

Tesis de Posgrado

Estudio molecular y funcional de la patología cardíaca inducida por inmunización con proteínas ribosomales P de Trypanosoma cruzi

López Bergami, Pablo

2000

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

López Bergami, Pablo. (2000). Estudio molecular y funcional de la patología cardíaca inducida por inmunización con proteínas ribosomales P de Trypanosoma cruzi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3234_LopezBergami.pdf

Cita tipo Chicago:

López Bergami, Pablo. "Estudio molecular y funcional de la patología cardíaca inducida por inmunización con proteínas ribosomales P de Trypanosoma cruzi". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3234_LopezBergami.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

***Estudio molecular y funcional de la patología
cardíaca inducida por inmunización con proteínas
ribosomales P de Trypanosoma cruzi***

Pablo López Bergami

*Tesis presentada para optar al Título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires*



1132341

Director: Dr. Mariano Levin

*Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI).
FCEyN, U.B.A. - CONICET.*

2000

Estudio molecular y funcional de la patología cardíaca inducida por inmunización con proteínas ribosomales P de Trypanosoma cruzi

RESUMEN

El estudio de la respuesta inmune contra las proteínas ribosomales P de *Trypanosoma cruzi* en el suero de pacientes chagásicos crónicos sugirió que esta respuesta inmune podría jugar un importante rol en el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica. En función de esos resultados se encaró una tarea de clonado de las proteínas ribosomales P2 β y P0 de *T. cruzi* en vectores procariontes con el objeto de expresar y purificar abundantes cantidades de proteínas recombinantes. Estas proteínas se utilizaron para desarrollar modelos de inmunización en ratones. En primer término se determinó la especificidad de la respuesta inducida mediante estos modelos. Luego se estudió la respuesta contra los principales epítopes de éstas proteínas localizados en el extremo C-terminal (péptido R13 en TcP2 β y P015 en TcP0). Se determinó que la respuesta contra estos epítopes fue similar a la observada en sueros humanos. Paralelamente, se realizaron estudios tendientes a determinar alteraciones en la función cardíaca de los animales inmunizados. De esta forma, mediante la realización de electrocardiogramas, se estableció el desarrollo de alteraciones en la generación del impulso nervioso (arritmias), alteraciones en la conducción intraventricular y en la repolarización. La participación de los anticuerpos anti-P en la generación de alteraciones cardíacas también fue confirmada en ensayos realizados sobre corazones aislados de conejo.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, Enfermedad de Chagas, Proteínas ribosomales P, cardiomiopatía, autoinmunidad, inmunización, respuesta humoral, electrocardiograma

Molecular and functional study of the cardiac pathology induced by immunization with ribosomal P proteins from Trypanosoma cruzi

ABSTRACT

The study of the immune response against ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in chronic Chagas disease patient's sera suggested that this immune response might play an important role in the development of Chagasic Cardiomyopathy. The molecular cloning of the ribosomal P2 β and P0 proteins allowed us to express and purify high amounts of recombinant proteins. These proteins were used to develop animal models of immunization. First, we assessed the specificity of the induced response and determining the induction of high levels of anti-P antibodies. Then, we determined that the response against the C-terminal epitopes of these proteins (peptide R13 in TcP2 β and peptide P015 in TcP0) was similar to those observed in human sera. Immunized animals showed a modified electrocardiographic pattern compared to that in control mice. The participation of anti-P antibodies in the induction of cardiac disturbances was also assessed in a whole rabbit heart isolated system.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas Disease, ribosomal P proteins, cardiomyopathy, autoimmunity, immunization, humoral response, electrocardiogram

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mariano Levin por su confianza y apoyo permanente.

Al Dr. Héctor Torres y la Dra. Mirtha Flawiá por darme la posibilidad de realizar esta Tesis en el INGEBI.

Al "grupo Chagas"

A las distintas generaciones de becarios del INGEBI

Al personal técnico y administrativo del INGEBI

Al Dr. Jorge Scaglione

Al Dr. Oscar Schwin

Al Dr. Jean-Luc Teillaud

APOYO INSTITUCIONAL

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires. Proyecto 01/TW-18

Agencia Nacional de Promoción Científica. Proyecto FONCyT BID 802/OC-AR PICT 05-00103-02030

UNDP-Banco Mundial-Organización Mundial de la Salud (OMS), Programa de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR)

Centro Argentino-Brasileño de Biotecnología (CABBIO)

Fundación Antorchas

Agencia Atómica Internacional

Programa Iberoamericano de Ciencia y Técnica para el Desarrollo (CyTED). Sub-programa III. Biotecnología.

Ministere d' Affaires Etrangeres, France, Cooperation Regionale Francaise, Embajada de Francia en Argentina.

TRABAJOS PUBLICADOS DURANTE EL PERIODO DE TESIS

- "Prevalence of anti-R13 antibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection."
Aznar C., Lopez Bergami P., Brandariz S., Mariette C., Kaplan D., Levitus G., Levin M.J. and Hontebeyrie M. FEMS Immunology and Medical Microbiology 12: 231-238, 1995.
- "Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in Lupus."
Kaplan, D., Ferrari, I., Lopez Bergami, P., Mahler, E., Levitus, G., Chiale, P., Hoebeke, J., Van Regenmortel, MHV, Levin, MJ. Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 10301-10306, 1997.
- "Immunization with recombinant *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2 β protein induces changes in the electrocardiogram of immunized mice."
Lopez Bergami, P., P. Cabeza Meckert, D. Kaplan, G. Levitus, F. Elias, F. Quintana, M. Van Regenmortel, R. Laguens and M.J. Levin. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 18, 75-85, 1997.
- "Los anticuerpos antiproteínas ribosomales P estimulan el receptor β adrenérgico en la Enfermedad de Chagas pero no en el lupus eritematoso sistémico."
Kaplan, D., Ferrari, I., Lopez Bergami, P., Mahler, E., Levitus, G., Chiale, P.A., Levin, M.J. Rev. Argent. Cardiol. 66, 127-137, 1998
- "Generation of antibodies with functional autoreactive properties in chagas disease."
Ferrari, I., Mahler, E., Kaplan, D., López Bergami, P., Quintana, F., Ghio, S., Levitus, G., Levin, M.J. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 93, S II: 83-84, 1998.
- "Functionally active cardiac antibodies in Chronic Chagas Disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens."
Masuda, M., Levin, M.J., Farias de Oliveira, S., dos Santos Costa, P., Lopez Bergami, P., Couiri Pedrosa, R., Ferrari, I., Hoebeke, J., Campos de Carvalho, A. FASEB J., 12, 1551-1558, 1998.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

aa : aminoácido	MmP0 : proteína ribosomal P0 de ratón
acril : acrilamida	NFX : nifurtimox
ADN : ácido desoxiribonucleico	PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida
ADNc : ADN copia	pb : pares de bases
ADNp : ADN plasmídico	PCR : reacción en cadena de la polimerasa
AM : anticuerpo monoclonal	PM : peso molecular
APS: persulfato de amonio	rpm : revoluciones por minuto
ARN : ácido deoxiribonucleico	RT : transcriptasa reversa
ARNm : ARN mensajero	scFv : Fragmento variable de cadena simple
ARNt : ARN de transferencia	SDS : dodesil sulfato de sodio
amp : ampicilina	SN : sobrenadante
bis : bisacrilamida	T. amb. : temperatura ambiente
BNL : benznidazole	TEMED : tetrametil-etiléndiamina
Br. et. : Bromuro de etidio	TcP2 β : proteína ribosomal P2 β de <i>T. cruzi</i>
BSA : albúmina bovina	TcP0 : proteína ribosomal P0 de <i>T. cruzi</i>
CDR : complementary determining region	<i>T. cruzi</i> : <i>Trypanosoma cruzi</i>
CFA : adyuvante completo de Freund	Tm : temperatura de hibridación
cpm : cuentas por minuto	ufc : unidades formadoras de colonias
C-terminal : carboxilo terminal	ufp : unidades formadoras de placas
D.O.: densidad óptica	V: volts
ECG : electrocardiograma	VH : región variable de la cadena pesada
EDTA : ácido etiléndiamino tetracético	Vk : región variable de la cadena liviana
ELISA : enzimoimmunoensayo de adsorción	kappa
g : aceleración de la gravedad	VL : región variable de la cadena liviana
GST : glutathion-S-transferasa	vs : versus
IFI : inmunofluorescencia indirecta	β gal : β galactosidasa
Ig : inmunoglobulina	μ g : microgramo
IgG : inmunoglobulina G	μ l : microlitro
IgM : inmunoglobulina M	μ m : micrometro
IPTG : isopropil- β -tiogalactósido	
Kda : kilodalton	
LES: lupus eritematoso sistémico	
MBP : proteína de unión a maltosa	
MCC : miocardiopatía chagásica crónica	

INDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1. GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	1
1.1.1. Reseña histórica	1
1.1.2. Epidemiología	3
1.1.3. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> y vías de transmisión	4
1.2. FASES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	8
1.2.1. Fase aguda	8
1.2.2. Fase indeterminada	9
1.2.3. Fase crónica	9
1.3. MIOCARDIOPATIA CHAGASICA CRONICA	10
1.4. DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	13
1.5. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	15
1.6. ENFERMEDAD DE CHAGAS e INMUNOSUPRESION	19
1.7. PATOGENESIS DE LA MIOCARDIOPATIA CHAGASICA CRONICA	22
1.7.1. Hipótesis no autoinmunes	22
1.7.2. Hipótesis autoinmune	23
1.7.2.1. Autoinmunidad mediada por células	24
1.7.2.2. Autoinmunidad humoral	25
1.7.2.3. Anticuerpos dirigidos contra proteínas con actividad funcional	29
1.8. ANTIGENOS DE <i>T. cruzi</i>	31
1.8.1. Antígenos involucrados en la inmunoprotección	32
1.8.2. Antígenos involucrados en la inmunopatogenia	33
1.9. PROTEINAS RIBOSOMALES P	34
1.9.1. Proteínas ribosomales P de <i>T. cruzi</i>	35
1.9.1.1. Proteína ribosomal P2 β de <i>T. cruzi</i>	36
1.9.1.2. Proteína ribosomal P0 de <i>T. cruzi</i>	37
1.10. MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	38
1.11. HIPOTESIS	40
1.12. OBJETIVO GENERAL	40
1.13. OBJETIVOS ESPECIFICOS	40

	Página
2. MATERIALES Y METODOS	42
2.1. COMPOSICION DE SOLUCIONES Y MEDIOS EMPLEADOS	42
2.2. BACTERIAS, FAGOS y PLASMIDOS	43
2.2.1. Cepas bacterianas utilizadas	43
2.2.1.1. Preparación de <i>E. coli</i> Y1090 para infección con fago λ gt11	43
2.2.1.2. Preparación de lisado de <i>E. coli</i> Y1089 lisógena	43
2.2.1.3. Preparación de bacterias competentes para transformación	44
2.2.2. Fagos	44
2.2.2.1. Fagos recombinantes	45
2.2.2.2. Amplificación de los fagos	45
2.2.2.3. Rastreo de bibliotecas construídas en λ gt11	45
2.2.2.4. Ensayo de placa de lisis	46
2.2.3. PLASMIDOS	46
2.2.3.1. Plásmido pMal-c2	46
2.2.3.2. Plásmido pGex-1 λ T	47
2.2.3.3. Plásmido pGem-T Easy	48
2.2.3.4. Plásmido pUC119-Myc	49
2.3. AMPLIFICACION DE ADNc DE FAGOS λ gt11 RECOMBINANTES POR PCR	50
2.4. ANALISIS Y PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN	51
2.4.1. Electroforesis en geles nativos de agarosa	51
2.4.2. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	51
2.4.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión	52
2.5. EXTRACCION DE ADN PLASMIDICO	52
2.5.1. En gran escala (Maxipreparaciones)	52
2.5.2. En pequeña escala (Minipreparaciones)	53
2.6. SUBCLONADO DE ADNc EN PLASMIDOS DE EXPRESION	53
2.6.1. Digestión con enzimas de restricción	53
2.6.2. Reacción de ligación	54
2.6.3. Transformación	54
2.7. ANALISIS DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES	54
2.7.1. "Quick"-Miniprep	55

	Página
2.7.2. "Colony" PCR	55
2.7.3. Rastreo radioactivo de plásmidos recombinantes	56
2.7.3.1. Marcado radioactivo de oligonucleótidos	56
2.7.3.2. Hibridación de los filtros con oligonucleótidos marcados radioactivamente	57
2.7.4. Secuenciación de ácidos nucleicos	57
2.7.5. Comparación de secuencias con bases de datos	59
2.8. EXPRESION DE LAS PROTEINAS RECOMBINANTES	59
2.8.1. Sistema λ gt11	59
2.8.2. Sistema pMal y sistema pGex	59
2.9. PURIFICACION DE LAS PROTEINAS RECOMBINANTES	60
2.9.1. Sistema λ gt11	60
2.9.2. Sistema p-Mal	60
2.9.3. Sistema pGex	61
2.9.4. Digestión enzimática de proteínas recombinantes con el factor Xa	65
2.9.5. Determinación de la concentración de proteínas	65
2.10. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLI-ACRILAMIDA	65
2.10.1. Tinción de los geles con Coomasie-blue	67
2.10.2. Patrones de peso molecular	67
2.11. ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEINAS A FILTROS DE NITROCELULOSA	67
2.12. WESTERN BLOT	68
2.13. PREPARACION DE PROTEINAS DE <i>T. cruzi</i> .	69
2.14. PREPARACION DE PROTEINAS DE CORAZON	69
2.15. ANIMALES	69
2.16. PROTOCOLOS DE INMUNIZACION	70
2.17. ANTIGENOS UTILIZADOS	70
2.17.1. Antígenos del sistema MBP	70
2.17.2. Antígenos del sistema GST	70
2.17.3. Péptidos sintéticos	70
2.18. SUEROS	73
2.18.1. Sueros de pacientes chagásicos	73
2.18.2. Sueros de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico	73

	Página
2.18.3. Sueros de ratones infectados con <i>T. cruzi</i> .	73
2.19. DETERMINACION DE ANTICUERPOS POR LA TECNICA DE ELISA	74
2.19.1. Ensayos de inhibición de la reacción de ELISA	75
2.20. TECNICA DE REEMPLAZO POR ALANINAS (ALANINE REPLACEMENT)	75
2.21. OBTENCION DE LINFOCITOS Y EVALUACION DE LA LINFOPROLIFERACION FRENTE A PROTEINAS RIBOSOMALES P Y PEPTIDOS RELACIONADOS	76
2.22. CLONADO DE REGIONES VARIABLES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	76
2.22.1. Extracción del ARN de los hibridomas y preparación del ADNc	78
2.22.2. Amplificación de las regiones variables	80
2.22.3. Análisis de las secuencias de las regiones variables	83
2.23. EXPRESION DEL scFv	83
2.24. ANALISIS HISTOPATOLOGICO	83
2.25. ANALISIS ELECTROCARDIOGRAFICOS	84
2.26. ENSAYO DE ACTIVIDAD FUNCIONAL	85
2.26.1. Aislamiento y cultivo de cardiocitos	85
2.26.2. Determinación de la frecuencia de contracción	86
2.26.3. Preparación de IgG	86
2.27. ELECTROCARDIOGRAMAS EN CORAZONES AISLADOS DE CONEJO	86
2.28. ANALISIS ESTADISTICO	87

3.	RESULTADOS	88
3.1.	CLONADO DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P DE <i>T. cruzi</i>	88
3.1.1.	Clonado de las proteínas ribosomales P en el plásmido pMal	89
3.1.1.1.	Purificación de las proteínas recombinantes con MBP	95
3.1.2.	Clonado de las proteínas ribosomales P en el plásmido pGex	98
3.1.2.1.	Purificación de las proteínas recombinantes con GST	100
3.2.	CLONADO DE AUTOANTIGENOS	103
3.2.1.	Clonado de las proteínas ribosomales P de mamífero	103
3.3.	PARAMETROS RELEVANTES PARA EL DESARROLLO DE UN MODELO DE ESTUDIO DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P	107
3.3.1.	Determinación de antígenos apropiados para el estudio <i>in vitro</i> de la respuesta inmune inducida por inmunización con las proteínas ribosomales P	107
3.3.2.	Determinación del esquema de inmunización	112
3.3.3.	Determinación de la dosis de antígeno	113
3.4.	ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL INDUCIDA POR LA INMUNIZACION CON PROTEINAS RIBOSOMALES P	115
3.4.1.	Estudio de la respuesta humoral inducida por la inmunización con la proteína MBP-TcP2 β	117
3.4.2.	Estudio de la respuesta inmune inducida por la inmunización con la proteína MBP-TcP0	123
3.4.3.	Estudio de la respuesta humoral inducida por la inmunización con la proteína MBP-MmP0	128
3.5.	CARACTERIZACION INMUNOLOGICA Y CLONADO DE LAS REGIONES VARIABLES DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 17.2	132
3.6.	COMPARACION DE LA REPUESTA OBTENIDA POR INMUNIZACION CON LAS PROTEINAS P RECOMBINANTES CON RESPECTO A LA RESPUESTA INMUNE DURANTE LA INFECCION POR <i>T. cruzi</i>	140
3.7.	ROL DE LOS ANTICUERPOS CONTRA LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P DE <i>T. cruzi</i> EN LAS ALTERACIONES CARDIACAS GENERADAS POR SUEROS DE PACIENTES CHAGASICOS	145
3.8.	EFECTO DE LA INMUNIZACION CON PROTEINAS P RECOMBINANTES EN LA INDUCCION DE ANTICUERPOS CON ACTIVIDAD FUNCIONAL CONTRA RECEPTORES CARDIACOS	150
3.9.	EFECTO DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P SOBRE LA FUNCION CARDIACA DE RATONES INMUNIZADOS	153

4.	DISCUSION	162
5.	CONCLUSIONES	176
6.	BIBLIOGRAFIA	178



1. Introducción

1.1. GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

1.1.1. Reseña histórica

En 1908 el médico brasileño Carlos Chagas fue comisionado por el Ministerio de Salud Pública del Brasil para estudiar un brote de malaria en la población de Lassance, estado de Minas Gerais. Durante su estadía, Chagas comenzó a analizar la conducta de insectos que habitaban las casas del lugar ya que sospechó que podrían actuar como transmisores de alguna enfermedad. Estos insectos eran denominados "barbeiros" por los lugareños debido a su costumbre de picar a la gente en la cara durante las horas de sueño. Chagas descubrió que estos insectos hematófagos domiciliarios estaban infectados por un *Trypanosoma* hasta ese momento desconocido, al que denominó *Schizotrypanum cruzi* en homenaje a su maestro, el Dr. Oswaldo Cruz. Al cabo de un año de trabajo Chagas, a la corta edad de 29 años, logró describir el agente etiológico, los vectores, los signos clínicos y la existencia de reservorios animales de una nueva enfermedad que posteriormente se denominó en su honor, Enfermedad de Chagas (Chagas, 1909, 1911).

"...julgamos tratar-se de uma trypanozomiase humana, molestia ocasionada pelo Schizotrypanum cruzi, cujo transmissor é o Conorrhinus sanguisuga..."
(Chagas, 1909).

1911 Carlos Chagas presenta en la Academia Nacional de Medicina evidencias de la existencia de transmisión congénita de la enfermedad.

