin péptido libre inhibiendo y D.O.c es la densidad óptica del ensayo cuando se utilizó una concentración "c" de péptido.

#### **2.25.- MEDICIÓN DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DE UN ANTICUERPO.**

##### **MÉTODO DE FRIGUET:**

Existen numerosos métodos para determinar la constante de afinidad de un anticuerpo. Sin embargo, la mayoría de ellos requieren separar los complejos antígeno-anticuerpo del medio en donde quedan los anticuerpos libres. En el caso de trabajar con péptidos pequeños esto no es posible dado que no son inmunoprecipitables.

Friguet y col. (1985) desarrollaron un procedimiento donde el equilibrio ocurre en solución y la cantidad de anticuerpo libre presente en el equilibrio es estimado por ELISA, sin necesidad de separar los complejos antígeno-anticuerpo. En condiciones en donde existe una dependencia lineal entre la D.O. medida por ELISA y la concentración de anticuerpos libres, y conociendo la concentración total de anticuerpos, la concentración de anticuerpos libres en el equilibrio puede ser determinada utilizando la relación:

$$nd / Bn = \text{D.O.}_d / \text{D.O.}_B \quad (1)$$

donde  $\text{D.O.}_d$  es la densidad óptica medida en presencia de una determinada concentración molar de antígeno, y  $\text{D.O.}_B$  es la densidad óptica medida en ausencia de antígeno, d es la

concentración molar de anticuerpo libre, B es la concentración molar total de anticuerpo y n es la valencia del anticuerpo. La fracción de anticuerpo unido a antígeno,  $\alpha$  puede ser definida como:

$$\alpha = (D.O._B - D.O._d) / D.O._B \quad (2)$$

Esta definición es válida siempre y cuando no ocurra un reajuste del equilibrio en la fase líquida durante la incubación en los pocillos revestidos con antígeno. Esta condición puede ser asegurada estableciendo las condiciones experimentales (tiempo de incubación para una determinada concentración de antígeno utilizada) de manera de que el porcentaje de anticuerpo unido no supere el 10 % de la cantidad total de anticuerpo. Para determinar las condiciones que cumplan con este requisito, después de incubar el anticuerpo a diferentes concentraciones en los pocillos un tiempo medido, el contenido de cada pocillo es transferido a otro también revestido con la misma cantidad de antígeno, e incubado por el mismo tiempo. Luego se continúa con el ensayo y finalmente si la diferencia entre las D.O. entre ambos pocillos no supera el 10 %, esta condición experimental es la que se debe utilizar para determinar la constante de afinidad.

#### **Aspectos teóricos:**

Los datos necesarios para el cálculo de la constante de afinidad pueden ser representados a partir de las siguientes transformaciones de la ley de acción de masas:

$$s_x / s_c = K ( B_n - s_x ) \quad (3)$$

donde  $s_x$  son los epítopes unidos (expresados en concentración molar, M),  $s_c$  son los epítopes libres (M), y  $K$  es la constante de afinidad.

Dado que la cantidad de epítopes unidos es igual a la cantidad de sitios de anticuerpo unidos,  $s_x = n_y$  donde  $n_y$  es el número de sitios de anticuerpo unidos a antígeno, la ecuación 3 se puede escribir:

$$n_y / s_c = K ( B_n - n_y ) \quad (4)$$

Utilizando el factor  $\alpha$ ,  $n_y$  puede ser expresado como:

$$ny = \alpha Bn$$

y sustituyendo  $ny$  de la ecuación 4:

$$\alpha / sc = K ( 1 - \alpha ) \quad (5)$$

La ecuación 5 permite la construcción de gráficos de Scatchard del tipo  $\alpha / sc$  vs.  $\alpha$  en donde el valor de  $K$  puede ser obtenido de la pendiente.

Si la concentración molar total de sitios de unión del anticuerpo,  $Bn$ , es desconocida, es posible obtener el valor de  $K$  utilizando la expresión de Klotz de la ley de acción de masas (Klotz, 1953):

$$1 / \alpha = 1 / K \times 1 / ( As - \alpha Bn ) + 1 \quad (6)$$

donde  $A$  es la concentración molar total del antígeno, y  $s$  es su valencia.

La concentración de epítopes libres,  $sc$ , puede ser expresada como:

$$sc = As - \alpha Bn$$

Cuando la concentración total de antígeno que es utilizada en el ensayo es mucho mayor que la concentración total de anticuerpos (  $As > 10 Bn$  ),  $Bn$  y  $\alpha Bn$  son despreciables con respecto a  $As$ , y  $sc$  puede ser aproximado a  $As$ .

En estas circunstancias la ecuación 6 puede ser simplificada como:

$$1 / \alpha = 1 / (KAs) + 1 \quad (7)$$

Multiplicando ambos miembros de la ecuación 7 por  $\alpha K$  y reordenando queda:

$$\alpha / A = K - \alpha K$$

De la pendiente de un gráfico  $\alpha / A$  vs.  $\alpha$  se obtiene el valor de la constante de afinidad  $K$ .

## **2.26.- EL SISTEMA BIACORE:**

El sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia) permite el análisis cuantitativo de interacciones moleculares en tiempo real, por lo que es posible la medición de constantes de asociación y disociación.

El sistema utiliza resonancia de superficie de plasma (SPR) (Kretschman y col., 1968), un fenómeno mecano-cuántico que detecta cambios en las propiedades ópticas de una superficie delgada de oro sobre un soporte de vidrio (superficie sensora) (Lofas y col., 1990). La superficie sensora lleva una matriz de dextrán sobre la cual uno de los reactivos es unido covalentemente, mientras que el otro es introducido mediante un flujo sobre la superficie.

La resonancia ocurre a un ángulo específico de la luz incidente. El ángulo de resonancia depende del índice de refractancia en las vecindades de la superficie metálica y es monitoreado continuamente, permitiendo seguir en tiempo real la asociación o disociación de moléculas a la superficie sensora. Este sistema hace que no sea necesario el marcado de ninguno de los componentes.

### **2.26.1.- Inmovilización de los anticuerpos inmunopurificados anti-R13 sobre la superficie sensora:**

Los procedimientos utilizados fueron los descritos por Lofas y col. (1990).

El anticuerpo (ligando) inmunopurificado como se describió (ver 2.23.2) fue utilizado para la inmovilización. El ligando fue inmovilizado sobre la matriz de dextrán gracias a un efecto de intercambio iónico producido por un pH menor que el del punto isoeléctrico y covalentemente unido por sus grupos amino primarios.

Previo a la inmovilización de los anticuerpos, la matriz fue activada con 30 µl de una mezcla de EDC (N-etil-N'-[(3-dimetilamino)propil]carbodimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida) en una relación 1:1. Los anticuerpos (100 µl) a una concentración de 100 µg/ml en tampón

acetato 10 mM pH 5 fueron inyectados a una velocidad de 5  $\mu$ l/min. Los sitios de la matriz no ocupados por los anticuerpos, fueron bloqueados mediante el pasaje de 30  $\mu$ l de etanolamina-HCl pH 8,5 seguido de 15  $\mu$ l de 50 mM NaOH para remover anticuerpos unidos no covalentemente. Finalmente se pasaron 100  $\mu$ l de HBS pH 7,4 (10 mM Hepes, 0,15 M NaCl, 3,4 mM EDTA, 0,05 % surfactante P20)

Los reactivos NHS, EDC, surfactante P20, etanolamina-HCl y el sensor CM5, fueron obtenidos de Biosensor AB, Uppsala, Suecia.

#### **2.26.2.- Pasaje de péptidos acoplados sobre la superficie sensora con anticuerpos**

##### **inmovilizados:**

Se pasaron 60  $\mu$ l de una solución de péptido acoplado a BSA en HBS a una concentración de 500  $\mu$ g/ml a una velocidad de 5  $\mu$ l/min. Al finalizar, se siguió pasando HBS a la misma velocidad medir los RU de disociación.

#### **2.27.- CULTIVO DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS**

##### **MONOCLONALES:**

La línea celular utilizada fue la ppA-1 (Villela y col., 1991) cedida por el Dr. Ballesta, Ins. Severo Ochoa, UAM, Madrid. Los anticuerpos secretados por esta línea celular están dirigidos contra los últimos 15 aminoácidos de las proteínas P ribosomales de levadura, que son iguales a los últimos 15 aminoácidos de las proteínas P ribosomales de mamíferos.

Las células se crecieron en medio Dulbecco modificado Eagle medium con 10 % de suero fetal bovino. Se hicieron pasajes sucesivos hasta obtener  $5 \times 10^8$  células. La especificidad de la línea se ensayó tomando el sobrenadante del cultivo, y ensayando su reactividad inmunológica por ELISA frente a los péptidos H13, H11, R10 acoplados a BSA.

## **2.28.- DETERMINACIÓN DEL ISOTIPO DE LOS ANTICUERPOS SECRETADOS POR EL HIBRIDOMA:**

Placas de ELISA previamente revestidas con péptido sintético H13, fueron incubadas con el sobrenadante del cultivo del hibridoma sin diluir. Luego del lavado se los pocillos se incubaron con anticuerpos anti diferentes isotipo de cadena pesada y liviana:

anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3, anti-IgG4, anti-IgM, anti-cadena liviana kappa, y anti-cadena liviana lambda, todos conjugados con peroxidasa. La determinación del isotipo de los anticuerpos se determinó revelando con peróxido de hidrógeno y pNitro-Fenil-Fosfato (Mesri y col., 1990), y midiendo la absorbancia como en un ELISA.

## **2.29.- OBTENCIÓN DEL ARN TOTAL DE LOS HIBRIDOMAS:**

Se utilizó una versión modificada del protocolo descrito en "Molecular Cloning" (Sambrook y col., 1989).

Se resuspendió el "pellet" de células en 800 µl de PBS sin iones calcio o iones sodio, previamente enfriada en hielo.

Se agitó con "vortex" por 1 min. y se dejó en hielo por 5 min. Se colocó en tres tubos eppendorf 300 µl de solución de lisado: 0,14 M NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 8,6, 0,5 % Nonidet P-40, 1 mM DTT, 1000 unidades/ml inhibidor de ARNasas. En cada uno de estos tubos se colocaron 300 µl de la suspensión de células. Se dejó 5 min. en hielo, se depositó la mezcla de cada tubo sobre 500 µl de un colchón de 2 M sacarosa y centrifugó a 9000 rpm en microcentrífuga por 20 min a 4 °C.

Se recuperó la fase superior de cada tubo cuidando de no mezclar las fases. Se transfirió todas las fases superiores a un tubo "corex" de 15 ml.

Se agregó un volumen de solución de tampón de proteinasa K: 0,2 M Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 0,3 M NaCl, 2 % SDS, y 200 µg/ml de proteinasa K. Se incubó por 30

min. a 37 °C y luego se agregó un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). Se agitó con "vortex" y se centrifugó 5 min. a 5000 g. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ARN con 2,5 volúmenes de etanol. Se incubó 15 min a - 70 °C (ó 2 hs. a - 20 °C) y se centrifugó a 15000 g por 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, y se dejaron los tubos invertidos sobre un papel de filtro para dejar escurrir todo el líquido.

Se resuspendió el ARN con 300 µl de agua libre de ARNasas y se transfirió la solución a un tubo eppendorf.

Se agregó 45 µl de 3 M NaAco y un volumen de etanol se mezcló por inversión y se dejó precipitando a - 20 °C hasta el momento de ser utilizado (mínimo 2 hs. ó 15 min a - 70°C).

Antes de utilizar el ARN, se precipitó el volumen a utilizar, centrifugando 10 min a 12000 rpm en

microcentrífuga y se resuspendió el "pellet" con agua libre de ARNasas en 1/10 del volumen original.

### 2.30.- OBTENCIÓN DE ADN COPIA:

A partir del ARN total se realizó una reacción de transcriptasa reversa usando hexámeros al azar como oligonucleótidos:

ARN total	2 µg
10 x tampón PCR (Promega)	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µl
H <sub>2</sub> O libre de ARNasas	1 µl
dNTP 10 mM	2 µl
inhibidor ARNasas	1 U
AMV RT (Promega)	2,5 U
hexámeros	2,5 µM



La mezcla de reactivos, excluyendo la enzima y el inhibidor de ARNasas, se incuba a 65° C por 10 min. Se deja que la temperatura descienda hasta 20° C, se agrga la enzima y el inhibidor y se incuba a 22° C por 10 min. luego a 42° C por 40 min. y se finaliza la reacción con una incubación a 95° C por 5 min.

### 2.31.- AMPLIFICACIÓN DE LA CADENA LIVIANA DEL ANTICUERPO POR PCR:

ADN copia	10 µl
10 x tampón PCR (Promega)	9 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4,2 µl
oligo 1 (0,1 mg/ml)	3 µl
oligo 2 (0,1 mg/ml)	3 µl
Taq polimerasa (Cetus)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	70,3 µl

La secuencia de los oligonucleótidos fue obtenida del trabajo de Orfanoudakis y col. (1993) (12).

oligo 1: GCGTCGTCTAGAATTAACACTCATTCTGTTGAA

oligo 2: CCTACCAGTTCCGAGCTCCAGATGACCCAGACTCCA

### **Programa de ciclos:**

300 seg.      95° C

90 seg.      60° C

90 seg.      72° C      → 30 ciclos

90 seg.      95° C

300 seg.      72° C

10 µl del producto de la reacción de PCR se sembraron en un gel de agarosa 0,8 %.

### **2.32.- SUBCLONADO DE LA BANDA DE PCR EN UN VECTOR APTO PARA LA SECUENCIACIÓN:**

Al producto de la reacción de PCR se le realizó una extracción con fenol, cloroformo y eter, y se precipitó con acetato de amonio 0,25 M de concentración final y 2 volúmenes de etanol absoluto. El precipitado se resuspendió en 10 µl de agua deionizada.

La mitad del ADN se cortó con las enzimas de restricción SacI y XbaI, aprovechando los sitios que portaban los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación.

Paralelamente se cortaron 200 ng de cada uno de los plásmidos pGEM-3Zf(+) y pGEM-3Zf(-) (Promega Corporation, Madison, WI) con las mismas enzimas de restricción.

Todos los cortes de restricción se limpiaron con Magic DNA Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, WI), y se resuspendieron en 50 µl de agua deionizada.

Se ligó el producto de PCR con ambos vectores y se utilizó esta construcción para transformar un cultivo de *E. coli* competentes de la cepa *E. coli* XL1-Blue. De las colonias transformadas se obtuvo el ADN plasmídico, y se confirmó las construcciones por mapeo de restricción y corrida electroforética en geles de agarosa.

### **2.33.- SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR:**

#### **2.33.1- Obtención de ADN simple cadena:**

Se siguió el protocolo para obtención de ADN simple cadena para los plásmidos pGEM. Basicamente se hicieron crecer a las bacterias transformadas en medio LB durante toda la noche a 37° C con agitación. Al día siguiente se inocularon 5 ml de 2x YT con 100 µl de cultivo saturado. Se dejó crecer durante 1 hora a 37° C con agitación, se infectó con 50 µl de fago "helper" M13 ( $10^{10}$  ufp), y se continuó el crecimiento durante 7 hs. a 45° C con agitación. Al término, se cosechan los fagósmidos con 0,25 vol. PEG-NH<sub>4</sub>AcO (PEG 40 % / NH<sub>4</sub>AcO 7,5 M, 1/1), se fenoliza, y se precipitó el ADN simple cadena con NH<sub>4</sub>AcO y 2 vol. de etanol.

El ADN simple cadena se resuspendió en 15 µl de agua deionizada.

#### **2.33.2.- Secuenciación de ADN simple cadena:**

Se utilizó el kit de secuencia de Amersham "Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit US 70770" (Amersham International plc, Amersham, UK). Se siguieron los pasos descritos en el protocolo del kit.

### **2.34.- COMPARACIÓN DE SECUENCIA DE ADN:**

Se envió por correo electrónico la secuencia obtenida a la sede del EMBL en Heidelberg para su comparación con el banco de datos de secuencias de ADN y con el banco de datos de proteínas SWISS-PROT, para comparar la secuencia de aminoácidos deducida. Se utilizó el programa FASTA. para la comparación. Los requisitos de estringencia fueron los estandar.

### 2.35.- ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS:

Los resultados del ensayo doble ciego de la OMS fueron analizados por el Dr. Luquetti en el Instituto de Medicina Tropical, Goiania, Brasil. El valor estadístico del índice Kappa fue empleado para el análisis de las 344 muestras ensayadas para evaluar el nivel de acuerdo entre el estado clínico y los ensayos serológicos clásicos realizados por el Dr. Luquetti versus los resultados obtenidos por ELISA utilizando la proteína recombinante y extracto total de *T. cruzi* como antígenos. El valor del índice Kappa se resulta de evaluar la proporción de verdadera concordancia (concordancia observada corregida por la concordancia posible al azar), teniendo en cuenta los verdaderos valores positivos ó negativos y falsos valores positivos ó negativos. El valor del índice Kappa fue calculado según lo descrito por Levin y col. (1991).

La sensibilidad fue calculada como el número de muestras que fueron encontradas positivas para ambos ensayos clásicos y para el ELISA, "a", dividido por el número de muestras positivas sólo para los ensayos serológicos clásicos, "A", (sensibilidad =  $a / A$ ).

La especificidad fue calculada como el número de muestras que resultaron negativas tanto para los ensayos clásicos como para el ELISA, "b", dividido por el número de muestras que resultaron negativas sólo para los ensayos serológicos clásicos, "B", (especificidad =  $b / B$ ).

Por consistir el trabajo en un análisis de los valores presentados por dos variables (homogenato de *T. cruzi* y AKJL7) en cuatro situaciones clínicas diferentes (CS, CL, CD y CI) corresponde efectuar un estudio simultáneo de todas ellas y luego, si el análisis inicial presenta valores significativos, testearlas por una prueba posterior para determinar cuales son las situaciones clínicas que difieren en cada técnica.

Previo a ello, es necesario conocer la normalidad de la distribución de los datos y la homocedasticidad de las varianzas, dado que se utilizarán pruebas paramétricas que exigen este tipo de distribución.

La prueba estadística adecuada a esta situación es el análisis de varianza (univariate analysis of variance, ANOVA), y en la comparación posterior (post-hoc comparison of means) la prueba de Tukey para muestras de tamaño desigual (Tukey HSD for unequal sample sizes, or Spjotvoll & Stoline test). Para comprobar la normalidad de distribución (test of normality) se utilizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y chi cuadrado (Chi square test).

La homocedasticidad de varianzas se analizó mediante las pruebas de Hartley, Cochran C y Bartlett Chi<sup>2</sup> (test de homogeneity of variances).

Como en los valores utilizando el homogenato *T. cruzi* se encontraron varianzas no homogéneas y la prueba de chi<sup>2</sup> ponía en evidencia un cierto grado de distorsión en la normalidad de distribución, se llevó a cabo una prueba doble: paramétrica (ANOVA) y no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis, Kruskal-Wallis ANOVA by ranks), para confirmar los resultados.

La capacidad de los dos antígenos para discriminar entre las cuatro patologías se estudió mediante el análisis de la función discriminante (discriminant function analysis).

Se evaluó la capacidad pronóstica mediante el método gráfico ROC (receiver operating characteristic) (Patterson y col., 1989), buscando las líneas de corte que maximizan la relación entre la especificidad y la sensibilidad. El valor de Odd ratio (OD) establece cuantas veces es más probable que la variable estudiada se encuentre por encima de las líneas de corte de ROC. El valor predictivo positivo (VPP) indica la probabilidad porcentual de que el diagnóstico sea correcto. El valor positivo por azar (positive by random, Pr) indica la probabilidad porcentual de obtener un resultado correcto se obtenga por azar.

El nivel de significancia aceptado para todos los ensayos fue  $p < 0,05$ , para dos extremos.

El fago  $\lambda$  gt11- JL7 clonado de una biblioteca de ADN copia de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Levin y col., 1989), fue utilizado en ensayos inmunoenzimáticos de placa de lisis. Los ensayos confirmaron que los anticuerpos anti-JL7 son específicos de individuos infectados por *T. cruzi* y no se encuentran en individuos normales o pacientes infectados por otros parásitos (Luquetti y col., 1990, Levin y col., 1991). Sin embargo, la detección de anticuerpos circulantes anti-JL7 podía ser mejorada utilizando la técnica de ELISA, con la proteína recombinante purificada como base antigénica del ensayo. Para hacerlo se subclonó el ADN copia (ADNc) de JL7 en un plásmido de expresión (Joyce y col., 1993) para luego producir y purificar el antígeno de cultivos bacterianos, y finalmente poner a punto el ensayo inmunoenzimático.

Se decidió construir un vector que expresase a JL7 como una fusión bajo control del promotor del fago lambda,  $P_L$ .

Previo a la construcción del vector, se ensayó con un "pool" de 10 sueros provenientes de pacientes chagásicos crónicos la reactividad anti-Klenow, no encontrándose reacción positiva para ninguno de ellos.

## ***RESULTADOS***

### **3.1.- DESARROLLO DE UN REACTIVO DIAGNOSTICO RECOMBINANTE PARA LA INFECCION HUMANA POR *TRYPANOSOMA CRUZI*:**

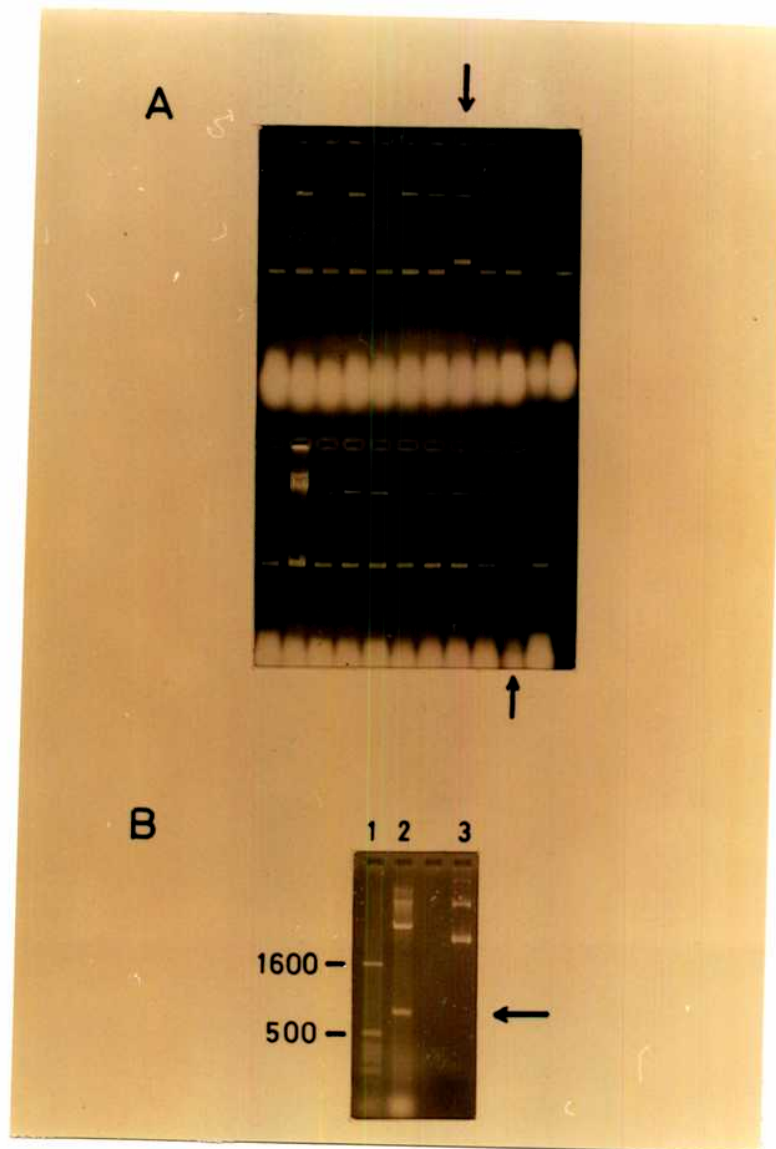
#### **3.1.1.- Construcción del plásmido pEK-JL7:**

El plásmido pEK-JL7 fue construido a partir de pCJ55, y del inserto de ADNc del fago  $\lambda$  gt11- JL7 (ver 2.5. y fig. 3). El plásmido se utilizó para transformar bacterias *E. coli* MC1061( $\lambda$ ). Los ADN plasmídicos de varias colonias se corrieron en un gel de agarosa (fig. 4A). Los plásmidos de mayor tamaño se digirieron con EcoRI y BamHI. Se pudo observar la escisión de un fragmento que correspondía al tamaño del ADNc de JL7 (753 pb, ver anexo) más el segmento correspondiente al fragmento Klenow (192 pb) (fig. 4B).

Dado que la inserción del ADNc de JL7 no fue dirigida, existía una probabilidad del 50 % de obtener vectores con JL7 en dirección contraria a la necesaria para la expresión. Para determinar cuales eran las colonias con JL7 en la orientación correcta, algunas de las colonias recombinantes se indujeron con temperatura. Se corrieron los homogenatos en geles de poliacrilamida. Western blots del cultivo inducido y de proteína Klenow pura se revelaron con suero chagásico (fig. 5).

El peso molecular de la proteína inducida (35 kD) y su reconocimiento específico por el suero confirman la identidad JL7 de la proteína recombinante.



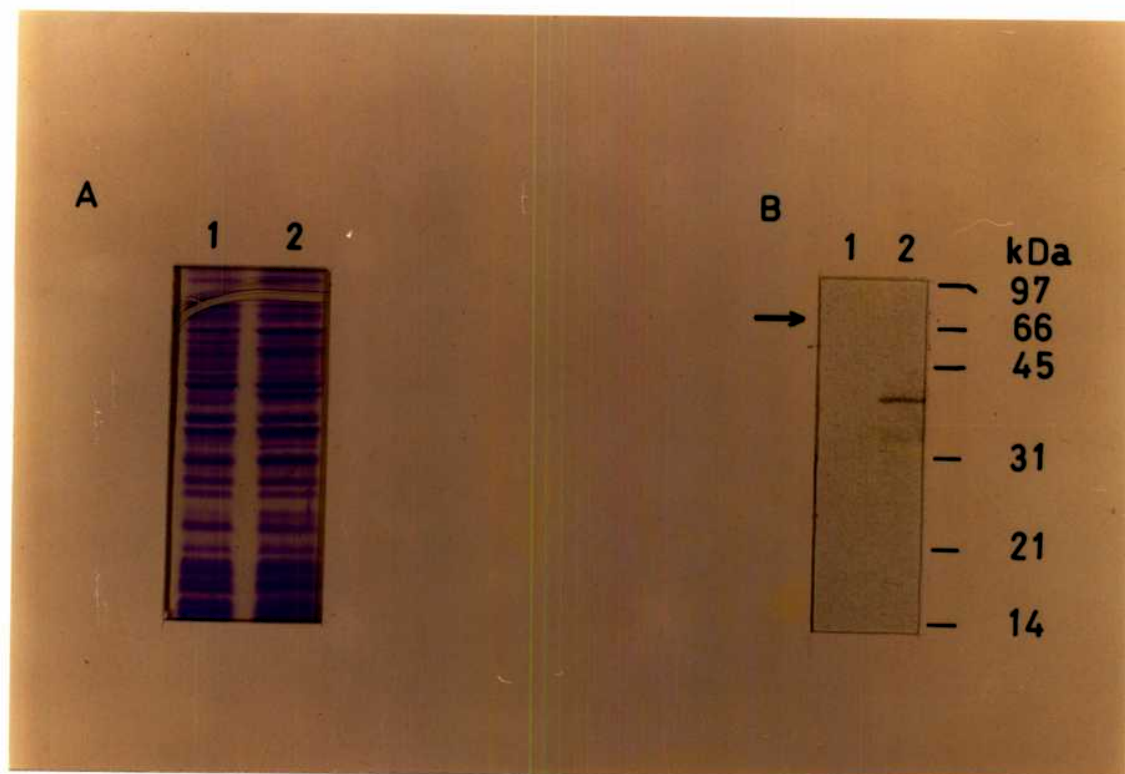


**Figura 4:**

Identificación de los plásmidos recombinantes.

**A)** Electroforesis en geles de agarosa 1,2 % de los plásmidos obtenidos de las colonias recombinantes transformadas con pEK-JL7. Las flechas indican aquellas preparaciones de mayor peso molecular.

**B)** Electroforesis en geles de agarosa 1,2 % de pEK-JL7. Calle 1: marcadores de peso molecular. Calle 2: pEK-JL7 cortado con EcoRI. La flecha indica la banda correspondiente al inserto AKJL7. Calle 3: pEK-JL7



**Figura 5:**

Expresión y reconocimiento de la proteína recombinante AKJL7.