1913 Guerreiro y Machado proponen un método para realizar el diagnóstico serológico.

1916 Carlos Chagas demuestra que el sistema digestivo también se encuentra afectado por esta enfermedad (Brener, 1989).

Luego de esta etapa inicial de grandes descubrimientos comienza un período con fuertes críticas hacia los descubrimientos de Chagas que se extiende

hasta comienzos de la década del 30. Durante este tiempo la Enfermedad de Chagas es prácticamente olvidada. La revalorización de los descubrimientos de Chagas se debe al trabajo de investigación del médico Salvador Mazza, quién impulsó la creación de un Instituto Nacional dedicado a estudiar las enfermedades regionales. En 1928, se creó oficialmente la "Misión de Estudios de la Patología Regional Argentina" (MEPRA). Durante el trabajo de Mazza en esta institución se describieron más de mil casos de esta afección (Mazza, 1934 y 1943). Las observaciones realizadas confirmaron la existencia de la Enfermedad de Chagas, impulsaron estudios epidemiológicos y aumentaron el conocimiento acerca de los síntomas y lesiones característicos de la infección.

- 1936 Mazza sugiere que por medio de transfusión sanguínea puede transmitirse la enfermedad (Mazza, 1936). Debido a esto, en la década del `40 el código Sanitario Argentino recomienda a los bancos de sangre descartar o rechazar la sangre de donantes con Enfermedad de Chagas (Battaglia, 1949).
- 1952 Se confirma el primer caso de Enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea (Freitas, 1952).
- 1953 Se describió la utilidad del Violeta de Genciana para el tratamiento de sangre contaminada (Nussenzweig, 1953).
- 1956- Laranja (1956) y Rosembaum (1964) realizan una minuciosa descripción de
1964 la miocardiopatía chagásica.
- 1980 Se inicia el clonado de material genético de *T. cruzi* con la secuenciación del ADN de minicírculo (Morel, 1980).
- 1988- Se publican los primeros resultados relacionados al clonado de antígenos
1989 de *T. cruzi*

- 1990 Los ensayos realizados en forma conjunta por organismos internacionales y laboratorios latinoamericanos demuestran la utilidad de los antígenos clonados como reactivos diagnóstico.
- 1991 Se lanza la iniciativa conjunta de los países del Cono Sur para interrumpir la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas (Kingman, 1991; Schofield, 1999).
- 1994 Se inicia el Proyecto Genoma de *T. cruzi*, encarado fundamentalmente por laboratorios sudamericanos (Degraeve, 1997; Zingales 1997).
- 1997 Los países de América Central lanzan una iniciativa conjunta para interrumpir la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas (Schofield, 1997).

Se desconoce la antigüedad de la Enfermedad de Chagas en el continente americano. Sin embargo, resulta de interés destacar que recientemente mediante técnicas de PCR se detectó la presencia de ADN de *T. cruzi* en muestras de un hombre momificado hace 4000 años (Guhl, 1999).

1.1.2. Epidemiología

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es la tercera enfermedad parasitaria en importancia, después de Malaria y Schistosomiasis en el continente americano. Actualmente existen entre 18 y 20 millones de personas infectadas y se calcula que 90 millones de personas (1/4 de la población latinoamericana) se encuentran en riesgo potencial de infección por vivir en áreas endémicas. La Enfermedad de Chagas es endémica del continente americano en una región delimitada por el paralelo 42 norte y 46 sur, es decir, desde México hasta el centro de Argentina y Chile. Se informan aproximadamente 550.000 casos nuevos de Enfermedad de Chagas por año y 50.000 muertes. Además de la valiosa pérdida de vidas humanas, se estima que la Enfermedad de Chagas produce una pérdida global anual de aproximadamente 8.156 millones de dólares debido a mortalidad temprana e incapacidad laboral en jóvenes infectados. Esta pérdida

anual equivale a un 2,5% de la deuda externa del continente en 1995 (World Bank, 1993; Moncayo, 1993; Schofield, 1991; Moncayo, 1997).

La Enfermedad de Chagas es considerada una enfermedad socioeconómica típica, inseparable de la pobreza y el subdesarrollo. Su distribución geográfica coincide con la de los insectos transmisores de hábitos domiciliarios (Romaña, 1963) y la incidencia de la enfermedad es mayor en áreas rurales, dada la gran vinculación que existe entre la proliferación de los vectores y la precariedad de las viviendas, en las cuales pueden alimentarse, guarecerse y proliferar (Santos-Buch, 1985).

1.1.3. Ciclo de vida de *T. cruzi* y vías de transmisión

Trypanosoma cruzi es un parásito correspondiente al sub-phylum Mastigophora del phylum Sarcomastigophora que comprende protozoos flagelados con una estructura mitocondrial particular, denominada kinetoplasto. Su ubicación sistemática es:

Reino: Protista	Familia: Trypanosomatidae
Phylum: Sarcomastigophora	Género: <i>Trypanosoma</i>
Sub-phylum: Mastigophora	Subgénero: <i>Schizotrypanum</i>
Clase: Zoomastigophorea	Especie: <i>cruzi</i> (Chagas, 1909)
Orden: Kinetoplastida	(Hoare, 1972).
Suborden: Trypanosomatina	

El ciclo de vida de *T. cruzi* se desarrolla en 2 tipos de hospedadores, un hospedador vertebrado y uno invertebrado (vector). El ciclo de vida selvático de la Enfermedad de Chagas comprende la interacción entre vectores salvajes invertebrados y hospedadores vertebrados en distintos ecosistemas naturales del continente americano. En el ciclo selvático generalmente existe un balance ecológico entre el parásito y sus vectores y hospedadores, ya que aparentemente el parásito no afecta a los vectores invertebrados ni a sus reservorios salvajes. El ciclo doméstico resulta del contacto entre el humano y el vector infectado debido a la colonización de ecosistemas artificiales por los vectores invertebrados y/o a la

invasión de ecosistemas naturales por parte del hospedador humano. En este ciclo, donde el hospedador vertebrado es el hombre y sus animales domésticos, el parásito puede causar un daño importante en el hospedador con altos niveles de morbilidad y mortalidad. La interacción de los ciclos selvático y doméstico ocurre como producto de distintos factores sociales y ecológicos. A modo de ejemplo de la influencia de estos factores resulta interesante destacar que en regiones selváticas de Brasil las poblaciones indígenas conviven con vectores infectados y sin embargo, los indígenas no padecen la Enfermedad de Chagas ya que el medio ambiente es preservado por la cultura nativa. Otro ejemplo es la ausencia de casos autóctonos de Enfermedad de Chagas en los Estados Unidos debido a que el progreso social no permite la existencia de ecosistemas artificiales que puedan ser colonizados por vectores infectados (Barreto, 1979).

Más de cien especies de mamíferos, incluyendo animales domésticos y reservorios silvestres pertenecientes a los ordenes Marsupialia, Edentata, Rodentia, Carnivora, Lagomorpha, Artiodactyla, Chiroptera y Primata se comportan como hospedadores vertebrados (Brenner, 1979). Se han descrito más de 80 especies de insectos pertenecientes a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae que se comportan como hospedador invertebrado de *T. cruzi*. Los géneros *Pastrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius* son los más frecuentes. El tipo de vector que transmite la enfermedad varía de acuerdo a la región geográfica considerada, siendo en Argentina, el principal *Triatoma infestans*. Del idioma quechua surge su denominación popular de "vinchuca" (Mazza, 1943).

Diversos intentos han sido realizados para clasificar y/o relacionar los distintos aislamientos de *T. cruzi* realizados en distintas partes del continente. Los métodos bioquímicos o moleculares tales como perfiles electroforéticos, análisis por esquizodemos, cariotipificación y "fingerprint" de ADN entre otros, han demostrado la gran variabilidad existente entre los distintos aislamientos de *T. cruzi*. Sin embargo, evidencias recientes indican que es posible agrupar los múltiples aislamientos de *T. cruzi* en dos linajes principales. Llamativamente, los aislamientos asignados al linaje 1 corresponden al ciclo doméstico de la enfermedad mientras que los asignados al linaje 2 corresponden al ciclo selvático (Fernandes, 1998; Macedo 1998; de Diego, 1998).

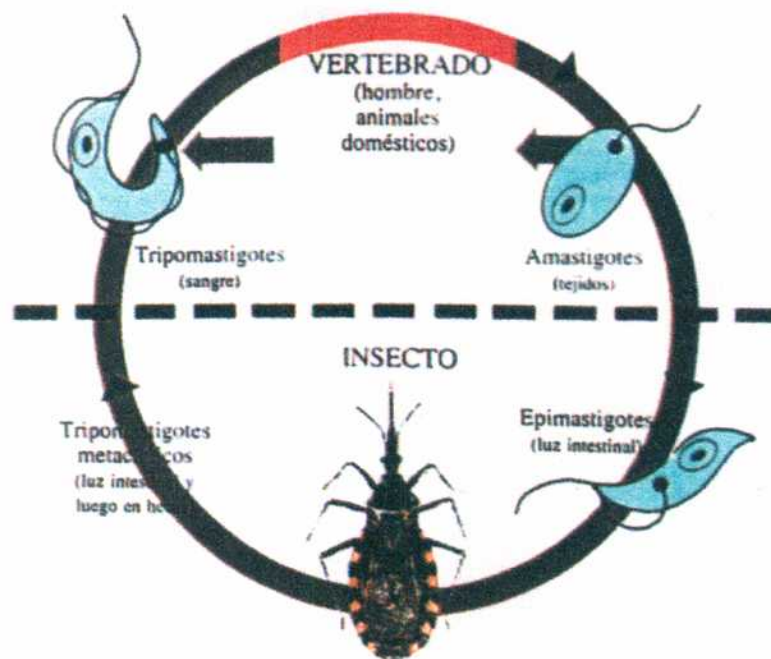
A pesar de la existencia de vías alternativas de transmisión, la infección por el vector es la verdadera causa del mantenimiento de la endemia. Estos insectos se ocultan en grietas y hendiduras del techo y las paredes de viviendas humildes y por la noche se dejan caer sobre sus habitantes para alimentarse de su sangre mientras éstos duermen. Inmediatamente después de succionar la sangre, el hematófago defeca liberando parásitos que se encuentran en el estadio de tripomastigotes metacíclicos en las heces. El prurito causado por la picadura lleva al individuo a facilitar el contacto de las heces contaminadas con la herida, favoreciendo la penetración del parásito a través de la piel. La conjuntiva ocular es otra puerta de entrada frecuente en la infección por *T. cruzi* (Romaña, 1963; Brener, 1979).

Luego de ingresar al individuo, los tripomastigotes metacíclicos invaden células de varios tejidos, donde se diferencian a amastigotes. Estos se multiplican por división binaria (cada 12 horas) diferenciándose sólo algunos de ellos en tripomastigotes. A los 4 ó 5 días la célula parasitada se rompe liberando los tripomastigotes a la circulación. Los mismos se diseminan por vía hemática e ingresan a otras células. La infección del insecto se produce durante su ingesta, por succión de las formas tripomastigotes presentes en la sangre del huésped mamífero (tripomastigotes sanguíneos). Estas pasan a la región posterior del intestino donde se transforman en epimastigotes cortos, que luego de sucesivas divisiones dan lugar a epimastigotes, responsables del mantenimiento de la infección en el huésped invertebrado. Finalmente, algunos epimastigotes alcanzan el recto y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, los cuales son eliminados con las heces del insecto y depositados sobre la piel o mucosas del mamífero. *T. cruzi* es un parásito intracelular obligado y por lo tanto debe penetrar en las células del huésped mamífero para replicarse. Sin embargo, no todas las células tienen la misma probabilidad de ser infectadas ya que el parásito posee un marcado tropismo por células de músculo esquelético, tejido cardíaco y nervioso (Santos-Buch, 1985).

Dentro de las vías alternativas de transmisión de la Enfermedad de Chagas se encuentran la transfusión sanguínea y la transmisión transplacentaria (Chagas congénito). Se estima que en algunas regiones de nuestro país aproximadamente el 20% de los donadores de sangre están infectados (Perez, 1989). En las últimas décadas el número de casos de Enfermedad de Chagas ha aumentado

considerablemente en zonas urbanas. El motivo de este cambio es la emigración permanente por motivos socio-económicos hacia centros poblados de personas infectadas residentes en zonas rurales.

CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*



Epimastigote: forma flagelada replicativa en el intestino medio del insecto vector. El flagelo emerge de la región lateral anterior respecto a la dirección del movimiento del organismo y el kinetoplasto es anterior al núcleo celular. Tripomastigote: forma flagelada no replicativa dentro de ambos hospedadores. El flagelo emerge del extremo apical posterior y el kinetoplasto es posterior al núcleo celular. Amastigotes: forma no flagelada, de localización intracelular en vacuolas ácidas y replicativa en el citoplasma del hospedador.

Una de las consecuencias de estos movimientos poblacionales es la contaminación de los bancos de sangre por donantes seropositivos que desconocen que están infectados. Se estima que aproximadamente 300.000 individuos infectados viven actualmente en San Pablo, 200.000 en Buenos Aires y 100.000 en los Estados Unidos de América. Esta migración de pacientes infectados es responsable de la detección reciente de los primeros casos de Enfermedad de Chagas en Estados Unidos. El mayor riesgo de la presencia de personas infectadas en regiones donde la Enfermedad de Chagas no es endémica o habitual se debe a que no se realizan las determinaciones correspondientes a los donantes de sangre (Schmuñiz, 1977; Wendel, 1992 y 1998). Los casos de Chagas congénito ocurren aproximadamente en el 2% y 4% de los nacimientos de madres infectadas. Las madres se encuentran usualmente en la etapa indeterminada de la enfermedad y la transmisión se asocia a complicaciones ocurridas durante el parto. La sintomatología que presentan estos niños es muy similar a la observada en la fase aguda. Finalmente, con menor frecuencia, la transmisión puede ocurrir por contaminación con heces de triatomíneos, con parásitos en cultivo, o bien con sangre de animales inoculados en el laboratorio (Santos-Buch, 1985).

1.2. FASES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

1.2.1. Fase aguda

La infección por *T. cruzi* ocurre en la mayoría de los casos durante la primera década de vida del individuo, encontrándose las mayores frecuencias en niños de hasta cinco años de edad. El período agudo puede ser asintomático o presentar algunos de los siguientes signos o síntomas: fiebre, temblores, parasitemia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, vómitos y diarrea. En un bajo número de casos (1-5%) se observa la aparición de miocarditis, generalmente reversible, caracterizada por taquicardia, cardiomegalia y disfunción cardíaca, a veces acompañada por alteraciones electrocardiográficas (Laranja, 1956; Rosenbaum, 1964; Elizari, 1993). Otros signos de importancia diagnóstica 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, conocido 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). El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas aguda se realiza por la observación de los síntomas y/o signos mencionados o mediante la detección del parásito, antígenos circulantes o anticuerpos específicos, los cuales aparecen 2 ó 3 semanas luego de la infección (Santos-Buch, 1985).

1.2.2. Fase indeterminada

Luego de uno o dos meses del comienzo de la infección desaparecen los signos y síntomas característicos de la fase aguda y el paciente entra en la fase indeterminada de la enfermedad. Durante esta etapa, caracterizada por la ausencia de síntomas, el diagnóstico se realiza mediante la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* o más difícilmente por la detección de parásitos en sangre. La mayoría de las personas infectadas permanece en este período de la enfermedad durante el resto de su vida (Santos-Buch, 1985).

1.2.3. Fase crónica

Aproximadamente un 30 % (con grandes diferencias regionales) de los pacientes que se encuentran en la fase indeterminada desarrollan muy lentamente, con el correr de los años, síntomas de daño visceral, característica fundamental de la fase crónica de la Enfermedad de Chagas. La existencia de daño visceral comienza a ser aparente entre 10 y 30 años después de la infección (Santos Buch 1985). La manifestación clínica más frecuente e importante de daño visceral en la Enfermedad de Chagas crónica es la Miocardiopatía Chagásica Crónica (Rosembaum, 1964). Otras manifestaciones de la Enfermedad de Chagas crónica observadas con menor frecuencia son los desórdenes de tipo neurológico o las formas digestivas (megasíndromes) las cuales son atribuidas a la destrucción de células del sistema nervioso vegetativo (Koberle, 1968) y alteraciones del sistema nervioso periférico (Sica *et al.*, 1986; Gonzalez Cappa, 1987; Losavio *et al.*, 1989). Al igual que el porcentaje de individuos que desarrollan la patología chagásica, la

incidencia de las distintas manifestaciones varía considerablemente con la región geográfica analizada (Santos Buch 1985).

La gran diversidad de síndromes clínicos observados en la Enfermedad de Chagas y de respuestas inmunológicas frente a la infección parasitaria ha sido atribuida tanto a factores del hospedador como a características inherentes a la cepa infectante de *T. cruzi*. Una misma cepa de *T. cruzi* puede presentar diferentes grados de virulencia en distintas especies de hospedadores (Wrightsmann, 1985; Macedo 1998). Además, una misma cepa puede provocar una enfermedad más o menos severa dependiendo de la edad y el estado fisiológico del hospedador. La importancia de la cepa parasitaria en la afección chagásica, fue evaluada en experimentos con líneas consanguíneas de ratón. Animales singeneicos presentaron perfiles immuno-bio-patológicos diferentes de acuerdo a la cepa con la cual fueron inoculados experimentalmente. Estos experimentos permitieron caracterizar distintas cepas de laboratorio con diferentes grados de virulencia. Otro factor de importancia es la cantidad de parásitos inoculados y la existencia de reinfecciones (Santos-Buch, 1985).

1.3. MIOCARDIOPATIA CHAGASICA CRONICA

La Miocardiopatía Chagásica Crónica (MCC) se manifiesta con frecuencia en la tercer o cuarta década de vida del individuo. Se trata de una enfermedad cardíaca altamente incapacitante, progresiva e irreversible prácticamente en la totalidad de los casos. 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. Esencialmente se trata de una panmiocarditis, que en estadios avanzados cursa con un marcado agrandamiento de las cavidades cardíacas, hipertrofia, deterioro de la función sistólica, disturbios en la conducción y arritmias. La MCC se caracteriza por la presencia de una necrosis microfocalizada y diseminada. Los cardiocitos se observan necrotizados o hialinizados, pero más frecuentemente se observa la presencia de cicatrices de tejido conectivo denso que reemplazan fibras necrotizadas. Este proceso se denomina fibrosis y se encuentra acompañado por la presencia de un infiltrado celular de tipo inflamatorio (células mononucleares). La localización de los infiltrados también 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) (no pudiéndose distinguir de la etapa indeterminada o asintomática). Luego de cierto tiempo el proceso se agrava por la multiplicación de los microfocos apareciendo los signos clínicos y electrocardiográficos de la MCC (Laranja, 1956; Rosembaum, 1964; Elizari, 1993).

Las anomalías más importantes observadas a nivel auricular en estos pacientes son extrasístoles, disturbios en la conducción intra-auricular y fibrilación. A nivel ventricular, los disturbios en la conducción y las arritmias son la expresión evidente del daño miocárdico. El bloqueo de rama derecha, y el hemibloqueo anterior izquierdo, separados o en forma conjunta son los problemas de conducción más comunes. Un daño mayor del sistema de conducción puede llevar a distintos grados de bloqueo aurículo-ventricular. En las zonas endémicas la observación de bloqueo de rama derecha y/o bloqueo aurículo-ventricular es una señal casi inequívoca de Enfermedad de Chagas. En los casos avanzados de MCC son frecuentes las contracciones ventriculares prematuras y repetitivas. Estas arritmias implican un mayor riesgo de eventos de muerte súbita, la cual en caso de ocurrir, representa para algunos pacientes la primera manifestación de la enfermedad (Elizari, 1993).

Las anomalías mencionadas son habitualmente detectadas en un ECG de rutina. A pesar que muchas de estas alteraciones son muy características no se debe soslayar la importancia de cierta subjetividad durante el análisis del ECG. Recientemente, en un estudio multicéntrico a ciegas seis cardiólogos de seis países de América analizaron en forma independiente 100 ECG de pacientes con MCC. La conclusión de este estudio fue que para algunas anomalías electrocardiográficas, especialmente las de baja prevalencia, se observó un bajo nivel de concordancia inter-observador, indicando que en muchos casos las alteraciones leves no son correctamente diagnosticadas. En consecuencia, se planteó un método estandarizado para la realización de los ECG con el fin de alcanzar una unificación en el diagnóstico (Elizari, 1993).

Las características distintivas de los ECG que facilitan el diagnóstico diferencial con respecto a otras cardiopatías dilatadas 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 (Laranja, 1956; Rosembaum, 1964; Elizari, 1993; Lazzari, 1998).

Como se mencionó anteriormente, el motivo del deterioro cardíaco de un paciente chagásico crónico es una miocarditis activa en constante evolución. Una de las características distintivas de la MCC es que al observar muestras de autopsias o biopsias de corazón al microscopio, raramente se encuentran nidos de amastigotes en las fibras miocárdicas (Rosembaum, 1964). A pesar que no se descarta la posibilidad 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 (Rosembaum, 1964; Koberle, 1968; Lambrecht, 1965; Andrade, 1979). En autopsias de pacientes con MCC los análisis histológicos revelaron la presencia de formas intracelulares de *T. cruzi* en varios órganos como glándula adrenal, útero, vejiga, esófago, etc (Wendel, 1992). En todos estos órganos la presencia del parásito es acompañada por reacciones inflamatorias muy leves o inexistentes, interpretadas como procesos reparativos o cicatrizantes de alteraciones producidas en la etapa aguda. Por el contrario, las progresivas lesiones y fibrosis observadas en las fibras miocárdicas sin detección histológica de parásitos y el lento curso temporal de la enfermedad indican la existencia de un proceso en permanente evolución. La existencia de una inflamación crónica activa o que evoluciona permanentemente sumada al hecho que la localización de los focos inflamatorios no coincide con la de los escasos pseudoquistes de amastigotes, condujo a la idea que en la generación de las lesiones propias de la Enfermedad de Chagas crónica se halla involucrado un componente inmunológico (Rosembaum, 1964; Koberle, 1968). Entre los fenómenos inmunológicos que podrían contribuir a la patogénesis de la enfermedad la hipótesis de la existencia de un proceso autoinmune ha recibido gran atención y base experimental (Hudson, 1985; Kierszenbaum, 1986 y 1999; Tarleton, 1999).

1.4. DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Durante el período agudo de la enfermedad, la presencia de parásitos circulantes permite el diagnóstico mediante la utilización de métodos parasitológicos directos, como la gota fresca, el Método de Strout, el microhematocrito o indirectos como el hemocultivo o el xenodiagnóstico (Ledesma Patiño, 1992).

La fase crónica cursa con una muy baja parasitemia y los métodos descriptos no permiten detectar los escasos parásitos circulantes. Es preciso, entonces recurrir a métodos serológicos de diagnóstico (Wendel 1998). Estos métodos se basan en la detección de anticuerpos contra el parásito empleando como antígeno un extracto de *T. cruzi*. Los ensayos más utilizados son: fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta y ELISA. Pese a la utilidad de estos ensayos, la complejidad y heterogeneidad de esta mezcla de antígenos permite poner de manifiesto reacciones no específicas. Así, se genera un importante número de reacciones clasificadas como falsos positivos ya que sueros de pacientes infectados con otros parásitos o con afecciones autoinmunes e incluso de dadores normales reaccionan contra el extracto de *T. cruzi* (Wendel, 1992).

En los últimos años comenzaron a emplearse proteínas purificadas de *T. cruzi* caracterizadas previamente como antígenos (Kirchoff 1987; Cooper 1991). Sin embargo, la purificación de estas proteínas resultaba muy laboriosa e ineficiente. El advenimiento de las técnicas de biología molecular permitió clonar aquellas proteínas antigénicas. Esto redundó en la descripción de numerosas proteínas que eran reconocidas por un elevado número de sueros de pacientes chagásicos. El análisis de la reactividad de estas proteínas empleando sueros de pacientes agudos y crónicos demostró la existencia de anticuerpos específicos para cada fase de la enfermedad (Levin, 1991). La mayoría de estas proteínas son reconocidas por sueros de pacientes chagásicos crónicos (Luquetti, 1990; Goldenberg, 1991; Grubert, 1993; Paranhos-Barcalla, 1994) y algunas de ellas preferentemente por pacientes en la etapa aguda de la infección (Affranchino, 1989) lo cual permite realizar un diagnóstico diferencial.

En el año 1990 y 1991 la Organización Mundial de la Salud y el CYTED organizaron ensayos multicéntricos con el fin de comparar en ensayos estandarizados y a doble ciego la potencialidad diagnóstica de varios antígenos (Moncayo, 1990; Levin, 1991). En ambos casos, los antígenos Ag1/JL7/H49, Ag2 y A13 resultaron ser excelentes marcadores de infección chagásica crónica (índice Kappa > 0.80) (Ibañez, 1988; Moncayo, 1990; Levin, 1991). El antígeno recombinante JL7 codifica para una secuencia repetitiva de 68 aminoácidos, similar a la presente en el antígeno 1 (Ibañez, 1988), en el antígeno FRA (Lafaille, 1989) y el recombinante H49 (Cotrim, 1990). Se trata de un fragmento de una proteína flagelar de *T. cruzi* de aproximadamente 300 kD (Lafaille, 1989), asociada al citoesqueleto, e involucrada en la unión del flagelo al cuerpo celular del parásito (Cotrim, 1990 y 1995).

Sin embargo, a pesar de los adelantos descriptos, el diagnóstico de rutina en las unidades hospitalarias actualmente se realiza por medio de reactivos comerciales basados en extractos de *T. cruzi*. Este tipo de ensayo diagnóstico continúa siendo utilizado a pesar de su falta de especificidad, considerables variaciones en la reproducibilidad y confiabilidad y la falta de una correcta estandarización. Recientemente, en un estudio llevado a cabo sobre 541 sueros provenientes de 9 países de Latinoamérica se comparó el valor predictivo de 6 antígenos recombinantes (H49, JL7, A13, B13, JL8, 1F8) contra los métodos tradicionales. Estos antígenos demostraron poseer en forma combinada mejor sensibilidad y especificidad que los métodos usualmente empleados. Los resultados de este estudio indican que el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas puede ser mejorado sustancialmente mediante la combinación en un kit diagnóstico de algunos de estos antígenos recombinantes de *T. cruzi* (Umezawa, 1999).

En forma paralela al perfeccionamiento de los métodos de diagnóstico inmunológicos comenzaron a desarrollarse las técnicas de diagnóstico por PCR. Estos ensayos se basan en la detección de ADN de parásito en muestras de sangre, de tejidos e incluso de preparados histológicos. Básicamente, se han desarrollado dos tipos de reacciones de PCR: una de ellas amplifica una secuencia de ADN de minicírculos (Avila, 1991) y la otra amplifica una secuencia de 188 pb de la secuencia repetitiva del ADN nuclear altamente repetitivo (Moser, 1989). Estas

secuencias son altamente específicas de *T. cruzi* y por lo tanto una de las mayores ventajas del ensayo es su gran especificidad. La sensibilidad del ensayo es también elevada habiéndose calculado que puede detectar la presencia de un solo parásito en diez mililitros de sangre. A pesar de lo promisorio que resulta este método de detección, tal vez no pueda superar la elevada sensibilidad y especificidad que brindan la nueva generación de antígenos recombinantes. Sin embargo, en algunos casos el diagnóstico de *T. cruzi* por PCR posee grandes ventajas sobre las técnicas inmunológicas. La diferencia radica en que la determinación inmunológica es un método indirecto que sólo detecta los anticuerpos anti-parásito. De esta forma el diagnóstico por PCR puede resultar más eficiente para la detección temprana de la transmisión congénita (Diez, 1998), para decidir el inicio de la terapia antiparasitaria y realizar su seguimiento (Gomes, 1999; Russomando, 1998). Recientemente, Schijman *et al.* (resultados no publicados) detectaron en un paciente transplantado la reactivación de la parasitemia en 30 días antes por PCR que utilizando los métodos convencionales.

1.5. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

El tratamiento actual de los pacientes chagásicos con miocarditis tiene como fin contrarrestar las alteraciones en el funcionamiento cardíaco generadas por la infección. Las alteraciones presentes en pacientes con Enfermedad de Chagas son en muchos aspectos similares a las observadas en pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática (CDI). En consecuencia, el tratamiento es similar en ambas enfermedades y por lo tanto los distintos tipos de arritmias y alteraciones pueden ser controladas con antagonistas β -adrenérgicos, amiodarona, verapamil, ajmalina, etc (Rosembaum, 1983; Chiale, 1984; Haedo, 1986; Mendoza, 1994).

Este tipo de tratamiento resulta paliativo y no curativo ya que en ningún caso se ataca directamente al parásito. Mas aún, al momento de aplicar esta terapia, resulta en muchos casos irrelevante el hecho de que el paciente esté infectado o no por *T. cruzi*. El tratamiento de estos pacientes con sustancias parasiticidas no se practica en forma generalizada a pesar del conocimiento de la existencia de este tipo de drogas desde hace varias décadas (Viotti, 1994).

En los últimos 20 a 30 años se han desarrollado distintos tipos de drogas antiparasitarias (tripanomicidas) y su efecto ha sido estudiado en modelos experimentales. Entre ellas pueden citarse los inhibidores de cistein proteasa (Scheidt, 1998; Engel, 1998), los nitrofuranos (nifurtimox, Bayer, recientemente discontinuado) y los nitroimidazoles (benznidazole, Roche) (de Castro, 1993). Sin embargo en vastas zonas del continente se carece de políticas claras en relación al tratamiento tripanomicida de los pacientes chagásicos. El resultado de esta situación es una gran heterogeneidad de criterios lo cual lleva a adoptar distintos tipos de tratamientos en cada centro asistencial independientemente de una política nacional o regional (Fragata Filho, 1995; Coura, 1996). En nuestro país, por ejemplo, las normas de aplicación de estas drogas tripanomicidas datan del año 1983 (Normas para Atención Médica del Infechado Chagásico, Ministerio de Salud y Acción Social, Buenos Aires, Argentina, 1983). A pesar que esta norma recomendó procedimientos para tratar los casos agudos de la enfermedad, estas recomendaciones no fueron de uso generalizado.

Desde hace varios años existe cierto grado de consenso en que las drogas tripanomicidas se deben usar en la fase aguda (independientemente de que la ruta de infección haya sido congénita, vectorial, transfusional o accidental) y en pacientes inmunosuprimidos o transplantados. (Fragata Filho, 1995; Coura, 1996; Luquetti, 1997). Esta actitud se encuentra respaldada por abundante evidencia experimental. En el caso de pacientes agudos, generalmente niños, el tratamiento con nifurtimox (NFX) o benznidazole (BNL) provocó elevados porcentajes de seroconversión y de eliminación total del parásito (Moya, 1985; Shikanai-Yasuda, 1990; de Andrade, 1996; Russomando, 1998; Sosa Estani, 1998). Algunos de estos ensayos fueron realizados por organismos dependientes de la autoridad sanitaria nacional (en Argentina, el Instituto Nacional Fátala Chaben) (de Andrade, 1996; Sosa Estani, 1998) lo cual hace pensar que en el corto plazo este criterio será adoptado como política oficial. En el caso de pacientes chagásicos transplantados o infectados con el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) se observó que el tratamiento con NFX o BNL impidió la reactivación del parásito (de Carvalho, 1996).

A diferencia del tratamiento de pacientes en la fase aguda, existe gran controversia acerca del tratamiento antiparasitario de los casos sub-agudos,

crónicos e indeterminados, es decir la gran mayoría de los pacientes chagásicos (Fragata Filho, 1995). Los principales argumentos en contra de la aplicación de estas drogas son la existencia de efectos colaterales y la convicción de una buena parte de la comunidad médica que este tipo de tratamiento es improductivo para pacientes que en su mayoría nunca desarrollarán la enfermedad (indeterminados). En el caso de los pacientes crónicos resulta más difícil explicar el origen de la resistencia a la aplicación del tratamiento tripanomicida. Sin duda, uno de los motivos principales es que aún se debate la presencia del parásito en los corazones de los pacientes chagásicos con MCC. En efecto, durante años se aseveró que la presencia de pseudoquistes de amastigotes en el corazón era escasa y que su localización no coincidía con la de los focos inflamatorios. De acuerdo con esta evidencia, si el parásito no juega un rol importante en la patogénesis de la MCC, la aplicación del tratamiento tripanomicida no redundará en ningún beneficio para el paciente. Sin embargo, nuevas evidencias sugieren la presencia del parásito en el corazón de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica. Entre estas evidencias pueden citarse la detección de parásitos en las lesiones cardíacas mediante inmunohistoquímica, PCR y PCR "in situ" (Jones, 1993; Higuchi, 1993; Brandariz, 1995, Olivares-Villagomez, 1998) y la reactivación de la infección en pacientes inmunosuprimidos (por transplante, infección por HIV o tratamientos con corticoides) (Rassi, 1998). Mediante el uso de PCR también se observó recientemente en ratones infectados con *T. cruzi* una absoluta correlación entre la persistencia de parásitos y la presencia de lesiones en tejido muscular (Zhang, 1999).

En conjunto, estos resultados revalorizan el rol del parásito y sugieren que *T. cruzi* tiene una gran importancia en la patogénesis de la MCC. Estas nuevas evidencias, reclaman atención y proponen una profunda revisión de los criterios actuales relacionados a la aplicación de tratamientos antiparasitarios en pacientes con Enfermedad de Chagas crónica (Levin, 1993). Dado que estos pacientes son los principales afectados por esta enfermedad es obligación de la comunidad científica y médica determinar urgentemente la utilidad de estos tratamientos sobre la calidad y expectativa de vida de los mismos. Al respecto, en el transcurso de las últimas dos décadas se han realizado en forma aislada, fundamentalmente en Brasil, ensayos clínicos con Benznidazole y Nifurtimox en pacientes chagásicos en el estadio crónico o indeterminado de la enfermedad. Los resultados de estos

tratamientos no fueron uniformes y la eficacia del tratamiento varió entre distintas áreas geográficas, probablemente debido a las diferencias en la cepa infectante. A pesar de ello, se observaron importantes porcentajes de seroconversión y eliminación del parásito (Cancado, 1975; Schenone, 1981; Ferreira, 1990; Levi, 1996; Coura, 1997; Apt, 1998). Además, se observó que la administración de estas drogas genera efectos colaterales como anorexia, vómitos y dermatopatias alérgicas, pero se ha descrito un método alternativo para administrar BNL que reduce los efectos colaterales (Carpintero, 1983). A pesar de la escasa experiencia en este tema en nuestro país, Viotti *et al.* (1994) trataron 131 pacientes con BNL y realizaron un seguimiento a lo largo de diez años. En el transcurso de este trabajo se observó una marcada reducción en la aparición de ECG patológicos, un menor progreso hacia cardiopatías, un menor deterioro clínico y seronegativización o disminución en los niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi*. La conclusión general de estos ensayos es que si bien estas drogas no son ideales el resultado es alentador y su administración resulta de utilidad para los pacientes con Enfermedad de Chagas crónica o indeterminada. Recientemente, varios años después de obtenidas las citadas evidencias experimentales, el Ministerio de Salud de nuestro país, revisó la norma original y aprobó un nuevo procedimiento (Resolución N° 28/99 Secretaría de Programas de Salud, Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación). Este nuevo procedimiento recomienda la aplicación de Benznidazol en pacientes en la etapa aguda o indeterminada de la Enfermedad de Chagas y pacientes con "forma cardíaca incipiente asintomática". También se recomienda el tratamiento en casos de accidente con material contaminado con *T. cruzi*.

A pesar del avance que implica la aplicación del Benznidazole, es necesaria la aparición de drogas más específicas contra el parásito. Sin embargo, la falta de interés de los laboratorios farmacéuticos en el desarrollo de estas drogas así como la falta de fondos de las Agencias de investigación y Universidades Nacionales de los países latinoamericanos conspira contra el objetivo de obtener mejores drogas (Coura, 1996). No obstante, recientemente se observó que drogas utilizadas habitualmente en el tratamiento de infecciones causadas por hongos (Urbina, 1996; Urbina, 1998) también poseen actividad antiparasitaria. Estas drogas pertenecen a la familia de inhibidores de la biosíntesis de esteroides e inhiben la enzima esteroide C14 α demetilasa. Como *T. cruzi* no puede usar el abundante colesterol presente

en su hospedador mamífero, la inhibición de la síntesis de esteroides endógenos impide su proliferación y supervivencia. En ensayos realizados en ratones infectados con distintas cepas de *T. cruzi* se observó que estas drogas eran entre 3 y 4 órdenes de magnitud más potentes que BNL y NFX para la eliminación del parásito. También se determinó que poseen amplio espectro y baja toxicidad lo cual podría ser alentador en el tratamiento de la Enfermedad de Chagas (Urbina, 1999 ; Molina, 2000).

1.6. ENFERMEDAD DE CHAGAS e INMUNOSUPRESION

Cuando el avance del daño cardíaco no puede ser detenido se llega a lo que se denomina fase final de la MCC donde el nivel de insuficiencia cardíaca es tal que la vida del paciente corre grave peligro. En estos casos, la única terapia posible es el trasplante cardíaco. En nuestro país no se ha realizado este tipo de tratamiento en pacientes chagásicos ya que se lo consideró contraindicado debido a la posible recurrencia de la infección por la inmunosupresión. Sin duda, otros factores que contribuyen a esta situación es la escasa concientización sobre la donación de órganos y el elevado costo de la operación, inaccesible para la mayoría de los pacientes chagásicos. En Brasil, sin embargo, este tipo de operaciones se realiza con mayor frecuencia y a la fecha se han realizado más de 70 trasplantes de corazón a pacientes con Enfermedad de Chagas en los últimos 15 años (Stolf, 1994 ; de Carvalho, 1996 ; Bocchi, 1996).

Durante el trasplante cardíaco el paciente debe ser sometido a tratamientos inmunosupresores para disminuir el riesgo de rechazo del nuevo corazón. En el caso de los pacientes chagásicos esta situación plantea un nuevo e interesante escenario desde el punto de vista científico: la infección por *T. cruzi* en un hospedador inmunosuprimido. En los primeros trasplantes de este tipo se observó, al igual que ocurre en ratones inmunosuprimidos, una reactivación de la infección (Tarleton, 1994 y 1996). Las manifestaciones clínicas observadas durante esta reactivación presentan características propias, ya que hay elevada parasitemia como en la fase aguda y un gran daño visceral como en la fase crónica (Bocchi, 1996; Luquetti, 1997). Por este motivo, durante mucho tiempo la realización de trasplantes de corazón a pacientes chagásicos fue desaconsejada.