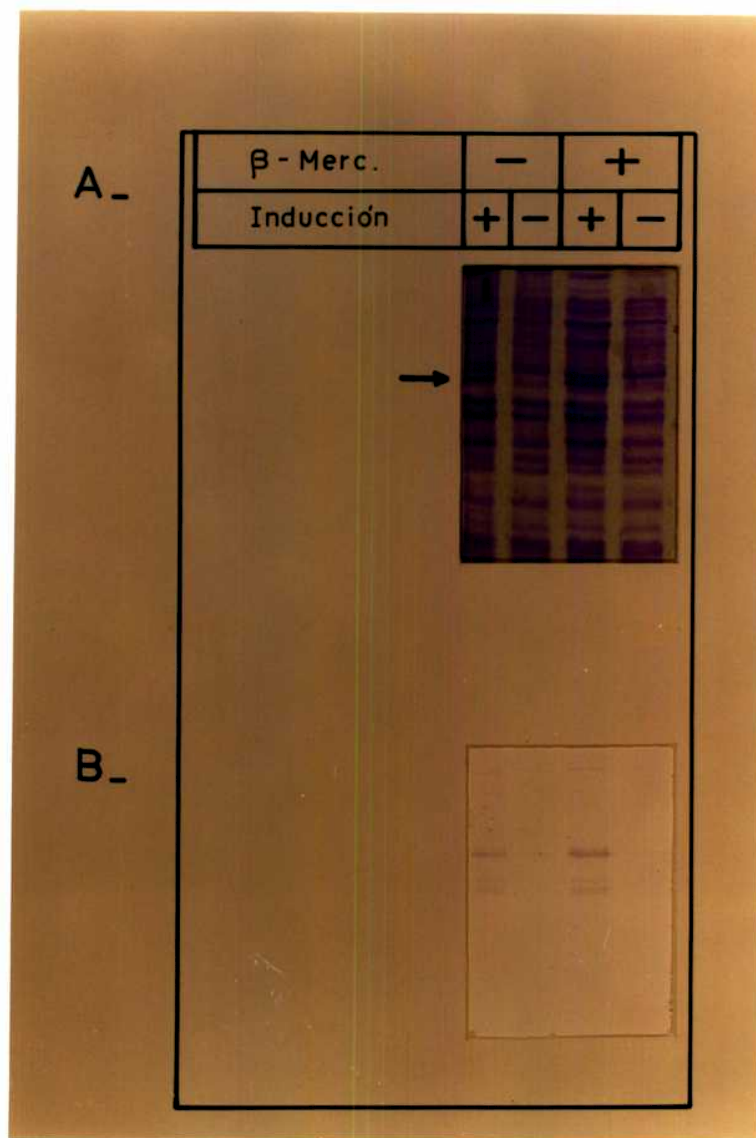
**A)** Gel de SDS-poliacrilamida 10 % de extractos proteicos de bacterias transformadas con pEK-JL7. Calle 1: cultivo sin inducir. Calle 2: cultivo inducido a 42 ° C.

**B)** Western blot revelado con un "pool" de 10 sueros chagásicos crónicos. Calle 1: fragmento Klenow (flecha). Calle 2: cultivo inducido a 42 ° C.

### **3.1.2.- Expresión de la proteína recombinante:**

A partir de una colonia recombinante positiva para AKJL7 se realizó el cultivo de manera de inducir su síntesis.

Dos alícuotas del cultivo antes de la inducción y dos después de la inducción, se utilizaron para realizar el análisis de las muestras (inducida y sin inducir) resuspendidas en tampón de siembra con  $\beta$ -mercaptoetanol, y dos (inducida y sin inducir) resuspendidas en tampón de siembra sin  $\beta$ -mercaptoetanol. No hubo diferencia de movilidad entre las proteínas tratadas con y sin  $\beta$ -mercaptoetanol. El suero chagásico identificó las bandas por Western blot (fig. 6).



**Figura 6:**

Análisis del efecto del  $\beta$ -mercaptoetanol sobre AKJL7.

A) Gel de SDS-poliacrilamida 10 %. La flecha indica la posición de la banda correspondiente a AKJL7 B) Western blot revelado con suero chagásico (1:400)

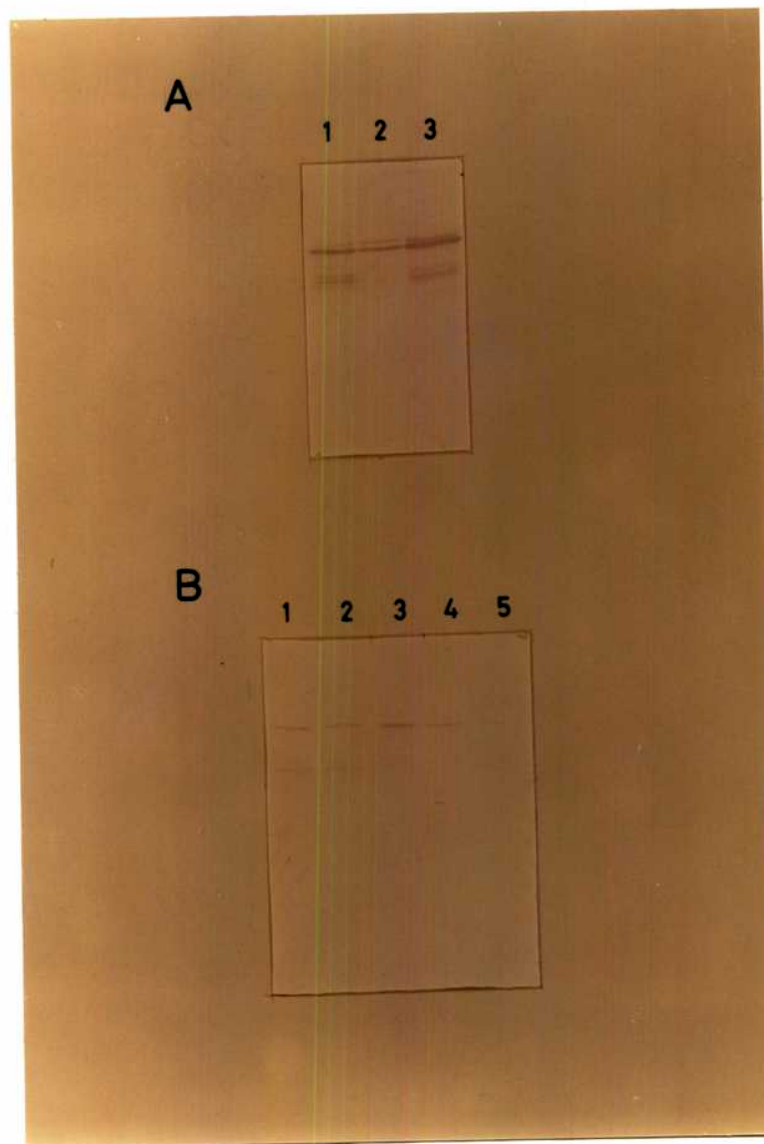
### **3.1.3.- Purificación de la proteína recombinante:**

#### **3.1.3.1.-Localización celular de la proteína recombinante:**

Para desarrollar la estrategia de purificación, se determinó que fracción celular se enriquecía en la proteína recombinante. Se corrieron en PAGE-SDS muestras correspondientes al homogenato total, a la fracción soluble y a la fracción insoluble. Se transfirió a nitrocelulosa y se reveló con suero chagásico (fig. 7A). La mayor cantidad de proteína recombinante se detectó en la fracción soluble. Se decidió, por lo tanto, seguir una estrategia de purificación para esta fracción.

#### **3.1.3.2.- Test de fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :**

A partir de una alícuota de la fracción soluble mencionada anteriormente, se determinó el porcentaje de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con que precipita la proteína recombinante. Se precipitaron las proteínas con diferentes porcentajes de la sal (ver 2.11.1) y las diferentes fracciones se corrieron en un PAGE-SDS y el Western blot fue revelado con suero de paciente chagásico (fig. 7B). Se observó que con 25 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no se logra precipitar la proteína recombinante, pero con 75 % no precipita en su totalidad.



**Figura 7:**

Análisis de la solubilidad de AKJL7.

**A)** Análisis de la localización celular de AKJL7. Western blot revelado con suero chagásico (1:400). Calle 1: fracción soluble. Calle 2: fracción insoluble. Calle 3: proteínas totales.

**B)** Análisis de la solubilidad en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  Western blot revelado con suero chagásico (1:400) de las fracciones precipitables con diferentes porcentajes de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Calle 1: sobrenadante de la precipitación con 75 % de sal. Calle 2: fracción precipitable con 75 % de sal. Calle 3: fracción precipitable con 60 % de sal. Calle 4: fracción precipitable con 40 % de sal. Calle 5: fracción precipitable con 25 % de sal.

### **3.1.3.3.- Purificación por cromatografía líquida de rápida resolución (FPLC):**

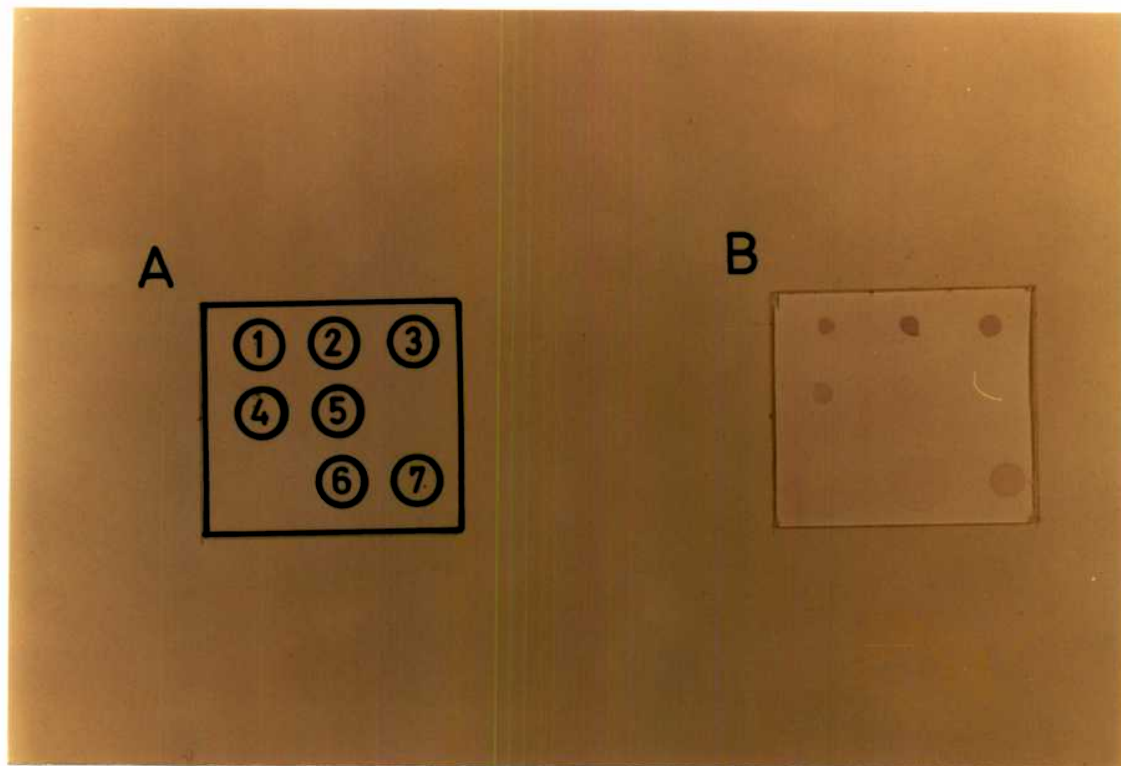
A partir del precipitado del cultivo inducido del punto 3.1.2. se procedió a la purificación de la proteína recombinante como se explica en Materiales y Métodos (ver 2.11.1.).

Las diferentes fracciones obtenidas por la precipitación diferencial con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se analizaron por dot blot y revelaron con suero de paciente chagásico (fig. 8).

Veinte ml de la fracción 7 fueron aplicados en una columna de fenil-sefarosa CL 4B (Pharmacia XK 26/50 column, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweeden). Los diferentes picos de la cromatografía se observan en la fig. 9. La presencia de proteína recombinante en cada fracción se determinó por dot blot. Las fracciones 114, 118, 120, 122 y 124 fueron corridas en PAGE-SDS y el Western blot revelado con suero chagásico (fig. 10).

Las fracciones 114 a 124 se juntaron y dializaron contra 25 mM Tris pH 9 durante toda la noche y se concentró en speed-vac hasta un volumen de 400 $\mu$ l. Estos se aplicaron en una columna de tamiz molecular Superosa 12 (fig. 11). Nuevamente se realizaron dot blots y las fracciones 5, 6 y 7 se sembraron en un PAGE-SDS y el Western blot se reveló con suero chagásico (fig. 12).

La fracción 6 fue dializada contra 0,1 X PBS durante toda la noche y liofilizada. Esta fracción fue la utilizada en la puesta a punto del ELISA diagnóstico.



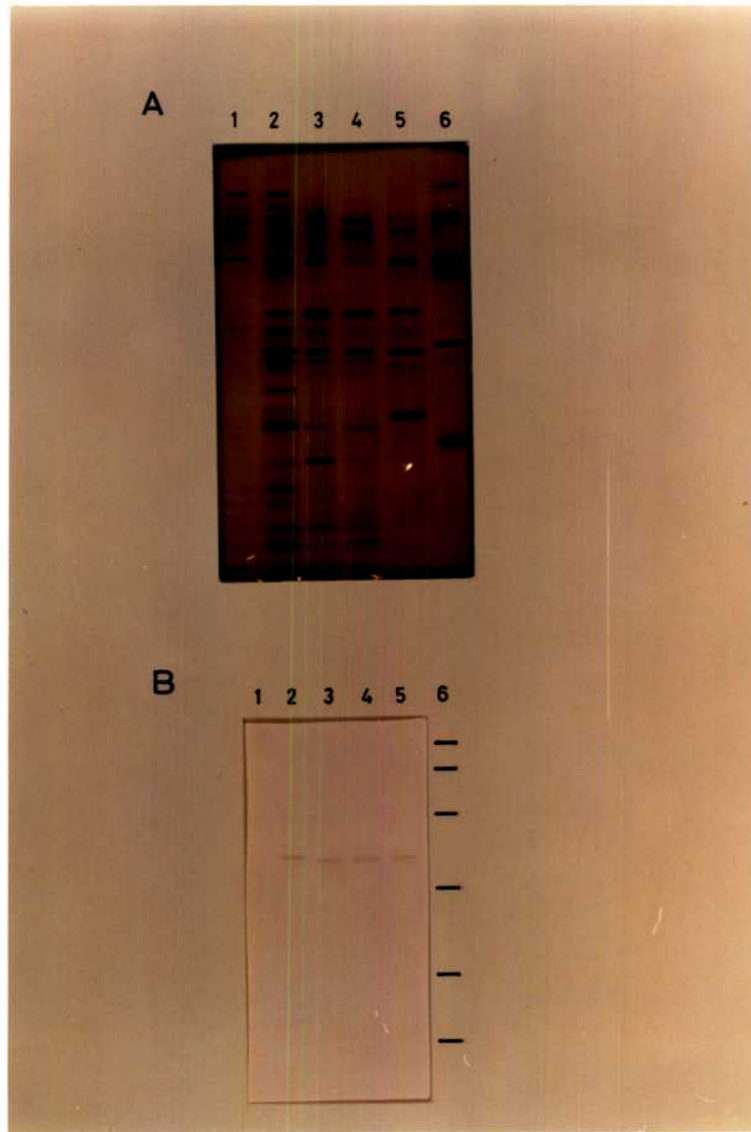
**Figura 8:**

Precipitación diferencial con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (ver 2.11.1)

A) Esquema de la ubicación de cada una de las fracciones.

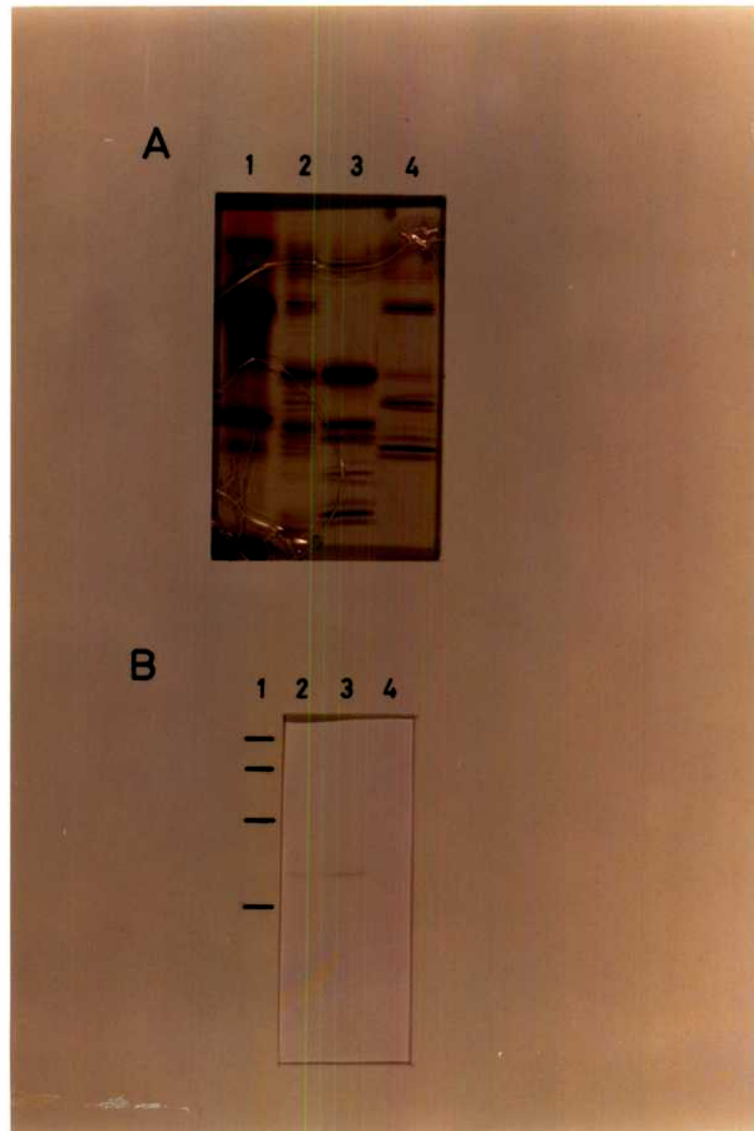
B) Dot blot de cada una de las fracciones de la precipitación diferencial revelado con suero chagásico (1:400).





**Figura 9:**

Perfil de elución de proteínas de la columna fenil-sefarosa CL-4B. Las flechas indican las fracciones correspondientes a cada uno de los picos. Las proteínas se eluyeron mediante un gradiente lineal entre 0 y 100 % de tampón 25 mM Tris-HCl pH 9, 1 M NaCl (línea de rayas).

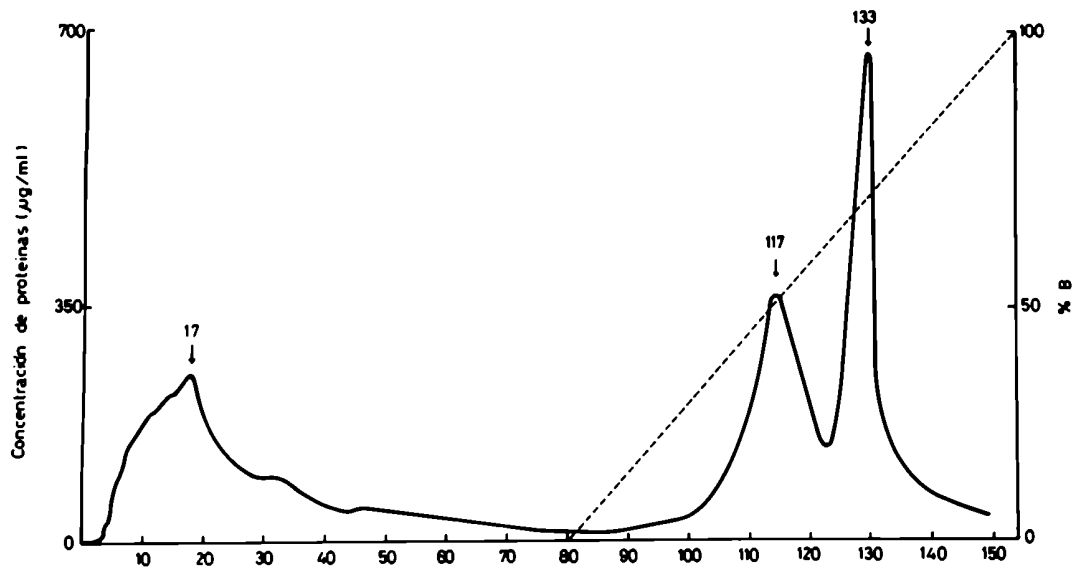


**Figura 10:**

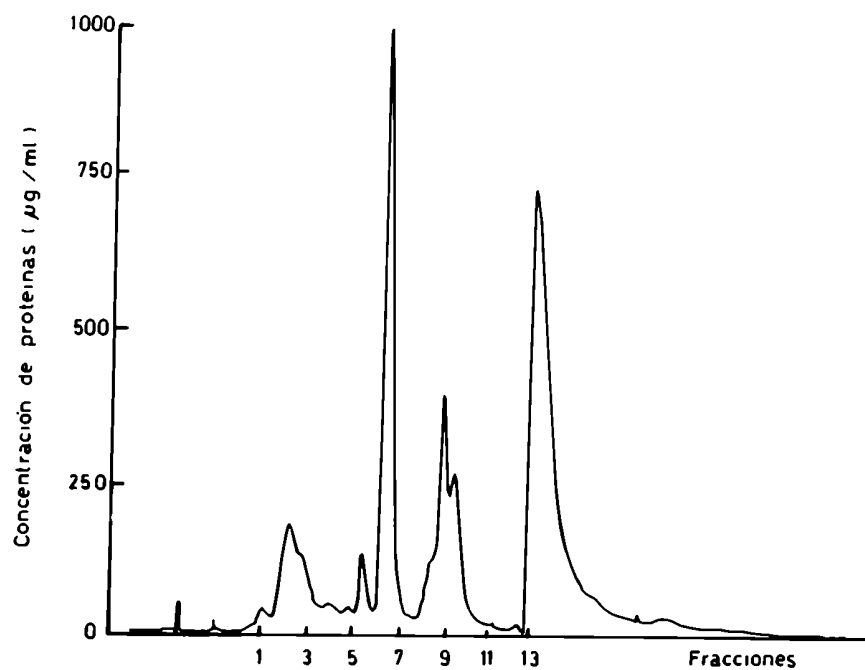
Análisis de la purificación de la columna fenil-sefarosa CL-4B.

A) Gel de SDS-poliacrilamida 10 % con las fracciones positivas para AKJL7. Calle 1: fracción 114. Calle 2: fracción 118. Calle 3: fracción 120. Calle 4: fracción 122. Calle 5: fracción 124. Calle 6: marcadores de peso molecular: 97, 66, 45, 31, 21 y 14 kDa.

B) Western blot del gel A revelado con suero chagásico (1:400)



**Figura 11:**  
Perfil de elución de proteínas de la columna Superosa 12.



**Figura 12:**

Análisis de la purificación de la columna Superosa 12.

A) Gel de SDS-poliacrilamida 10 % con las fracciones positivas para AKJL7. Calle 1: marcadores de peso molecular: 97, 66, 45, 31, 21 kDa. Calle 2: fracción 5. Calle 3: fracción 6. Calle 4: fracción 7.

B) Western blot del gel A revelado con suero chagásico (1:400)

### **3.1.4.- Puesta a punto del ensayo diagnóstico AKJL7 para la infección chagásica:**

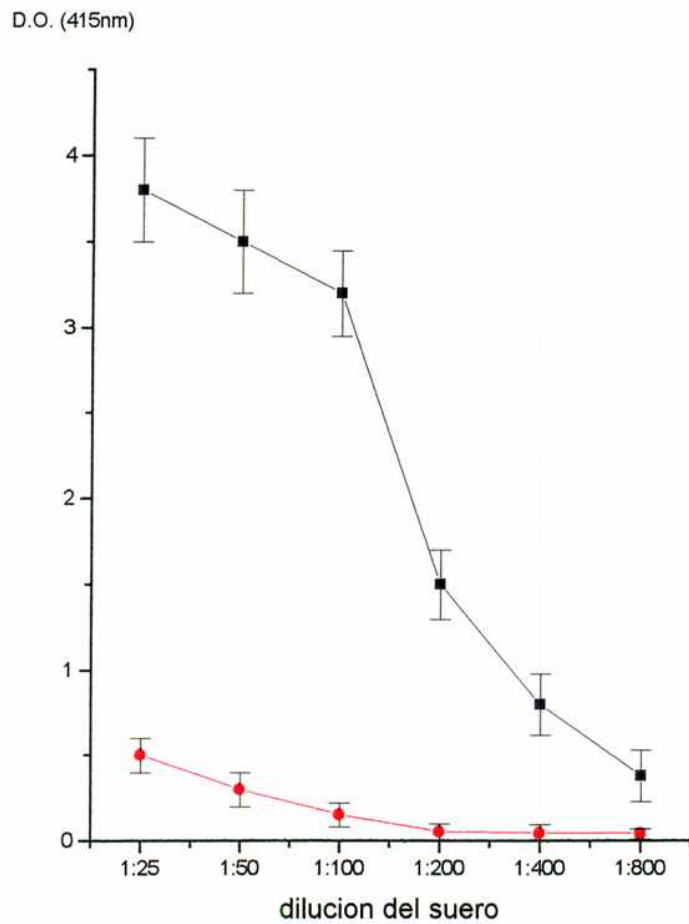
Dado que la sensibilidad de un ELISA depende de la cantidad de antígeno utilizado, se determinó la concentración óptima de antígeno a adsorber en c/pocillo de una placa de 96. Se ensayaron distintas condiciones de adsorción, siendo la variable más estudiada la cantidad de proteína recombinante AKJL7 a adsorber. Se mantuvo constante en esta parte de la puesta a punto la dilución de suero utilizada, 1/400 de un suero de referencia perteneciente a un paciente chagásico. En la figura 13 se grafica la densidad óptica medida en función de la cantidad de antígeno adsorbido. De acuerdo a lo sugerido por Catty. D (1989) que decidió utilizar para la adsorción la cantidad de antígeno correspondiente al punto anterior a la máxima lectura obtenida (saturación), así se trabajó con 50 ng de AKJL7 por pocillo.

Luego se volvió a definir la dilución óptima de suero para 50 ng de antígeno por pocillo. Se incubó la placa con diferentes diluciones de 5 sueros chagásicos y 5 sueros normales. En la figura 14 se grafica la densidad óptica medida en función de las diferentes diluciones de los sueros. Se decidió utilizar diluciones entre 1/200 y 1/400 ya que mantienen un comportamiento lineal y en ese rango se diferencian claramente los sueros chagásicos de los normales.

### **3.1.5.- Comparación entre el ensayo de placa de lisis con el fago lambda JL7 versus ensayo de ELISA utilizando el recombinante AKJL7:**

Cinco sueros de pacientes con infección crónica por *T. cruzi* y cinco sueros de individuos normales fueron utilizados para comparar la reactividad del ensayo de placa de lisis original con el ELISA - AKJL7.

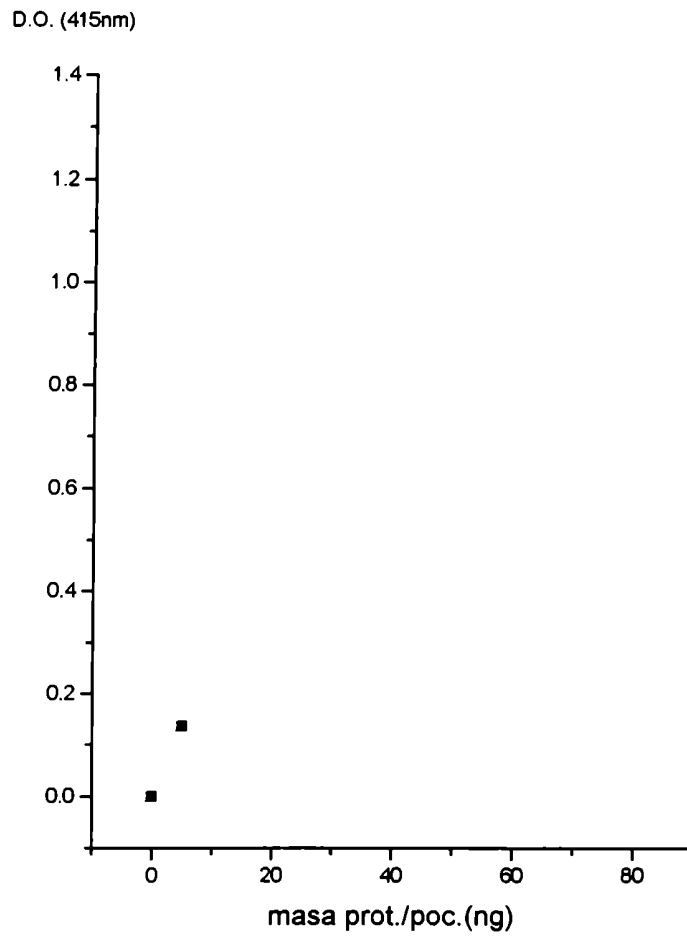
Como puede verse en la figura 15, a reacciones más intensas de placa de lisis (ver 2.17.) corresponden mayores valores de D.O. medida por ELISA.



**Figura 13:**

Puesta a punto del ELISA para AKJL7.

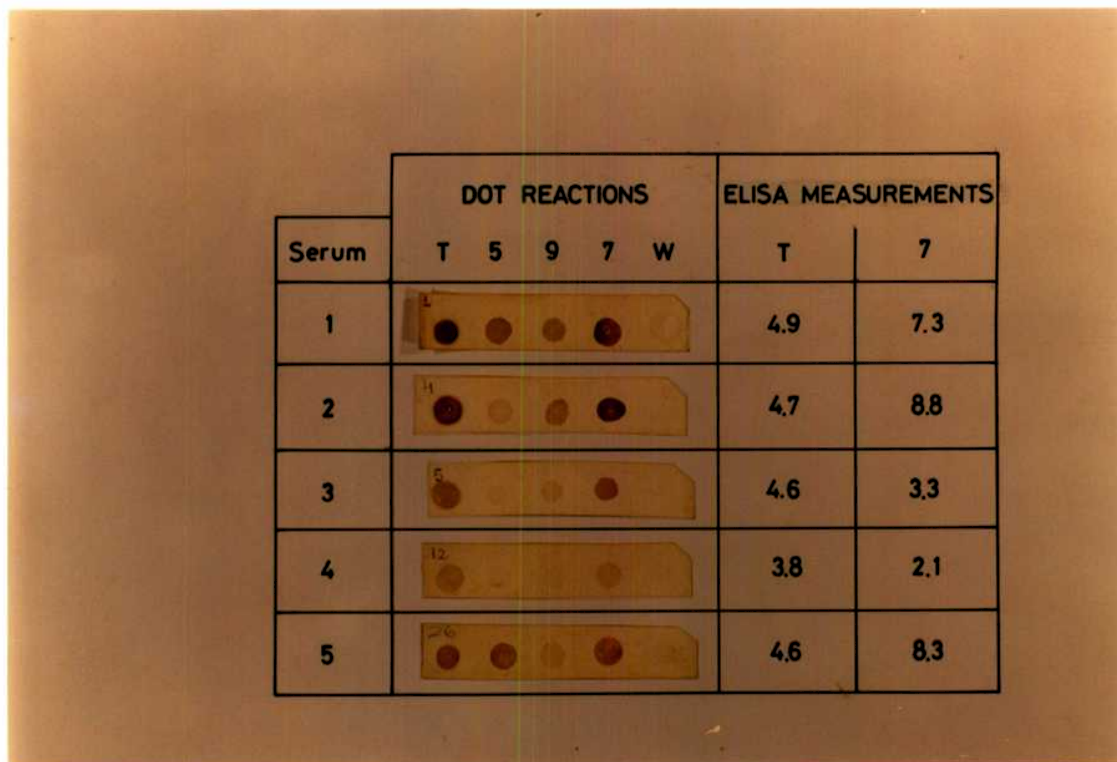
Densidad óptica en función de la masa del antígeno adsorbido a la placa, revelado con suero chagásico (1:400).



**Figura 14:**

Puesta a punto del ELISA para AKJL7.

Densidad óptica (415 nm) en función de la dilución de los sueros chagásicos (cuadrados negros) y los sueros normales (círculos rojos). La masa de antígeno utilizado fue de 50 ng por pocillo.



**Figura 15:**

Comparación entre el ensayo de placa de lisis con  $\beta$ gal-JL7 y el ELISA con AKJL7.

**Dot reactions:** ensayo de placa de lisis: T: extracto de *T. cruzi*, 7: fago  $\lambda$ gt11-JL7, W: fago  $\lambda$ gt11 sin inserto.

**ELISA MEASUREMENTS:** ensayo de ELISA: T: extracto de *T. cruzi*, 7: AKJL7.

Los valores de ELISA están expresados como veces el promedio más 3 desviaciones estandar (S.D.) de los valores de D.O. de 5 sueros chagásicos.



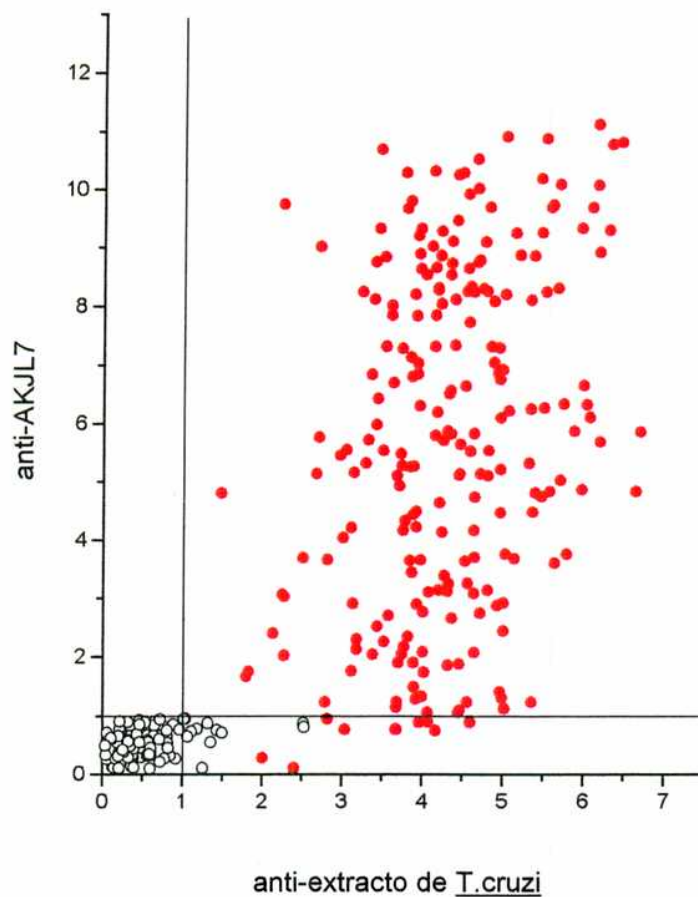
### 3.1.6.- ELISA con AKJL7 y extracto de *Trypanosoma cruzi*: Ensayo patrocinado por la OMS, el ICGEB/ PNUD y el CYTED.

Las capacidades diagnósticas del ELISA con AKJL7 y del ELISA basado en un extracto de *T. cruzi* para el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas fueron evaluadas en un estudio realizado a ciego (ver 2.22.1).

Se analizaron 344 sueros de individuos chagásicos (N=228), y no chagásicos (N=116) (leishmánicos, con enfermedades autoinmunes e individuos normales) seleccionados y clasificados por el Dr. Luquetti del Laboratorio de la Enfermedad de Chagas del Instituto de Medicina Tropical de Goiania, Brasil. En la figura 16 se representan los valores anti-AKJL7 vs. anti-*T. cruzi* para cada suero. Ambos antígenos se comportaron como reactivos diagnósticos excelentes con un índice Kappa de 0,93 y 0,94 respectivamente (tabla 4).

Aunque ambos reactivos poseen índices Kappa semejantes, el extracto de *T. cruzi* es más sensible ( $s=1$ ) que el recombinante, mientras que este último presenta una mayor especificidad ( $e=1$ ) (tabla 4).

La tabla 5 muestra un análisis completo de los resultados, discriminando entre las diferentes características de los pacientes donantes, ya sean chagásicos, afectados por otras parasitosis, enfermos autoinmunes o normales. El extracto de *T. cruzi* detectó todos los verdaderos positivos, siendo su sensibilidad igual a 1. Sin embargo, 12 muestras de pacientes no chagásicos fueron positivas para este reactivo: 4 muestras de pacientes con Leishmania, 2 con cardiopatías no chagásicas, 1 paciente con una enfermedad autoinmune, y 5 individuos normales (fig. 17).



**Figura 16:**

Distribución de los valores anti-AKJL7 vs anti-*T. cruzi* del ensayo diagnóstico por ELISA. Círculos rojos: sueros chagásicos crónicos. Círculos vacíos: sueros no chagásicos.

Los valores se expresan como veces el promedio más 3 S.D. de 20 sueros normales (línea de corte).

**TABLA 4:**

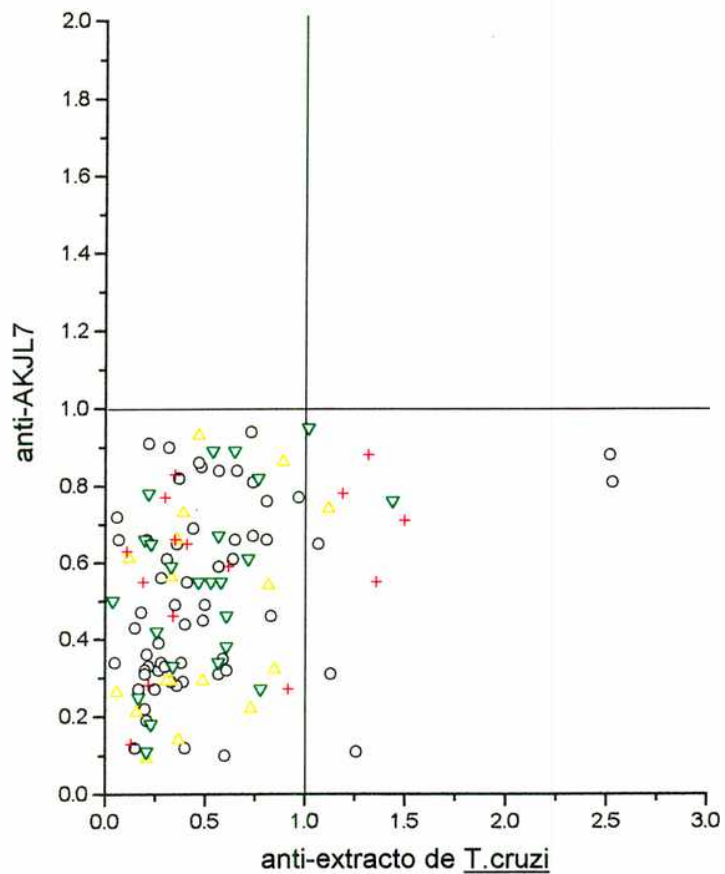
Resultado del ensayo diagnóstico por ELISA utilizando el extracto de *T. cruzi* y el AKJL7.

Grupo	N	Análisis	EXT. de <i>T. cruzi</i>	AKJL7
CC	228	Verdaderos positivos	228	218
		Falsos negativos	0	10
NO	116	Verdaderos negativos	104	116
		Falsos positivos	12	0
		Sensibilidad	1	0,95
		Específic.	0,90	1
		Indice Kappa	0,93	0,94

**TABLA 5:**

Análisis de las reactividades de cada grupo de pacientes para el extracto de *T. cruzi* y el AKJL7.

GRUPO	<i>T. cruzi</i>				AKJL7		
	N	POS	NEG	%POS	POS	NEG	%POS
CS	54	54	0	100,0	53	1	98,1
CL	57	57	0	100,0	54	3	94,7
CD	59	59	0	100,0	56	3	94,9
CI	58	58	0	100,0	55	3	94,8
CC	228	228	0	100,0	218	10	95,6
NC	57	7	50	12,3	0	57	0
NE	59	5	54	8,4	0	59	0
NO	116	12	104	10,3	0	116	0



**Figura 17:**

Distribución de los valores anti-AKJL7 vs anti-*T. cruzi* para los sueros no chagásicos del ensayo diagnóstico por ELISA.

Círculos negros: sueros normales. Cruces rojas: sueros leishmámicos. Triángulos verdes: sueros de pacientes con cardiopatías no chagásicas. Triángulos amarillos: sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes.

Los valores se expresan como veces el promedio más 3 S.D. de 20 sueros normales (línea de corte).

Por el contrario AKJL7 no reaccionó con individuos no chagásicos, alcanzando una máxima especificidad, pero no reconoció los sueros de 10 pacientes chagásicos: 3 con forma indeterminada de la infección, 3 con cardiopatía chagásica leve, 3 con la forma digestiva de la enfermedad, y sólo 1 con cardiopatía chagásica severa (fig. 18). Es de notar que todos los falsos negativos para AKJL7 tienen un valor cercano a la línea de corte (entre 0,6 y 0,9), salvo en uno, que corresponde al suero de un paciente con la forma digestiva de la enfermedad.

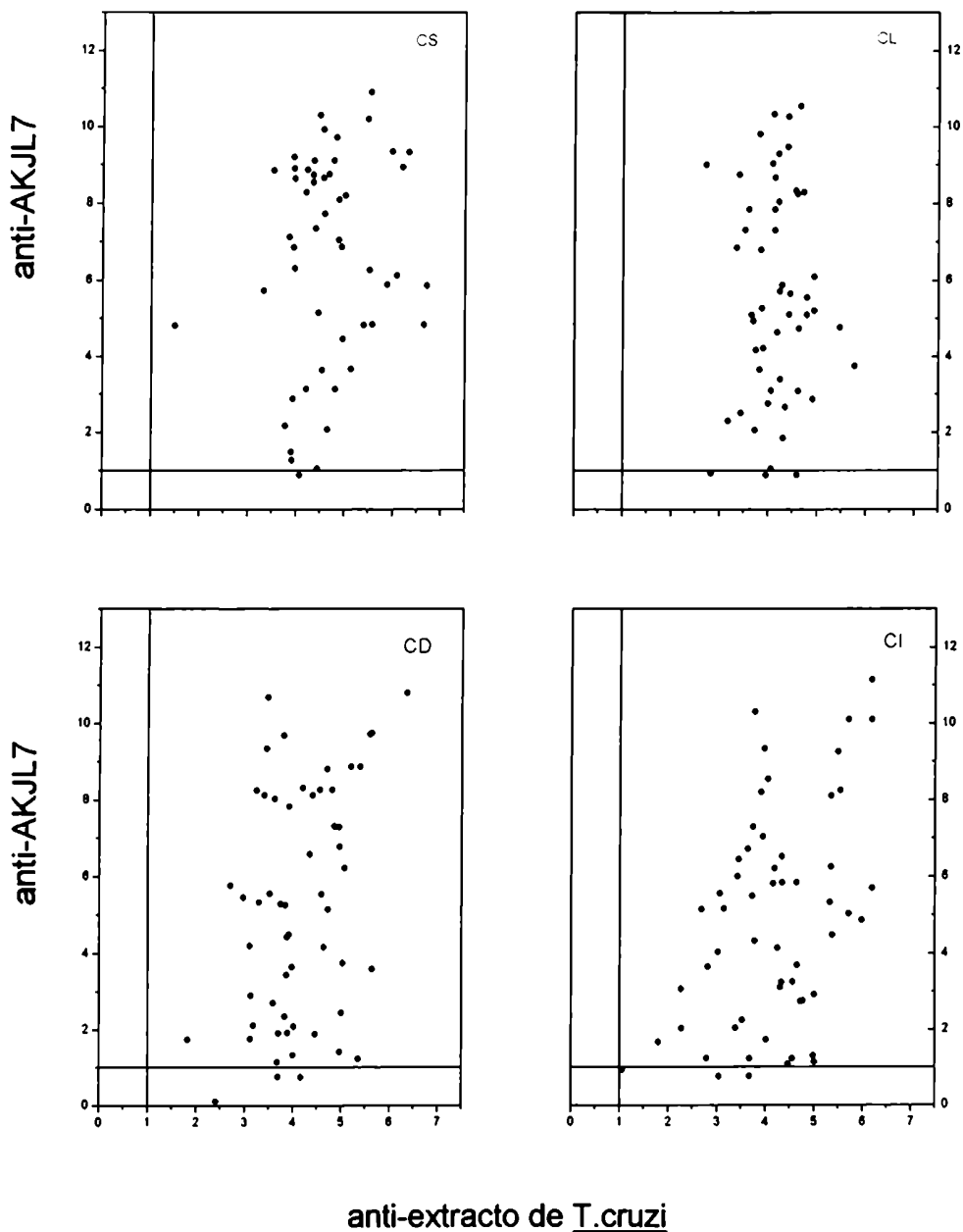
Dada la elevada especificidad que presentó AKJL7, se puede afirmar que todo aquel individuo con valores mayores que 1 para este antígeno será seropositivo para la infección por *T. cruzi*. Por otro lado, se puede afirmar que todo aquel individuo con valores inferiores a la unidad para el homogenato de *T. cruzi* será seronegativo para la Enfermedad de Chagas.

Evaluando de esta manera el total de muestras podemos indicar que los 344 sueros se pueden clasificar en 3 grandes grupos:

- 218 sueros seropositivos para la infección por *T. cruzi*.
- 104 sueros seronegativos para la infección por *T. cruzi*.
- 22 sueros indeterminados.

Diez de los 22 sueros indeterminados corresponden a sueros de pacientes chagásicos, mientras que los 12 restantes son de individuos no chagásicos con otras parasitosis o enfermedades, o normales. La descripción detallada se observa en la tabla 6.

De esta manera, usando los 2 reactivos y analizando los resultados de cada suero para ambos, se puede diagnosticar la infección por *T. cruzi* con un nivel de incertidumbre menor al 6,4 %.



**Figura 18:**

Distribución de los valores anti-AKJL7 vs anti-*T. cruzi* para los sueros chagásicos crónicos del ensayo diagnóstico por ELISA, separados según su patología.

CS: Chagásicos con cardiopatía severa. CL: Chagásicos con cardiopatía leve. CD: Chagásicos con patología digestiva. CI: Chagásicos indeterminados. (ver 2.22.1)

Los valores se expresan como veces el promedio más 3 S.D. de 20 sueros normales (línea de corte).

**TABLA 6:**

Composición de los pacientes indeterminados.

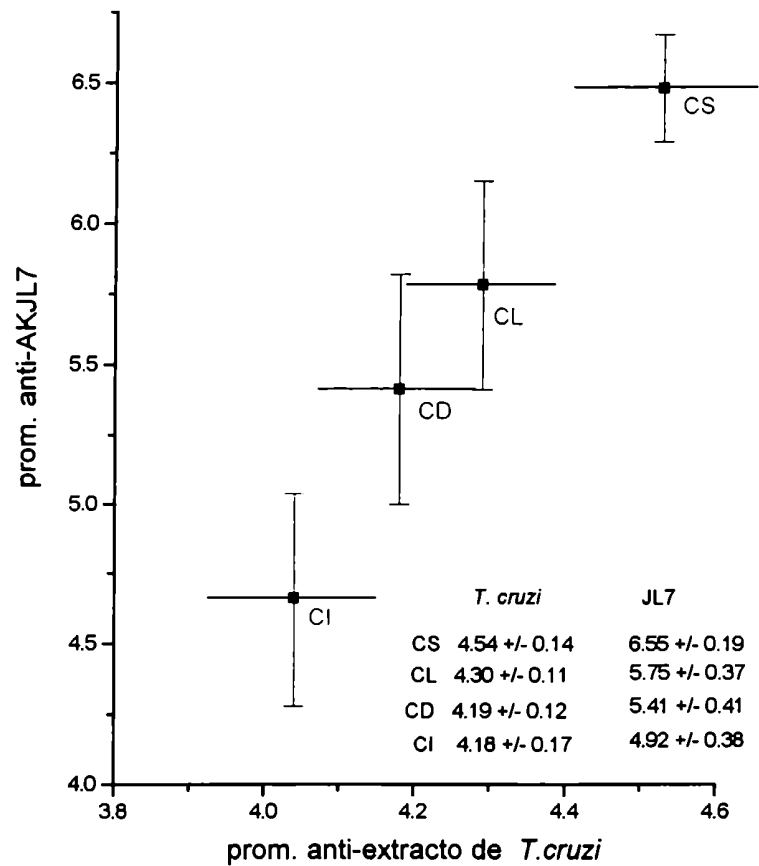
	indeterminados (n)	totales (n)	% indeterminados
<b>no chagásicos</b>			
normales	5	59	8,5
cardíacos	2	23	8,7
leishmánicos	4	15	26,7
lúpicos	1	19	5,3
<b>chagásicos</b>			
indeterminado	3	58	5,2
digestivos	3	59	5,1
card. leves	3	57	5,3
card. severos	1	58	1,7
<b>totales</b>	<b>22</b>	<b>344</b>	<b>6,4</b>



Para investigar si existía alguna relación entre los niveles de anticuerpos circulantes contra nuestros antígenos y el grado de patología, decidimos calcular el promedio de los valores de los niveles anti-*T. cruzi* y anti-AKJL7 para cada grupo de pacientes chagásicos. El gráfico mostró una relación entre los niveles de anticuerpos y la gravedad de los síntomas de cada grupo: a síntomas mas severos corresponden valores mas elevados de niveles de anticuerpos (fig. 19).

A partir de este resultado, se decidió realizar un estudio estadístico de los cuatro grupos de sueros chagásicos. Primero se estudió la normalidad de las distribuciones de cada grupo utilizando las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y chi cuadrado (tabla 7A). Se observa que los valores del grupo CS tanto para el extracto de *T. cruzi* como para AKJL7 no presentan una distribución normal por chi cuadrado. Es por esto que para determinar si las diferencias en los valores promedio para cada uno de los grupos clinicos diferian significativamente, fue necesario realizar pruebas paramétricas (ANOVA) y no paramétricas (prueba de Kruskal-Wallis). Las diferencias entre los valores promedios cuando se utilizó el extracto de *T. cruzi* resultaron no significativas (ANOVA y Test post-hoc de Tukey), mientras que si lo fueron para el antígeno recombinante entre los grupos CS y CI ( $p < 0,019$ ) (tabla 7 B y C).

La capacidad del ensayo de discriminar entre pacientes del grupo CS y del grupo CI, se puede estudiar calculando las líneas de corte por el método de ROC (receiver-operator characteristic) (Patterson y col., 1989) que maximicen la relación entre sensibilidad y especificidad, separando ambos grupos. Así para *T. cruzi* la nueva línea de corte fue de 4,35 y para AKJL7 de 5,82. Estadísticamente se determinó que aquellos sueros que superen a ambas líneas de corte de ROC, tienen una probabilidad del 70,6 % de pertenecer al grupo de los cardiopatas chagásicos severos. La sensibilidad del método fue del 44,4 % y la especificidad del 82,8 % (tabla 8, fig. 20).



**Figura 19:**

Valores promedio anti-AKJL7 vs anti-*T. cruzi* para cada grupo de pacientes chagásicos crónicos.

CS: Chagásicos con cardiopatía severa. CL: Chagásicos con cardiopatía leve. CD: Chagásicos con patología digestiva. CI: Chagásicos indeterminados. (ver 2.22.1)

**TABLA 7:**

**A) Test de normalidad de distribución.**

	Kolmogorov-Smirov	Valor p	Chi2	Valor p
<i>T. cruzi</i>				
CS	0,127	NS	10,00	<0,040
CL	0,074	NS	4,91	0,178
CD	0,053	NS	4,70	0,319
CI	0,024	NS	1,25	0,939
<i>AKJL7</i>				
CS	0,133	NS	19,50	<0,002
CL	0,048	NS	3,18	0,672
CD	0,087	NS	7,59	0,269
CI	0,064	NS	6,13	0,293

**B) Estadística descriptiva y ANOVA para el extracto de *T. cruzi* y AKJL7.**

	Media arit. +/- ES	ANOVA	K-W
<i>T. cruzi</i>			
CS	4,54 +/- 0,14	0,182 (NS)	0,107 (NS)
CL	4,30 +/- 0,11		
CD	4,19 +/- 0,12		
CI	4,18 +/- 0,17		
<i>AKJL7</i>			
CS	6,55 +/- 0,19	<0,027	<0,024
CL	5,75 +/- 0,37		
CD	5,41 +/- 0,41		
CI	4,92 +/- 0,38		

**C) Test post-hoc de Tukey para grupos de tamaño desigual.**

	CS	CL	CD	CI
CS	-	0,473	0,171	<0,019
CL	0,473	-	0,925	0,422
CD	0,171	0,925	-	0,798
CI	<0,019	0,422	0,798	-

**TABLA 8:**

**Ensayo discriminatorio por el Método de ROC entre los grupos CS y CI.**

**A) *T. cruzi* y AKJL7**

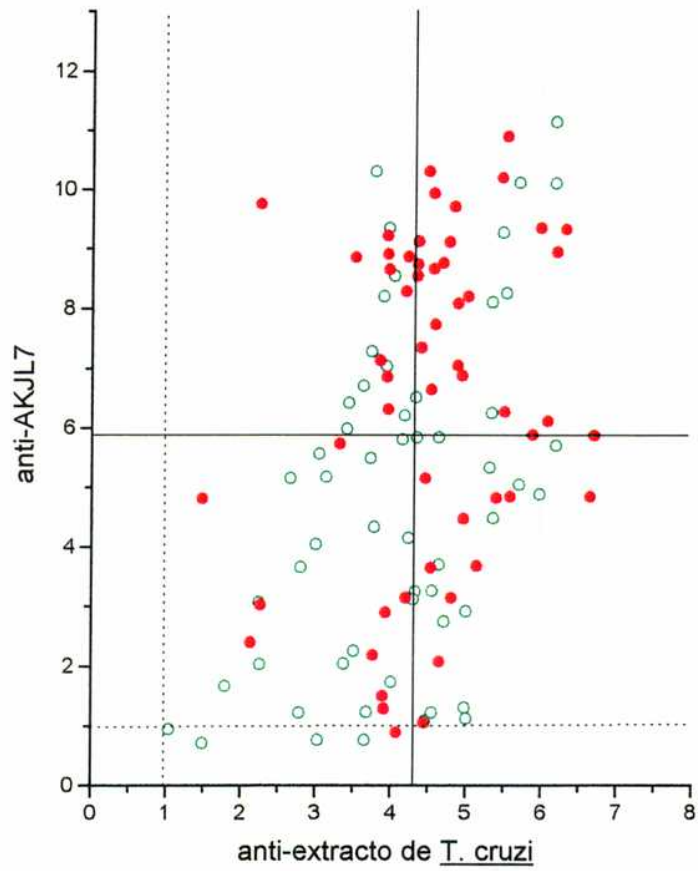
	cut-off	p	OR	S	E	Pr	VPP
<i>T. cruzi</i>	4.35	<0.058	2.23	61.1	58.6	48.2	57.9
AKJL7	5.82	<0.005	3.25	64.8	63.8	48.2	62.5

<i>T. cruzi</i>	CS (n)	CI (n)	total (n)		AKJL7	CS (n)	IC (n)	total (n)
positivos	33	24	57		positivos	35	21	56
negativos	21	34	55		negativos	19	37	56
total	54	58	112		total	54	58	112

**B) *T. cruzi* +AKJL7**

	p	OR	S	E	Pr	VPP
<i>T. cruzi</i> + AKJL7	< 0.004	3.84	44.4	82.8	48.2	70.6

<i>T. cruzi</i> + AKJL7	CS (n)	CI (n)	total (n)
positivos	24	10	34
negativos	30	48	78
total	54	58	112



**Figura 20:**

Capacidad discriminante de los grupos CS y CI del ensayo, utilizando líneas de ROC (receiver-operator curves).

Círculos llenos rojos: sueros del grupo CS. Círculos vacíos verdes: sueros del grupo CI. (ver 2.22.1)

Los valores se expresan como veces el promedio más 3 S.D. de 20 sueros normales (línea de corte).

Si bien estos valores no alcanzan para diagnosticar diferentes formas clínicas de la infección crónica con total certeza, sí están marcando una tendencia a nivel estadístico: entre los pacientes que presentan mayores niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi* y anti-AKJL7 circulantes existe una mayoría significativa con la forma clínica más severa.

### **3.2.- ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD DE LOS SUEROS CHAGÁSICOS CRÓNICOS CONTRA LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES P:**

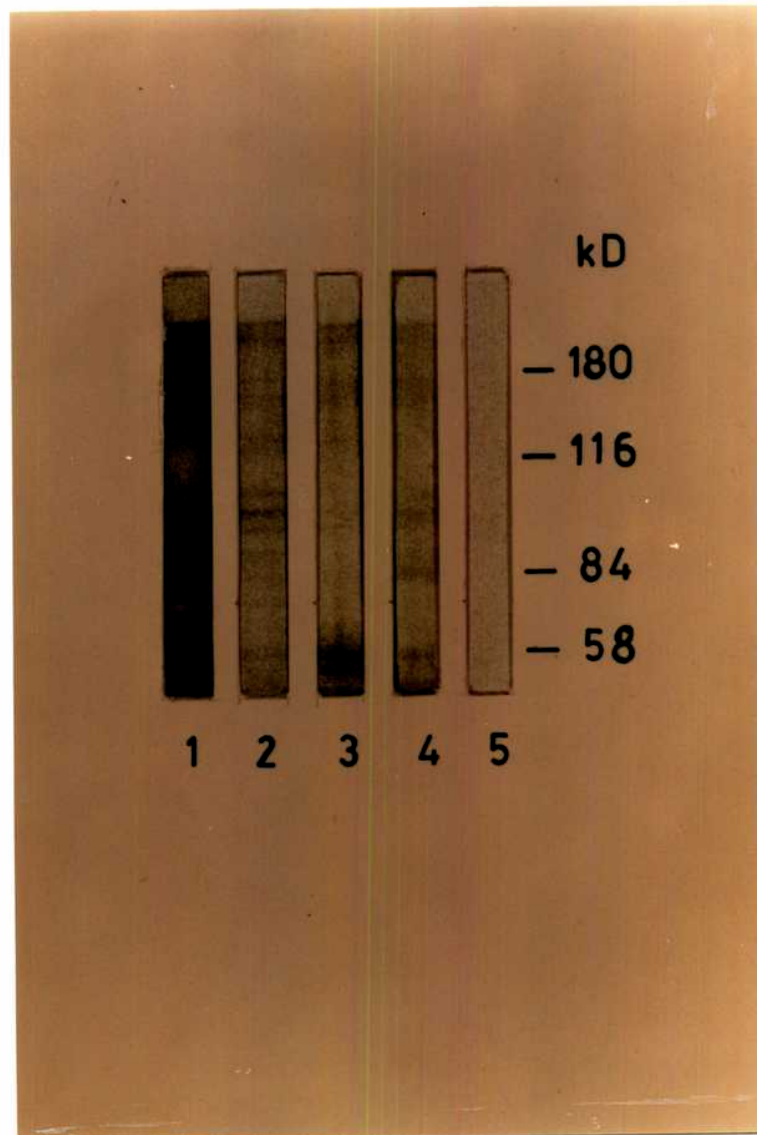
Estudios previos demostraron que las proteínas ribosomales P son antigénicas en sueros de pacientes chagásicos crónicos. La secuencia C-terminal de estas proteínas presenta una alta homología con la misma región de las proteínas ribosomales P humanas, definida como el "epítotope P" en Lupus Eritematoso Sistémico, enfermedad autoinmune sistémica. Anticuerpos anti-JL5 reconocen a la proteína ribosomal P humana de 17 kDa (ver 1.12.2.).