Recientemente, de Carvalho *et al.* (1996) realizaron un análisis retrospectivo de todos los trasplantes cardíacos llevados a cabo en la Universidad de San Pablo. En todos los casos los pacientes fueron tratados en forma simultánea con ciclosporina y azathioprina (tratamiento inmunosupresor) y también con benznidazole para inhibir la reactivación del parásito. Sorprendentemente, el porcentaje de rechazo en los pacientes chagásicos fue significativamente menor que en los pacientes no chagásicos operados en idénticas condiciones. Más aún, en los pacientes chagásicos que produjeron eventos de rechazo éstos fueron menos severos que en los no chagásicos. La expectativa de vida de estos pacientes (65% en 10 años) fue similar a las habituales para este tipo de operaciones, observándose una evidente mejora en su calidad de vida (Amato, 1997). El tratamiento con benznidazole previno en forma efectiva la reactivación del parásito.

Por su parte, Bocchi *et al.* (1996) realizaron trasplantes de corazón en dos grupos de pacientes tratados con benznidazole y distintas dosis de ciclosporina. En el grupo de pacientes tratados con bajas dosis de ciclosporina los resultados fueron similares a los descriptos por de Carvalho, mientras que en el grupo de pacientes tratados con mayores dosis de ciclosporina se observó reactivación del parásito en el 55% de los casos. Estos resultados indican que ante la depresión del sistema inmune el parásito no puede ser controlado y reanuda su ciclo de proliferación. Por consiguiente, para evitar la reactivación de la enfermedad es necesario realizar el tratamiento antiparasitario y además implementar un tratamiento inmunosupresor que no sea muy agresivo. La eficacia del tratamiento con BNZ también ha sido demostrada en el caso de pacientes chagásicos que recibieron trasplante de médula (Altclas, 1996), riñón e hígado (Jardim, 1994).

En función de las citadas evidencias experimentales, el Ministerio de Salud de nuestro país (Resolución N° 28/99 Secretaría de Programas de Salud, Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación) recomendó aplicar el tratamiento con Benznidazole en todos los trasplantes de órganos donde intervenga un paciente chagásico u órganos provenientes de pacientes chagásicos.

Otra situación de inmunosupresión en la cual se produce la reactivación de la Enfermedad de Chagas es el caso de pacientes VIH positivos infectados con *T. cruzi*. En estos pacientes se observó una alta frecuencia de reactivación de la Enfermedad de Chagas, que en un considerable número de casos (25%) condujo a una severa enfermedad cardíaca. Se ha informado que en este proceso de reactivación el parásito puede afectar además del corazón, el sistema nervioso y digestivo. En estos casos el tratamiento con BNZ redujo la parasitemia, estabilizó el estado clínico y controló el daño cardíaco en estos pacientes (Sartori, 1998 y 1998a). Estos resultados plantean la necesidad de que *T. cruzi* sea incluido en la lista de patógenos oportunistas que afectan a pacientes inmunocomprometidos por SIDA (Ferreira, 1997).

Una de las características más llamativas de la miocardiopatía chagásica crónica es la relativa ausencia de *T. cruzi* en las regiones lesionadas de los tejidos afectados. Con el transcurso de los años esta observación se repitió sistemáticamente y se transformó en una de las características de la infección más claramente demostradas. Sin embargo, estas observaciones fueron realizadas empleando microscopía óptica de limitada sensibilidad. En los últimos años el advenimiento de técnicas más sensibles como inmunohistoquímica y PCR permitió demostrar que en realidad el parásito se encuentra presente en las lesiones. En el mismo sentido, los resultados obtenidos en pacientes inmunosuprimidos debido a la infección por VIH o a la realización de transplantes concuerdan en demostrar la presencia de *T. cruzi* en el paciente infectado. La reactivación del parásito en un hospedador inmunosuprimido también se ha demostrado en pacientes no chagásicos que reciben órganos de pacientes chagásicos. En estos casos el trasplante de riñón (de Faria, 1993; Carvalho, 1997) e hígado (Vázquez, 1993) provenientes de pacientes de zona endémica provocó la reactivación del parásito y la transmisión de la Enfermedad de Chagas a los pacientes que recibieron el órgano transplantado. Estos resultados indicarían que si bien el organismo no es capaz de erradicar al parásito, éste es controlado por el sistema inmune.

1.7. PATOGENESIS DE LA MIOCARDIOPATIA CHAGASICA CRONICA

En el transcurso de los 90 años transcurridos desde la descripción de la Enfermedad de Chagas en 1909 varias teorías han sido sugeridas para explicar su patogénesis. En las últimas dos décadas han predominado las hipótesis que sostienen la existencia de procesos autoinmunes en la generación de la enfermedad. Sin embargo, en forma esporádica, continúan publicándose trabajos que defienden teorías no autoinmunes que tuvieron gran auge en los años '60 y '70. Entre estas teorías, la que recibió mayor atención es la hipótesis neurogénica.

1.7.1. Hipótesis no autoinmunes

Una de las primeras ideas desarrolladas para explicar el origen de las lesiones observadas en la forma cardíaca y digestiva de la Enfermedad de Chagas fue la hipótesis neurogénica. Esta hipótesis postula que el agrandamiento y dilatación del órgano son consecuencia de la destrucción selectiva por el parásito de neuronas postganglionares con control autónomo sobre el órgano afectado. La destrucción de la inervación parasimpática llevaría a una dominancia no compensada del sistema simpático, haciendo a las células cardíacas hipersensibles a los efectos de las catecolaminas. Sin embargo, este tipo de denervación también puede ser observado en otras afecciones cardíacas. Este resultado y la falta de correlación entre la ubicación de estas lesiones y la presencia del parásito ha llevado a pensar que el daño neuronal es una consecuencia antes que una causa de la MCC (Davila, 1989). Efectivamente, estudios morfológicos y funcionales recientes sugieren que las anomalías en el sistema simpático y parasimpático están precedidas por daño en el miocardio y disfunciones en el ventrículo izquierdo (Davila, 1998).

Por otra parte, se ha postulado que alteraciones en la microcirculación cardíaca que lleven a isquemias pueden ser causa de daño en el tejido cardíaco (Rossi, 1984). La evidencia a favor de esta hipótesis es la observación de hipoperfusión en regiones de vasculatura normal, sugiriendo que los problemas de circulación pueden preceder y generar el daño del tejido cardíaco (Tanowitz, 1996; Rossi, 1997).

Existe una tercer teoría que sostiene que los granulocitos (eosinófilos y neutrófilos) inicialmente reclutados para eliminar restos celulares y/o parásitos podrían degranularse y causar mayor daño tisular. El mayor daño tisular generaría un reclutamiento adicional de granulocitos amplificando el efecto de destrucción tisular (Kierszenbaum, 1996). Esta hipótesis surgió de la observación de correlación entre el número de eosinófilos en los infiltrados inflamatorios y la severidad de las lesiones (Molina, 1987).

1.7.2. Hipótesis autoinmune

A pesar de que el mismo Carlos Chagas (1934) y otros autores en la década del 40 (Margariños Torres, 1941) postularon la existencia de "...una reacción alérgica del huésped contra *T. cruzi* que destruye las células cardíacas...", durante la mayor parte de este período la hipótesis autoinmune no recibió mucha atención. Hacia mediados de los años 70 se publicaron algunos trabajos que hacían referencia a la existencia de mecanismos autoinmunes en la Enfermedad de Chagas. En esos trabajos se describió la presencia de anticuerpos contra antígenos de endocardio, vasculares e intersticiales (EVI) (Cossio, 1974), contra vainas de Schwann de nervios periféricos (Khoury, 1979), contra retículo sarcoplasmático de músculo estriado (Acosta, 1983; Santos Buch, 1985a) y contra cerebelo de rata (Ribeiro dos Santos 1979) en sueros de pacientes chagásicos. Varios años después, los autores de algunos de esos trabajos (Cossio, 1974; Khoury, 1979) debieron retractarse al advertir la naturaleza heterofílica de los anticuerpos anti-EVI y anti-tejido nervioso (Khoury, 1983). Esto condujo a una revisión de todos aquellos trabajos en los que se utilizaron sistemas alogeneicos, llegando a la conclusión de que en muchos casos los anticuerpos detectados en realidad reaccionaban contra antígenos no humanos presentes en los preparados animales utilizados. A pesar de ello, dichas investigaciones, lograron focalizar la atención de parte de la comunidad científica sobre la posibilidad de la existencia de fenómenos autoinmunes en la Enfermedad de Chagas. Los resultados de este cambio de pensamiento se comienzan a ver hacia mediados de la década del 80, cuando un gran número de trabajos informa de manera más convincente la participación de fenómenos autoinmunes en la Enfermedad de Chagas (Hudson, 1985; Kierszenbaum, 1986; Petry, 1989). En el transcurso de los últimos 15 años se

han acumulado evidencias experimentales para establecer la importancia de los fenómenos autoinmunes en la patogénesis de la Enfermedad de Chagas, a punto tal que actualmente es la hipótesis más aceptada para explicar la etiología de la MCC (Kierszenbaum, 1999; Tarleton, 1999). Sin embargo, menor es el acuerdo en cuanto a los diferentes componentes del sistema inmune (celulares y humorales) que estarían involucrados en la MCC.

1.7.2.1. Autoinmunidad mediada por células

Se ha demostrado la existencia de linfocitos de pacientes chagásicos capaces de proliferar en presencia de extractos de corazón humano (Todd, 1983; Mosca, 1985), así como de ejercer un efecto citotóxico sobre células cardíacas fetales humanas (Texeira, 1978). Acosta y Santos Buch (1985) demostraron la acción citolítica de linfocitos de ratones infectados sobre fibras miocárdicas singeneicas. Hontebeyrie *et al.* (1987) observaron que linfocitos T CD4⁺ provenientes de ratones crónicamente infectados inducían una reacción de hipersensibilidad retardada anti-*T. cruzi* al ser transferidos a ratones vírgenes de infección. Asimismo, se observó que la inoculación de estos linfocitos en nervios ciáticos de animales singeneicos provocaba reacciones inflamatorias comparables a las encontradas en la Enfermedad de Chagas crónica experimental.

Otro modelo que ha resultado útil en el estudio de las reacciones inmunológicas contra el corazón es el desarrollado por Ribeiro dos Santos *et al.* (1992). Este modelo consiste en el implante subcutáneo de corazones de ratones BALB/c recién nacidos en la oreja de ratones singeneicos. El corazón implantado generalmente inicia su actividad contráctil 7 días después de realizado el implante. Cuando los implantes fueron realizados en animales infectados crónicamente con las cepas altamente virulentas Y o Colombia de *T. cruzi* se observó, al cabo de 20 días, que los injertos eran completamente rechazados. Por el contrario, en animales controles no infectados o infectados con cepas no virulentas los implantes persistieron más de un año. Utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD4 o anti-CD8 se demostró que los anticuerpos anti-CD4 prevenían el rechazo del implante. Más aún, la inoculación de células CD4⁺ provenientes de ratones infectados con cepas virulentas en orejas de ratones singeneicos con implante de corazón indujo

rápidamente el rechazo del mismo (Ribeiro dos Santos, 1990). Sin embargo, Tarleton *et al.* (1997) no pudieron reproducir estos resultados al realizar los implantes en ratones C3H/HeSnJ y C57BL/6J infectados crónicamente con las cepas Brasil y Sylvio X10/4 ya que los corazones implantados no fueron rechazados. Por el contrario, los corazones fueron rechazados sólo si el implante se realizaba en el período agudo de la infección. Llamativamente, las células involucradas en este rechazo fueron linfocitos T CD8⁺.

1.7.2.2.Autoinmunidad humoral

Las distintas teorías que explican el origen de los autoanticuerpos en la Enfermedad de Chagas crónica son la activación policlonal B, el mimetismo molecular y la liberación de autoantígenos.

La teoría de la activación policlonal B sostenida por el grupo de Coutinho, afirma que la infección por el parásito produce una alteración del sistema inmune que provoca una expansión inespecífica e indiscriminada de linfocitos B, incluyendo los autorreactivos (D'Imperio Lima, 1986). En el marco de esta hipótesis este grupo informó la presencia de linfocitos B y T activados en ratones infectados con *T. cruzi*. La respuesta inmune desarrollada es de tipo policlonal y además la mayor parte de las células B activadas no reaccionan contra antígenos de *T. cruzi* y si lo hacen contra antígenos murinos (D'Imperio Lima, 1985; Minoprio, 1988).

Ternynck *et al.* (1990) analizaron los autoanticuerpos producidos durante la infección experimental en comparación con los autoanticuerpos naturales presentes en ratones normales. Se observó 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 indicando 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 los determinantes antigénicos hacia los cuales estaban dirigidos. Las alteraciones del sistema inmune descritas han sido explicadas postulando una posible liberación de

mitógenos inespecíficos por parte del parásito o por la depleción de células inmunorregulatorias (Minoprio, 1989). Sin embargo, ninguno de estos procesos ha podido ser establecido. En un caso de infección accidental por *T. cruzi* descrito por Grauert *et al.* (1993), se observó elevados niveles de anticuerpos contra *T. cruzi*, así como también contra laminina, tubulina, seroalbúmina bovina, mielina, tubulina y actina al día 17 post infección. Sin embargo el título de anticuerpos contra estos antígenos comenzó a descender al día treinta. Estos resultados constituyen el primer caso documentado de activación policlonal B en la fase aguda de la infección humana. A pesar de la evidencia descripta, es necesario resaltar que tales alteraciones en la respuesta B no han podido ser observadas aún en pacientes en el estadio crónico de la Enfermedad de Chagas.

Las otras teorías que explican la existencia de autoanticuerpos en la Enfermedad de Chagas son la existencia de mimetismo molecular y la liberación de autoantígenos. El término mimetismo molecular hace referencia a la similitud entre moléculas o fragmentos de moléculas de *T. cruzi* y de su hospedador a nivel de su estructura conformacional o de su secuencia aminoacídica (Oldstone, 1987; Damian, 1989; Oldstone, 1998). La existencia de mimetismo a nivel molecular sería la causa por la cual las células y los anticuerpos dirigidos inicialmente contra antígenos parasitarios finalmente reaccionarían contra antígenos propios, jugando de esta forma, un rol accidental pero determinante en la patogénesis de la Enfermedad de Chagas (Eisen, 1991; Oldstone, 1998).

La existencia de epítopes compartidos por *T. cruzi* y tejidos de mamífero ha sido claramente demostrada por diferentes autores. Se ha informado la existencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas del parásito capaces de reaccionar contra estructuras del mamífero tales como proteínas neuronales (Wood, 1982; Snary, 1983) o musculares (Zwirner, 1994). Otras proteínas que presentan mimetismo molecular son algunas proteínas flagelares (Engman, 1989), proteínas de choque térmico (Engman, 1990), tubulina (Paulin, 1988) y proteínas ribosomales P (Levin, 1989; Schijman, 1992a; Skeiky, 1992).

Van Voorhis y Eisen (1989) identificaron una proteína flagelar de tripomastigotes de *T. cruzi* de 160 KDa (Fl-160) mediante el rastreo de una

biblioteca de ADNc con suero de un ratón crónicamente infectado. Los anticuerpos anti-FI-160 reconocían además una proteína de 48 Kda presente en tejido nervioso y ausente en extractos proteicos de corazón, músculo, hígado y riñón. Los autores observaron asimismo que el 44% de los sueros chagásicos reconocían FI-160 y plantearon la posibilidad de que los anticuerpos anti-FI-160 estuvieran involucrados en la producción del daño neuronal observado ocasionalmente en pacientes con Enfermedad de Chagas. Sin embargo, posteriormente no se encontró correlación entre la capacidad de los sueros de pacientes chagásicos de reconocer FI-160 y el estado clínico del paciente (Van Voorhis, 1991). Utilizando una estrategia similar, Kerner *et al.* (1991) aislaron un antígeno recombinante de *T. cruzi* denominado K1-7, con alta homología con la proteína asociada a microtúbulos (MAP, "microtubule-associated protein"). El antígeno no sólo era reconocido por sueros de pacientes chagásicos sino que estos anticuerpos anti-K1-7 reaccionaban en forma cruzada con proteínas de citoesqueleto de *T. cruzi* y de fibroblastos, así como también con preparaciones de microtúbulos de cerebro bovino. Interesantemente, anticuerpos monoclonales específicos contra microtúbulos de cerebro bovino eran capaces de reaccionar con el antígeno recombinante K1-7 de *T. cruzi*. Por otra parte, la localización citoplasmática de K1-7 implica que su interacción con el sistema inmune del hospedador requiere la destrucción del parásito. Al respecto, McCormick *et al.* (1993) demostró que anticuerpos presentes en suero de ratones infectados reaccionaban con una proteína citoplasmática de 43-45 Kda presente en corazón y músculo esquelético. Mc Cormick y Rowland (1989) señalaron la aparición de anticuerpos anti-miocardio durante la fase aguda y crónica de la infección experimental y a través de ensayos de absorción demostraron que los antígenos reconocidos estaban presentes tanto en extractos de tripomastigotes como de miocardio y músculo estriado, pero ausentes en músculo liso. Luego se precisó que las proteínas blanco de esta reacción eran la miosina y desmina (Tibbetts, 1994).

Más recientemente, Cunha Neto *et al.* (1995) informaron en un controvertido trabajo la presencia de anticuerpos contra la cadena pesada de miosina cardíaca (CMHC) en el 100% de los sueros provenientes de dadores normales, pacientes chagásicos agudos y pacientes chagásicos crónicos. Anticuerpos anti-CMHC aislados a partir del 61% de los sueros de pacientes crónicos y del 9% de los

sueros de pacientes agudos estudiados reconocieron una proteína de *T. cruzi* de aproximadamente 116 KDa denominada B13, la cual no fue reconocida por anticuerpos anti-miosina provenientes de los dadores normales. La secuencia de homología entre la proteína B13 y la CMHC fue identificada en el hexapéptido AAALDK de CMHC (la proteína B13 posee la secuencia AAAGDK). Los autores propusieron que la reactividad anti-miosina observada en sueros de dadores normales y pacientes chagásicos se debe a la presencia de anticuerpos naturales, los que difieren en su especificidad contra miosina. Mientras que la reactividad anti-miosina pudo ser inhibida al preincubar los sueros provenientes de pacientes chagásicos (crónicos y agudos) con el péptido AAAGDK de B13, no ocurrió lo mismo con los sueros normales. En ese trabajo no se estableció si la reactividad observada en el 39% de los sueros chagásicos que no reconocen B13 pero si miosina se debe a los anticuerpos naturales. Es necesario destacar que la baja reactividad contra B13 observada en los sueros provenientes de pacientes chagásicos no es muy distinta a la observada en sueros de pacientes con cardiomiopatía idiopática dilatada y otras cardiopatías, lo cual plantea ciertos interrogantes sobre las conclusiones alcanzadas. Los resultados mencionados contrastan totalmente con los obtenidos por Tibbets *et al.* (1994) quienes observaron que el suero proveniente de ratones hiperinmunizados con un extracto de corazón o con miosina purificada no reaccionaba por Western blot con ninguna proteína de *T. cruzi*. Recientemente, Baig *et al.* (1997) refutaron los resultados de Cunha Neto *et al.* (1995) en un trabajo donde se estudiaron 15 pacientes crónicos y agudos de Argentina. Ninguno de los sueros estudiados presentó anticuerpos contra tejido cardíaco en general y contra miosina en particular. Sueros de dadores normales provenientes de Argentina y Europa presentaron 0% y 3,5% de reacción contra antígenos proteicos de corazón.