Con el fin de estudiar el origen de estos autoanticuerpos anti-P en la Enfermedad de Chagas, y los posibles mecanismos que los originan, se diseñaron una serie de experiencias con sueros de pacientes con cardiopatía chagásica.

#### **3.2.1.- Estudio de la reactividad contra proteínas ribosomales del parásito y humanas por Western blot:**

La reactividad de los sueros de pacientes chagásicos crónicos (CC) utilizados fue corroborada por experiencias de Western blots de un extracto de *T. cruzi*. Como se observa en la figura 21 los sueros reaccionan contra proteínas del parásito.

A continuación se estudió la reactividad de los sueros contra las proteínas ribosomales del parásito y humanas (fig. 22). Las proteínas del parásito son antigénicas en la infección crónica, en particular las proteínas ribosomales. Entre ellas, las proteínas ribosomales P, con un peso molecular alrededor de los 17 kDa.

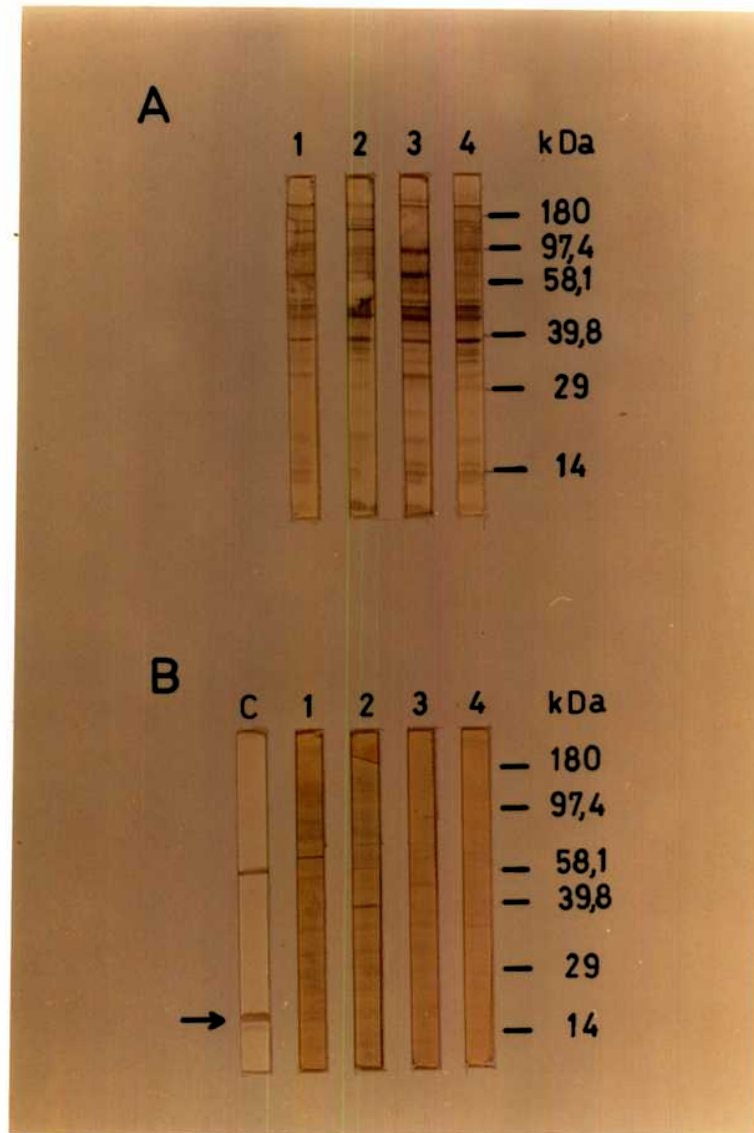


**Figura 21:**

Reactividad de los sueros chagásicos contra proteínas de *T. cruzi*.

Extractos de *T. cruzi* se separaron por electroforesis en gels de poliacrilamida 10 %. Una vez transferidas a nitrocelulosa los Western blots fueron revelados con suero chagásico (1:400). Calle 1: suero 20. Calle 2: suero 34. Calle 3: suero 18. Calle 4: suero 12. Calle 5: suero normal. Se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular.





**Figura 22:**

Reactividad de los sueros chagásicos contra proteínas ribosomales.

Proteínas ribosomales se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida 15 %. Una vez transferidas a nitrocelulosa los Western blots fueron revelados con suero chagásico (1:400). Calle 1: suero 20. Calle 2: suero 34. Calle 3: suero 18. Calle 4: suero 12. Calle C: suero lúpico (1:200). Se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular. La flecha indica la posición de las proteínas ribosomales humanas, P1 y P2.

A) proteínas ribosomales de *T. cruzi*.

B) proteínas ribosomales de células HeLa.

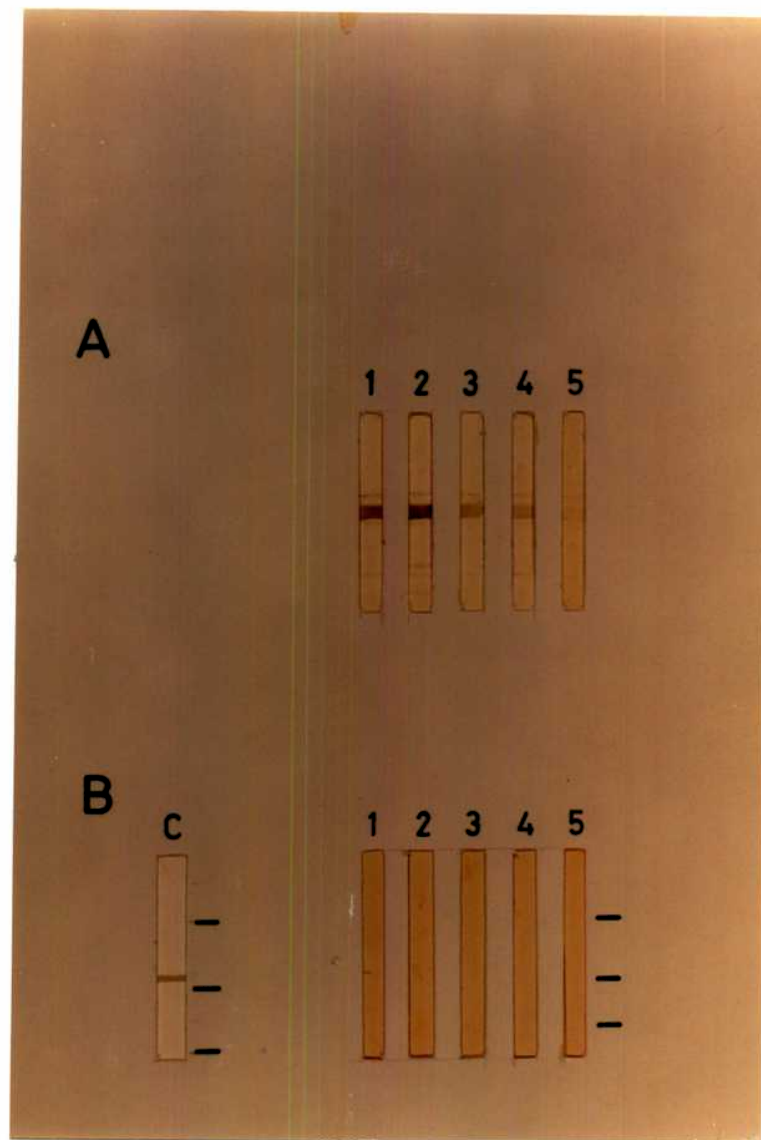
Los sueros chagásicos ensayados reconocen a las proteínas ribosomales P humanas, aunque la reactividad es baja. La identidad de estas proteínas queda demostrada por el reconocimiento específico del suero de un paciente lúpico P positivo que sólo reconoce a las proteínas ribosomales P.

En experiencias anteriores, Levitus y col. (1991a, 1991b) demostraron para un pequeño número de sueros, que los anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados utilizando la técnica de Hall (ver 2.11. 3), eran capaces de reconocer debilmente a las proteínas ribosomales P humanas. Se repitió esta experiencia utilizando un mayor número de sueros, con objeto de caracterizar mejor esta actividad autoreactiva. Para nuestra sorpresa, los anticuerpos anti-JL5 no reaccionaron en forma detectable o reaccionaron muy levemente con las proteínas humanas (fig. 23).

### **3.2.2.- Estudio de la reactividad contra proteínas ribosomales y ribosomales P del parásito y humanas por ELISA:**

Dado que la técnica de Western blot no detectó la unión de los anticuerpos anti-JL5 con las proteínas ribosomales P humanas, se decidió estudiarla con una técnica más sensible como el ensayo inmunoenzimático de fase sólida (ELISA).

Se ensayó la reactividad de 20 sueros chagásicos y un suero lúpico P positivo contra proteínas totales de *T. cruzi*, proteínas de ribosoma de *T. cruzi* y de ribosomas de células Hela, y contra las proteínas recombinantes P2 de *T. cruzi* (TcP2 $\beta$ ) y humana (P2h). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9.



**Figura 23:**

Reactividad de los sueros chagásicos contra proteínas recombinantes.

Proteínas recombinantes se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida 10 %. Una vez transferidas a nitrocelulosa los Western blots fueron revelados con suero chagásico (1:400). Calle 1: suero 20. Calle 2: suero 34. Calle 3: suero 18. Calle 4: suero 14. Calle 5: suero 12. C: suero lúpico (1:200). Se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular de 180, 116 y 84 kDa. La flecha indica la posición de las proteínas ribosomales humanas, P1 y P2.

A) proteínas recombinante  $\beta$ gal-S23.

B) proteínas recombinante  $\beta$ gal-P2 humana.

**Tabla 9:**

Reactividad por ELISA de los sueros chagásicos crónicos.

sueros	anti-T. cruzi	anti-rib. T. cruzi	anti-Rib.Hela	anti-TcP2 $\beta$	anti-P2h
8	12,90	7,23	0,88	1,37	0,43
12	4,40	3,41	0,86	0,47	0,43
14	10,82	9,42	0,67	1,31	0,58
18	6,92	5,27	1,27	2,82	1,00
20	15,94	9,89	0,91	2,92	0,71
34	12,96	11,44	1,44	3,27	0,87
49	14,38	8,03	0,74	3,42	0,84
102	15,94	12,00	1,62	3,68	1,53
140	15,94	12,18	1,85	6,16	1,00
TCh	6,84	5,39	1,21	1,83	1,04
PG	14,54	11,39	0,94	3,05	0,60
CU	10,30	8,45	0,33	1,42	0,88
ME	8,73	7,09	0,18	1,08	0,98
MS	12,85	6,17	0,83	ND	ND
JL	5,04	2,61	0,61	ND	ND
GM	5,41	6,26	0,12	0,69	0,97
CA	5,05	7,18	0,33	1,00	0,94
EG	4,71	4,3	0,85	ND	ND
AD	5,32	7,18	0,14	1,39	1,00
FC	6,53	9,42	0,15	1,84	1,05
SLE	ND	4,66	4,87	3,75	3,98

Niveles de anticuerpos expresados como veces la línea de corte. SLE: suero de paciente con Síndrome de Lupus Eritematoso (1/200).

Todos los sueros chagásicos (n=20) presentaron títulos anti-*T. cruzi*, anti-ribosoma de *T. cruzi* y anti-P del parásito por encima de la línea de corte. De estos, sólo 5 reaccionaron con las proteínas ribosomales P humanas. Por otra parte, la proteína recombinante TcP2 $\beta$  fue reconocida por 18 de los sueros chagásicos, demostrando la antigenicidad de esta proteína en la infección crónica. La proteína recombinante humana fue reconocida por 4 de estos sueros. El suero lúpico reaccionó con la misma intensidad con todas las proteínas ribosomales con aproximadamente igual título.

Los datos de la tabla 9 demuestran que existe una correlación entre una fuerte reactividad anti-*T. cruzi* y la capacidad de los sueros de reaccionar con las proteínas ribosomales P humanas. En efecto, los sueros que reaccionan con los autoantígenos P son los que reconocen más intensamente las proteínas de *T. cruzi*.

Para corroborar la capacidad de los anticuerpos anti-TcP2 $\beta$  de reconocer a las proteínas humanas, se procedió a inmunopurificar según Hall (ver 2.11.3) estos anticuerpos a partir de 10 sueros de pacientes chagásicos crónicos. Estos anticuerpos fueron enfrentados contra proteínas ribosomales del parásito y humanas, y con los recombinantes TcP2 $\beta$  y P2h. Como control se inmunopurificaron anticuerpos anti-TcP2 $\beta$  de un paciente lúpico. Los resultados se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10:**

Reactividad por ELISA de los anticuerpos inmunopurificados

sueros	anti-Rib. T. cruzi	anti-Rib. Hela	anti-TcP2 $\beta$	anti-P2h
8	1.87	1.83	2.45	0.60
12	0.48	0.43	1.38	0.66
14	1.52	0.46	1.29	0.62
18	2.17	2.11	1.61	1.18
20	2.38	0.94	4.13	0.84
34	2.27	1.51	3.17	0.65
49	1.52	0.71	2.45	0.46
102	14.42	1.41	4.51	1.31
140	11.05	4.81	2.38	1.27
PG	2.43	1.52	2.56	0.65
LES	2.54	2.62	2.14	2.35

Niveles de anticuerpos expresados como veces la línea de corte. LES: suero de paciente con Síndrome de Lupus Eritematoso (1/200).

Con excepción de un caso, todos los anticuerpos inmunopurificados reconocieron las proteínas ribosomales de *T. cruzi* y el recombinante TcP2 $\beta$ . Los anticuerpos inmunopurificados de 6 sueros reconocieron a las proteínas ribosomales humanas y de estos 4 reaccionaron con la proteína recombinante humana. Es decir que los anticuerpos que reconocen a la proteína recombinante del parásito son capaces, dependiendo del paciente, de reconocer a proteínas ribosomales humanas. Como la cantidad de proteína utilizada en todas las experiencias es la misma, es evidente que el extracto ribosomal humano es más antigénico que la proteína recombinante humana. Esto se explica por la existencia de más de un autoepitope en el ribosoma humano (Bonfa y col., 1993), o por la conformación particular que adquieren las proteínas ribosomales P en el ribosoma.

### **3.2.3.- Mapeo epitópico de la proteína TcP2 $\beta$ .**

Hemos demostrado, entonces, que los anticuerpos anti-proteínas ribosomales P del parásito reaccionan con las proteínas humanas. Para estudiar si este comportamiento es similar al de los anticuerpos anti-P de los pacientes lúpicos se decidió mapear el epítoto responsable de esta autoreacción, con sueros chagásicos y lúpicos.

#### **3.2.3.1 Comparación entre la reactividad contra S23 y 9D de sueros chagásicos y lúpicos:**

El recombinante 9D presenta su extremo C-terminal en fusión a la parte C-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa (ver 2.4.2). Se utilizó este recombinante para evaluar la importancia del extremo C-terminal en la reactividad antigénica.

Para esto se comparó por ELISA la reacción de 20 sueros provenientes de pacientes chagásicos crónicos con el recombinante S23 y el recombinante 9D. Diecisiete sueros (85 %) presentaron un mayor reconocimiento hacia S23, mientras que 3 sueros (15 %) reaccionaron en mayor medida contra 9D (tabla 11). El suero de un paciente lúpico P positivo reconoció también en mayor medida al recombinante con su extremo C-terminal libre.

De esto se deduce la importancia en el reconocimiento de las proteínas P del extremo C-terminal libre. Es probable que el agregado C-terminal que sufre el recombinante 9D esté modificando la conformación y su reconocimiento por los sueros.



**Tabla 11:**

Cociente entre los valores obtenidos por ELISA para los recombinantes TcP2 $\beta$  y 9D ensayado para los diferentes sueros chagásicos y lúpico (LES).

<b>sucros</b>	<b>TcP2<math>\beta</math>/9D</b>
8	1,1
12	1,6
14	5,4
18	2,4
20	2,7
34	4,6
49	3,2
102	2,6
140	0,95
TCh	3,4
PG	1,1
CU	0,9
ME	2,0
MS	1,6
JL	1,3
GM	0,5
CA	3,0
EG	2,1
AD	1,8
FC	2,8
LES	1,8

### **3.2.3.2.- Inhibición de la reactividad anti-TcP2 $\beta$ por R13:**

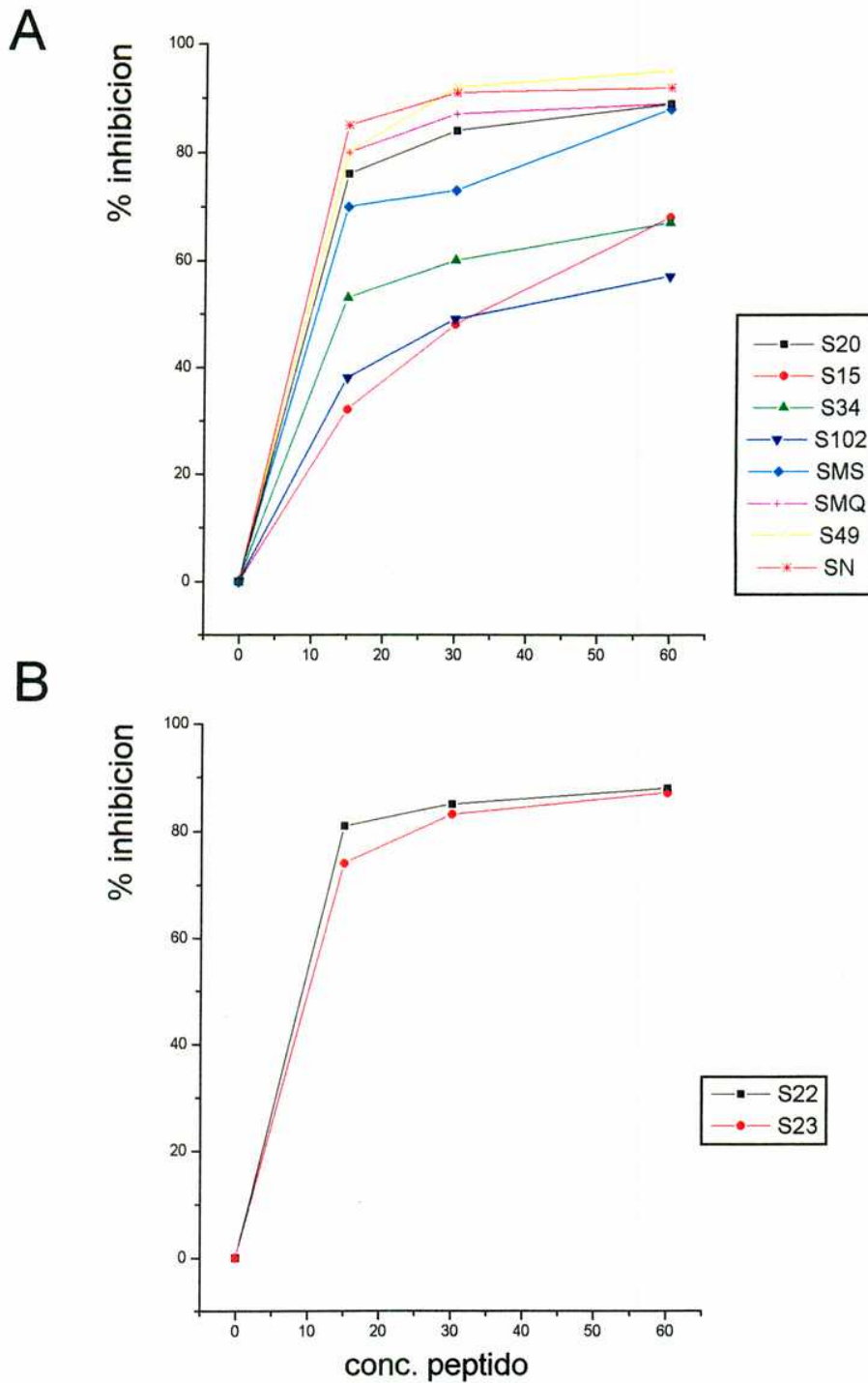
Para evaluar en que medida la respuesta anti-P se debe al reconocimiento de la región C-terminal, se realizaron ensayos de inhibición de la reacción anti-TcP2 $\beta$  por R13. Para esto se incubaron diferentes sueros provenientes de pacientes chagásicos crónicos y lúpicos con cantidades crecientes de péptido sintético R13. En la figura 24, se muestran los ensayos de inhibición. Se observa que en todos los casos la inhibición es mayor al 50 %, llegando hasta 90 % o más, para algunos de los sueros chagásicos. Esto es similar a lo que ocurre en los sueros provenientes de pacientes lúpicos.

Este ensayo confirma que la región C-terminal, formada por los últimos 13 aminoácidos, es el determinante antigénico fundamental de la reactividad anti-P de los sueros chagásicos.

### **3.2.3.3.- Mapéo fino de los epitopes R-13 y H-13:**

Una de las hipótesis para explicar las diferencias de reactividades anti-proteínas ribosomales P de *T. cruzi* o humanas, surge del análisis de las secuencias de los 13 aa C-terminales de ambas proteínas. El péptido correspondiente a la proteína P del parásito, R13, contiene una zona fuertemente ácida: EEEDDD, que se encuentra interrumpida en H13 por el cambio no conservativo de un glutámico por una serina: EESDDD.

El estudio del epítipo P, se realizó mediante una batería de péptidos sintéticos: R13, R11, R10 y H11. Estos péptidos acoplados a BSA se enfrentaron con 12 sueros chagásicos y 3 sueros lúpicos P positivos para medir su reactividad por ELISA (tabla 12).



**Figura 24:**

Inhibición de la reactividad anti-TcP2 $\beta$  de los sueros chagásicos y lúpicos por el péptido sintético R13. La reactividad anti-TcP2 $\beta$  se midió por ELISA usando a la proteína recombinante MBP-S23 como antígeno. La concentración del péptido está expresada en micromolar. Los valores se expresan como % de inhibición (ver 2.24.5)

A) sueros chagásicos.

B) sueros lúpicos.

**Tabla 12:**

Reactividad de los sueros frente a los diferentes péptidos sintéticos.

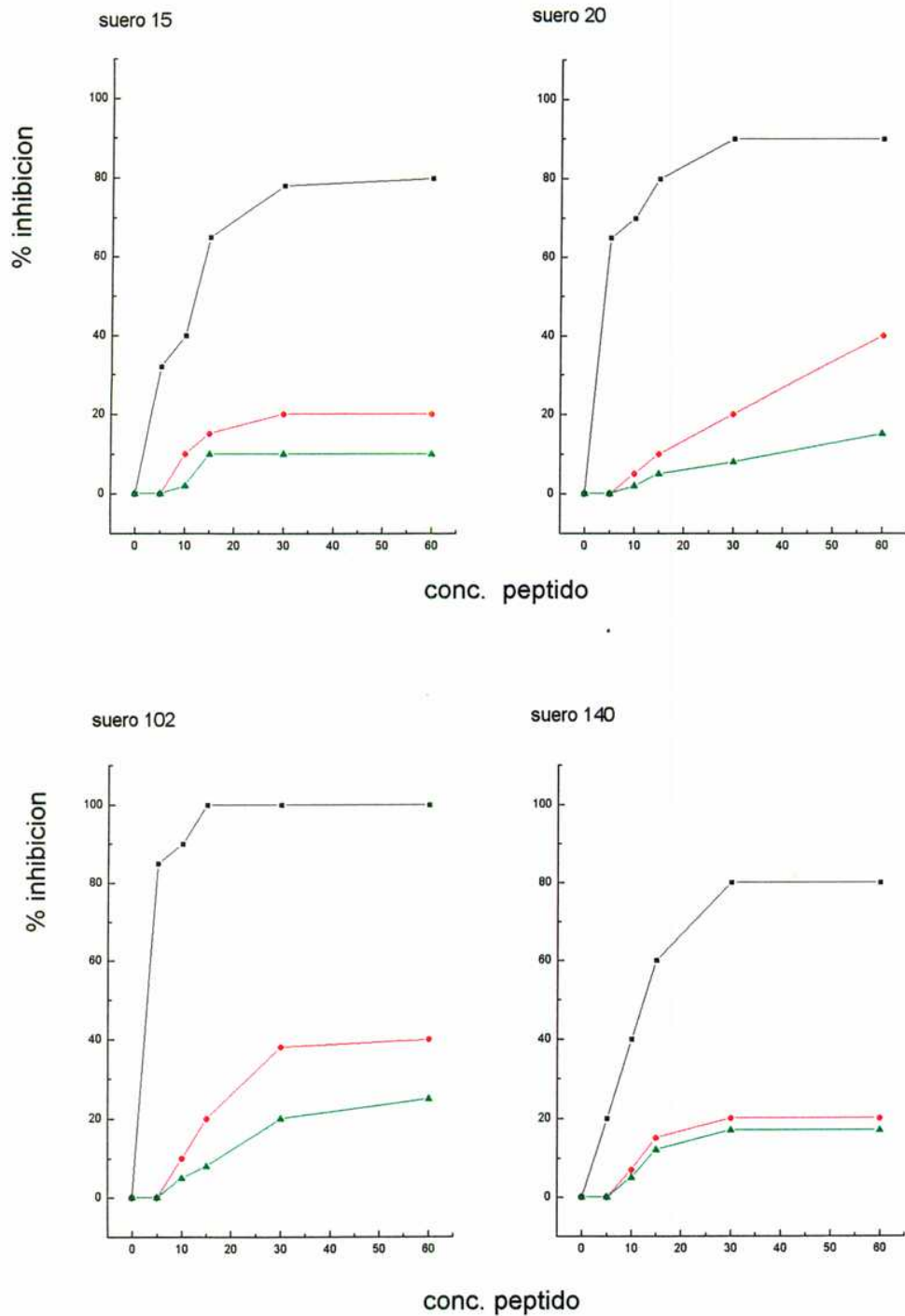
<b>sueros</b>	<b>R13</b>	<b>R11</b>	<b>R10</b>	<b>H11</b>
8	0.689	0.242	0.002	0.026
12	0.295	0.290	0.004	0.020
14	0.737	0.308	0.003	0.034
20	0.903	0.610	0.005	0.064
34	0.875	0.598	0.045	0.071
49	1.218	0.725	0.015	0.049
102	1.213	0.992	0	0.057
140	2.096	1.913	0	0.029
TCh	1.109	1.100	0.156	0.156
PG	0.680	0.437	0.141	0.146
GM	0.143	0.120	0.013	0.014
AD	0.828	0.696	0.178	0.266
LES1	0.240	0.190	0.195	0.193
LES2	0.732	0.652	0.603	0.585
LES3	0.140	0.206	0.210	0.203

Los valores se obtienen de sustraer el valor de la línea de corte a las mediciones de densidad óptica para cada suero. LES1, LES2 y LES3: sueros de pacientes con Síndrome de Lupus Eritematoso (1/200).

El mapeo epitópico pone en evidencia la importancia de la zona ácida del antígeno R13 para los sueros de pacientes chagásicos. Mientras que la reactividad hacia R13 y R11 es similar, ésta decrece marcadamente para R10 y H11. Es interesante comparar las reactividades hacia R11 y H11. El cambio de un aminoácido (glutámico por serina) disminuye el reconocimiento en aproximadamente 90 %. Los sueros lúpicos reconocen, en forma similar, a los cuatro péptidos.

Para confirmar estos resultados se realizaron ensayos de inhibición de cuatro de los sueros chagásicos utilizados previamente. En estos se inhiben específicamente los anticuerpos anti-R13 con péptido sin acoplar (fig. 25). Se observa que mientras el péptido R11 inhibe en por lo menos un 80 % el reconocimiento por R13, H11 sólo inhibe hasta un 40 % y R10 hasta un 20 %. Estos ensayos confirman los resultados anteriores y garantizan la especificidad anti-antígenos propios.