Es necesario hacer la salvedad que ciertas discrepancias encontradas por diferentes grupos de investigadores pueden deberse a la utilización de distintas cepas de parásitos o de ratones y en el caso de los estudios llevados a cabo en humanos a diferencias regionales. Sin embargo, en ciertas oportunidades se ha dado el caso de no poder reproducir resultados obtenidos por otros laboratorios. En estas ocasiones sería necesario intercambiar muestras entre los laboratorios antes de poder sacar alguna conclusión acerca de los resultados (Kierszenbaum, 1999).

Otra de las hipótesis elaboradas para explicar la generación de autoanticuerpos es la teoría de la liberación de autoantígenos. Esta teoría propone que los autoanticuerpos se generarían contra antígenos propios que se encuentran secuestrados en el interior de las células y que se verían expuestos al sistema inmune a raíz del daño tisular producido por la MCC (Williams, 1985). Esta hipótesis explicaría la presencia de anticuerpos contra proteínas estructurales altamente conservadas como laminina, espectrina, tubulina en el suero de pacientes chagásicos (Unterkircher, 1993). En algunos casos no es sencillo determinar cuál fue el mecanismo por el que se originaron los autoanticuerpos, ya que la teoría de la liberación de autoantígenos tiene algunas similitudes con la hipótesis del mimetismo molecular. La diferencia entre ambas teorías radica en que en un caso la aparición del autoanticuerpo es posterior a la injuria cardíaca (teoría de liberación de autoantígenos), mientras que en el otro caso es anterior al daño cardíaco (teoría de Mimetismo Molecular). Además, en esta última la proteína que inicia la respuesta inmune pertenece a *T. cruzi*, mientras que en la teoría de liberación de autoantígenos, la proteína que estimula al sistema inmune pertenece al hospedador mamífero.

1.7.2.3. Anticuerpos dirigidos contra proteínas con actividad funcional

En el año 1984 Borda *et al.* informaron que la incubación de inmunoglobulinas (Igs) provenientes del suero de pacientes chagásicos con preparaciones de aurícula de rata producía un aumento en la contractilidad, que podía ser revertido por antagonistas β -adrenérgicos. Posteriormente el mismo grupo informó que las Igs de pacientes chagásicos inhibían la unión de [3 H]dihydroalprenolol a membranas de miocardio de rata, comportándose como un inhibidor no competitivo. Mijares *et al.* (1996) utilizaron Igs provenientes de ratones infectados para detectar la actividad de canales de Ca^{++} de tipo L sobre cardiocitos de cobayos. Los anticuerpos provenientes de ratones en la etapa aguda de la infección activaron los canales de Ca^{++} vía la activación de receptores β -adrenérgicos. Mientras tanto, anticuerpos provenientes de ratones en la etapa crónica de la infección redujeron las corrientes de Ca^{++} por activación de receptores muscarínicos. Elies *et al.* (1996) utilizaron péptidos correspondientes a los rulos extracelulares de distintos receptores cardíacos y determinaron por ELISA y por

BIAcore la existencia de una alta prevalencia de anticuerpos dirigidos contra el receptor muscarínico M2 y en menor medida contra los receptores β 1 adrenérgico y β 2 adrenérgico en suero de pacientes chagásicos. Las IgG de estos pacientes mostraron un efecto cronotrópico positivo sobre cardiocitos de rata en cultivo. Este efecto aumentaba en presencia de atropina y se anulaba en presencia de bisoprolol indicando que dicho efecto se debía a la activación de receptores β 1-adrenérgicos y muscarínicos. Sorprendentemente, el efecto cronotrópico positivo era anulado al preincubar las IgG con el péptido AESEE derivado de la proteína ribosomal P0 de *T. cruzi* (Ferrari, 1995), demostrando así la existencia de reacción cruzada entre ese péptido y la secuencia AESDE ubicada en el segundo rulo extracelular del receptor β 1 adrenérgico e identificada como el sitio de unión de los anticuerpos al receptor. Por su parte el efecto cronotrópico positivo que presentan los sueros de pacientes con Cardiopatía Idiopática Dilatada (Fu, 1993) no fue inhibido por el péptido AESDE indicando la existencia de distintas especificidades en el reconocimiento del segundo rulo del receptor β 1 en pacientes con distintas patologías.

Goin *et al.* (1994) inmunopurificaron Igs de sueros de pacientes y ratones chagásicos con especificidad hacia un péptido interno del segundo rulo extracelular del receptor muscarínico. Estas IgG reconocieron por Western blot una proteína de tamaño similar al receptor muscarínico en extractos de aurícula de rata. Además, estas IgG produjeron una disminución en la contractilidad, un aumento en los niveles de GMPc y una disminución en los niveles de AMPc de cardiocitos en cultivo. Todos estos efectos fueron inhibidos mediante el agregado de atropina. La existencia de anticuerpos anti-receptor muscarínico en un 89% de los pacientes chagásicos asintomáticos con disfunciones del sistema nervioso autónomo establece una posible correlación entre la presencia de estos anticuerpos y los síndromes disautonómicos en la Enfermedad de Chagas. Al respecto, Perez Leirós *et al.* (1997) demostraron que IgGs de pacientes chagásicos se unen al receptor muscarínico en células CHO que expresan el receptor M2, provocando disminución en la unión de agonistas y parcial desensibilización. Además se determinó que este tipo de anticuerpos se encontraba presente en pacientes chagásicos con bradicardia (Goin, 1999). También se ha descrito la presencia de anticuerpos contra este receptor pero dirigidos contra el tercer bucle intracelular (Retondaro, 1999). Recientemente se observó la presencia de anticuerpos contra el receptor

nicotínico de acetilcolina en suero de pacientes chagásicos. Estos anticuerpos fueron capaces de inhibir la unión de α -bungarotoxina al receptor. Además se observó una correlación positiva entre la presencia de anticuerpos contra el receptor de acetil-colina en el suero y un deterioro de la transmisión neuromuscular de los pacientes, sugiriendo una posible participación de estos anticuerpos en la generación de las alteraciones neuromusculares observadas en la Enfermedad de Chagas (Goin, 1997).

Como se ha detallado es vasta la evidencia experimental a favor de la existencia de anticuerpos en pacientes con Enfermedad de Chagas con capacidad de reconocer receptores cardíacos y tener un efecto funcional sobre ellos. Estos resultados han llevado a proponer la existencia de una asociación entre la existencia de tales anticuerpos y el estado clínico del paciente. El siguiente paso en esta línea de pensamiento debería ser establecer en forma directa la significancia real de estos anticuerpos in vivo (Kierszenbaum, 1999).

1.8. ANTIGENOS DE *T. cruzi*

La necesidad de implementar estrategias de vacunación, diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Chagas junto con el desarrollo de las técnicas de ADN recombinante y de anticuerpos monoclonales permitió, durante los últimos veinte años, la identificación y caracterización de un gran número de proteínas de *T. cruzi*, algunas de ellas con actividad enzimática y otras con propiedades antigénicas. Estas proteínas fueron clonadas a partir de librerías de expresión genómica o de ADNc del parásito, por rastreo con sueros policlonales humanos o de animales infectados, o con anticuerpos monoclonales (Ibañez, 1988; Frasch, 1991).

La respuesta inmune hacia el parásito puede dividirse en una respuesta efectora lítica, una respuesta irrelevante, una respuesta protectora y una respuesta patológica. Si bien esta es una división operacional es lógico pensar que los diferentes tipos de respuesta son provocados por distintos tipos de antígenos de *T. cruzi* (Brener, 1979). Mas aún, la respuesta inmune humoral característica de la etapa aguda estaría dirigida hacia antígenos diferentes de los que serían blanco de

mitógenos inespecíficos por parte del parásito o por la depleción de células inmunorregulatorias (Minoprio, 1989). Sin embargo, ninguno de estos procesos ha podido ser establecido. En un caso de infección accidental por *T. cruzi* descrito por Grauert *et al.* (1993), se observó elevados niveles de anticuerpos contra *T. cruzi*, así como también contra laminina, tubulina, seroalbúmina bovina, mielina, tubulina y actina al día 17 post infección. Sin embargo el título de anticuerpos contra estos antígenos comenzó a descender al día treinta. Estos resultados constituyen el primer caso documentado de activación policlonal B en la fase aguda de la infección humana. A pesar de la evidencia descripta, es necesario resaltar que tales alteraciones en la respuesta B no han podido ser observadas aún en pacientes en el estadio crónico de la Enfermedad de Chagas.

Las otras teorías que explican la existencia de autoanticuerpos en la Enfermedad de Chagas son la existencia de mimetismo molecular y la liberación de autoantígenos. El término mimetismo molecular hace referencia a la similitud entre moléculas o fragmentos de moléculas de *T. cruzi* y de su hospedador a nivel de su estructura conformacional o de su secuencia aminoacídica (Oldstone, 1987; Damian, 1989; Oldstone, 1998). La existencia de mimetismo a nivel molecular sería la causa por la cual las células y los anticuerpos dirigidos inicialmente contra antígenos parasitarios finalmente reaccionarían contra antígenos propios, jugando de esta forma, un rol accidental pero determinante en la patogénesis de la Enfermedad de Chagas (Eisen, 1991; Oldstone, 1998).

La existencia de epítopes compartidos por *T. cruzi* y tejidos de mamífero ha sido claramente demostrada por diferentes autores. Se ha informado la existencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas del parásito capaces de reaccionar contra estructuras del mamífero tales como proteínas neuronales (Wood, 1982; Snary, 1983) o musculares (Zwirner, 1994). Otras proteínas que presentan mimetismo molecular son algunas proteínas flagelares (Engman, 1989), proteínas de choque térmico (Engman, 1990), tubulina (Paulin, 1988) y proteínas ribosomales P (Levin, 1989; Schijman, 1992a; Skeiky, 1992).

Van Voorhis y Eisen (1989) identificaron una proteína flagelar de tripomastigotes de *T. cruzi* de 160 KDa (Fl-160) mediante el rastreo de una

la respuesta inmune durante la etapa crónica (Stolf, 1990). Las IgM presentes durante la etapa aguda reaccionan principalmente con proteínas de superficie, mientras que la respuesta de los pacientes crónicos (mayormente IgG) está dirigida principalmente contra proteínas citoplasmáticas, aunque ciertas proteínas de superficie siguen siendo reconocidas (Araujo, 1988; Stolf, 1990).

De esta forma, los blancos moleculares de la respuesta humoral lítica son principalmente antígenos de superficie de tripomastigotes sanguíneos o metacíclicos. Estos anticuerpos son capaces de proteger al hospedador ya que se unen a parásitos vivos y los lisan en conjunción con el sistema del complemento. En el transcurso de la infección la actividad de los anticuerpos líticos declina rápidamente (Krettli, 1982) mientras que los anticuerpos contra antígenos irrelevantes persisten durante años en el paciente infectado. La respuesta "irrelevante" hace referencia a anticuerpos dirigidos en general contra antígenos citoplasmáticos cuya presencia muchas veces no depende de la existencia de una infección activa. Estos anticuerpos son los detectados en los ensayos serológicos clásicos.

1.8.1. Antígenos involucrados en la inmunoprotección

Teniendo en cuenta la existencia de una respuesta inmune humoral protectora durante la infección chagásica y que *T. cruzi* no experimenta variación antigénica como otros tripanosomátidos, se han encarado diversas formas de vacunación, utilizando preparaciones de parásitos muertos o atenuados así como glicoproteínas de superficie, proteínas flagelares, enzimas y fracciones subcelulares del parásito (Wizel, 1998). La eficacia de estas vacunas ha sido evaluada en ratones mediante el desafío con cepas virulentas de *T. cruzi*. En la mayoría de estos ensayos se ha descrito cierto grado de protección contra el desafío experimental. Sin embargo, los resultados de ninguno de ellos han sido suficientemente satisfactorio (Brener, 1997).

Una nueva tendencia en el desarrollo de vacunas es la inoculación con ADN desnudo de un determinado gen del parásito. Recientemente se ha desarrollado una vacuna empleando el gen que codifica para la enzima transialidasa (Costa,

1998). Esta enzima de *T. cruzi* cataliza la transferencia de residuos de ácido siálico de los glicoconjugados del huésped a la superficie del parásito. Estos residuos estarían involucrados en la interacción e infección de las células del mamífero hospedador (Schenkman, 1994). La inducción de anticuerpos específicos podría impedir la actividad de la enzima y por lo tanto la entrada del parásito a la célula. Sin embargo, los niveles de protección frente al desafío con *T. cruzi* obtenidos con esta vacuna de ADN no fueron los esperados. Tampoco se obtuvieron resultados satisfactorios utilizando la enzima recombinante como vacuna (Pereira-Chioccola, 1999).

1.8.2. Antígenos involucrados en la inmunopatogenia

La generación de lesiones cardíacas similares a las observadas en la Enfermedad de Chagas mediante la inmunización de animales con parásitos muertos fue demostrada por Muniz *et al.* (1947). Estos resultados demostraron hace más de 50 años que las proteínas de *T. cruzi* son capaces por si mismas de generar miocarditis, en ausencia de parásito vivo. En ese momento se postuló, que ciertos antígenos de *T. cruzi* activaban los linfocitos, los cuales desarrollaban una actividad citotóxica contra células nerviosas y/o cardíacas. En procura de identificar dichos antígenos involucrados en la patogenia se desarrollaron modelos experimentales de inmunización con fracciones subcelulares de *T. cruzi*.

Texeira *et al.* (1974, 1975) demostraron que las lesiones cardíacas y el proceso inflamatorio fue más intenso en los animales inoculados con una fracción enriquecida en ribosomas, polirribosomas, microfilamentos y lisosomas pequeños. Por su parte se observó que los linfocitos de conejos inmunizados con la fracción compuesta de núcleos y membranas plasmáticas y la compuesta de lisosomas y fragmentos de mitocondrias y retículo endoplásmico eran capaces de lisar fibras musculares infectadas y no infectadas (Texeira, 1974). Experiencias realizadas en ratones por Ruiz (1985) mostraron que la mayoría de los ratones inmunizados con la fracción microsomal (análoga a la fracción ribosomal) desarrollaron miocarditis inflamatoria mientras que los inmunizados con la fracción citosólica mostraron predominantemente alteraciones en el electrocardiograma. Esto indicaría que los mecanismos involucrados en la generación de la miocarditis y la destrucción del

sistema de conducción del impulso eléctrico son diferentes dado que son provocados por inmunización con fracciones antigénicas distintas (Ruiz, 1985). De Titto (1983, 1985) midieron la respuesta inmune humoral y celular de pacientes chagásicos contra estas fracciones del parásito. Se demostró que el título de anticuerpos contra la fracción microsomal y la respuesta linfoproliferativa hacia la fracción citosólica son mayores en pacientes chagásicos con cardiopatía, sugiriendo una asociación entre la respuesta inmune contra estas fracciones y la patología cardíaca. Las evidencias citadas indicarían que los antígenos citoplasmáticos y mas aún los correspondientes a la fracción microsomal estarían implicados en la producción de lesiones cardíacas. Sin embargo, han sido escasos los avances realizados en la identificación de las proteínas involucradas en este proceso. Hasta la fecha, sólo se ha propuesto a las proteínas ribosomales P y una proteína homóloga a la miosina cardíaca como los únicos antígenos de *T. cruzi* involucrados en patogenia.

1.9. PROTEINAS RIBOSOMALES P

La subunidad mayor de todos los ribosomas posee una prolongación lateral que está formada por varias copias de proteínas pertenecientes a la familia de proteínas ribosomales P. En eucariontes, esta familia está compuesta por tres polipéptidos denominados P0, P1 y P2. P0 es una fosfoproteína ácida de 38 KDa y P1/P2 son fosfoproteínas ácidas cuyos PM varían entre 10 y 18 KDa. 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 (Vidales, 1981; Levin 1993a).

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 eucariontes 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, 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

eucariontes analizadas y que el epítotope C-terminal se encuentra altamente conservado. En bacterias, esta región de la proteína L12 muestra una gran movilidad, confiriendo la capacidad de rotar y de ser expuesto como epítotope (Moller,1991). Sin embargo, las células eucarióticas han desarrollado un sistema de proteínas P más evolucionado en cuanto a que existe un grado importante de diversidad en el número de proteínas. En mamíferos hay tres genes diferentes de proteínas ribosomales P (Rich, 1987; Wool, 1991), en levaduras hay cinco genes (Remacha, 1988) y existen al menos 10 genes en *T. cruzi* (Levin, 1993a). Asimismo, en eucariotas la proteína ácida ribosomal debe ser fosforilada para que sea ensamblada dentro del ribosoma (Naranda, 1991). En eucariotas superiores, se ha identificado residuos de serina ubicados en un entorno ácido en el extremo C-terminal como los sitios de fosforilación por caseína kinasas (Chan, 1989).

1.9.1. Proteínas ribosomales P de *T. cruzi*

Se han informado las secuencias completas de ADNc que codifican las cuatro proteínas ribosomales P de *T. cruzi*: P-JL5 o TcP2α de 107 aminoácidos (Schijman, 1990), TcP1 de 109 aa (Vázquez, 1992), TcP2β de 112 aa (Vázquez, 1992a) y TcP0 de 321 aa (Schijman, 1992).

La comparación de secuencia revela un origen común y sugiere que la región C-terminal de P0 podría haber sido derivada de una copia extra del gen de la proteína L7/L12-P2 que se fusionó con la parte terminal del gen relacionado con L10 (Ramírez, 1989). 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. P1 y P2 se desvían del consenso C-terminal, ya que la típica serina es reemplazada por un ácido 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, 1993a).

<i>T. cruzi</i> P0	P A A A A E P E E E D D D D D F G M G A - L F -
<i>T. cruzi</i> P1	P A A A A A K K - E E E E E D D D M G F G L F D
<i>T. cruzi</i> P2β	P A A A D A K K - E E E E E D D D M G F G L F D
<i>H.sapiens</i> P2	E K K D E K K E E S E E S D D D M G F G L F D

Estos cambios de aminoácidos producidos en una región altamente conservada en la escala evolutiva probablemente sea una de las causas por la cual las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* son muy antigénicas en la Enfermedad de Chagas.

1.9.1.1. Proteína ribosomal P2 β de *T. cruzi*

El primer trabajo en el que se señaló la existencia de anticuerpos contra las proteínas ribosomales P data del año 1989. En ese trabajo se determinó que el antígeno recombinante JL5 era un importante marcador serológico (Levin, 1989). Posteriormente se determinó que el antígeno JL5 codificaba para un péptido de 35 aminoácidos correspondiente a la porción C-terminal de una proteína ribosomal P de *Trypanosoma cruzi* (Mesri, 1990). Este antígeno se obtuvo al rastrear con el suero de un paciente chagásico con cardiomiopatía una biblioteca de *T. cruzi* construida en el fago λ gt11. Este antígeno resultó de particular interés ya que fue reconocido por un alto porcentaje de sueros de individuos chagásicos con cardiomiopatía, mientras que no reaccionaba con suero de pacientes chagásicos sin evidencias de compromiso cardíaco. Otros antígenos, en cambio, fueron reconocidos por sueros de pacientes chagásicos independientemente de la existencia o no de compromiso cardíaco (Levin, 1989).