Resulta claro que la diferencia entre las zonas ácidas de ambos péptidos determina un reconocimiento diferencial importante, medido por ELISA, por parte de los anticuerpos presentes en los pacientes chagásicos crónicos. Esto podría deberse a la existencia de un epítipo específico de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*, que estuviese formado exclusivamente por la zona ácida. Para confirmar o no esta hipótesis se realizaron ensayos de inhibición de la reacción anti-R13 con péptidos derivados de las regiones ácidas de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*, humanas y de *Leishmania sp.*:



**Figura 25:**

Inhibición de la reactividad anti-R13 de los sueros chagásicos por los péptidos sintéticos R11, H11 y R10. La reactividad anti-R13 se midió por ELISA usando al péptido R13 como antígeno. La concentración del péptido está expresada en micromolar. Los valores se expresan como % de inhibición (ver 2.24.5). R11: negro. H11: rojo. R10: verde.

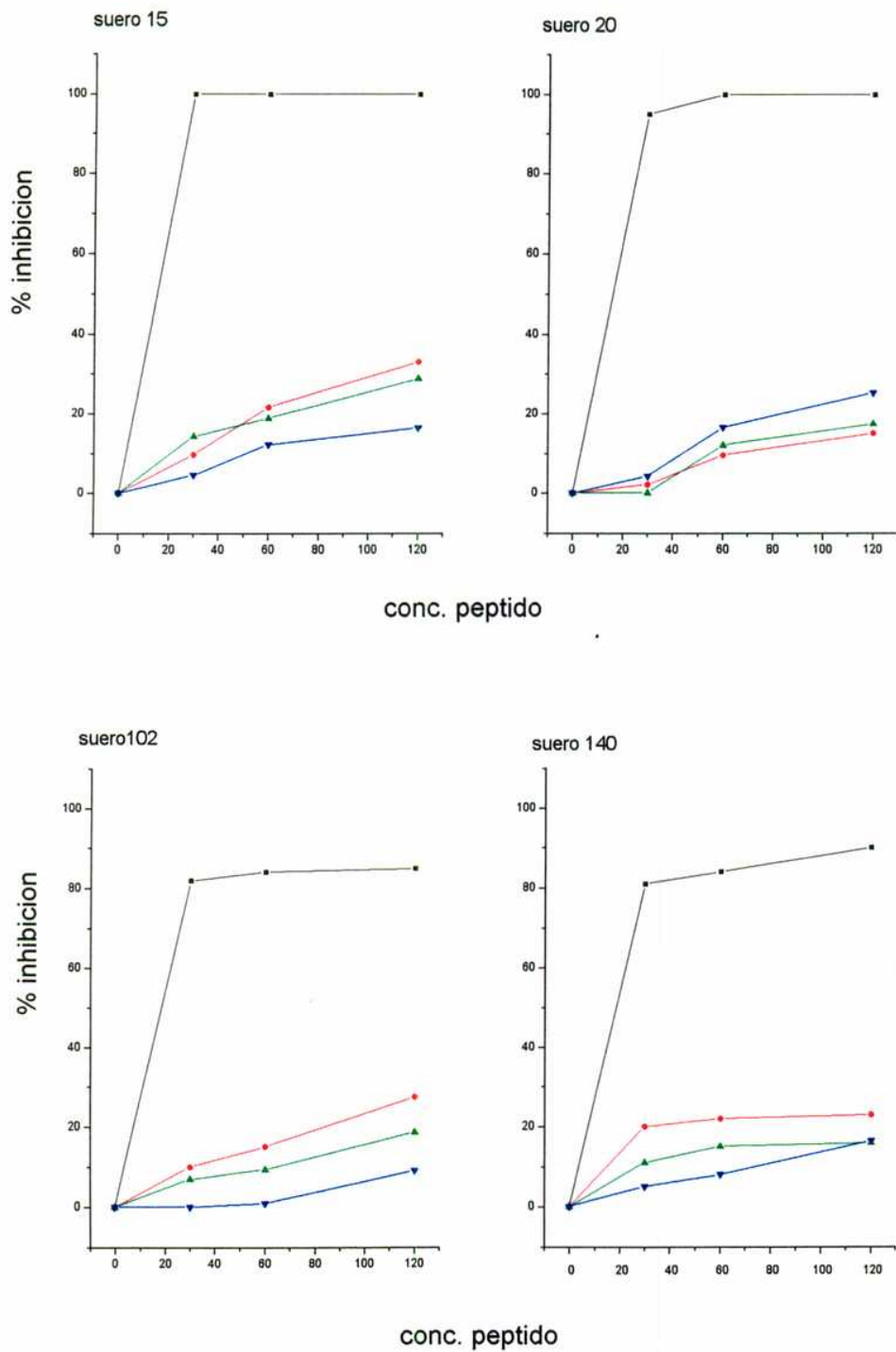
R7, región ácida del epítoto P de <i>T. cruzi</i> :		EEEDDDMG
IS,	humana:	EESDDDMG
IA,	" de <i>Leishmania sp.</i> :	EEADDDMG

En la figura 26 se observan las inhibiciones de cuatro sueros de pacientes chagásicos crónicos con cantidades crecientes de los tres péptidos. La región ácida solamente fue capaz de inhibir hasta un 30 % de la reacción anti-R13. Como control positivo de inhibición se utilizó el péptido R11.

Se intentó, entonces, inhibir la reacción anti-R13 con cantidades crecientes de una mezcla equimolar de los péptidos IE y R7. Ninguno de los cuatro sueros utilizados mostró una inhibición mayor al 20 % (fig. 27).

Estos resultados indican la existencia de un epítoto único, continuo, que no admite desdoblamiento. La región ácida estaría modulando la reactividad inmunológica, pero no resulta antigénica "per se". Indudablemente son los 13 últimos aminoácidos en su conjunto el determinante antigénico de la región C-terminal.

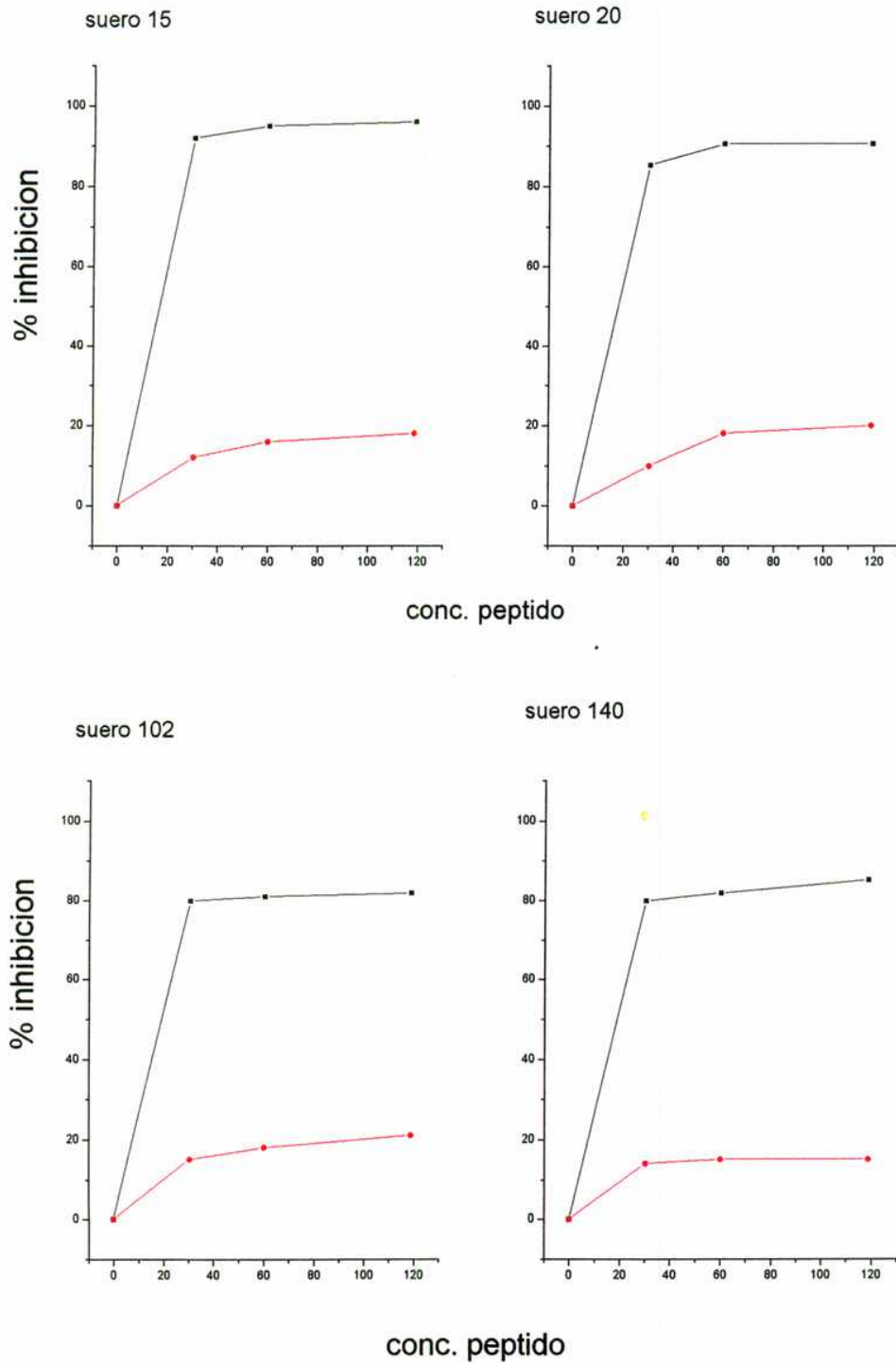
Se confirma, sin embargo, una reactividad contra la región conservada del epítoto. Aunque mucho menor que contra R13, la reactividad contra H13 es positiva y específica. Esta respuesta anti-proteínas propias podría estar desencadenada: a) por una activación policlonal B, b) por una liberación de autoantígenos ó c) por un mecanismo de mimetismo molecular.



**Figura 26:**

Inhibición de la reactividad anti-R13 de los sueros chagásicos por los péptidos sintéticos R11,R7, IS e IA. La reactividad anti-R13 se midió por ELISA usando al péptido R13 como antígeno. La concentración del péptido está expresada en micromolar. Los valores se expresan como % de inhibición (ver 2.24.5). R11: negro. R7: rojo. IS: azul. IA: verde.





**Figura 27:**

Inhibición de la reactividad anti-R13 de los sueros chagásicos por los péptidos sintéticos R7 más IE en cantidades equimolares. La reactividad anti-R13 se midió por ELISA usando el péptido R13 como reactivo. La concentración de la suma de los péptidos está expresada en micromolar. Los valores se expresan como % de inhibición (ver 2.24.5). R11: trazo negro. R7 + IE: trazo rojo.

### **3.2.4.- Inmunopurificación de anticuerpos por columnas de afinidad:**

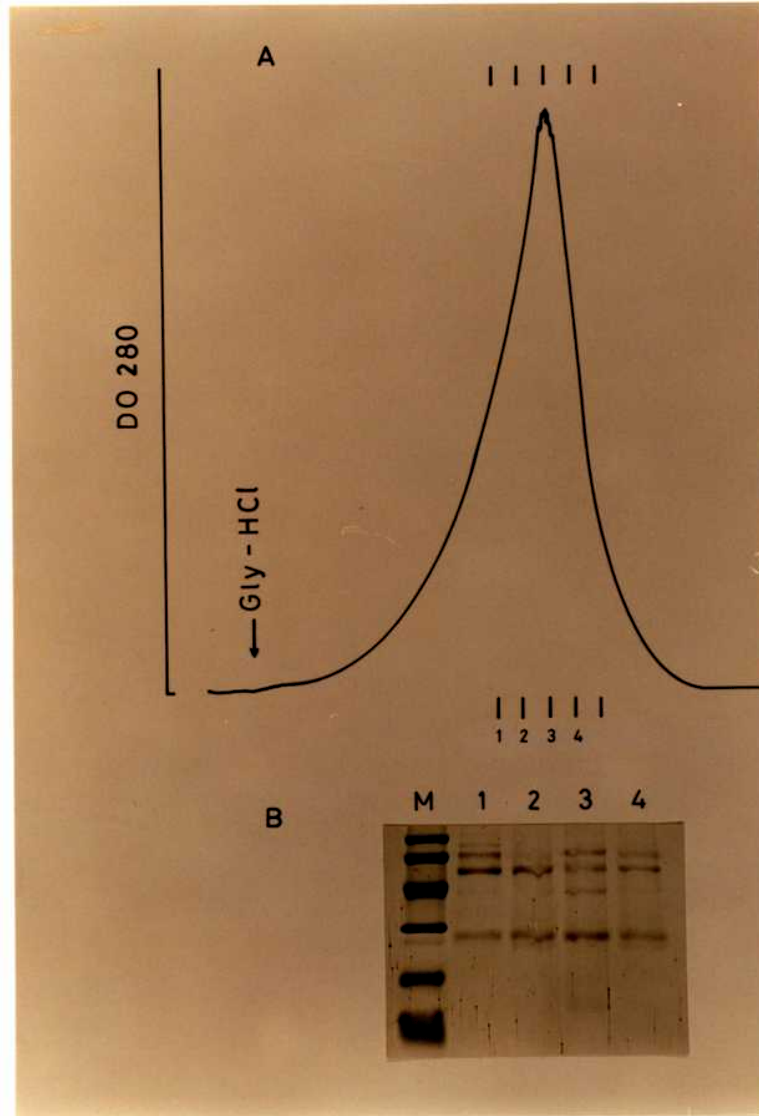
Si la reactividad contra las proteínas P propias fuera producida tanto por una activación policlonal, como por una la liberación de autoantígenos, se deberían encontrar anticuerpos circulantes específicos contra las mismas. Por el contrario, si se debe a un mecanismo de mimetismo molecular, la especificidad primaria de los anticuerpos será contra las proteínas P del parásito y luego reaccionan cruzadamente con las proteínas del huésped.

Para explicar cual de los mecanismos mencionados anteriormente es el responsable de la producción de anticuerpos contra proteínas propias, se procedió a inmunopurificar anticuerpos contra los diferentes péptidos. Se utilizaron columnas de afinidad adsorbidas con péptido R13 y H13, por las que se pasaron sueros provenientes de pacientes chagásicos crónicos, y suero de pacientes lúpicos.

En la figura 28 se observa el perfil de proteínas de la elución de los anticuerpos anti-R13, y un gel de poliacrilamida donde se corrieron las fracciones correspondientes al pico de elución, donde se observan las cadenas livianas y pesadas de las inmunoglobulinas.

### **3.2.5.- Estudio de la reactividad de los anticuerpos anti-R13 y anti-H13 de pacientes chagásicos y lúpicos:**

La reactividad contra R13 de cada una de las fracciones eluidas de las columnas de inmutofinidad R13 y H13, fue evaluada por ELISA. Las fracciones que contienen los anticuerpos anti-R13 y anti-H13 reaccionan contra R13 como se muestra en la figura 29.

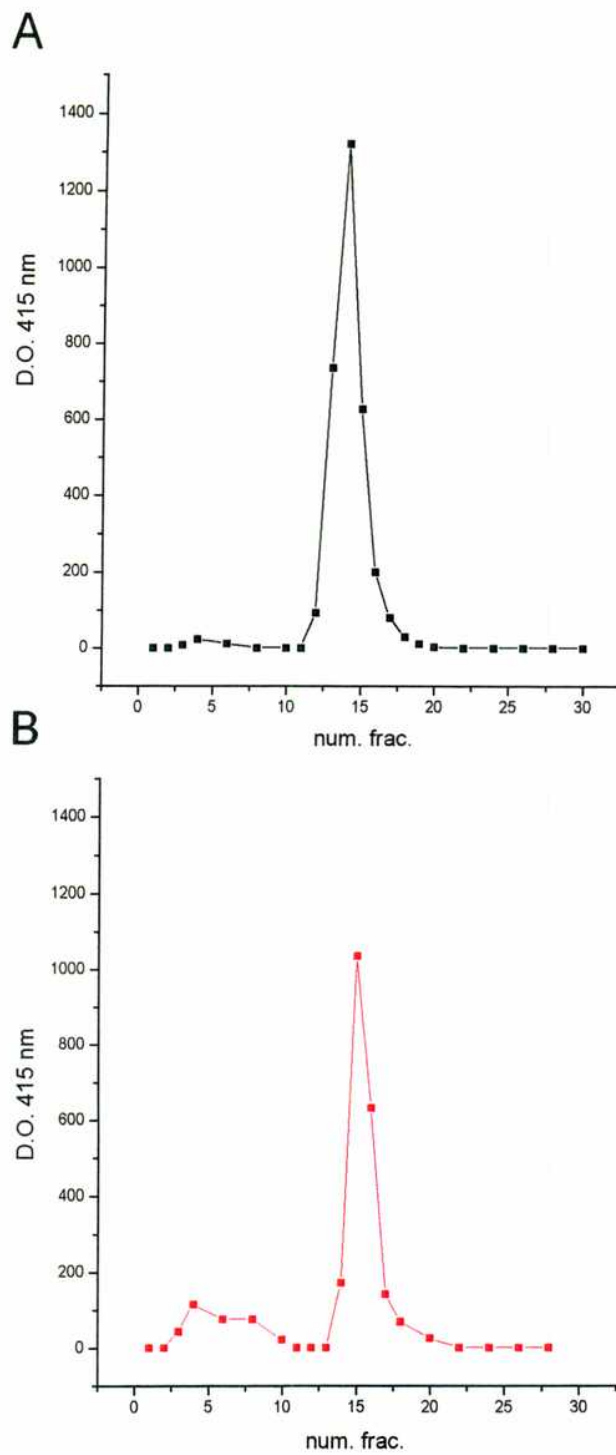


**Figura 28:**

Inmunopurificación de anticuerpos anti-péptidos.

A) Perfil de proteínas de la elución de la columna utilizada para la purificación de anticuerpos anti-R13. La flecha indica donde se comenzó la elución por el agregado de TRIS-HCl/ Glicina pH 3.

B) Gel de SDS-poliacrilamida 7,5 % teñido con plata en donde se separaron las cadenas pesadas y livianas correspondientes a los anticuerpos inmunopurificados y concentrados de cada una de las fracciones del pico de elución. M: marcadores de peso molecular: 180, 116, 84, 58, 45 y 36 kDa.



**Figura 29:**

Reactividad contra R13 medida por ELISA de cada una de las fracciones de anticuerpos inmunopurificados del suero 20.

A) anticuerpos inmunopurificados anti-R13.

B) anticuerpos inmunopurificados anti-H13.

Las fracciones de cada uno de los tubos correspondientes al pico de actividad, se agruparon y concentraron. Este concentrado se utilizó para ensayar la especificidad de estos anticuerpos (tabla 13).

El comportamiento de los anticuerpos inmunopurificados anti-R13 resultó el esperado, se encontró un mayor reconocimiento de R13 que de H13, confirmando el mapeo epitópico previo.

Los anticuerpos inmunopurificados anti-H13, también mostraron una afinidad mayor por el péptido R13 que por H13, comportándose en forma semejante que los anticuerpos anti-R13, y totalmente diferente que los anticuerpos anti-H13 provenientes del paciente lúpico. Este resultado se explica asumiendo que los anticuerpos inmunopurificados de los pacientes chagásicos por ambas columnas anti-R13 y anti-H13, es en realidad, el mismo.

Podría estar ocurriendo, sin embargo, que los anticuerpos específicos contra H13 estuviesen eluyendo en otra fracción de la purificación. Para evaluar esta hipótesis, se midió por ELISA la reacción de cada una de las fracciones eluidas de ambas columnas contra los diferentes péptidos (fig. 30).

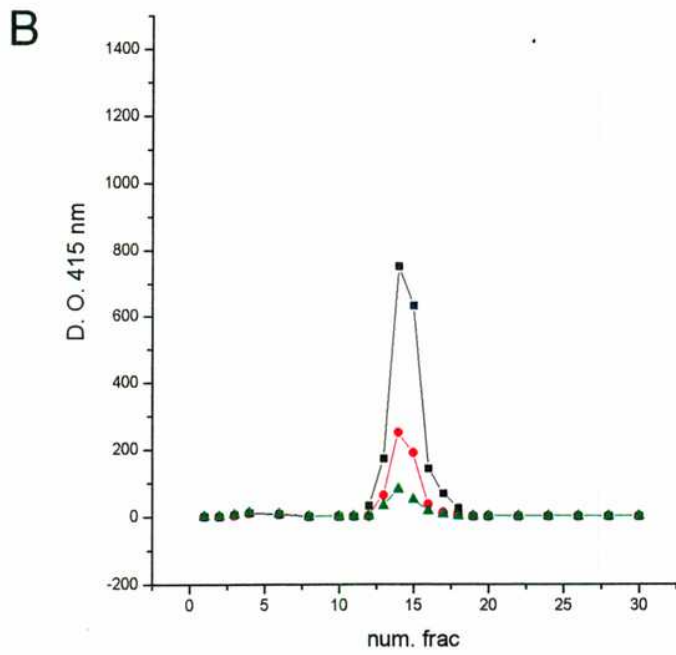
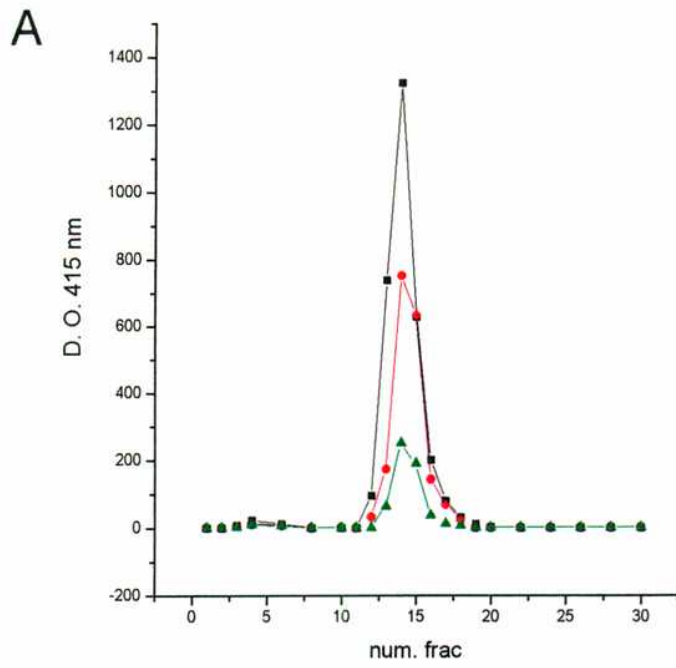
Todas las fracciones de la inmunopurificación de anticuerpos anti-R13 y anti-H13 reconocieron en mayor medida al péptido R13 que a H13. Se repitió este ensayo, pero ahora, con anticuerpos inmunopurificados mediante una columna con el péptido R10 adsorbido. Nuevamente se obtuvo el mismo resultado.

**Tabla 13:**

Especificidad de los anticuerpos anti-R13 y anti-H13:

	<b>R13</b>	<b>R11</b>	<b>R10</b>	<b>H13</b>
<b>anti-R13</b>	0,754	0,636	0,023	0,173
<b>anti-H13</b>	0,445	0,433	0,039	0,144
<b>anti-H13 L</b>	0,657	0,641	0,595	0,656

Densidades ópticas obtenidas para los anticuerpos inmunopurificados contra cada uno de los péptidos. Anti-H13 L: anticuerpos inmunopurificados anti-H13 obtenidos de un paciente lúpico.



**Figura 30:**

Reactividad contra R13, H13 y R10 medida por ELISA de cada una de las fracciones de anticuerpos inmunopurificados del suero 20. R13: negro. H13: rojo. R10: verde

**A)** anticuerpos inmunopurificados anti-R13.

**B)** anticuerpos inmunopurificados anti-H13.

### **3.2.6.- Cálculo de las constantes de afinidad de los anticuerpos anti-R13 y anti-H13:**

Los resultados previos indican que los anticuerpos anti-R13 y anti-H13 inmunopurificados mediante columnas de afinidad poseen la misma especificidad. Es decir, pese a haber sido aislados por columnas diferentes, ambos son anticuerpos que reconocen por ELISA primariamente al péptido R13. Para confirmar inequívocamente esta afirmación se procedió al cálculo de las constantes de afinidad contra R13 de ambas poblaciones de anticuerpos.

Debido a que el péptido R13 no es inmunoprecipitable ya que presenta una valencia unitaria para el reconocimiento de los anticuerpos, se utilizó el Método de Friguet para el cálculo de las constantes de afinidad (ver 2.25).

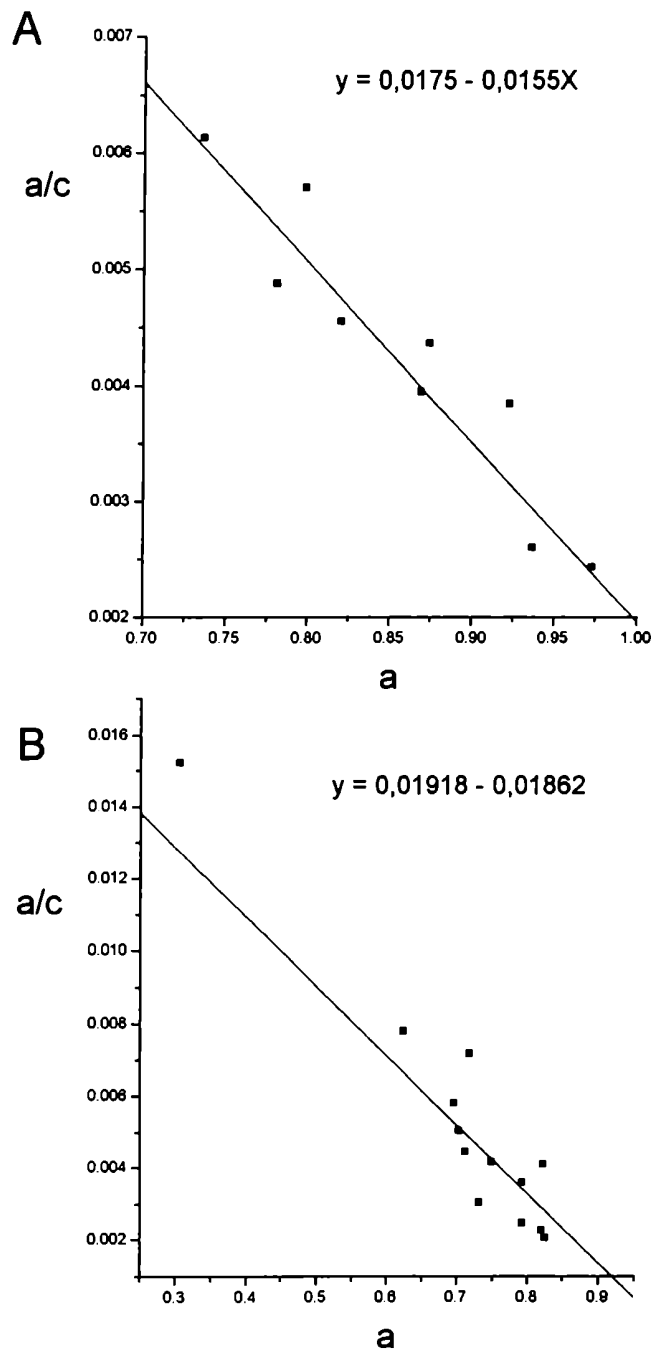
En la figura 31 se observan los gráficos  $\alpha / A$  vs.  $\alpha$  de los anticuerpos anti-R13 y anti-H13 inmunopurificados a partir del suero de un paciente chagásico. De la pendiente de estos gráficos se obtiene el valor de la constante de afinidad.

Se calculó la constante de afinidad de los anticuerpos inmunopurificados de 4 pacientes chagásicos (tabla 14). En todos los casos las constantes de afinidad contra R13 de los anticuerpos inmunopurificados anti-R13 y anti-H13 resultaron ser equivalentes.

Estos resultados junto con los anteriores, permiten concluir que los anticuerpos inmunopurificados anti-R13 y anti-H13 son la misma población de anticuerpos, y que no existe una población específica anti-H13. Es decir, ambas columnas inmunopurifican el mismo anticuerpo cuya especificidad por ELISA es hacia R13 mayor que hacia H13. Así, el reconocimiento de H13 se explica por reacción cruzada.

Por este método, no fue posible calcular la constante de afinidad de estos anticuerpos contra H13, porque las diluciones necesarias impiden detección de actividad (ver 2.25).





**Figura 31:**

Ensayo de Friguet para el cálculo de constantes de afinidad contra el péptido R13. Gráficos del cociente a/c vs a (ver 2.25). Los valores se aproximaron a rectas por cuadrados mínimos.

**A)** Cálculo para los anticuerpos anti-R13 inmunopurificados del suero 20.

**B)** Cálculo para los anticuerpos anti-H13 inmunopurificados del suero 20.

**Tabla 14:**

Constantes de afinidad de los anticuerpos anti-R13 y anti-H13 contra R13

suero	anticuerpo	K af. ( $M^{-1}$ )
20	anti-R13	$1,6 \pm 0,2 \cdot 10^7$
	anti-H13	$1,7 \pm 0,2 \cdot 10^7$
34	anti-R13	$1,4 \pm 0,1 \cdot 10^7$
	anti-H13	$1,1 \pm 0,1 \cdot 10^7$
TCh	anti-R13	$1,9 \pm 0,2 \cdot 10^7$
	anti-H13	$2,0 \pm 0,2 \cdot 10^7$
PG	anti-R13	$1,8 \pm 0,2 \cdot 10^7$
	anti-H13	$1,7 \pm 0,2 \cdot 10^7$

Sin embargo, podría estar ocurriendo que exista una pequeña población de anticuerpos específicos anti-H13, pero que su presencia esté siendo enmascarada por la copurificación de una población mayor de anticuerpos anti-R13.

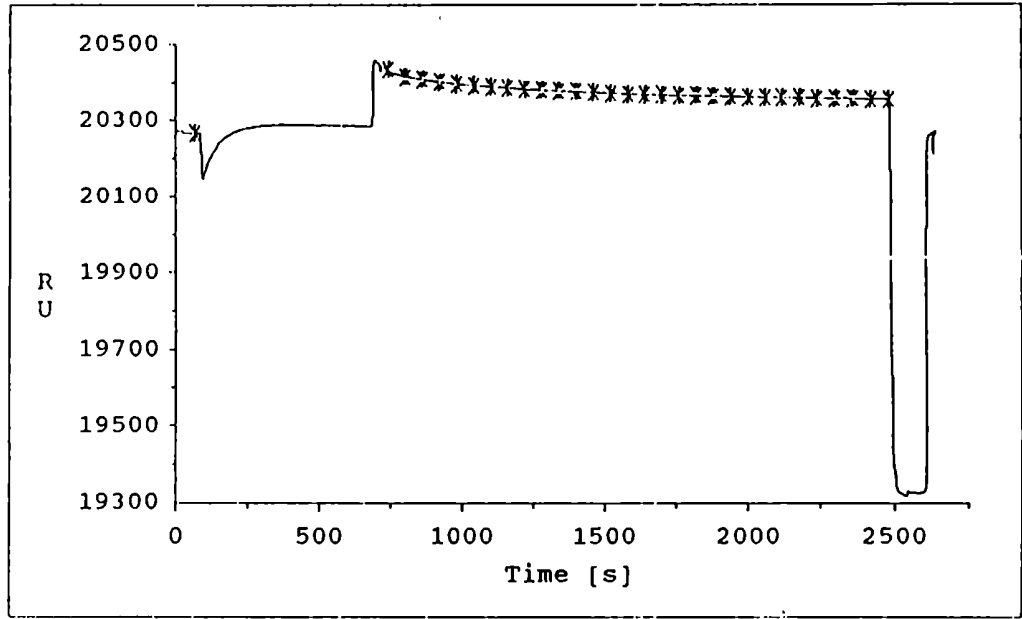
Para resolver este interrogante, decidimos trabajar con una técnica inmunológica de gran sensibilidad, y que permite evaluar las interacciones antígeno-anticuerpo, en tiempo real. Para esto se utilizó el sistema BIAcore.

### **3.2.7.- Ensayos con el sistema BIAcore:**

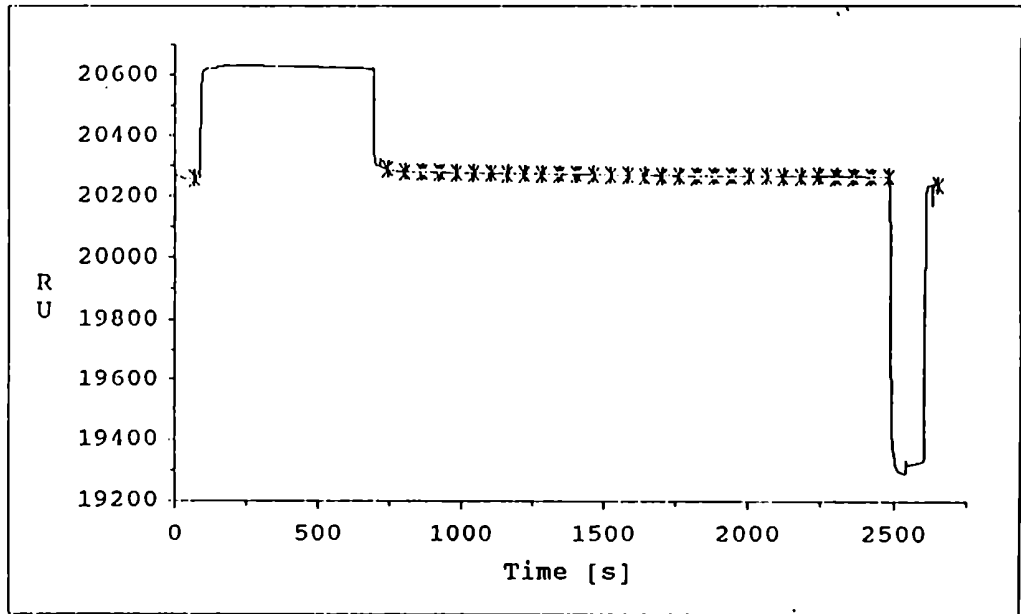
Utilizamos este método para medir la capacidad de los anticuerpos anti-H13 de interactuar con los péptidos R13 y H13 acoplados a BSA. Gracias a la gran sensibilidad y precisión del método se pudo comparar la velocidad de disociación del anticuerpo para cada uno de los péptidos. Debido a que el punto isoeléctrico de estos péptidos es bajo (2.59 y 2.61 respectivamente) no fue posible inmovilizarlos a la superficie de dextrán. Inmovilizamos entonces, los anticuerpos inmunopurificados anti-H13 y se introdujo un flujo constante de soluciones de los diferentes péptidos acoplados a BSA sobre la superficie sensora. Como control se utilizó BSA sin acoplar.

En la figura 32 se grafican los valores obtenidos (RU) en función del tiempo para R13 y H13 (tabla 15). A partir de estos valores se pudo graficar una curva exponencial decreciente, y utilizando el programa Kinetics for McIntosh en el Kell program (Mc Pherson, 1988) se calculó mediante una regresión no lineal, los valores RU para tiempo cero y las velocidades de disociación (fig. 33). La velocidad de disociación para R13 fue de  $0,0002 \text{ seg.}^{-1}$ , mientras que para H13 fue de  $0,001 \text{ seg.}^{-1}$ . Asumiendo que las velocidades de asociación son iguales para ambos péptidos, podemos concluir que la constante de afinidad para R13 es cinco veces mayor que para H13.

**A**



**B**



**Figura 32:**

Ensayos con el Sistema BIAcore.

RU vs tiempo para la disociación de los péptidos R13 y H13 sobre los anticuerpos inmunopurificados anti-R13 del suero 20. Las mediciones comienzan al pasar el flujo de HBS (ver 2.26.2).

**A)** pasaje del péptido R13.

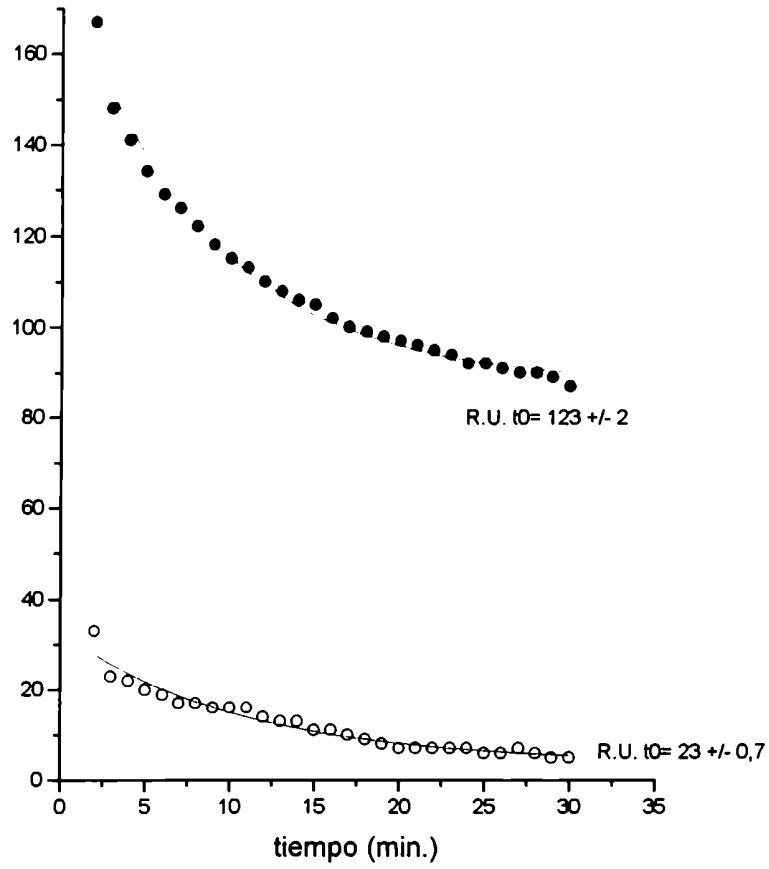
**B)** pasaje del péptido H13.

**TABLA 15:**

Respuesta relativa (RU) en función del tiempo de la unión de anticuerpos anti-R13 por diferentes péptidos medidos por BIAcore.

tiempo (min)	R13	H13	BSA
0	167	33	4
1	148	23	1
2	141	22	-2
3	134	20	-5
4	129	19	-7
5	126	17	-9
6	122	17	-11
7	118	16	-14
8	115	16	-15
9	113	16	-17
10	110	14	-18
11	108	13	-19
12	106	13	-21
13	105	11	-23
14	102	11	-24
15	100	10	-25
16	99	9	-26
17	98	8	-28
18	97	7	-29
19	96	7	-31
20	95	7	-33
21	94	7	-34
22	92	7	-35
23	92	6	-36
24	91	6	-37
25	90	7	-39
26	90	6	-41
27	89	5	-42
28	87	5	-42
29	87	5	-43
30	87	5	-43

R.U.



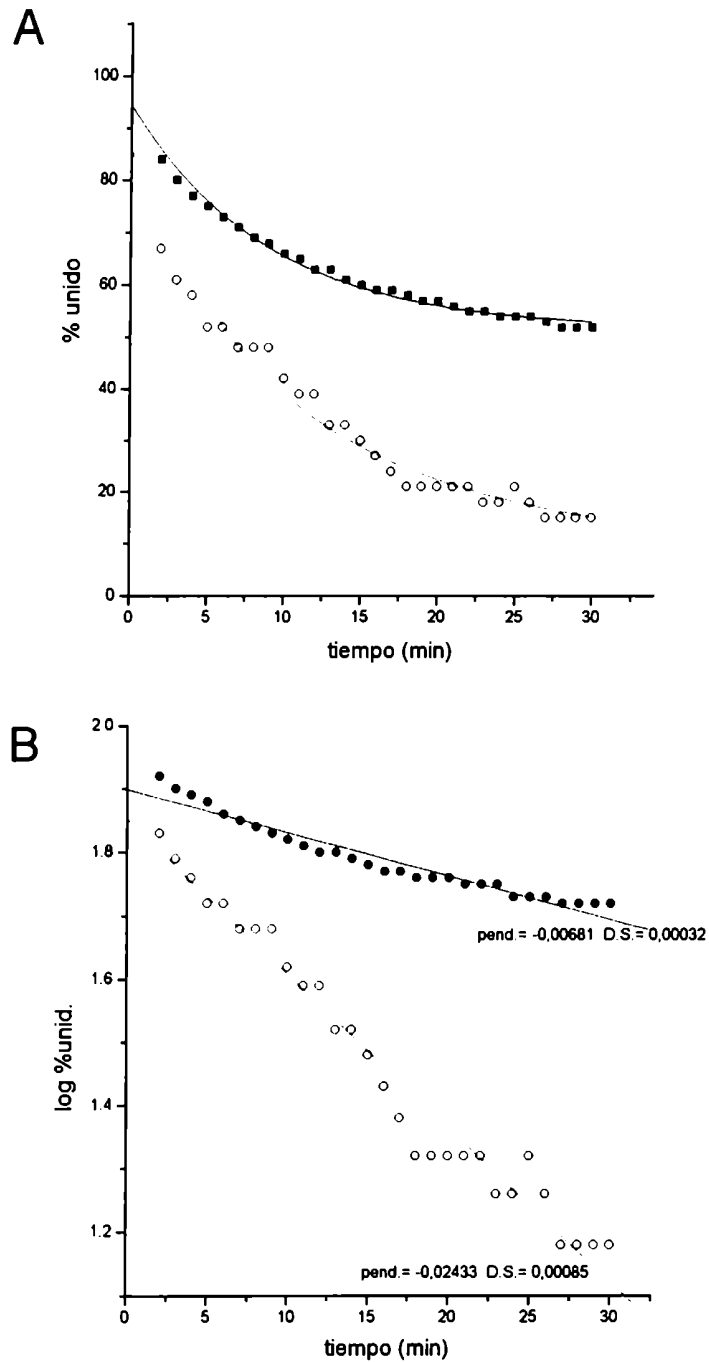
**Figura 33:**

Ensayos con el Sistema BIAcore.

Detalle de los valores de RU vs tiempo de la figura 32. Los valores aproximan a una monoexponencial decreciente, con lo que se extrapola los valores de RU a  $t=0$ .

R13: círculos llenos. H13: círculos vacíos.

Para determinar si es que existe más de una población de anticuerpos interactuando con los péptidos, se transformaron los valores de R.U. a porcentaje de péptido unido (fig. 34A) y se aproximaron nuevamente a curvas exponenciales decrecientes. Mediante el logaritmo decimal se linealizaron (fig. 34B). Dado que las rectas presentan altos valores de correlación ( $R = 0,98$ ) y no se observan fracturas en rectas con diferentes pendientes, concluimos que se trata de una sola población de anticuerpos interactuando con distinta constante de afinidad. Estos resultados confirman que la respuesta inmunológica contra la región C-terminal de las proteínas ribosomales P esta dirigida específicamente contra las proteínas del parásito. No existe una subpoblación específica contra las proteínas ribosomales P humanas, sino que los anticuerpos son capaces de reconocer a las proteínas ribosomales propias por reacción cruzada. Es decir, la respuesta autoinmune provocada por autoepítopes típica del Síndrome de Lupus Eritematoso no es lo que nosotros caracterizamos para la Enfermedad de Chagas.



**Figura 34:**

Ensayo con el sistema BIAcore.

**A)** Porcentaje de péptido unido en función del tiempo.

**B)** Linearización de los valores de A mediante el logaritmo decimal. Aproximación lineal por cuadrados mínimos.

Círculos llenos: péptido R13. Círculos vacíos: péptido H13.



### **3.3.-CLONADO Y SECUENCIACIÓN DE LA CADENA LIVIANA DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-PROTEÍNAS RIBOSOMALES P:**

Por los resultados expuestos es claro que, a pesar de presentar la región C-terminal de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* y humanas más de un 90 % de homología, la respuesta inmunológica hacia cada una de ellas es diferente. Mientras que los anticuerpos anti-P generados en Lupus Eritematoso Sistémico reconocen por igual a H13 y a R13, los anticuerpos anti-P en la infección chagásica tienen una distinta afinidad. Evidentemente, los idiotopes de ambos anticuerpos son diferentes.

Una manera de estudiar molecularmente estas diferencias, es clonar y secuenciar las cadenas variables de estos anticuerpos.

Dado que no se contaban los elementos para realizar este tipo de estudio en humanos, se decidió abordar este enfoque clonando la región variable de un anticuerpo monoclonal que reacciona con todas las proteínas ribosomales P. Este es el anticuerpo producido por el hibridoma ppA-1 gentilmente cedido por el Dr. Ballesta (ver 2.27 )

### **3.3.1.- Medición de la reactividad del sobrenadante del cultivo del hibridoma**

#### **frente a péptidos sintéticos. Determinación del isotipo:**

Para corroborar la especificidad de la línea hibridoma, se midió por ELISA la reactividad de los anticuerpos del sobrenadante del cultivo frente a un extracto de proteínas ribosomales y frente a los péptidos sintéticos, R11, H11, R10 y R7. Como control se enfrentó paralelamente suero de paciente lúpico P positivo diluido 1/200 (tabla 16A).

Una vez asegurada la reactividad contra la parte C-terminal de las proteínas P ribosomales, fue necesario determinar el isotipo de los anticuerpos para poder diseñar los oligonucleótidos específicos para amplificar las cadenas liviana y pesada. Para esto se enfrentaron los anticuerpos monoclonales con anticuerpos anti-isotipo (tabla 16B).

Fue posible determinar que el isotipo de la cadena liviana es kappa, pero resultó imposible asignarle un isotipo a la cadena pesada. Debido a esto, se decidió continuar con la amplificación de la cadena liviana.

### **3.3.2.- Amplificación del ARNm que codifica la cadena liviana del anticuerpo anti-P secretado por el hibridoma:**

A partir de  $5 \times 10^8$  células se obtuvo ARN total, y mediante la técnica de transcriptasa inversa se obtuvo ADN copia total. Utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar la cadena liviana kappa, y luego de poner a punto el número de ciclos, tiempos y temperaturas del ciclador térmico, fue posible obtener un ADN amplificado que correspondía al tamaño esperado (aprox. 700 pb.) (fig. 35).

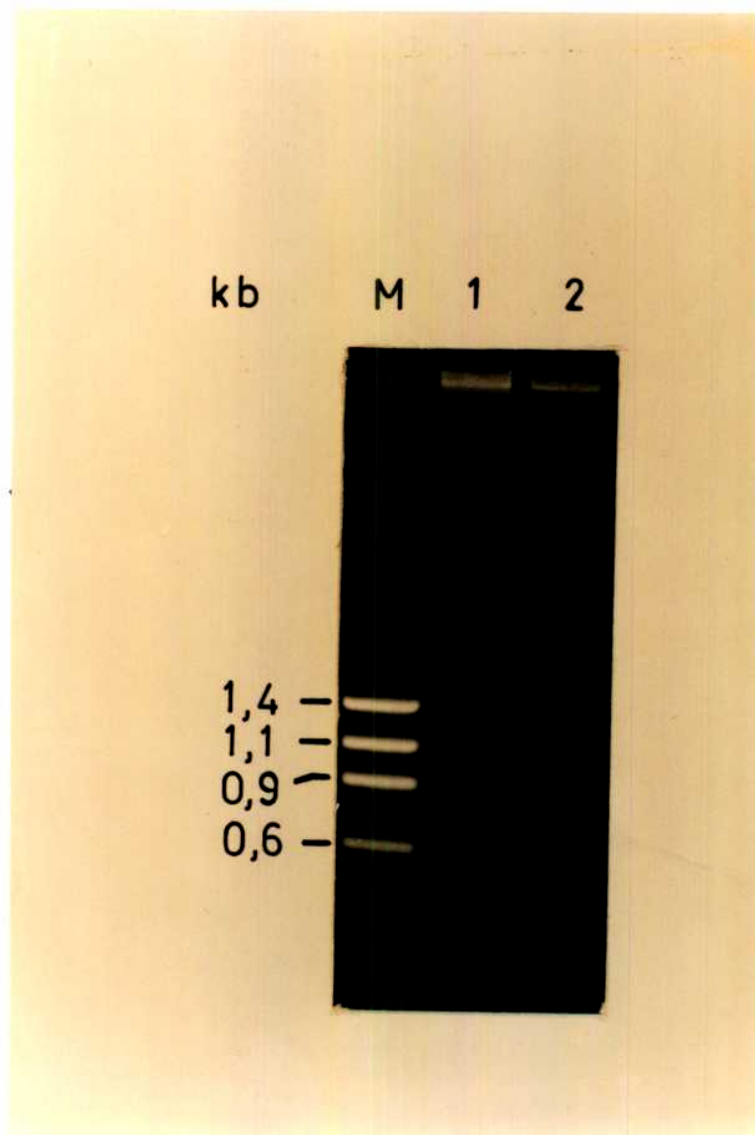
**Tabla 16:**

**A) Reactividad (D.O.) por ELISA del sobrenadante del cultivo del hibridoma ppA-1.**

	<b>prot. ribos.</b>	<b>R11</b>	<b>H11</b>	<b>R10</b>	<b>R7</b>
<b>suero SLE</b>	0,858	0,226	0,292	0,200	0,106
<b>sb. monocl.</b>	0,366	0,420	0,356	0,165	0,149
<b>control neg.</b>	0,013	0,012	0,013	0,014	0,010

**B) Caracterización isotípica del anticuerpo monoclonal ppA-1.**

	<b>anti-<math>\gamma</math>1</b>	<b>anti-<math>\gamma</math>2</b>	<b>anti-<math>\gamma</math>3</b>	<b>anti-<math>\gamma</math>4</b>	<b>anti-<math>\mu</math></b>	<b>anti-<math>\kappa</math></b>	<b>anti-<math>\lambda</math></b>
<b>ppA-1</b>	0,030	0,017	0,033	0,035	0,027	0,543	0,016
<b>IgG1/<math>\kappa</math></b>	0,640	0,023	0,050	0,034	0,030	0,620	0,020



**Figura 35:**

Electroferesis en gel de agarosa 0,7 % de los productos de amplificación por PCR de la cadena liviana kappa del anticuerpo monoclonal ppA-1.

Calle 1: producto de amplificación utilizando oligonucleótidos específicos en la síntesis del ADNcopia. Calle 2: producto de amplificación utilizando hexanuclétidos al azar en la síntesis del ADNcopia. M: marcadores de peso molecular.

### **3.3.3.- Secuenciación y comparación de las secuencias en banco de datos:**

El ADN amplificado se subclonó en un sendos vectores, pGEM-3Zf(+) y pGEM-3Zf(-) apto para síntesis de ADN simple cadena en ambas direcciones. A partir de este ADN se realizaron reacciones de secuencia y se interpretaron los geles, obteniéndose una secuencia de 653 pares de bases (fig. 36A).

Esta secuencia y la de aminoácidos deducida, fueron comparadas en los bancos de datos de EMBL en Heidelberg. La secuencia resultó ser 75 % homóloga en aminoácidos a la familia de cadenas livianas kappa. Cuando se compararon la región constante de la familia de cadenas liviana kappa con la putativa región constante del la secuencia de aminoácidos deducida, la homología fue del 100 % (fig. 36B).

**A**

**B**

**Figura 36:**

**A)** Secuencia de nucleótidos de la cadena liviana kappa del anticuerpo monoclonal ppA-1.  
**B)** Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana kappa del anticuerpo monoclonal ppA-1 deducida a partir de la secuencia de la figura 36A. Se detallan los bloques correspondientes a los consensos característicos para las cadenas livianas kappa.

***DISCUSION Y  
CONCLUSIONES***

## Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

El diagnóstico es el primer paso para el control de una enfermedad, tanto a nivel individual como de una comunidad. La aplicación de métodos diagnósticos efectivos ha determinado progresos en el estado sanitario de diversas poblaciones. En el caso particular de la Enfermedad de Chagas, el diagnóstico rápido y específico permite seguir la incidencia de la infección en diversas regiones del país y en diferentes grupos etáreos. Simultáneamente, el diagnóstico permite evaluar en el mediano plazo el éxito de programas de prevención y, a nivel de un paciente, los efectos de un tratamiento antiparasitario. Ejemplos que ilustran estos casos se describen a continuación:

1) Hacia 1962 la provincia de Jujuy presentaba más del 50 % de sus viviendas con vinchucas, no se controlaba la sangre en los bancos y no se disponían de laboratorios de diagnóstico. En ese mismo año, y a partir de la creación del Servicio Nacional de Chagas, se comienza a llevar adelante el control de la transmisión vectorial y no vectorial de la enfermedad. Se prepararon y capacitaron recursos humanos para realizar la lucha contra el insecto y mejorar el diagnóstico. En 1964 la infección en varones de 18 años era del 13,7 %. En 1985, la prevalencia de la infección en la provincia de Jujuy había caído al 8,8 %. En los últimos 5 años, no hubo registros de Chagas postransfusional, gracias al control de la sangre en los bancos públicos y privados. El último caso agudo en la provincia se registró en 1982, un niño de un año con signo de Romana, hepatoesplenomegalia y síndrome febril; la gota fresca mostró *T. cruzi* y el Strout fue positivo observándose gran cantidad de tripomastigotes por campo (Ripoll, 1992).

2) A nivel nacional, ensayos serológicos realizados durante los últimos 30 años por el Programa Nacional de Control del Vector, demuestran que la prevalencia de serología positiva en varones de 18 años a ser incorporados al servicio militar, disminuyeron



del 10,3 % en los años 1965-1969 al 2,4 % en 1992. Esta disminución es consecuencia de las campañas de desinsectación realizadas en todas las regiones del país (Chuit, 1992).

Campañas de desinsectación y construcción de viviendas en toda Latinoamérica, en los últimos años, ha logrado disminuir los casos de transmisión vectorial, (WHO, 1991, Dias, 1987, Schofield, 1992). Sin embargo, el control de la transmisión no-vectorial se logra mediante técnicas de diagnóstico que permitan rastrear en forma rápida y eficiente los bancos de sangre, como así también diagnosticar, con una alta sensibilidad y especificidad, aquellos individuos infectados por *T. cruzi*. En este último punto la especificidad es un factor determinante, ya que los métodos basados en la detección de anticuerpos en el suero de pacientes mediante extractos crudos o parcialmente purificados de parásito presentan reacción cruzada con el suero de pacientes infectados por otros parásitos como *Leishmania sp.* ó *T. rangeli* (Camargo, 1969, Anthony, 1979) o enfermedades autoinmunes (síndrome de lúpus eritematoso, artritis reumatoidea) (Carrasco, 1985).

Los individuos infectados por *Leishmania braziliensis braziliensis* y *T. cruzi*, pero sólo diagnosticados como leishmánicos, constituyen un grupo particularmente vulnerable, no sólo por los posibles efectos de una infección mixta, sino también por el efecto cardiotóxico de las drogas antimonioales utilizadas para tratar la leishmaniasis.

Resulta evidente, la importancia de contar con reactivo diagnóstico de máxima sensibilidad y especificidad. El mismo, sin dudas, contribuirá al control no vectorial de la Enfermedad de Chagas. Sin embargo no se puede soslayar el problema de los ya más de 16 millones de infectados en toda América Latina. Los esfuerzos tienen que concentrarse también, en el desarrollo de un reactivo con capacidad pronóstica, que pueda diferenciar serológicamente las distintas formas de la enfermedad, para tratar diferencialmente a los pacientes según sea la forma clínica que presenten.

### **Antígeno Klenow-JL7.**

En este trabajo se describe la producción y purificación de un nuevo antígeno recombinante, AKJL7, desarrollado para ser utilizado en el diagnóstico de la infección chagásica por ELISA. Comparamos su desempeño versus el de un extracto total de proteínas del parásito, en un ensayo doble ciego con un panel de 344 sueros. Ambos antígenos demostraron ser excelentes reactivos diagnósticos con altos índices Kappa (ver 3.1.6, tabla 4 ). El extracto parasitario reaccionó con 12 sueros de individuos no chagásicos (falsos positivos) pero no dió ningún falso negativo, mientras que el antígeno recombinante no reaccionó con 10 sueros chagásicos (falsos negativos) pero no dió ningún falso positivo. Uno de los falsos positivos que manifestó el extracto de *T. cruzi*, era un suero de un paciente lúpico P positivo. Su reactividad anti-*T. cruzi* estaba determinada por el reconocimiento de las proteínas P del parásito (resultado no presentado).

Aprovechando la máxima sensibilidad del extracto y la máxima especificidad del antígeno recombinante se reanalizaron las muestras con los valores de ambos antígenos. La combinación de los resultados obtenidos con uno y otro de los reactivos permiten el siguiente análisis. Asumiendo como positivos sólo aquellos sueros que presentaron valores positivos para AKJL7, y como negativos los seronegativos para *T. cruzi*, se clasificaron las muestras en: positivos verdaderos (PV), negativos verdaderos (NV) e indeterminados (I). De esta manera más del 95,6 % de los individuos infectados por *T. cruzi* resultaron PV, más del 89,6 % de los individuos no chagásicos resultaron NV y sólo 6,4 % I (ver 3.1.6, tabla 6).

### **Anticuerpos anti-AKJL7 y patología.**

En un estudio sobre comportamiento evolutivo de la reacción de fijación de complemento en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas, Rassi (1969) describe que los títulos de los anticuerpos circulantes anti-*T. cruzi* en los pacientes chagásicos son variables, con un comportamiento Gaussiano dentro de la población infectada. Según el autor, estos títulos no guardan relación con la gravedad de los síntomas. A una conclusión similar llegó Matsumoto (1993) por inmunofluorescencia indirecta sobre amastigotes. Nuestro trabajo, sin embargo, encuentra una relación entre los títulos de los anticuerpos anti-AKJL7 y el estadio clínico de los pacientes (ver 3.1.6, fig. 19 y tabla 7B). El promedio de los valores anti-AKJL7 para el grupo de pacientes CS (6,55 +/- 0,19) difiere significativamente del promedio de los valores obtenidos para el grupo CI (4,93 +/-0,38) ( $p < 0,019$ ). Esto nos llevó a calcular líneas de corte de ROC (ver, 2.35) para evaluar la capacidad diagnóstica de cardiopatía del ensayo, o en otros términos, constatar si los sueros que presentaban valores por encima de la línea ROC corresponden, en su mayoría, a pacientes con cardiopatía severa. En términos estadísticos, es significativamente mayor ( $p < 0,0035$ ) el número de pacientes CS que presentan niveles anti-*T. cruzi* y anti-AKJL7 que superen sus líneas de ROC (4,35 y 5,82 respectivamente) que los CI (24 contra 10) ( ver 3.1.6, tabla 8).