El undecapéptido C-terminal de JL5, denominado R11 (EDDDMGFGLFD), contiene una homología del 90% con respecto al correspondiente en la proteína ribosomal P humana, denominado H11 (SDDDMGFGLFD) (Rich, 1987; Mesri, 1990). Esta observación resultó de gran importancia ya que dicho péptido constituye el epítipo reconocido por los anticuerpos anti proteínas P presentes en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), una enfermedad autoinmune (Elkon, 1985; Bonfa, 1986). Esta homología planteaba la posible existencia de una reacción cruzada entre la proteína ribosomal P de *T. cruzi* y la humana. Efectivamente, se demostró la naturaleza autoinmune de los anticuerpos anti-JL5 al comprobarse su capacidad de reconocer en Western blot la proteína ribosomal P humana de 17 KDa (Levitus, 1991). Mas aún, se determinó que el principal epítipo de JL5 estaba definido por los 13 aminoácidos C-terminales (R-13, EEEDDDMGFGLFD). Se encontró además, que niveles elevados de anticuerpos

anti-R13 estaban invariablemente asociados con las formas más severas de cardiomiopatía chagásica. En consecuencia, el anticuerpo anti-R13 sería un excelente marcador inmunológico de daño miocárdico con inflamación activa y ello podría tener importantes implicancias pronósticas (Schejtman, 1990). En forma paralela se identificó el clon recombinante λ gt11-S23, que contenía la secuencia de JL5 y codificaba casi la totalidad de la proteína ribosomal P2 β , careciendo solamente de los 5 aminoácidos N-terminales (López Bergami, 1997).

Se observó además que la reactividad anti-R13 presente en el suero de pacientes chagásicos era mayor que la observada contra el péptido humano correspondiente H13 (EESDDDMGFGLFD) (Mesri, 1990; Levitus, 1991). Este perfil de respuesta sólo puede ser obtenido por la exposición al sistema inmune de la proteína parasitaria. Por lo tanto, este resultado llevó a postular, a pesar de la escasa evidencia histológica, la presencia del parásito en el individuo infectado crónicamente. En la actualidad esta hipótesis ha sido confirmada con el uso de técnicas altamente sensibles como la PCR mediante la cual se logró amplificar secuencias del parásito a partir de cortes de corazones de pacientes chagásicos (Jones, 1993; Brandariz, 1995). De esta manera la respuesta anti-parásito instalada en el individuo con Enfermedad de Chagas crónica podría generar una respuesta secundaria autorreactiva asociada con el daño tisular (Levin, 1993; Tarleton, 1999).

1.9.1.2. Proteína ribosomal P0 de *T. cruzi*

Mediante el empleo de una estrategia similar a la utilizada para el aislamiento de la proteína ribosomal P2 β se clonó el antígeno recombinante CH3. Este antígeno corresponde a la proteína ribosomal P0 de *T. cruzi* (Schijman, 1992). Sorpresivamente, los anticuerpos anti-proteínas P de pacientes lúpicos no reconocían este antígeno en ensayos de Western blot. Este resultado indicó que probablemente la secuencia del extremo C-terminal difería de la secuencia consenso. Efectivamente al secuenciar el ADNc de CH3 se obtuvo la secuencia C-terminal FGMGALF (Schijman, 1992). Esta secuencia difiere considerablemente del motivo P consenso MGFGLFD. Posteriormente se determinó que la secuencia de aminoácidos ácidos localizada próxima al extremo C-terminal de TcP0, y

especialmente el péptido P0β (AEDEE) poseía homología con una región del segundo rulo del receptor β1-adrenérgico.

Receptor M2	V	R	T	V	E	D	G	E	C	Y	I	Q	F	F	S	N	A	A	V	T	F	G	T			
β1(H26R)	H	W	W	R	A	E	S	D	E	A	R	R	C	Y	N	D	P	K	C	C	D	F	V	T	N	R
TcP0		A	A	A	A	E	D	E	E	E	D	D	D	D	D	D	F	G	M	G	A	L	F			

La existencia de esta semejanza llevó a realizar una serie de experimentos que demostraron la reacción cruzada entre TcP0 y el segundo rulo extracelular del receptor β1 (Ferrari, 1995). El reconocimiento de P0 por anticuerpos presentes en el suero de pacientes chagásicos fue inhibido por los péptidos derivados de P0 y H26R. No se observó inhibición con un péptido correspondiente al segundo rulo extracelular del receptor β2-adrenérgico humano o con un péptido no relacionado. Además, la reducción del efecto cronotrópico positivo sobre cardiocitos de ratas neonatales producido por anticuerpos inmunopurificados contra H26R fue bloqueado por antagonistas β1 específicos y el péptido P0β. Estos resultados prueban que *T. cruzi* es capaz de inducir una respuesta autoinmune funcional contra el receptor cardiovascular humano β-adrenérgico a través de un mecanismo de mimetismo molecular (Ferrari, 1995).

1.10. MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Los primeros modelos experimentales que reprodujeron la historia natural de la Enfermedad de Chagas se establecieron en la década del 60 (Kumar, 1969). Posteriormente, se han descripto distintos modelos experimentales de infección con *T. cruzi* en ratón (Laguens, 1980, 1981, Rossi, 1984), rata (Revelli, 1980), conejos (Texeira, 1975), perros (Andrade, 1984) y primates (Bolomo, 1980). En todos estos modelos experimentales se observó la presencia de infiltración mononuclear en corazón y la degeneración de los cardiocitos con subsecuente fibrosis. Estas alteraciones fueron similares a las observadas en la MCC humana (Rosembaum, 1964). De todos los modelos disponibles el mejor estudiado es el modelo de ratón ya que se han determinado alteraciones histopatológicas y electrocardiográficas similares a las halladas en los pacientes chagásicos utilizando distintas cepas de *T. cruzi* y distintas cepas de ratones (Postan, 1986 y 1987 ; Sadigursky, 1986;

Andrade 1987). Estos estudios revelaron que las principales alteraciones electrocardiográficas observadas en ratones infectados crónicamente con *T. cruzi* fueron: bloqueo aurículo-ventricular de primer grado, cambios en la conducción intraventricular, taquicardia y bradicardia (Sadigursky, 1986).

1.11. HIPOTESIS

La hipótesis de este trabajo de investigación es que anticuerpos específicos contra las proteínas ribosomales P de *Trypanosoma cruzi* generados durante la infección desempeñarían un rol en la patogénesis de la Enfermedad de Chagas. Se propone que durante la Miocardiopatía Chagásica Crónica, la respuesta inmune anti-proteínas P podría contener un componente autorreactivo que contribuiría a la generación de alteraciones cardíacas características de esta infección crónica.

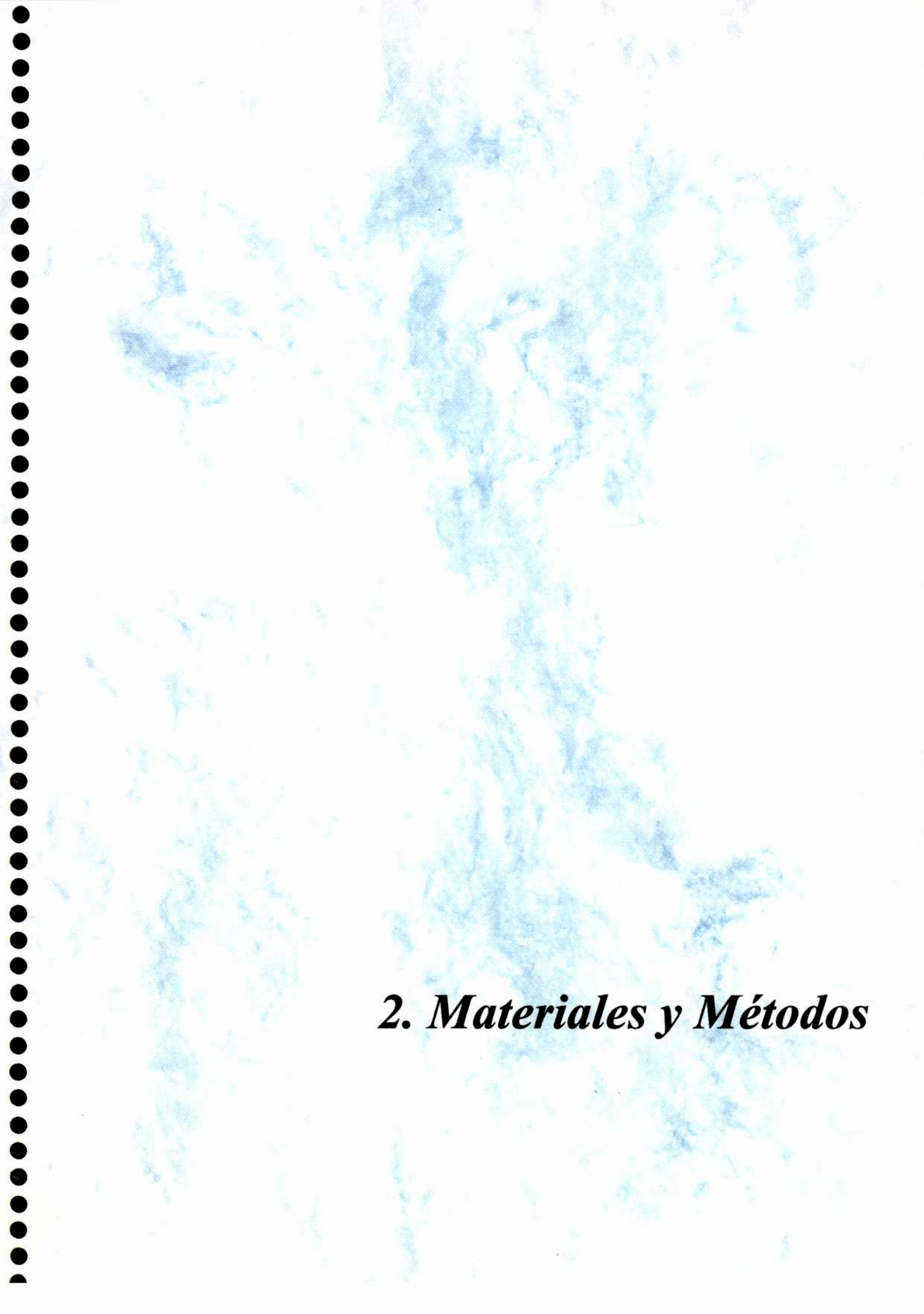
1.12. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo de investigación es determinar si es posible reproducir algunos de los fenómenos que caracterizan la fisiopatología de la Miocardiopatía Chagásica Crónica mediante la inducción de anticuerpos contra las proteínas ribosomales P de *Trypanosoma cruzi* por inmunización con proteínas recombinantes purificadas.

1.13. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Clonado, expresión y purificación de las proteínas ribosomales P2 β y P0 de *T. cruzi* (TcP2 β y TcP0) y de las proteínas ribosomales P de ratón (MmP0) para ser utilizadas en la inmunización de ratones y en ensayos inmunológicos.
2. Caracterización de la respuesta inmune inducida por la inmunización con las proteínas recombinantes TcP2 β , TcP0 y MmP0.
3. Caracterización de los epítopes de las proteínas ribosomales P reconocidos por los anticuerpos inducidos por inmunización con las proteínas P recombinantes.
4. Caracterización inmunológica y clonado de las regiones variables de un anticuerpo dirigido contra el extremo C-terminal de la proteína TcP2 β .

5. Estudio comparativo del perfil de anticuerpos obtenido por inmunización con las proteínas recombinantes con respecto al perfil de anticuerpos séricos presentes en ratones crónicamente infectados con *T. cruzi* y en pacientes con Miocardiopatía Chagásica Crónica.
6. Determinación del rol de los anticuerpos anti-proteínas ribosomales P de *T. cruzi* en las alteraciones cardíacas generadas por sueros de pacientes chagásicos.
7. Estudio de la reactividad contra antígenos cardíacos inducida por inmunización con las proteínas ribosomales P recombinantes. Determinación de la actividad funcional de los anticuerpos autorreactivos.
8. Estudio de las posibles alteraciones histológicas del miocardio en ratones inmunizados con las proteínas P recombinantes.
9. Evaluación de alteraciones eléctricas de la función cardíaca asociadas a elevados títulos de anticuerpos contra las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* luego de la inmunización con proteínas recombinantes.



2. Materiales y Métodos

2.1. COMPOSICION DE SOLUCIONES Y MEDIOS EMPLEADOS

BPB 6X = TBE 6X, 60% Glicerina, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% Xylen cianol.

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

Buffer de siembra 2X: (Cracking buffer) (en TBS) 0.2% azul de bromofenol, 4% SDS, 10%, β -mercaptoetanol, 20% glicerol y Tris-HCl pH 6.8 10 mM.

Buffer L: 5 mM $MgCl_2$, 25 mM acetato de potasio, 1 mM DTT, 250 mM de sacarosa, 1 % Tritón-X100, 20 mM Tris-HCl pH: 7.4

Buffer TMK: 1 mM $MgCl_2$, 100 mM AcOK, 10 mM Tris-HCl pH: 7.4

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

LB-amp: LB + 100 μ g/ml ampicilina.

LB-agar: LB + 1,5% bactoagar (Difco).

LB-"top" agarosa: LB + 0,7% agarosa (Sigma, St. Louis, MO).

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

PBS-G: PBS + 1% gelatina.

PBS-Tw: PBS + 0,05% Tween 20.

PBS-leche: PBS + 3% leche descremada en polvo

TAE 1X: 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA.

TBE 0,5X = Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0).

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

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

TBS-leche: TBS + 3% leche descremada en polvo

TGE: Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; glucosa 50 mM; EDTA 10 mM

TNE: 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH: 8.0

SM: 50 mM Tris-HCl pH: 7.5, 100 mM NaCl, 8 mM $MgSO_4$, 0,02% gelatina.

Solución 1: 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM glucosa.

Solución 2: NaOH 0,2 N - SDS 1 %.

Solución 3: KOAc 1,32 M pH 4,8

Solución de Tyrode: NaCl 127 mM, KCl 2,7 mM, $NaHCO_3$ 12 mM, $MgCl$ 0,5 mM glucosa 10 mM, CaCl 2,7 mM, pH 7,2.

2.2. BACTERIAS, FAGOS y PLASMIDOS

2.2.1. Cepas bacterianas utilizadas

E. coli JM107: supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi Δ (lac-proAB).

E. coli DH5 α F': F'(endA1, hsdR17, supE44, thi-1 recA1, gyrA relA1 lacIZYA-argF) U169 deoR (80dlac(lacZ)M15).

E. coli JM109: recA1, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, supE44, Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZ Δ M15].

Las cepas fueron mantenidas en placas de LB-agar-amp por cortos períodos a 4°C, y en cultivos líquidos con 50% de glicerol a -70°C por períodos largos (mayores a un mes).

2.2.1.1. Preparación de *E. coli* Y1090 para infección con fago λ gt11

Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* Y1090 en 100 ml de LB-amp y 0,2% maltosa y se incubó durante 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 MgSO₄, 10 mM estéril y frío. Las bacterias preparadas se conservaron a 4°C por no más de 15 días (Huynh, 1985).

2.2.1.2. Preparación de lisado de *E. coli* Y1089 lisógena

El lisado de bacterias *E. coli* Y1089 lisógenas para λ gt11 salvaje fue utilizado para competir la reactividad de los sueros contra proteínas bacterianas. Se preparó a partir de 1 litro de cultivo crecido a saturación, cultivado como se detalla en 2.2.1.1. Las bacterias se centrifugaron a 1.500g por 10 min a temperatura ambiente se resuspendieron en 50 ml de TBS y se lisaron por 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento (nitrógeno líquido-agua corriente). El homogenato final se guardó a -20°C (Huynh, 1985).

2.2.1.3. Preparación de bacterias competentes para transformación

Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* DH5 α F' a partir de una placa de LB en 2 ml de caldo LB y se dejó toda la noche con agitación a 37°C. Al día siguiente 1 ml de este cultivo fue inoculado en 50 ml de LB y se dejó crecer con agitación a 37°C hasta alcanzar una DO_{660nm} de 0,3 - 0,4. El cultivo se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 12,5 ml de CaCl₂ 0,1 M frío y se dejaron las células en hielo durante 45 min. Las células fueron nuevamente centrifugadas y el pellet se resuspendió en 0,1 M MOPS pH 6,5, 50 mM CaCl₂, 20 % glicerol. La suspensión se incubó durante 20 min en hielo y se la congeló sumergiéndola en un baño de etanol/hielo seco. Las células así preparadas se almacenaron a – 70°C hasta su uso (Sambrook, 1989).

2.2.2. Fagos

λ gt11: lac5, Δ shndIII λ 2-3, srl λ 3°, clts857, srl λ 4°, nin5, srl λ 5°, Sam100.

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

clts857: mutación termosensible que produce la inactivación del represor cl a 42°C, originando la inducción del ciclo lítico.

El fago λ gt11 es un vector de clonado capaz de producir un polipéptido a partir de un fragmento de DNA foráneo. Su utilización más difundida es la construcción de bibliotecas de expresión, las cuales son rastreadas con antisueros o con anticuerpos específicos. El sitio usado para la inserción del ADN foráneo es el único sitio Eco RI ubicado dentro del gen lacZ, 53 pb río arriba del codón de terminación del gen de β -galactosidasa. De esta forma, la proteína codificada por el ADN foráneo se expresa como una proteína de fusión con β -galactosidasa. Para obtener un extracto crudo de proteínas de *E. coli* enriquecido en la proteína recombinante, es necesario previamente inducir la integración del fago de interés al genoma de la bacteria obteniendo de esta forma una bacteria lisógena (Huynh, 1985).

2.2.2.1. Fagos recombinantes

λ gt11-CH3: fago recombinante aislado a partir de una biblioteca de ADN complementario de *T. cruzi* (cepa RA, estadio tripomastigote) en λ gt11.

λ gt11-S23: clon recombinante aislado a partir de una biblioteca de ADN complementario de *T. cruzi* (cepa RA, estadio tripomastigote) en λ gt11.

λ gt11-JL5: clon recombinante aislado a partir de una biblioteca de ADN complementario de *T. cruzi* (cepa RA, estadio tripomastigote) en λ gt11.

2.2.2.2. Amplificación de los fagos

Para obtener una suspensión de fagos de aproximadamente 10^{10} ufp/ml, se infectaron 200 μ l de *E. coli* Y1090 con 10 μ l de fagos (aproximadamente 10^6 ufp/ml). Luego de 20 min. a 37°C se mezclaron con 3 ml de top-agarosa (previamente fundida y mantenida a 50°C) y se sembraron en una placa de Petri (96 mm) de LB-agar-amp la cual se colocó a 42°C. Al cabo de aproximadamente 4 horas 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 a un tubo de 1,5 ml. Los fagos remanentes en la placa se colectaron con 2 ml más de SM que se mezclaron con los 5 ml anteriores. 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 3000 x g durante 10 min a 4°C. Se colectó el sobrenadante, se agregó cloroformo (0.3% final) y se mantuvo a 4°C.

2.2.2.3. Rastreo de bibliotecas construídas en λ gt11

La biblioteca de ADNc fue rastreada según lo descrito por Huynh (1985) empleando sueros de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) anti-P positivos (poseen anticuerpos contra las proteínas ribosomales P). Para ello, se mezcló 3×10^4 ufp de la biblioteca con 150 μ l de bacterias *E. coli* Y1090 competentes y se incubó 20 min a 37°C. Luego se sembró sobre una placa de LB-amp como se describe en el punto 2.2.2.2. Las placas fueron incubadas a 42°C

hasta la aparición de pequeñas placas de lisis. En ese momento, se colocó sobre la placa un filtro de nitrocelulosa (Hybond, Amersham) previamente embebido en IPTG 10 mM y se incubaron las placas 3 horas a 37°C. Antes de remover los filtros, éstos fueron marcados en forma asimétrica para identificar posteriormente su orientación. Luego los filtros se lavaron con TBS-Tw y se colocaron durante 12 horas en TBS-leche. Las placas se colocaron a 4°C. Para el revelado, los filtros se incubaron durante tres horas con suero de un paciente con LES (dilución 1/400). El revelado se continuó como se describe en el punto 2.12.

2.2.2.4. Ensayo de placa de lisis

Para la formación del césped bacteriano, se mezclaron 0,5 ml de células Y1090 (ver punto 2.2.1.2.) con 3 ml de LB-top agararosa (previamente fundido y mantenido a 55°C). La mezcla se colocó sobre una placa de LB-amp y se incubó 30 min a 37°C. Luego se colocó sobre el césped de bacterias 1 µl de cada fago a analizar. Se dejó secar 10 min junto al mechero y luego la placa se incubó 40 minutos a 42°C. En este momento se colocó sobre las incipientes placas de lisis tiras de nitrocelulosa (previamente embebidas en IPTG 10 mM) y se incubó la placa 2 horas a 37°C. Durante este período se indujo la expresión de las proteínas recombinantes las cuales quedaron inmovilizadas sobre la nitrocelulosa. Al cabo de dos horas, los filtros de nitrocelulosa se colocaron en TBS-leche. El revelado de los filtros se realizó de acuerdo a lo descrito en 2.12.

2.2.3. PLASMIDOS

2.2.3.1. Plásmido pMal-c2

Se utilizó el plásmido pMal-c2: $lacI P_{tac}$, $malE\Delta 2-26$ -fx- $lacZ\alpha$, Amp^r . (New England Biolabs, Beverly MA). En este plásmido el inserto de interés es clonado bajo el control del promotor "tac" y utiliza la señal de iniciación del gen $malE$ (Kellerman, 1982; Amann, 1985). Este promotor produce señales de expresión muy altas, de modo que las proteínas recombinantes constituyen entre el 20 y el 40% del total de proteínas celulares. Este vector contiene el gen $LacZ$, lo cual permite una rápida identificación de las colonias transformadas con el plásmido recombinante

mediante ensayos de α -complementación. El gen clonado se ubica río abajo del gen *malE* que codifica para la proteína de unión a la maltosa (MBP) lo cual resulta en la expresión de una proteína de fusión MBP- antígeno (Fig. 1). Esta característica permite una sencilla purificación de la proteína de fusión utilizando la afinidad de la MBP por la maltosa (Kellerman, 1982). El clonado en el plásmido p-Mal ofrece además la posibilidad de separar la proteína portadora MBP del antígeno clonado mediante la digestión con la proteasa Xa.

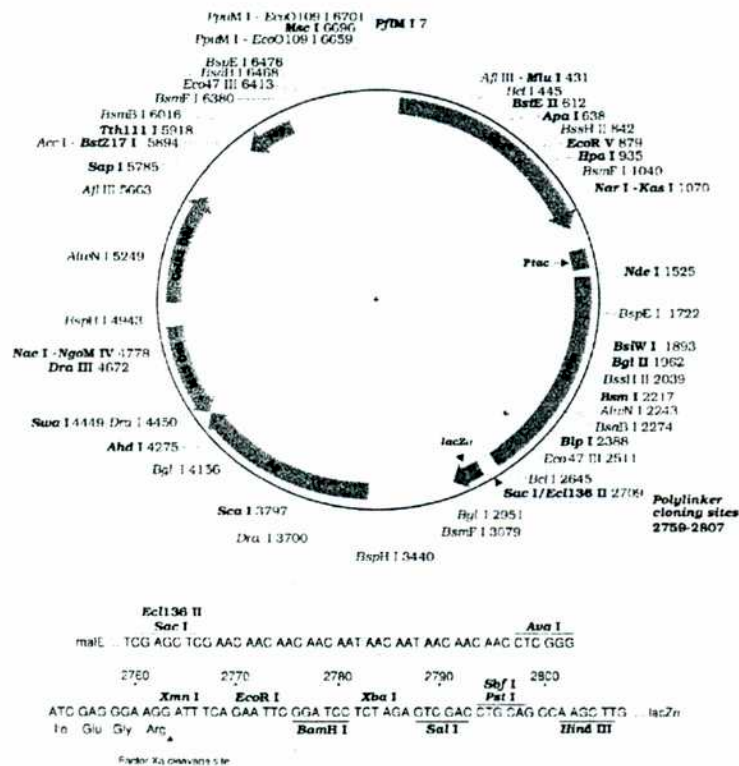


Figura 1. Plásmido *pMal*. Se observa la posición del promotor *Ptac*, los genes de resistencia a ampicilina (*Ap*), *malE*, *lacZ α* , *lacI^q* y el sitio de clonado ("Polilinker cloning sites"). En la parte inferior se observa la secuencia del sitio de clonado y el sitio de corte del Factor Xa.

2.2.3.2. Plásmido pGex-1 λ T

Se utilizó el plásmido pGex-1 λ T: *lacI^P_{tac}*, *Amp^r* (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Este vector presenta dos diferencias fundamentales respecto al plásmido pMal-C2. En primer lugar, el sitio de clonado se ubica río abajo de la secuencia del gen que codifica para la Glutathion-S-Transferasa de *Schistosoma*

japonicum, de modo que la proteína de fusión GST-antígeno generada puede purificarse en base a la afinidad de la GST por el glutation (Fig. 2). Además, este vector carece del gen LacZ, por lo cual no es posible realizar ensayos de α -complementación (Ausubel, 1987).

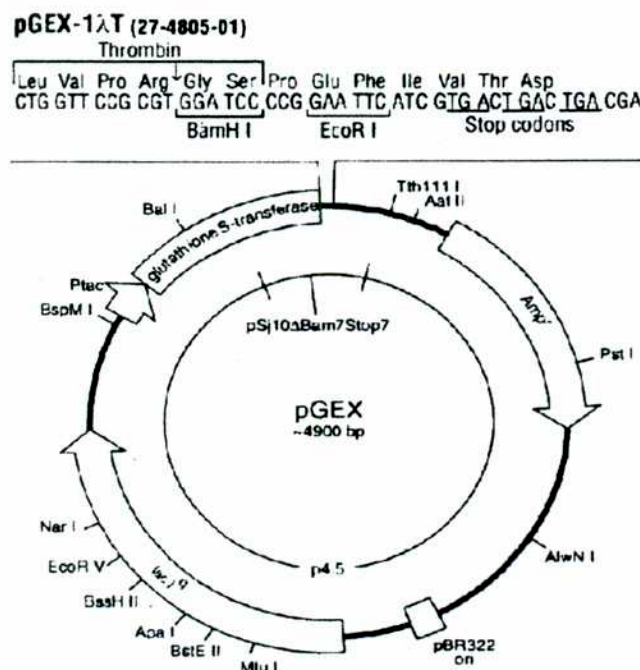


Figura 2. Plásmido pGex. Se observa la posición del promotor Ptac, el gen de resistencia a ampicilina (Amp^r), el gen de la glutation-S-transferasa, el gen lacI^q y en la parte superior la secuencia del sitio de clonado.

2.2.3.3. Plásmido pGem-T Easy

Se utilizó el plásmido pGem-T Easy (Promega, Madison, WI). Este vector se empleó para clonar en forma directa productos de PCR. Su principal característica es que posee bases T protruyentes en los extremos 3' lo cual permite la ligación en forma muy eficiente de fragmentos de PCR amplificados que presentan bases deoxyadenina en sus extremos generadas por la Taq polimerasa en forma independiente del templado. Este vector permite además una selección rápida de las colonias recombinantes por α -complementación (Fig. 3).

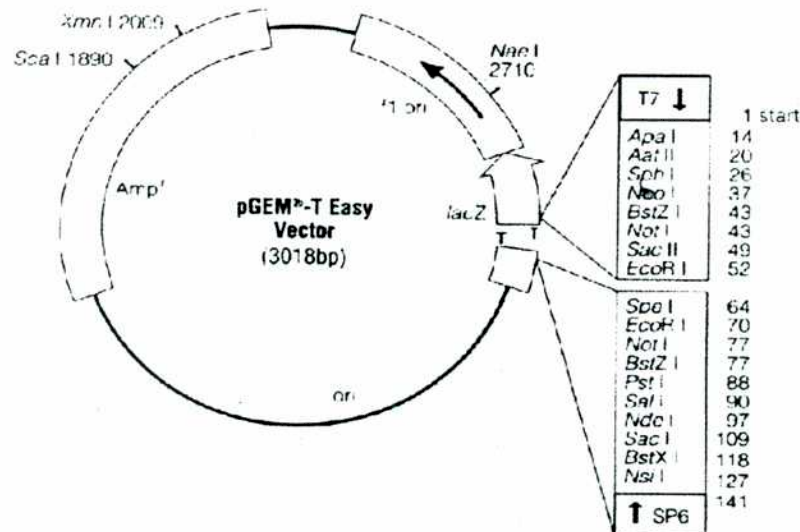


Figura 3. Plásmido pGem-T Easy. Se observa la posición del gen *lacZ*α y el gen de resistencia a ampicilina (*Amp^r*). A la derecha, se observa un esquema del sitio de clonado.

2.2.3.4. Plásmido pUC119-Myc

Este plásmido se utilizó para clonar y expresar las regiones variables de la cadena pesada y liviana del anticuerpo monoclonal en *E. coli*. Este plásmido fue diseñado por el Dr. Jean-Luc Teillaud (INSERM U 255 – Institut Curie, París, Francia) reemplazando el polilinker del plásmido pUC-119 por la secuencia que se observa en la Fig. 4. Este fragmento de ADN posee la secuencia líder PelB que permite la exportación del Fragmento variable de cadena simple (scFv, “single chain Fragment variable”) al periplasma de la bacteria y contiene el “tag” c-myc en el extremo C-terminal del scFv que permite la detección del mismo utilizando el anticuerpo monoclonal 9E10 anti-c-myc (Sigma) (Fig. 4).

PelB líder	Sitio de Clonado				c-myc
GCC ATG GCC CAG GTG CAG	CTG CAG	GTC GAC	CTC GAG	ATC AAA CGG	GCG GCC GCA GAA CAA
Nco I	Pst I	Sal I	Xho I	Not I	

Figura 4. Secuencia de la región de clonado del plásmido pUC-myc. Se observa la secuencia líder PelB, los sitios de corte para enzimas de restricción y el inicio del “tag”c-myc.

2.3. AMPLIFICACIÓN DE ADNc DE FAGOS λgt11 RECOMBINANTES POR PCR

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen total de 100 µl. La mezcla de reacción utilizada contiene: 10 µl de la suspensión de fagos (aprox. 10⁸ ufp/ml), 10 µl de buffer Taq 10 X, 1 µl de una solución 25 mM de dNTP, 2 µl de una solución 12,5 µM de cada primer y 5 µl de una solución 25 mM de MgCl₂. Finalmente se llevó a 100 µl de volumen final con agua deionizada. Las muestras fueron desnaturalizadas inicialmente durante 5 minutos a 95°C y luego se agregaron 2 U de Taq polimerasa (Promega). En cada corrida se realizaron controles negativos y positivos. La reacción se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9600 Perkin Elmer, utilizando el siguiente programa:

Desnaturalización del ADN	5 min. a 94°C	] 30 ciclos
Desnaturalización del ADN	1 min. a 94°C	
Pegado de los oligonucleótidos	1 min. a 55/60°C	
Síntesis de ADN	1.5 min. a 72°C	
Elongación de cadenas	10 min. a 72° C	

Alícuotas de cada reacción (5µl) fueron analizadas en un gel de 1% de agarosa en TAE 1X con 1 µl bromuro de etidio (10 mg/ml) a 100 V. Para la determinación del tamaño de los insertos amplificados, se usó como marcador de peso molecular 100 pb ladder (BRL). La temperatura de hibridación fue de 60 °C y 55°C para los oligonucleótidos P21-P26 y S1-S2, respectivamente.

Secuencia de los oligonucleótidos utilizados:

- P21 (21mer) 5` GGATCCCGTCAGTATCGGCGG 3` MW= 6543 Tm=70 °C
P26 (26mer) 5` AAGCTTAGCGACCGGCGCTCAGCTGG 3` MW= 8077 Tm=86 °C
S1 (23mer)(Bam HI) 5`GAGCACGTCAGGATCCGCGGAAT 3` MW=7095 Tm=65 °C
S2 (24mer)(Hind III) 5`GCGACCGAAGCTTAGCTGGAATTC 3` MW=7374 Tm=61 °C

2.4. ANALISIS Y PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN

2.4.1. Electroforesis en geles nativos de agarosa

La agarosa fue disuelta en "buffer" TAE 1X, a una concentración adecuada de acuerdo a la longitud del ADN a visualizar. Se agregó Br.Et. a una concentración final de 0.5 µg/ml. Las muestras de ADN se sembraron con "buffer" BPB 1X. La electroforesis se llevó a cabo con buffer TAE 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 empleando el sistema de video Baby Imager 4912-2010 (Appligene).

2.4.2. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN a purificar se separaron en un gel de 1,2 % agarosa. Se cortaron las secciones correspondientes, en un transiluminador de luz U.V. con un bisturí tratando de no tomar agarosa sin ADN. Se realizó un pequeño orificio con una aguja en la parte inferior de un tubo Eppendorf® de 0,5 ml y luego se tapó el orificio con algodón. El fragmento de agarosa conteniendo el ADN se colocó dentro del tubo a -20° C durante una hora. El tubo así preparado se colocó dentro de un tubo de 1,5 ml y se centrifugó 15 min a 12.000 rpm. De esta forma el "buffer" del fragmento de agarosa conteniendo el ADN pasa al tubo de 1,5 ml. Se realizaron dos extracciones con 0,4 ml de cloroformo y luego 2 extracciones con un volumen de éter. Luego de la segunda extracción, el tubo se dejó unos minutos a 37° C a fin de permitir la volatilización del éter residual. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, 0,1 volúmenes de KAcO 5M pH: 5,2, se dejó 20 minutos a -70°C y a continuación se centrifugó 15 minutos a 12000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 200 µl de etanol 70%. El ADN se dejó secar en una estufa a 37°C y se resuspendió en 20 µl de "buffer" TE.

2.4.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión

Los fragmentos de ADN a ser purificados fueron separados en un gel de 1,2 % agarosa de bajo punto de fusión. En un transiluminador de luz U.V. se cortó con bisturí la sección de agarosa conteniendo el fragmento de interés. Se colocó el fragmento de agarosa en un tubo Eppendorf® con 200 µl de buffer TE y 100 µl de acetato de sodio 3 M pH 6. Se dejó el tubo en un baño de 65°C por 10 minutos. Luego se agregó 500 µl de fenol precalentado a 65°C, se mezcló con vórtex y se centrifugó 3 minutos a 12.000 rpm. Se tomó el sobrenadante (fase acuosa superior) y se repitió la extracción con fenol. Para retirar el fenol remanente se hicieron 2 lavados con 500 µl de éter saturado con agua. Luego, se procedió tal como se describió en el ítem anterior.

2.5. EXTRACCION DE ADN PLASMIDICO

Las preparaciones en gran escala (maxi-preparaciones) así como las preparaciones en pequeña escala (mini-preparaciones) se realizaron siguiendo las indicaciones descriptas por Sambrook *et al.* (1989).

2.5.1. En gran escala (Maxipreparaciones):

Se inoculó 5 ml de medio LB-amp con una colonia aislada de bacterias transformadas por un plásmido con resistencia a ampicilina. Se incubó a 37°C con agitación durante toda la noche a fin de obtener un cultivo crecido a saturación. Este cultivo fue utilizado como inóculo para otro cultivo de 500 ml de LB-amp el cual fue crecido a saturación. El cultivo fue centrifugado a 5000 x g por 10 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó en buffer TGE. El pellet lavado fue resuspendido en 8 ml de buffer TGE. Se agregó 16 ml de NaOH, 0,2N, 1% SDS (p/v); se mezcló por inversión y se dejó por 5 min a T. amb. Se añadió 12 ml de KAcO 5M pH 5,2 frío y se mezcló por inversión. Se dejó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 10.000 x g durante 30 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó 0,6 vol. de isopropanol, se mezcló y se dejó 15 min a T. amb. Se centrifugó a 12000 x g por 30

min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet conteniendo el ADN plasmídico en 3 ml de buffer TE.

2.5.2. En pequeña escala (Minipreparaciones):

A partir de una colonia aislada se inocularon 3 ml de LB-amp. Se incubó a 37°C con agitación durante toda la noche a fin de obtener un cultivo crecido a saturación. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 12000 rpm por 3 min a T. amb. El pellet bacteriano se resuspendió en 200 µl de Solución 1. Se agregó 200 µl de Solución 2 y se mezcló por inversión. Se agregó 200 µl de Solución 3, se mezcló por inversión y se dejó 5 min a T. amb. Se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm. Cuidadosamente se removi6 550 µl del sobrenadante los cuales se transfirieron a un tubo Eppendorf. Se realizaron 2 extracciones con 400 µl de cloroformo y se precipitó el ADN plasmídico por agregado de 1 volumen de isopropanol y posterior centrifugación por 15 min a 12000 rpm a T. amb. Se descartó el sobrenadante y se dejó drenar el exceso de líquido por inversión del tubo abierto sobre papel absorbente. El pellet se lavó con 150 µl de etanol 70%, se secó durante 10 min a 37° C y se disolvió en 50 µl de agua.

2.6. SUBCLONADO DE ADNc EN PLASMIDOS DE EXPRESION

El ADN del vector (0,5 µg de pGEX o pMal) fue digerido con la o las correspondientes enzimas de restricción. Se verificó la digestión completa del ADN analizando alícuotas de los productos cortados en un gel de agarosa 0,8 %. El vector digerido fue purificado a partir de geles de agarosa. Los fragmentos de ADN a ser clonados fueron digeridos con la o las correspondientes enzimas de restricción y luego sometidos a electroforesis en agarosa 1 % (BRL). El fragmento de interés fue purificado como se describe en 2.4.2.

2.6.1. Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones fueron realizadas siguiendo las instrucciones del proveedor, modificando la temperatura y el tipo de buffer de acuerdo a la enzima a utilizar.

2.6.2. Reacción de ligación

Tanto los fragmentos a ser clonados como los plásmidos empleados en la reacción de ligación fueron cortados con las enzimas correspondientes y purificados a partir de geles de agarosa. La única excepción fue el plásmido pGem-T, el cual se utilizó como sugiere el kit pGem-T Vector System (Promega). Las ligaciones se realizaron empleando una relación molar vector:inserto de 1:1, 1:5 y 1:10. La masa de plásmido en cada tubo fue de 25 ng. Como control de ligación se incluyó una reacción con vector sin inserto (autoligado) (Sambrook, 1989). La ligación se realizó con ligasa NEB T4 (aprox. 400 unidades) durante toda la noche a 16°C. Posteriormente se transformaron células de *E. coli* DH5F'.

2.6.3. Transformación

La suspensión de ligación se mezcló suavemente con 100 µl de células competentes y se incubó en hielo durante 30 min. Luego se aplicó un golpe térmico de 1 minuto a 42°C, se agregó 1 ml de LB y se incubó a 37°C durante una hora. La mezcla de transformación se sembró en placas de LB-amp. En aquellos casos en que la selección se realizó por α -complementación se agregó 125 mg/ml de X-gal e IPTG 0,1 M. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h.