Muchos de los antígenos aislados con suero chagásico humano están formados por repeticiones de aminoácidos, probablemente inmunodominantes en la infección natural (Wendel, 1992). La secuencia aminoacídica de estas unidades repetitivas están muy conservadas entre cepas y aislados de *T. cruzi*, lo que sugiere que estas repeticiones tienen funciones fisiológicas y/o estructurales .

El antígeno JL7 se encuentra dentro de este grupo:

a) está formado por repeticiones prácticamente idénticas de 68 aminoácidos. La conservación de secuencia a nivel nucleotídico en estas repeticiones, indican que el motivo aminoacídico se haya conservado presumiblemente a través de conversión génica (Cotrim, 1995).

b) fue clonado en forma independiente por distintos laboratorios (Ibañez, 1988, Lafaille, 1989), a partir de distintas cepas y estadios de parásito y utilizando como inmunosondas sueros humanos de diversos orígenes, lo que refleja su gran antigenicidad y conservación.

El antígeno JL7 es parte de una proteína intracelular que estaría involucrada en la unión entre el flagelo y el cuerpo del parásito (Cotrim, 1995). Sin embargo es posible que su rol no sea solamente estructural. Dado que muchos de los tripanosomas infectivos son invariablemente destruidos en los sitios de la infección, la presencia de una proteína inmunodominante liberada por la lisis del parásito, está estimulando el sistema inmune y produciendo anticuerpos contra este péptido. Estos anticuerpos, sin embargo, no son de consecuencia para el parásito dado que la proteína blanco es intracelular.

Algunos autores ven en esta repetición de motivos una función infectiva del antígeno JL7, al "saturar" la respuesta inmune del huésped sin producir efecto sobre el parásito. Una situación similar, se presenta en los infectados por *T. brucei*. En estos individuos, la fuerte estimulación del sistema inmune contra las VSGs (proteína variante de superficie) (Cross, 1990) produce una respuesta que fracasa, ya que cambia su cubierta eludiendo los anticuerpos sintetizados contra la anterior proteína de superficie. Así, la respuesta inicial contribuye a "desorientar" al sistema inmunitario permitiendo la perpetuación de la infección.

### **Un nuevo tipo de reactivo diagnóstico para la Enfermedad de Chagas.**

A partir de los resultados obtenidos con el extracto de *T. cruzi* y AKJL7, y el análisis hecho posteriormente, planteamos un nuevo reactivo diagnóstico para la Enfermedad de Chagas. El mismo consta de ambos antígenos por separado en una placa de ELISA. De esta manera, la sensibilidad aportada por el extracto y la sensibilidad del recombinante configuran una poderosa herramienta diagnóstica. Los sueros se caracterizan sin posibilidad de falsos positivos o falsos negativos. Los casos indeterminados, se deberán retirar de los bancos de sangre o en el caso de tratarse de un análisis clínico se derivarán para su confirmación por otro método.

El análisis estadístico del ensayo diagnóstico permite inferir que aquellos pacientes con altos títulos contra los dos antígenos, tienen una alta probabilidad de tener síntomas de disfunción cardíaca, por lo que deberán ser rápidamente sometidos a estudios electrocardiográficos.

### **El reconocimiento del parásito en la infección crónica: respuesta contra proteínas intracelulares.**

La respuesta humoral en pacientes chagásicos crónicos se diferencia de la respuesta detectada en individuos infectados por otros protozoarios parásitos. Mientras que la infección crónica por *Plasmodium sp*, *Leishmania sp* y *Trypanosoma brucei* cursa con reconocimiento de proteínas de superficie del agente infeccioso, en Chagas crónico los blancos de la respuesta humoral son intracelulares. No sólo la proteína JL7 es reconocida, como se acaba de describir, sino también JL8, un péptido con homología con el antígeno S de *Plasmodium sp*, JL9 (Levin, 1990, Cowman, 1985), las proteínas ribosomales P (Levin, 1993), JL9, una proteína del parásito con homología con las MAPs (proteínas asociadas a

los microtúbulos) (Kerner, 1991), y RA1 (una proteína de choque térmico) (Levy-Yeyati, 1991), entre otras.

Sin embargo, nuestros estudios demuestran que no todos los antígenos intracelulares son igualmente reconocidos: JL7 y JL8 son reconocidos por suero de la gran mayoría de pacientes chagásicos crónicos (Levin, 1989), mientras que las proteínas que las proteínas ribosomales P, JL9 y RA1 son reconocidos predominantemente por suero de pacientes con miocardiopatía chagásica crónica (Levin, 1989, Levy-Yeyati, 1991).

Los resultados obtenidos en un ensayo multicéntrico organizado por el Sub-Programa de Biotecnología del CyTED (Levin, 1991), confirman esta hipótesis. En el mismo se demuestra que las proteínas de superficie del parásito son reconocidas por solamente un 33 % de los sueros de los pacientes crónicos, las proteínas conservadas son reconocidas en promedio por un 70 %, mientras que las proteínas no conservadas y específicas del parásito son reconocidas por más del 95 % de los sueros.

Una explicación posible de este comportamiento serológico se basa en el concepto de tolerancia (Thefilopoulos, 1995). La dificultad en reconocer las proteínas conservadas se basa en la semejanza antigénica entre infectado y agente infectante. Sin embargo, el parásito logra romper la tolerancia en algunos casos, justamente en aquellos pacientes con síntomas más severos. La ruptura de tolerancia podría generar autoanticuerpos, y estos podrían mediar fenómenos autoinmunes. Diversos trabajos explican como, por mecanismos de mimetismo molecular se desencadenan respuestas autoinmunes (Thefilopoulos, 1995).

## **Respuesta humoral anti-ribosoma.**

Hace 4 años Levitus demostró que los anticuerpos anti-JL5 reaccionan con las proteínas ribosomales P humanas (Levitus, 1991b), y que esta reactividad estaba definida por los últimos 13 aminoácidos de la proteína TcP2 $\beta$ . Sin embargo, un análisis más detallado de estas experiencias revelaba cierto grado de contradicción entre la postulada autoinmunidad anti-P en la Enfermedad de Chagas y su semejanza con la autoinmunidad anti-P sistémica. Esto nos llevó a profundizar el estudio de los anticuerpos anti-P en chagásicos y lúpicos.

A diferencia de lo informado anteriormente (Levitus, 1991b), no se pudo detectar la autoreactividad anti-P de los anticuerpos anti-JL5 por Western blot. Por lo tanto, fue indispensable caracterizar la naturaleza autoinmune de la respuesta anti-P chagásica con técnicas más sensibles, y una batería de sueros seleccionados por su elevada reactividad anti-P. Las técnicas utilizadas fueron: ELISA, ELISA de inhibición, inmunopurificación de anticuerpos, medición de las constantes de afinidad y medición de la reacción antígeno-anticuerpo en tiempo real con el sistema BIAcore.

Los primeros ensayos ELISA demostraron que los sueros de chagásicos crónicos reaccionaron proteínas ribosomales propias, de extractos de ribosomas y con recombinantes P humanas (ver 3.2.2, tabla 9). El nivel de esta autoreactividad corresponde aproximadamente a un 10 % de la respuesta anti-proteínas parasitarias, en cambio el suero lúpico P positivo reaccionó en forma semejante con todas las proteínas P, humanas y del parásito. Cuando se utilizaron anticuerpos anti-JL5 (ver 3.2.2, tabla 10), se obtuvieron resultados semejantes a los anteriores indicando que la reactividad contra la región C-terminal concentra la especificidad anti-P del suero.

Nuestros resultados indican además, que la antigenicidad de esta región depende de su grado de libertad. Esto se evaluó gracias a la existencia del recombinante 9D con su extremo C-

terminal incluido en la proteína de fusión  $\beta$ -galactosidasa. De acuerdo con la hipótesis de Möller, la proteína con su extremo C-terminal libre resultó más antigénica que 9D (tabla 11) Los ELISA de inhibición de la reactividad anti-P utilizando el péptido R13 confirman que este epítipo es uno de los determinantes antigénicos fundamentales de la proteína TcP2 $\beta$  (ver 3.2.3.3, tabla 12).

### **Mapeo fino de R13.**

Dado que la experiencias confirmaban que para Chagásicos y Lúpicos la reactividad se concentraba en la región C-terminal, pero que el reconocimiento del epítipo humano es diferente, se decidió realizar el mapeo fino de los epítopes R13 y H13. En la tabla 13 se pone de manifiesto la importancia de la única diferencia entre estos 2 péptidos. Mientras que los sueros lúpicos reaccionan por igual con R13 y H13, los sueros chagásicos presentaban una exquisita afinidad por el glutámico en la posición 3:

13

**R13:** EEEDDDMGFGLFD

**H13:** EESDDDMGFGLFD

Diferencias en el reconocimiento antigénico en función de cambios de aminoácidos puntuales, han sido descriptos. Altschuh (1992) usando el sistema BIAcore demuestra importantes cambios en las constantes de afinidad de un anticuerpos monoclonal al ir substituyendo diferentes aminoácidos de un péptido sintético del virus del mosaico de tabaco. De acuerdo a la posición y al tipo de aminoácido que se substituyese, hasta lograba anular el reconocimiento.



Esta fina especificidad de los anticuerpos chagásicos se demostró en experiencias de inhibición. Mientras que el péptido R11 (EDDDMGFGLFD) inhibe casi completamente la actividad anti-R13, la incubación de los sueros con el péptido H11 (SDDDMGFGLFD) sólo lo consigue en un 20-30 % dependiendo del suero (ver 3.2.3.3, fig 25).

Estos resultados plantearon la posibilidad de que la región antigénica de R13 estuviese circunscripta al hexapéptido EEEDDD. Sin embargo, experiencias de inhibición con este péptido y los péptidos SEEDDD y AEEDDD, como así también con una mezcla de los péptidos EEEDDD y MGFGFLD (ver 3.2.3.3, figs. 26 y 27), demuestran que el epítipo es el péptido EEEDDDMGFGLFD.

### **Uno o 2 epítopes?**

Si bien los sueros chagásicos reconocen a R13 y R11, también tienen cierto nivel de reactividad con R10 (ver 3.2.3.3, fig.25 ). Esta autoreactividad se explica: a) por la existencia de dos poblaciones de anticuerpos, una que reconoce la región conservada y otra anti-R13, ó b) una sólo población de anticuerpos contra R13 que por reacción cruzada reconoce a H13 con menor afinidad.

Para evaluar estas dos posibilidades, se inmunopurificaron anticuerpos por columnas de afinidad. Así se inmunopurificaron anticuerpos anti-R13, anti-H13 y anti-R10 de pacientes chagásicos y de un paciente lúpico. Al evaluar por ELISA la especificidad de estos anticuerpos observamos que los de pacientes chagásicos (anti-R13, anti-H13 y anti-R10) presentaron un comportamiento similar al suero: un mayor reconocimiento de R13 que de H13, mientras que los anticuerpos purificados de paciente lúpico reaccionaban por igual con todos los péptidos (ver 3.2.5, tabla 13). Esto sugiere que la autoreactividad anti-P de los

pacientes chagásicos es por reacción cruzada con una sólo población de anticuerpos reconociendo diferencialmente R13 y H13.

Para corroborar esta hipótesis se calcularon las constantes de afinidad de los anticuerpos anti-R13 para los anticuerpos anti- R13 y H13 purificados. Los resultados demuestran que sobre columnas R13 o H13 se purifica el mismo anticuerpo, ya que la constante de afinidad por R13 es semejante para todos los anticuerpos (ver 3.2.6, tabla 14).

Para descartar la posibilidad de un enmascaramiento de anticuerpos anti-H13 por una población mayoritaria de anticuerpos anti-R13, utilizamos el sistema BIAcore. En efecto, el hecho que el análisis logarítmico transforme a una sólo recta de disociación, confirma la existencia de una única población de anticuerpos capaces de interactuar con los péptidos R13 y H13 (ver 3.2.7, fig 34). Las diferencias de las velocidades de disociación para ambos péptidos, mucho mayor para H13 que para R13, explican parcialmente las diferencias en la reactividad.

Llamativamente la unión de los anticuerpos anti-R13 con el péptido H13 sobre columnas de afinidad fue mayor que lo permitían preveer las experiencias de ELISA. La capacidad de los anticuerpos anti-R13 de reconocer y unirse a H13 acoplado a una columna está aumentada. Este fenómeno puede explicarse porque en la columna los péptidos se encuentran unidos a una cadena de 22 carbonos, lo que les permite más flexibilidad que en la superficie plana de un ELISA o un Western blot, permitiéndoles mayor movilidad, simulando de alguna manera la situación observada en el pedúnculo del ribosoma (ver Introducción, 1.12). En la práctica nuestro trabajo pone en evidencia una autoreactividad que podría pasar casi desapercibida por los métodos inmunológicos clásicos de detección de autoanticuerpos (ELISA y Western blot).

Nuestros resultados indican que los mecanismos que generan los anticuerpos anti-P en los pacientes chagásicos y aquellos que los generan en los pacientes lúpicos, no son los mismos, en contradicción con lo expuesto por Skeiky y col. (1993). Estos investigadores llegan a esta conclusión al trabajar con concentraciones diferentes de suero chagásico y lúpico (el suero chagásico al doble de concentración) y diferentes cantidades de proteína recombinante humana para cada uno de los ensayos: 50 ng de proteína recombinante cuando se enfrentó con el suero lúpico y 200 ng al enfrentarla con el suero chagásico.

### **Presencia del parásito y mimetismo molecular.**

Wucherpfennig (1995) en un trabajo sobre mimetismo molecular en esclerosis múltiple afirma que las infecciones virales persistentes son de particular interés para la inducción y mantenimiento de una respuesta autoinmune. Las infecciones crónicas podrían explicar la expansión clonal y persistencia de linfocitos T autoreactivos.

En la Enfermedad de Chagas las progresivas lesiones y fibrosis observadas en el miocardio, y la relativa ausencia del parásito sugirieron la existencia de un proceso inmunopatológico específico de corazón. A pesar de ser varios los fenómenos inmunológicos que podrían estar implicados en la patogénesis de la enfermedad, la hipótesis de un proceso autoinmune ha recibido apoyo experimental (Hudson, 1985).

Nuestros resultados confirman la presencia de anticuerpos capaces de reconocer autoepítopes. Sin embargo, estos anticuerpos no están dirigidos contra las proteínas ribosomales humanas, sino contra las proteínas del parásito. Esto define un fenómeno que se puede encuadrar dentro de mimetismo molecular. En realidad, la presencia del parásito es detectada por el persistente perfil de respuesta anti-R13/H13.

La presencia del parásito se demostró por técnicas inmunohistoquímicas, por Higuschi (1993) que detecta antígenos del parásito en el tejido cardíaco de autopsias de pacientes. La ubicación de estos antígenos correlacionan significativamente ( $p < 0,005$ ) con infiltrados inflamatorios severos y moderados. Cuando los amastigotes se encontraban dentro de fibras musculares intactas no se encontraron signos de inflamación. Sin embargo, importantes infiltrados inflamatorios se hallaron cuando antígenos de *T. cruzi* fueron visualizados en el citoplasma de macrófagos o libres en el intersticio celular (Higuschi y col. 1993). También detectaron infiltrados leves en el miocardio aún en ausencia de parásito.

La confirmación de estos resultados se realizó por amplificación de secuencias de ADN de *T. cruzi*. A partir de biopsias de tejido cardíaco adyacente a los infiltrados inflamatorios de pacientes chagásicos con cardiopatía severa, Jones y col. (1993) amplificaron ADN genómico de *T. cruzi*. Más aún, Brandariz y col. (1995), demostraron que en un paciente chagásico severo con elevados títulos de anticuerpos anti *T. cruzi* y un perfil de anticuerpos anti-R13/H13 como el caracterizado en la presente tesis, típico de pacientes chagásico severo, se amplificaron secuencias específicas de *T. cruzi*. Este trabajo confirma además la predicción formulada anteriormente: el perfil R13 alto, H13 bajo delata la persistente presencia del parásito. Claramente, su presencia es indispensable para mantener este perfil serológico que no se detecta en pacientes que luego de tratamiento quimioterapéutico, seronegativizan su reacción anti-*T. cruzi* (resultados no mostrados).

Estos resultados permiten evaluar desde una nueva óptica resultados previos del laboratorio. En efecto, en 1990 se informó que pacientes con miocarditis chagásica presentaban elevados niveles séricos de anticuerpos anti-R13 (Levitus, 1991). En un primer momento, se consideró que este resultado representaba un alto grado de autoreactividad. Si nuestra hipótesis es correcta, los altos títulos anti-R13 correlacionan con presencia de parásito e inflamación activa.

Ciertamente, estos anticuerpos anti-R13 reaccionan con superficies celulares (Lopez Bergami, 1995) induciendo cambios funcionales, aunque no inflamatorios. De todo esto se desprende que las mediciones de los niveles de anticuerpos anti-R13 pueden completar el ensayo diagnóstico previamente propuesto (ver pg. 71), y medir también los niveles de anticuerpo anti-R13.

### **Anticuerpos anti-P y patología.**

Por lo anteriormente expuesto resulta claro la asociación entre la presencia de anticuerpos anti-proteínas ribosomales P y la presencia del parásito. Resta contestar si la respuesta inmunológica hacia estas proteínas está involucrada en la patología. Al respecto existen numerosos trabajos que así parecen demostrarlo. Ruiz y col. (1985) al inmunizar ratones con la fracción microsomal de *T. cruzi*, indujo una miocarditis similar a la observada en el modelo crónico experimental de la enfermedad. Lopez Bergami (1995) luego de inmunizar con la proteína recombinante TcP2 $\beta$  observó trazados eléctricos patológicos en el ECG, semejantes a los presentes en la infección experimental, aunque sin inflamación. La respuesta inmunológica anti-P generó anticuerpos que reaccionaron tanto con el péptido R13 como con H13, con un perfil semejante al descrito. Finalmente, Carvalho (1995) logró inhibir el bloqueo de la conducción A-V del corazón de un conejo expuesto a suero de pacientes chagásicos, por la preincubación de los mismos con el péptido R13.

En sus trabajos, Higuschi (1993) propone una acción directa por parte del parásito y/o de sus antígenos en el desarrollo de la miocarditis chagásica. Aunque no descartan mecanismos autoinmunes en la patogenia que expliquen los focos de infiltrados inflamatorios en sitios donde no detectan ni parásito ni antígenos del mismo.

Nuestros resultados y la información expuesta nos lleva a plantear una nueva hipótesis para la patogénesis autoinmune de la Enfermedad de Chagas: la autoinmunidad dependiente de *T. cruzi*. La presencia del parásito y su continua destrucción por parte de los macrófagos activados (NK) y linfocitos citotóxicos, mantiene una respuesta crónica y específica anti-*T. cruzi*. La patología se produce por reacción cruzada de esta respuesta anti-parásito contra blancos propios. Los mecanismos involucrados en la patología podrían ser:

i) producción de anticuerpos con efectos agonistas sobre receptores  $\beta$ -adrenérgicos: anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico con reactividad cruzada con proteínas ribosomales P fueron inmunopurificados a partir de suero de pacientes chagásicos crónicos con cardiopatía (Ferrari, 1995). Estos anticuerpos produjeron un efecto cronotrópico positivo *in vitro* sobre cardiomiocitos de ratas neonatales.

ii) sobreexpresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y moléculas de adhesión: D'Avila Reis (1993) describe la sobreexpresión de antígenos de tipo I (HLA-ABC) y de antígenos de tipo II (HLA-DR) en tejido cardíaco y células endoteliales de vasos respectivamente, de pacientes crónicamente infectados por el parásito, como así también una pequeña sobreexpresión de E-selectina en estas últimas células preferentemente en áreas con inflamación. La sobreexpresión de antígenos de histocompatibilidad permite una presentación antigénica aumentada mientras que la E-selectina promueve la adhesión de linfocitos CD4<sup>+</sup> sobre los vasos inflamados.

iii) sobreexpresión de citoquinas por parte de las células endoteliales: Tanowitz (1992) demostró que las células endoteliales humanas infectadas por *T. cruzi* expresaban  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  y factor estimulador de colonias 1, mientras que en células endoteliales no infectadas la expresión era mínima o inexistente. Estos incrementos en la expresión de citoquinas producen reclutamiento de linfocitos, coagulación y proliferación de músculo liso. Estos factores pueden resultar en espasmos coronarios y trombosis.

iv) producción de anticuerpos líticos: Zwirner (1994) describe un anticuerpo monoclonal lítico para la forma infectiva de *T. cruzi*, que reconoce un epítotope común presente en el parásito y en músculo liso y estriado de ratón. La presencia de anticuerpos con capacidad lítica y con reacción cruzada con epítotos del huésped podría estar contribuyendo a la destrucción de tejido específica observada en la infección.

De confirmarse nuestra hipótesis, autoinmunidad dependiente del parásito, un probable tratamiento para la Enfermedad de Chagas pasa por un diagnóstico sensible, específico y rápido, y en el caso de los individuos crónicamente infectados, la eliminación del parásito de los tejidos. No sólo de los tejidos afectados sino también de los órganos de origen linfóide donde puede estar ocurriendo gran parte de la presentación antigénica (Theofilopoulos, 1995).

Al respecto, Viotti (1994) describe el seguimiento durante un promedio de 8 años, de 131 pacientes chagásicos crónicos tratados con benznidasol y 70 pacientes sin tratamiento. El seguimiento constó de profundos estudios clínicos. Los pacientes no tratados presentaron una mayor progresión patológica de sus electrocardiogramas con respecto a los tratados (30 % vs. 4,2 %), y un mayor deterioro de su condición clínica (17 % vs. 2,1 %). El porcentaje de pacientes tratados que seronegativizó fue del 19,1 %, mientras que los no tratados llegaron a un 6 %.

En este sentido, contar en el futuro con nuevas drogas antiparasitarias, que permitan la eliminación total del tripanosoma, y que resulten inócuas para el huésped aparece como una posibilidad promisorio. Los trabajos que se realizan actualmente y que plantean la secuenciación del genoma de *T. cruzi* (Levin y col., 1994), pueden aportar la información necesaria para lograr este propósito.

Por lo expuesto, es claro que la infección por *T. cruzi* produce en el huésped respuestas inmunológicas anómalas, como el reconocimiento de epítopes propios, la expresión aberrante de antígenos de histocompatibilidad, o la producción aumentada de citoquinas y moléculas de adhesión, entre otros. El estudio a nivel molecular de esta respuesta puede ayudar a explicar alguno de estos mecanismos. Por esto es que en la parte final de este trabajo se informan los primeros avances en el clonado y secuenciación de la cadena liviana de un anticuerpo monoclonal anti-P (ver 3.3.). Conocer las secuencias de las zonas variables de las inmunoglobulinas que reconocen epítopes propios, nos permitirá comparar a nivel molecular las diferencias entre autoanticuerpos naturales, autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes sistémicas y los autoanticuerpos que se expresan por la infección con *T. cruzi*. Esta información permitirá entender el origen de estos anticuerpos, y caracterizar los sistemas implicados en su producción, en cada una de las situaciones mencionadas.



1. Se ha desarrollado un reactivo diagnóstico, el AKJL7, que utilizado en ELISA junto con un extracto total de proteínas de *T. cruzi*, permiten una evaluación de los pacientes chagásicos con máxima sensibilidad y especificidad.
2. Existe una correlación entre los títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* y anti-AKJL7 circulantes, y la gravedad en el cuadro clínico en la enfermedad cardíaca chagásica.
3. Los resultados enunciados en 1) y 2) han permitido formular un nuevo tipo de ensayo serológico con máxima especificidad y sensibilidad, y con posibilidades de obtener indicadores sobre el estado clínico del paciente.
4. Trabajando con un importante panel de sueros de pacientes chagásicos crónicos, se mapeó el epítoto carboxiterminal de las proteínas ribosomales P. Se demuestra que para la Enfermedad de Chagas, el tercer glutámico es fundamental para la antigenicidad del epítoto lineal de 13 aminoácidos, R13.
5. Se demostró por diversas técnicas, que los anticuerpos anti-R13, generados en el curso de la infección chagásica crónica son capaces de reconocer las proteínas ribosomales P humanas. Demostramos que estos anticuerpos están dirigidos primariamente contra las proteínas P del parásito, y que reaccionan cruzadamente con las proteínas propias. Para demostrarlo se utilizaron las siguientes técnicas:
  - a) Ensayos inmunoenzimáticos.
  - b) Inmunopurificación de anticuerpos contra péptidos de *T. cruzi* y humanos.
  - c) Cálculo de constantes de afinidad.
  - d) Comparación de velocidades de disociación.

Concluimos que el mecanismo por el cual se originan estos autoanticuerpos (autoanti-P) difiere del mecanismo que los origina en la respuesta autoinmune sistémica del Síndrome de Lupus Eritematoso, y que las autoreactividades en estas dos patologías son completamente distintas.

6. Los resultados serológicos demuestran que la respuesta crónica específica anti-proteínas ribosomales P de *T. cruzi* delata la presencia constante del parásito.
7. Se ha demostrado la importancia del método de medición de autoreactividades para detectar autoanticuerpos. Así, el anticuerpo anti-R13 tiene una efectiva capacidad de unión al autoepítotope H13 que se pone de manifiesto utilizando columnas de afinidad y mediciones en tiempo real.
8. A partir de nuestros resultados, y apoyados por resultados de otros equipos, se plantea la hipótesis de una "Autoinmunidad dependiente del parásito". Es decir, el componente autoinmune observado en la Enfermedad de Chagas está directamente relacionado con la presencia del parásito en tejidos, que excita la respuesta inmunológica de manera crónica y persistente. Esta respuesta inmunológica anti-parásito es la responsable del reconocimiento cruzado de blancos propios.
9. Nuestros resultados indican que para lograr una cura parcial o total de la enfermedad se requiere la total eliminación de *T. cruzi* de los tejidos del huésped. Los resultados informados por Viotti y col. (1994), apoyan esta conclusión.

## ***BIBLIOGRAFIA***

- Acosta A. M., Sadigursky M., & Santos Buch C. A. 1983.** Anti-striated muscle antibody activity produced by *T.cruzi*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 172: 364-369.
- Acosta A. M. & Santos Buch C. A. 1985.** Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. Circulation 71: 1255-1261.
- Affranchino J. L., Ibañez C. F., Luquetti A. O., Peterson U. & Frasch A. C. C. 1989.** Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. Mol. Biochem. Parasitol. 34: 221-228.
- Altschuh, D., Dubs, M. C., Weiss, E., Zeder-Lutz, G., Van Regenmortel, M. H. V. 1992.** Determination of Kinetics Constants for the Interaction between a Monoclonal Antibody and Peptides Using Surface Plasmon Resonance. Biochemistry, 31, 6298-6304.
- Amato Neto, V. 1968.** Transmissao por transfusao de sangue en Doenca de Chagas, Cancado, R, (Ed.), Belo Horizonte, 130-142.
- Amann, E., Brosius, J. 1985.** "ATG vectors" for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. Gene 40: 183-190.
- Amons, R., Pluijms, W., Moller, W. 1979.** The primary structure of ribosomal protein eL12/eL12-P from *Artemia salina* 80S ribosomes. FEBS Lett. 104: 85-89.
- Andrade, Z., Andrade, S. 1971.** American trypanosomiasis. Pathology of protozoan and helmitic disease. Marcial Rojas R. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore, pp. 69.
- Anthony, R. L., Johnson, C. M., Sousa, O.E. 1979.** Use of micro-ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangelli*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 28: 969-973.
- Birnboim, H. C., Doly, J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmids DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523.
- Bonfa, E., Viana, V. S. T., Barreto, A. C. P., Yoshinari, N. H., Cosermelli, W. 1993.** Autoantibodies in Chagas' Disease. An Antibody Cross-Reactive with Human and *Trypanosoma cruzi* Ribosomal Proteins. The Journal of Immunology, Vol 150, 3917-3923, No. 9, May 1.

- Borda E., Pascual J., Cossio P., De la Vega M., Arana R. & Sterin-Borda L. 1984.** A circulating IgG in Chagas' disease which binds to  $\beta$ -adrenergic receptor of myocardium and modulates their activity. Clin. Exp. Immunol. 5: 679.
- Brandariz, S., Schijman, A., Vigliano, C., Arteman, P., Viotti, R., Armenti, H., Beldjord, C., Levin, M. 1995.** Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA from archival heart tissue of a chronic Chagas' heart disease reference case. Aceptado en Lancet.
- Brener, Z. 1973.** Ann. Rev. Microbiol. 27, 347-383.
- Brener, Z. & Andrade, Z. 1979.** O parásito: relacoes hospedeiro-parásito. En *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Guanabara Koogan, Río de Janeiro, 1-41.
- Santos-Buch, C. A. & Acosta, A., 1985.** Pathology of Chagas' disease. Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis. Ed. Ian Tizard, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Cabeza Meckert P. M, Juskowicz M., Chambo J. G., Levin M. & Laguens R. P. 1991.** *Trypanosoma cruzi* aberrant expression of class II major histocompatibility complex molecules in skeletal and heart muscle cells of chronically infected mice. Exp. Parasitol. 72: 8-14.
- Camargo, M. E., Rebonato, C. 1969.** Cross-reactivity in immunofluorescence for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 18: 500-505.
- Carrasco, R. L., Breniere, S. F., Poch, O., Miguez, H. V., Selaes, H., Anatezana, G., Desjeux, P., Carlier, Y. 1985.** Chagas serology and its problems. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 65: 79-84.
- Campos de Carvalho, A. C., Levin, M., Farias de Oliveira, S., Nascimento, J. H. M., Pedrosa, R. C., Lopez Bergami, P., Ferrari, I., Masuda, M. O. 1995.** Possible involvements of anti-ribosomal Tc P protein in the cardiac disturbances of chronic Chagas' disease. XX Congreso da Sociedade Brasileira de Imunologia, Angra dos Reis, Brasil.
- Catty, D. 1989.** Antibodies, volume II, a practical approach. IRL Press, 97-152.
- Cerisola, J. A., Rabinovich, A., Alvarez, M., Di Corleho, C. A., Pruneda, J. 1972.** Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre. Bol. Of. Sanit. Panam. 63: 203-221.

- Chagas, C. 1909.** Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schyzotrypanum cruzi* N. Gen., N. sp., o agente etiológico da nova entidade mórbida do homen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1: 159-218.
- Chagas, C. 1911.** Moléstia de Chagas ou tiroidite parasitária. Nova doença humana transmitida pelo "barbeiro". Segunda Conferencia na Academia Nacional de Medicina. Tipogr. Leuzinger (Rio de Janeiro) .
- Chan, P. K., Aldrich, M., Cook, R., Busch, H. 1986.** Amino acid sequences of protein B23 phosphorylation site. J. Biol. Chem. 261: 1868-1872.
- Chuit, R. 1992.** Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas. Simposio Satélite, Noviembre. Organismo Oficial del Congreso Nacional de Medicina.
- Cooper, R. 1991.** Characterization of a candidate gene for GP72, an insect stage-specific antigen of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 49: 45-60.
- Cossio P. M., Bustuoabad O., Paterno E., Arana R. M. & Pasqualini C. D. 1984.** Experimental myocarditis induced in Swiss mice by homologous heart immunization resembles chronic experimental Chagas' disease. Clin. Exp. Immunol. 28: 519-524.
- Cotrim, P., Paranhos, G., Mortara, R., Wanderley, J., Rassi, A., Camargo, M., Da Silveira, F. 1990.** Expression in *E. coli* of a dominant immunogen of *T. cruzi* recognized by human chagasic sera. J. Clin. Microbiol., 28: 519-524.
- Cotrim, P. C., Paranhos-Baccala, G., Santos, M. R, Mortensen, C., Cano, M. I., Jolivet, M., Camargo, M. E., Mortara, R. A., Da Silveira, J. F. 1995.** Organization and expression of the gene encoding an aimmunodominant repetitive antigen associated to the cytoeskeleton of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 71: 89-98.
- Cowman, A. F., Saint, R. B., Coppel, R. L., Brown, G.V., Anders, R. F., Kemp, D. J. 1985.** Conseved Sequences Flank Variable Tandem Repeats in Two S-Antigen Genes of *Plasmodium falciparum*. Cell, Vol. 40, 775-783.
- Cross, G. A. M. 1990.** Cellular and genetic aspects of antigenic variation in trypanosomes. Annual Reviews of Immunology, 8, 83-110.

**Cunha-Neto, E., Duranti, M., Gruber, A., Zingales, B., de Messias, I., Stolf, N., Belloti, G., Patarroyo, M., Pilleggi, F., Kalil, J. 1995.** Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: Biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 92, pp 3541-3545.

**Cura, E. N., de Titto, E., Segura, E. 1992.** Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas. Simposio Satélite, Noviembre. Organismo Oficial del Congreso Nacional de Medicina.

**D'avila Reis, D., Jones, E. M., Tostes, S., Reis Lopes, E., Chapadeiro, E., Gazzinelli, G., Colley, D. G., McCurley, T. L. 1993.** Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49(2), 192-200.

**D'Imperio Lima M. R., Eisen H., Minoprio P., Joskowicz M. & Coutinho A. 1986.** Persistense of polyclonal activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. J. Immunol. 137: 353.

**Damian R. Molecular mimicry: parasite evasion and host defense. 1989.** Curr. Top. Microbiol. Immunol. 145: 101.

**Dao, L. 1948.** Otros casos de Enfermedad de Chagas en el Estado de Evarico (Venezuela). Formas agudas y crónicas. Observación sobre Enfermedad de Chagas Congénita. Rev. Policl. Caracas, 17: 17-32.

**De Arruda M.V., Colli W. & Zingales B. 1989.** Terminal  $\beta$ -D-galactofuranosyl epitopes recognized by antibodies that inhibit *T.cruzi* internalization into mammalian cells. Eur. J. Biochem. 182: 413-421.

**Deuschle, U., Kammerer, W., Gentz, R., Bujard, H. 1986.** EMBO J. 5, 2987.

**Elkon, K., Bonfa, E., Llobet, R., Dnho, W., Weissbach, H., Brot, N. 1986.** Identification and chemical synthesis of a ribosomal protein antigenic determinant in systemic lupus erythematosus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7419-7423.

**Dias, J. C. P. 1987.** Control of Chagas Disease in Brazil. Parasitol. Today 3: 336-341.

- Elkon, K., Bonfa, E., Llobet, R., Dnho, W., Weissbach, H., Brot, N. 1988.** Properties of the ribosomal P2 protein autoantigen are similar to those of foreign proteins antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 5186-5189.
- Elkon K. B., Parnassa A. P. & Lee Foster C. 1985.** Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. *J. Exp. Med.* 162: 459-471.
- Engman D. M., Krause J. H., Kirchoff L. V. & Donelson J. E. 1989.** A novel flagellar Ca<sup>2+</sup>-binding protein in trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 264: 18627.
- Engman D. M., Dragon E. A. & Donelson J. E. 1990.** Human humoral immunity to hsp70 during *T. cruzi* infection. *J. Immunol.* 144: 3987.
- Ferrari, I., Levin, M. J., Wallukat, G., Elise, R., Lebesgue, D., Chiale, P., Elizari, M., Rosenbaum, M., Hoebeke, J. 1995.** Molecular Mimicry between the Immunodominant Ribosomal Protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a Functional Epitope on Human  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor. *J. Exp. Med.* Vol. 182, July 59-65.
- Frasch, A. C. C., Cazzulo, J. J., Aslund, L., Pettersson, U. 1991.** Comparison of Genes Encoding *Trypanosoma cruzi* Antigens. *Parasitol. Tod.* vol. 7, no 6.
- Friguet, B., Chaffotte, A., Djavadi-Ohanience, L., Goldberg, M. E. 1985.** Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Meth.* 77: 305-319.
- Goldenberg, S. 1991.** Use of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen in the immunological diagnosis of Chagas' disease. *Mem. Inst. Butantan* 53 (Supl 1), 71-76.
- Gottesman, M. E., Adhya, S. 1980.** Das, A. *J. Mol. Biol.* 140, 57.
- Hall, R., Hyde, J., Goman, M., Simmons, D., Hope, I., Stoker, J. 1984.** Major surface antigen of a human malaria parasite cloned and expressed in bacteria. *Nature* 311: 379-382.



- Higuchi, M. L., De Brito, T., Martins Reis, M., Barbosa, A., Bellotti, G., Pereira-Barreto, A.C., Pileggi, F. 1993.** Correlation Between *Trypanosoma cruzi* Parasitism and Myocardial Inflammatory Infiltrate in Human Chronic Chagasic Myocarditis: Light Microscopy and Immunohistochemical Findings. *Cardiovasc. Pathol.* Vol. 2, No. 2, April-June: 101-106.
- Hoare, C. A. 1972.** The Trypanosomes of Mammals, Blakwell Scientific Publications.
- Hontebeyrie-Joskowicz M., Said G., Milon G., Marchal G. & Eisen H. 1987.** L3T4+ cells able to mediate parasite-specific delayed type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur. J. Immunol.* 17:1027-1033.
- Howard, J. & Rubio, M. 1968.** Enfermedad de Chagas congénita. I. Estudio y epidemiología de 30 casos. *Bol. Chil. Parasitol.* 23: 107-112.
- Hudson, L. 1985.** Autoimmune phenomena in chronic chagasic cardiopathy. *Parasitol. Today* 1: 6.
- Huynh, T., Young, R. & Davis, R. 1985.** Constructing and screening cDNA libraries in  $\lambda$ gt10 and  $\lambda$ gt11. *DNA cloning: A practical approach.* Vol. 1, Cap.2 D.M. Glover (Ed.). IRL Press, Oxford.
- Ibañez, C., Affranchino, J., Macina, R., Reyes, M., Leguizamón, S., Camargo, M., Aslund, L., Pettersson, U., Frasch, A. 1988.** Multiple *T. cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 30: 27-34.
- Jones, E. M., Coley, D. G., Tostes, S., Lopes, E. R., Vnencak-Jones, C. L., McCurley, T. L. 1993.** Amplification of *Trypanodoma cruzi* DNA sequences from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48: 348-357.
- Joyce, C. M. and Grindley, N. D. F. 1983.** Construction of a plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1830-1834.
- Kahn, S., Kahn, M., Eisen, H. 1992.** Polyreactive autoantibodies to negatively charged epitopes following *T. cruzi* infection. *Eur. J. Immunol.* 22: 3051-3056.

- Kerner, N., Liégeard, P., Levin, M., Hontebeyrie-Joskowicz, M. 1991.** *Trypanosoma cruzi*: Antibodies to a Map-Like Protein in Chronic Chagas' Disease Cross-React with Mammalian Cytoskeleton. *Exp. Parasitology*, 73
- Khoury E. L., Ritacco V., Cossio P. M., Laguens R. Szarfman A. Diez C., & Arana R. M. 1979.** Circulating antibodies to peripheral nerve in American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.* 36: 8-15.
- Kierzembaum F. 1986.** Autoimmunity in Chagas' disease. *J. Parasitol.* 72: 201-211.
- Kirchhoff, L. 1987.** Increased specificity of serodiagnosis of Chagas' disease by detection of antibody of the 72 and 90 kilodalton glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 155, 561-564.
- Klotz, I. M. 1953.** Protein interactions, in *The Proteins* Vol. 1, ed. by H. Neurath and K. Bailey, pp. 727-806. Academic Press, New York.
- Koberle, F. 1968.** Chagas' disease and Chagas'syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* 6: 63-116.
- Kretschmann, E., Raether, H. 1968.** *Z. Naturforsch, A* 23, 2135-2136.
- Krieger, M. 1992.** Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 427-434.
- Laemmli, U. K.. 1970.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lafaille, J., Lins, J., Krieger, M., Sauton-Padrón, T., De Souza, W., Goldemberg, S. 1989.** Structure and expression of two *T. cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 35: 127-136.
- Laguens R. P., Cabeza Meckert P. M. & Gelpi R. 1981** Chronic Chagas' disease in the mouse. Morphologic and electrocardiographic patterns of the cardiopathy. *Medicina*, 41: 35-39.
- Laguens R. P., Cabeza Meckert P. and Chambó G. 1988.** Antiheart antibody-dependent cytotoxicity in the sera of mice chronically infected with *T.cruzi*. *Infect. Immun.* 56: 993-997.

- Lambrecht, F. L. 1965. Biological variations in trypanosomes and their relations to the epidemiology of Chagas' disease. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 7: 346-352.
- Lanzavecchia, A. 1995. How Can Cryptic Epitopes Trigger Autoimmunity? J. Exp. Med. Vol. 181, June.
- Laranja, F. S., Dias, E., Nobrega, G., Miranda A. 1956. Chagas' disease. A clinical epidemiologic and pathologic study. Circulation 14: 1035-1060.
- Ledesma Patiño, O., Ribas Meneclier, C., Kalalo, E., Lugones, H., Marteleur Acevedo, A., Barbieri, G. 1992. Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas. Simposio Satélite, Noviembre. Organismo Oficial del Congreso Nacional de Medicina.
- Levin, M. J., Mesri, E., Benarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy Yeyati, P., Chiale, P. A., Ruiz, A. M., Kahn, A., Rosenbaum, M. B., Torres, H. N. y Segura, E. 1989. Identification of mayor *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41, 530-538.
- Levin, M. J., Levitus, G., Kerner, N., Lafon, S., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Finkielstein, C., Chiale, P., Schejtman, D., Hontebeyrie-Joskowicz, M. 1990. Autoantibodies in Chagas' heart disease: possible markers of severe Chagas' heart complaint. Mem. Inst. Osw. Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 85 (4): 539-543, oct/dec.
- Levin, M. J., da Silveira, J. F., Frasc, A. C. C., Camargo, M. E., Lafon, S., Degrave, W. M. and Rangel-Aldao, R. 1991. Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. FEMS Micr. Immunol. 89, 11-20.
- Levin, M. J., Vazquez, M., Kaplan, D., Schijman, A.G. 1993a. The *Trypanosoma cruzi* Ribosomal P Protein Family: Classification and Antigenicity. Parasitology Today, vol. 9, no 10.
- Levin, M.J., Kaplan, D., Ferrari, I., Arteman, P., Vazquez, M., Panebra, A. 1993. Humoral autoimmune response in Chagas disease: *Trypanosoma cruzi* ribosomal antigens as immunizing agents. FEMS Microbol Medical Immunol. 7, 205-210.

Levin, M., Ferrari, I., Vazquez, M., Franco da Silveira, J., Cano, M., Degrave, W., Requena, J., Alonso, C., Zingales, B., Gonzalez, A., Hernandez, R., Ramirez, J., Aldao, R., Saumier, M., Billaut, A., Le Paslier, D., Cohen, D. 1994. Toward the Physical Map of the *Trypanosoma cruzi* Nuclear Genome. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Vol. 89, Suppl. I.

Levitus, G., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Van Regenmortel, M. H. V., Levin, M.J. 1991a. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. Clin. Exp. Immunol. 85, 413-417.

Levitus, G. 1991b. Autoinmunidad humoral en la enfermedad de chagas crónica: anticuerpos contra las proteínas ribosomales P. Tesis doctoral de la Universidad de Buenos Aires.

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

Levy-Yeyati, P. 1992. Antígenos del estadio tripomastigote sanguíneo de la cepa RA I de *Trypanosoma cruzi* y de la cepa Boytrón de *Leishmania braziliensis braziliensis*: Respuesta humoral anti HSP70 en la Enfermedad de Chagas y Leishmaniosis. Tesis doctoral de la Universidad de Buenos Aires.

Lisboa Bittencourt, A. C. 1984. Doença de Chagas congénita na Bahia. Rev. Bahiana Saude Publ. 11: 165-208.

Lofas, S., Johnsson, B. J. 1990. Chem. Soc., Chem. Commun. 21, 1526-1528.

Lopez Bergami, P. 1995. Inmunopatología del daño cardíaco en la Enfermedad de Chagas: Estudio del rol de las proteínas ribosomales P. Seminario de Licenciatura, Cs. Biológicas, FCEN, UBA.

Luquetti, A. O. 1990. Use of *Trypanosoma cruzi*-defined proteins for diagnosis-multicenter trial serological and technical aspects. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 85, 497-505.

- Mac Connell, W.P.y Kaplan, N.O. 1982.** The activity of the ribosomal phosphoproteins from the 80S rat liver ribosomes. *J. Biol. Chem.* 257: 5359-5366.
- Matsumoto, T. K., Hoshino-Shimizu, S., Nakamura, P. M., Andrade, H.F., Umezawa, E. S. 1993.** High resolution of *Trypanosoma cruzi* Amastigote Antigen in Serodiagnosis of Different Clinical Forms of Chagas' Disease. *J. Clin. Microb.* June, 1486-1492.
- Mazza, S. 1943.** Comprobaciones de *Triatoma platensis*, *Eutriatoma oswaldoi*, *Pastrongylus seai* y *Psamulester coreodes* en la provincia de Santiago del Estero, todas ellas sobre infestación por *T. cruzi*. Otros datos sobre infestación esquizotripanosómica natural silvestre de *Triatoma infestans*. *Prensa Médica Arg.* 30: 1583-1595.
- Mc Cormick T. S. & Rowland E. C. 1989.** *Trypanosoma cruzi*: cross-reactive anti-heart autoantibodies produced during infection in mice. *Exp. Parasitol.* 69: 393-401.
- Medicina.* 41:35-39.
- Mesri, E. A., Levitus, G., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Dighiero, G., Van Regenmortel, M. H. V. y Levin, M. J. 1990.** Major *Trypanosoma cruzi* determinan in Chagas' heart disease shares homology with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1219-1224.
- Minoprio P., Burlen O., Pereira P., Guilbert B., Hontebeyrie-Joskowicz M. & Coutinho A. 1988.** Most B cells in acute *T.cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* 28: 553-561.
- Moller, W. 1991.** The ribosome and translation factors. *Biochimie*, 73, 1093-1100.
- Mosca W. & Plaja J. 1985.** Delayed hypersensitivity to heart antigens in Chagas' disease as measured by in vitro lymphocyte stimulation. *J. Clin. Microbiol.* 14: 1-5.
- Moser, D., Kirchoff, L., Donelson, J. 1989.** Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1477-1482.
- Mullis, K., Faloona, F. 1987.** Specific amplification of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335.
- Oldstone M. B. 1987.** Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 5: 819.

- Orfanoudakis, G., Karim, B., Bourel, D., Weiss, E. 1993.** Bacterially Expressed Fabs of Monoclonal Tumor Necrosis Factor Alpha in vitro Retain Full Binding and Biological Activity. *Molecular Immunology*, Vol. 30, No. 16, pp. 1519-1528.
- Paranhos-Bacalla, G., Santos, M., Cotrim, P., Rassi, A., Jolivet, M., Camargo, M., Franco da Sylveira, J. 1994.** Detection of antibodies in sera from Chagas' disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. *Parasite Immunology*, 16: 165-169.
- Patterson, R. E., Horowitz, S. F. 1989.** Importance of epidemiology and biostatistics in deciding clinical strategies for using diagnostic tests: A simplified approach using examples from coronary artery disease. *JACC*, Vol. 13, 7, p1653-1665.
- Paulin J. J., Keith C. H. & Tarleton R. L. 1988.** A monoclonal antibody to alpha-tubulin recognized host cell and *T.cruzi* tubulins. *J. Protozool.* 35: 123-129.
- Peralta, J. M., Filardi, L., Lourdes, M., Torres, S. 1980.** T. cruzi antibodies in mice infected with different strains of T. cruzi. *J. Parasitol.* 66: 342-344.
- Pérez, A., Segura, E. L. 1989.** Blood transfusion and transmission of Chagas' infection in Argentina. *Rev. Argent. Trans.* 15: 127-132.
- Petry, K, Eisen, H. 1989.** Chagas' disease: a model for the study of autoimmune disease. *Parasitol. Today*, 5: 111-121.
- Pinto Días, J. C. 1979.** Mecanismos de Transmissao en *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Brener, Z. & Andrade, Z. (eds.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 152-174.
- Ptashne, M. Jeffrey, A. Johnson, A. D., Maurer, R., Meyer, B. J., Pabo, C. O., Roberts, T. M., Sauer, R. T. 1980.** *Cell*, 19, 1.
- Rassi, A., Amato Neto, V., Siqueira, A.F. 1969.** Comportamento evolutivo da reação de fixação do complemento com os antígenos na fase crônica da moléstia de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 11: 430-435.

- Ribeiro dos Santos R, Laus J. L., Mengel J. O. & Savino W. 1990.** Chronic chagasic cardiopathy: role of CD4 T cells in the anti-heart autoreactivity. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 85: 367-369.
- Ribeiro dos Santos R, Rossi, M. A., Laus J. L., Santana Silva, J., Savino W. & Mengel J. O. 1992.** Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *T. cruzi*. J. Exp. Med., 175, 29-39.
- Ribeiro dos Santos R., Marquez J. O. & Koberle F. 1979.** Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. Tropenmed. Parasit. 30: 19-23.
- Rich, B. E., Steiz, J. A. 1987.** Human acidic ribosomal proteins P0, P1 and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis and assembly. Mol. Cell. Biol. 7:4065-4074.
- Ripoll, C. M. 1992.** Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas. Simposio Satélite, Noviembre. Organismo Oficial del Congreso Nacional de Medicina.
- Romaña, C. 1963.** Enfermedad de Chagas. López Libreros Ed., Buenos Aires.
- Rosenbaum, M. B. 1964.** Chagasic myocardiopathy. Prog. Cardiovasc. Dis. 7: 99-225.
- Ruiz, A. M., Esteva, M., Cabeza Meckert, P., Laguens, R. P., Segura, E. L. 1985.** Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcelular fraction of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trópica 42, 299-309.
- Ruiz A. M., Esteva M., Subías E. & Segura E. L. 1990.** Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *T.cruzi* Immunoprotection against metacyclic trypomastigotes obtained by immunization of mice with an affinity-purified antigen. Mol. Biochem. Parasitol. 39: 117-126.
- Sadigursky M., Acosta A.M. & Santos Buch C. A.. 1982.** Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *T.cruzi* clone. Am. J. Trop.Med. Hyg. 31: 934-941
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989.** Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory press.

- Santos Buch C. A., Acosta A. M., Zweerink H. J. & Sadigursky M. 1985.** Primary muscle disease: definition of a 25 Kd polypeptide myopathic specific Chagas antigen. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 37: 334-350.
- Schejtman, D., Levitus, G., Chiale, P., Levin, M., Elizari, M., Rosenbaum, M. 1990.** Determinantes antigénicos diferenciales de *T. cruzi* en pacientes chagásicos crónicos con y sin cardiopatía. Premio Fundación Pedro Cossio 1990 de la Asociación de Cardiología Argentina.
- Schijman, A. 1992.** Familia de proteínas ribosomales P en *T. cruzi*. Tesis doctoral de la Universidad de Buenos Aires.
- Schijman A. G., Levitus G. & Levin M. J. 1992.** Characterization of the C-terminal region of a *T. cruzi* 38-kDa ribosomal P0 protein that does not react with lupus anti-P autoantibodies. *Immunol. Letters.* 33: 15-20.
- Schmuñis, G. A. & Szarfman, A. 1977.** La Enfermedad de Chagas congénita. *Medicina (Buenos Aires)* 37: 47-53.
- Schofield, C. J. 1992.** The control of Chagas disease in AMerica. Conference. XXVIII Brazilian Congress on Tropical Medecine, Belém, Brazil.
- Segura, E. L., Perez, A. C., Cura, E. N., Carlomagno, M. A. 1989.** Chagas disease: prevention of transmission by blood transfusion. Workpaper for an International Meeting on the Control of Chagas disaese, Buenos Aires, 8 p.
- Skeiky Y., Benson D. R., Parsons M., Elkon K. B. & Reed S. D. 1992.** Cloning and expression of *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal PO protein and epitope analysis of anti-PO autoantibodies in Chagas' disease patients. *J. Exp. Med.* 176: 201-211.
- Skeiky Y., Benson D. R., Guderian, J. A., Sleath, P. R., Parsons M., Reed S. D. 1993.** *Trypanosoma cruzi* Acidic Ribosomal P Protein Gene Family. Novel P Proteins Encoding Unusual Cross-Reactive Epitopes. *Journal of Immunology*, Vol. 151, 5504-5515, No. 10, Nov. 15.



- Snary D., Flint J., Wood J., Scott M. T. & Miles M. A. 1983.** A monoclonal antibody with specificity for *T.cruzi*, central and peripheral neurones and ganglia. Clin. Exp. Immunol. 54: 617-624.
- Sturm, N., Degrave, W., Morel, C., Simpson, L. 1989.** Sensitive detection and schizome classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. Mol. Biochem. Parasitol. 33: 205-214.
- Taibi A., Plumas-Marty B., Capron A. & Ouaisi A. 1993.** *T.cruzi* : immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory- secretory antigen and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. J. Immunol. 151: 2676-2689.
- Tan, E. M. 1982.** Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. Adv. Immunol. 33: 167-240.
- Tan, E. M., Chan, E. K. L., Sullivan, K. F., Rubin, R. L. 1988.** Antinuclear antibodies (ANAs): Diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. Clin. Immunol. Immunopathol. 47: 121-141.
- Tanowitz, H. B., Gumprecht, J. P., Spurr, D., Calderon, T. M., Ventura, M. C., Reventos-Suarez, C., Kellie, S., Factor, S. M., Hatcher, V. B., Wittner, M., Berman, J. W. 1992.** Cytokine Gene Expression of Endothelial Cells Infected with *Trypanosoma cruzi*. The Journal of Infectious Disease, 166: 598-603.
- Teixeira A. R., Teixeira G., Macedo V. & Prata A. 1978.** *Trypanosoma cruzi*-sensitized T lymphocyte mediated <sup>51</sup>Cr release from human heart cells in Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27: 1097-1107.
- Teixeira, A. R. L. 1994.** Autoimmunity in Chagas' disease. Ciencia e Cultura, vol. 46(5/6) september/december.
- Ternynck T., Bleux G., Gregoire J., Avrameas S. & Kanellopoulos C. 1990.** Comparison between autoantibodies arising during *T.cruzi* infection in mice and natural autoantibodies. J. Immunol. 144: 1504-1511.

- Theofilopoulos, A. N. 1995.** The basis of autoimmunity: Part I. Mechanism of aberrant self-recognition. *Immunol. Today*, Vol. 16 No. 2.
- Tibbetts R. S., Mc Cormick T. S., Rowland E. C., Miller S. D. & Engman D. M.. 1994.** Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *T.cruzi* infected mice. *J.Immunol.* 152: 1493-1499
- Todd C., Todd N. R. & Guimaraes A. C. 1983.** Do lymphocytes from chagasic patients respond to heart antigens? *Infect. Immun.* 40: 832.
- Unterkircher C. Avrameas S. & Ternyck T. 1993.** Autoantibodies in the sera of *Trypanosoma cruzi*-infected individuals with or without clinical Chagas' disease. *J. Clin. Lab. Anal.* 7: 60-69.
- Van Regenmortel, M. H. V., Briand, J. P., Muller, S., Plaue, S. 1988.** Synthetic polypeptides as antigens: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier, Amsterdam,
- Van Voorhis W. C. & Eisen H. 1989.** F1-160: a surface antigen of *T.cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. Exp. Med.* 169: 641-652.
- Velazquez, E. 1993.** Autoantibodies give false-positive reactions in serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 35.
- Vilella, M. D., Remacha, M., Ortiz, B. L., Mendez, E., García Ballesta. 1991.** Characterization of yeast acidic ribosomal phosphoproteins using monoclonal antibodies. *J. P.; Eur. J. Biochem.* 196, 407-414.
- Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H., Segura, E. 1994.** Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: Clinical and serological evolution of patients with long-term follow-up. *American Heart Journal*, vol. 127, No 1.
- Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M. E., Rassi, A. 1992.** Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. *ISBT Brazil '92*, Sao Paulo, Brazil. P 31.

- WHO.** 1991. Control of Chagas disease. Report a WHO Expert Committee, Geneva. WHO Technical Report Series 811, 95 p.
- Williams G. T., Fielder L., Smith H. & Hudson L.** 1985. Adsorption of *T.cruzi* to mammalian cells *in vitro*. Acta Trop. 42: 33-38.
- Wood J., Hudson L., Jessel T. M. & Yamamoto M.** 1982. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *T.cruzi* parasites. Nature (London) 296: 34-38.
- Wucherpfenning, K. W., Strominger, J. L.** 1995. Molecular Mimicry in T Cell-Mediated Autoimmunity: Viral Peptides Activate Human T Cell Clones Specific for Myelin Basic Protein. Cell, Vol 80, 695-705, March 10.
- Zingales B. & Colli W.** 1985. *T.cruzi*: interactions with host cells. Cur. Top. Microbiol. Immunol. 117: 129-152.
- Zingales, B.** 1990. Use of two recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas' disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 85, 519-522.
- Zinker, S. y Warner, J. R.** 1976. The ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 251: 1799-1807.
- Zwirner N. W., Malchiodi E. L., Chiaramonte M. G. & Fossati C. A.** 1994. A lytic monoclonal antibody to *T.cruzi* bloodstream trypomastigotes which recognized an epitope expressed in tissues affected in Chagas' disease. Infect. Immun. 62: 2483-2489.

***ANEXO***

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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


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

```

**Figura 37:**  
 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del antígeno JL7. Se subraya la secuencia repetitiva.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'DK' with a long diagonal stroke extending from the bottom right.

**Lic. Dan Kaplan**

A handwritten signature in black ink, clearly legible as 'Mariano J. Levin'.

**Dr. Mariano J. Levin**