2.7. ANALISIS DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Para analizar los plásmidos de las colonias recombinantes se utilizaron distintos métodos. En algunos casos se realizaron minipreparaciones de ADNp y posteriormente mapeos por enzimas de restricción. En otros casos, dependiendo del plásmido utilizado, las características del inserto y el número de colonias obtenidas se emplearon los métodos descritos a continuación. En el caso de haber plaqueado las bacterias en LB-amp conteniendo IPTG-Xgal, sólo se analizaron las colonias blancas.

2.7.1. “Quick”-Miniprep

Se seleccionaron colonias al azar, las cuales de subcultivaron en 3 ml de medio LB-amp a 37° C durante toda la noche con agitación. Luego, se trasvasó 100 µl de cada cultivo a un tubo de 1,5 ml y se agregaron 100 µl de fenol. Se mezcló mediante utilizando vórtex y la mezcla se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min. Posteriormente 20 µl del sobrenadante se analizaron en geles de agarosa 0,8-1%. Este tipo de preparación permite visualizar la forma superenrollada del ADNp, así como también los distintos tipos de ARN y el ADN cromosómico.

2.7.2. “Colony” PCR

Bacterias provenientes de 1-3 colonias fueron colocadas en un tubo conteniendo 20 µl de agua. Luego, los tubos se colocaron a 100° C durante 5 min para provocar la lisis de las bacterias. Posteriormente se agregó a cada tubo los siguientes reactivos: 2 µl de buffer Taq 10X, 0,2 µl de una solución 25 mM de dNTP, 0,4 µl de una solución 12,5 µM de cada primer y 1 µl de una solución 25 mM de Mg Cl₂. Finalmente se agregó 0,5 U de Taq polimerasa (Promega). La reacción se realizó en las siguientes condiciones:

Desnaturalización del ADN	5 min. a 94°C	] 30 ciclos
Desnaturalización del ADN	1 min. a 94°C	
Pegado de los oligonucleótidos	1 min. a 55 °C	
Síntesis de ADN	1.5 min. a 72°C	
Completado de cadenas	10 min. a 72° C	

Secuencia de los primers para amplificación de fragmentos clonados en pGex:

pGex 855 (5´) 5´ GCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCA 3´

Tamaño: 23 nucleótidos MW=7177 Tm: 76°C

pGex (3´) 5´ CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG 3´

Tamaño: 23 nucleótidos Tm: 76 °C

Al finalizar la reacción de PCR 15 µl de cada reacción fueron analizados en geles de agarosa. La amplificación sobre el plásmido pGex salvaje genera una banda de 190 pb. En los plásmidos recombinantes la banda amplificada posee el tamaño del inserto correspondiente más 190 pb correspondientes a regiones del plásmido. Para realizar este método de rastreo se debe identificar cuidadosamente las colonias en las placas de Petri, ya que en caso de amplificar la banda deseada es necesario recuperar las colonias de la placa original.

2.7.3. Rastreo radioactivo de plásmidos recombinantes

En los casos en que el número de colonias obtenidas al transformar el control de autoligación fue elevado, se realizó el rastreo utilizando como sonda el inserto correspondiente marcado radioactivamente. Se colocaron filtros de nylon Hybond-N⁺ sobre las placas, marcados asimétricamente con una aguja para poder ubicar posteriormente las colonias con señales positivas. Luego de 1 min el filtro se retiró y se colocó sobre un papel Whatman[®] 3MM embebido en solución desnaturizante (1.5 M NaCl, 0.5 M NaCl) durante 3 min con la cara que tuvo contacto con las colonias hacia arriba. Luego, se repitió el procedimiento con solución neutralizante (1.5 M NaCl, 0.5 Tris-HCl pH 7.2, 1 mM EDTA) durante otros 3 minutos. Se lavó durante 5 minutos en 5X SSC, se fijó 20 minutos con 0.4 N de NaOH y se lavó nuevamente con 5X SSC por 5 min. Los filtros se secaron sobre un papel Whatman[®] 3MM y se guardaron a 4°C hasta su utilización (Sambrook, 1989).

2.7.3.1. Marcado radioactivo de oligonucleótidos

Se colocaron 10 µl del oligonucleótido a marcar (a partir de una solución 10µM), con de buffer T4 PNK (polinucleótido kinasa) (concentración final 1X), con 1µl de la enzima T4 PNK y 2 µl de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. La mezcla se incubó a 37°C durante una hora y luego 10 min a 70°C con 10 mM de EDTA. Posteriormente, se precipitó con 1 µl de ARNt de levadura (10 µg/µl) y 330 µl de etanol/acetato de amonio, durante 30 min a -70°C. La mezcla se centrifugó 15 min a 12.000 rpm y el pellet se resuspendió en 100 µl de agua deionizada. Se utilizaron 5 µl de sonda marcada por filtro.

Para la marcación de oligonucleótidos destinados a la secuenciación de ADN se procedió de la siguiente forma: se colocaron 8 μ l del oligonucleótido (10 μ g/ml), 1 μ l de buffer 10X T4 PNK, 0,5 μ l de la enzima T4 PNK y 0,5 μ l de γ^{32} P-ATP (6000 Ci/mmol, 135 uCi/ μ l). La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min y luego 2 minutos a 90°C.

2.7.3.2. Hibridación de los filtros con oligonucleótidos marcados radioactivamente

Los filtros se prehibridaron durante 2 h a 42°C en una solución conteniendo 5 ml de 20X SSC, 1 ml fosfato diácido de sodio 0.2 M pH 6.8, 1 ml de 50X Denhardt's, 500 μ l de SDS 10%, 100 μ l de ADN de esperma de salmón y agua deionizada c.s.p. 10 ml. La hibridación se realizó durante toda la noche a 37°C. Luego, los filtros fueron lavados con 6X SSC, 0.5% SDS durante 15 min a 37°C y 10 min a 45°C con agitación. Se controló con un contador Geiger la marca radiactiva, y en caso de observarse demasiada radiactividad, se siguió lavando durante 10 minutos más a 45°C. Los filtros se expusieron sobre películas AGFA-GEVAERT Curix RP1 durante 2 ó 3 días a -70°C.

2.7.4. Secuenciación de ácidos nucleicos

La secuenciación de ácidos nucleicos se llevó a cabo por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos. Para ello se utilizaron los kits de secuenciación Sequenase™ (USB Corp.) o fmol (Promega) y se siguieron las indicaciones de los fabricantes. Para secuenciar con el kit Sequenase se mezcló en un tubo 6 μ l de ADNsc (1 μ g) con 1 μ l del oligonucleótido correspondiente al inserto a secuenciar, 2 μ l de buffer de Sequenase y 1 μ l de agua deionizada. La mezcla se incubó a 65°C por 2 min y se dejó alcanzar la temperatura ambiente lentamente. Luego se agregó 1 μ l de DTT 0.1 M, 2 μ l de mezcla de elongación (1/5), 0.5 μ l de [α - 35 S]dATP y 2 μ l de Sequenase (1/4). Se mezcló bien y se centrifugó 10 seg. Luego se incubó entre 2-5 min a temperatura ambiente. Mientras tanto, se rotularon 4 tubos como A, C, G y T y se agregó a cada uno 2.5 μ l de los respectivos ddNTPs y los cuales fueron preincubados a 37°C. De la mezcla anterior se colocó 3.5 μ l a

cada uno de los tubos con los ddNTPs y se dejó 10 min a 37°C. Luego se les agregó 4 µl de solución de terminación (solución Stop) para terminar la reacción. Las reacciones se guardaron a -20°C hasta su utilización. Para cada reacción de secuencia (incluyendo los cuatro nucleótidos) se utilizaron 5 µCi de [α-³⁵S]dATP.

La secuenciación empleando el kit *fmol* se realizó mezclando en un tubo 5 µl de Buffer 5X, 1,5 µl de oligonucleótido marcado (1,5 pmol), 100 ng del ADN a secuenciar y agua hasta alcanzar un volumen final de 16 µl. Se agregó 1 µl de Taq DNA Polimerasa (Sequencing Grade). Cuatro µl de esta mezcla se trasvasaron a otros cuatro tubos rotulados A, C, G, T conteniendo cada uno 2 µl de la mezcla apropiada de d/ddNTP. Posteriormente se agregó una gota (aprox. 20 µl) de aceite mineral. Luego se realizó una reacción de PCR con el programa que se describe a continuación y una vez finalizada la reacción se agregó 3 µl de Solución Stop a cada tubo.

Desnaturalización del ADN	2 min. a 94°C	] 30 ciclos
Desnaturalización del ADN	30 seg. a 94°C	
Pegado de los oligonucleótidos	30 seg. a 42°C	
Síntesis de ADN	1 min. a 70°C	

Para ambos métodos de secuenciación los tubos fueron precalentados a 70 °C durante 3 min antes de sembrar las muestras en geles. Se utilizó una cuba de electroforesis Gibco-BRL para geles verticales de 30 x 40 cm, con espaciadores de 0.3 mm. Se emplearon geles de poliacrilamida 8% y 7 M de urea. Los geles se prepararon a partir de una solución stock de acrilamida-bisacrilamida (40:2) 40%. Para ello 42 gr. de urea (Sigma) fueron disueltos a 37°C con agitación en 15 ml del stock de acrilamida 40%, más 10 ml de TBE 10X y fue llevado hasta 100 ml con agua deionizada. La polimerización se realizó con 280 µl de APS (0.8 mg/ml) y 0.08% V/V de TEMED. La electroforesis se llevó a cabo aplicando una potencia constante de 60 W. Una vez concluída la migración el gel se enjuagó con agua corriente, para retirar la urea remanente. Los geles se secaron en vacío a 80°C durante 2 horas. Los filtros se expusieron sobre películas AGFA-GERVAERT Curix RP1 durante una 24-72 hs. a T. amb. (Sambrook,1989).

2.7.5. Comparación de secuencias con bases de datos

Las comparaciones de secuencias con bases de datos se realizó a través del programa BLAST del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2.8. EXPRESION DE LAS PROTEINAS RECOMBINANTES

2.8.1. Sistema λ gt11

Se realizó el método propuesto por Hall *et al.* (1984). Bacterias lisógenas para λ gt11 fueron cultivadas durante toda la noche a 30°C hasta obtener un cultivo crecido a saturación. La replicación del fago se indujo mediante incubación 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 h a 37°C.

2.8.2. Sistema pMal y sistema pGex

Un cultivo conteniendo aproximadamente 2×10^8 células/ml fue inducido por el agregado de IPTG (0.3 mM final) durante 2 h a 37°C. Las células se cosecharon por centrifugación y fueron resuspendidas 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 SN las proteínas citoplasmáticas (Extracto crudo). En este sistema las proteínas recombinantes carecen de todo tipo de señal de exportación o de localización y permanecen solubles en el citoplasma, por lo tanto, luego de la sonicación, la proteína recombinante permanece en el sobrenadante junto con las proteínas solubles. El pellet conteniendo proteínas insolubles, células no lisadas y debris celular fue descartado.

2.9. PURIFICACION DE LAS PROTEINAS RECOMBINANTES

2.9.1. Sistema λ gt11

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó a partir de 1 litro de cultivo como fue descrito anteriormente (Hall, 1984). 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 de TNE conteniendo sacarosa 50%. Luego de 10 min. se agregaron 32 ml de lisozima 4 mg/ml la cual 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 centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y el sobrenadante se guardó a -20°C.

2.9.2. Sistema p-Mal

En el sistema p-Mal las proteínas de interés son sintetizadas como una proteína de fusión con MBP. Esta característica permite la utilización de columnas de sefarosa-maltosa para su purificación (Fig. 5). 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 mismo buffer con el cual se equilibró la columna (Tris-HCl 20 mM, pH: 7.4, NaCl 0.2 M y β -mercaptoetanol 10 mM). Posteriormente, la proteína de fusión fue eluída con maltosa 10 mM. Durante los lavados y la elución se colectaron fracciones de 1.5 ml. Alícuotas de estas fracciones fueron utilizadas para determinar la concentración de proteínas (ítem 2.9.5) y analizadas por SDS-PAGE 10%.

Las fracciones en las cuales se observó la proteína recombinante libre de contaminantes fueron parcialmente liofilizadas durante 4 h y aquéllas en que la cantidad de proteínas observada en el gel fue similar se agruparon. Posteriormente se determinó la concentración proteica. El rendimiento fue entre 2 y 5 mg de proteínas recombinantes por litro de cultivo inducido.

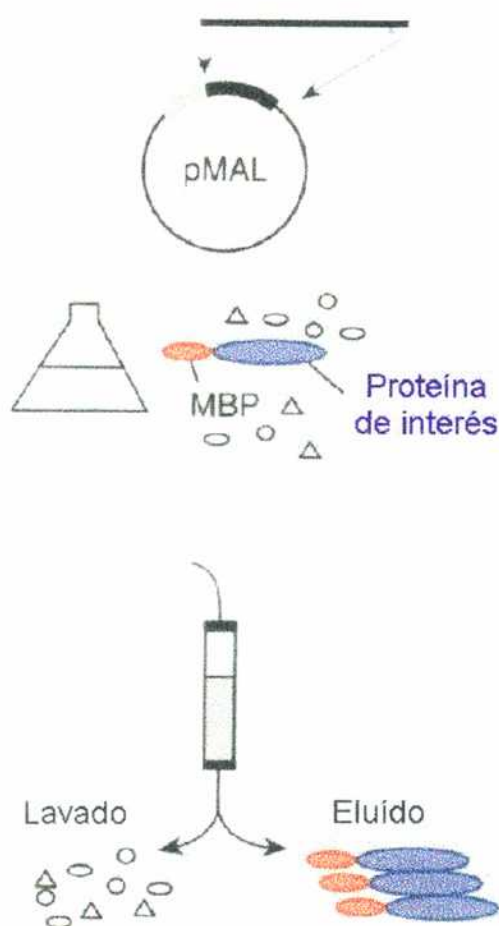


Figura 5. Esquema de la purificación de proteínas MBP recombinantes. De arriba hacia abajo se esquematizan las distintas etapas del proceso: clonado, expresión y purificación.

2.9.3. Sistema pGex

Se utilizó la misma metodología que la empleada para purificar proteínas de fusión con MBP, con la única diferencia que el extracto crudo obtenido luego de la sonicación se pasó por una columna de glutation-agarosa. La elución se realizó con glutation 5 mM.

2.9.3. Digestión enzimática de proteínas recombinantes con el factor Xa

La digestión se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor (New England Biolabs). Previamente a la digestión la proteína recombinante fue desnaturalizada por agregado de cloruro de guanidina 6 M y posterior diálisis contra PBS 0,1%. La reacción de digestión se realizó incubando la proteína recombinante con Factor Xa en una relación 1% m/m. Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente durante 48 horas. La eficiencia de la digestión se determinó por SDS-PAGE y la separación de los 2 fragmentos se realizó utilizando una columna de sefarosa-maltosa.

2.9.4. Determinación de la concentración de proteínas

Se realizó mediante un micrométodo adaptado del protocolo original descrito por Bradford (1976). A 10 μ l de cada muestra se agregaron 20 μ l de H₂O y 300 μ l de reactivo de Bradford. Las muestra se analizaron por duplicado en placas de poliestireno de 96 pozos y se midió la DO₅₉₅ en un lector Immunoskan. 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.

2.10. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis de proteínas se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli (1970) para geles discontinuos conteniendo SDS. Se utilizaron las cubas y accesorios del sistema "mini-Protean II" (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) para geles pequeños de 7x8 cm. Para el armado de los geles se siguió la siguiente tabla:

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

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

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

Soluciones madre	Concentración final de acrilamida =4%
30% acril./0,8% bis	0,67 ml
0,5M Tris-HCl pH: 6,8	1,25 ml
10% SDS	50 µl
H ₂ O	3,05 ml
10% APS	25 µl
TEMED	5 µl
TOTAL	5 ml

Para evitar la inhibición de la polimerización por contacto con el aire y obtener una interfase recta, luego de verter entre los vidrios la mezcla del gel separador, se colocó 1 ml de agua. Luego que el gel polimerizó (20 min a T. amb.), se volcó el agua y se completó el armado con la mezcla correspondiente del gel concentrador y el peine elegido. Las muestras a analizar se colocaron en tubos Eppendorf, se agregó un volumen de buffer de siembra (0,2% azul de bromofenol, 4% SDS, 10% mercaptoetanol, 20% glicerol, en TBS) y se calentaron a ebullición durante 3 min luego de lo cual se sembraron en el gel (hasta 20 µl de muestra por calle). Como buffer de corrida se utilizó una solución 0,1% SDS, 192 mM glicina,

25mM Tris, pH: 8,3. Las condiciones de migración fueron: 20 mA por gel durante aproximadamente 45 min, a temperatura ambiente (Ausubel, 1987).

2.10.1. Tinción de los geles con Coomassie-blue

Para observar el perfil proteico de las muestras luego de la migración, se incubó el gel en la solución de tinción (0,05% Coomassie Brilliant blue R (Sigma), 45% metanol, 10% ácido acético) durante 1h a temperatura ambiente con agitación suave y se destiñó incubando de la misma manera en una solución 45% metanol, 10% ácido acético, hasta la visualización de las bandas. Para su conservación, el gel se colocó sobre un papel de filtro Whatman 3MM, se cubrió con una lámina de celofán y se secó utilizando un secador de geles a 80° C durante 2 h.

2.10.2. Patrones de peso molecular

Se utilizaron marcadores de peso molecular preteñidos, abarcando el rango de 27.000-180.000 Daltons (Prestained kit protein Molecular Weight, Sigma). Se prepararon según la indicación de los fabricantes y se emplearon 5 µl/calle.

2.11. ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEINAS A FILTROS DE NITROCELULOSA

Las condiciones de transferencia fueron básicamente las descritas por Towbin (1979). Se utilizó el sistema de Bio Rad "Mini-Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell". Previamente al armado del aparato de transferencia, se recortaron dos papeles Whatman 3MM y un filtro de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham) del tamaño del gel y junto con las esponjas se dejaron sumergidos en buffer de transferencia (192mM glicina, 25mM Tris, 20% metanol, pH: 8,3). Luego de la electroforesis, se separó una de 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 un recipiente conteniendo buffer de transferencia. Sobre la placa plástica orientada hacia el polo negativo se colocó una esponja y el papel Whatman 3MM con el gel hacia arriba. Se lo cubrió con la nitrocelulosa y se completó el armado con el papel Whatman 3MM restante, la

otra esponja y la otra placa plástica. Se ajustaron ambas placas entre sí y el dispositivo completo se colocó dentro de la cuba conteniendo buffer de transferencia, previamente enfriado a 4°C. La transferencia se llevó a cabo a 150 mA por gel, a 4°C durante 1h. Finalizada la transferencia, se verificó la eficiencia de la misma incubando el filtro en una solución de Rojo Ponceau.

2.12. WESTERN BLOT

Las proteínas transferidas a nitrocelulosa se detectaron, en todos los casos, según el método descrito por Huynh *et al.* (1985) y siguiendo las indicaciones de los fabricantes del kit Vecta Stain ABC (Vector Laboratories). Todas las incubaciones y lavados se efectuaron a T. amb. con agitación. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la nitrocelulosa, el filtro se colocó en TBS-leche durante 30 min. Se retiró la solución anterior y se incubó por 2 horas con el primer anticuerpo, previamente diluido en TBS-leche conteniendo 0,05% de Tween 20. Los anticuerpos no unidos se eliminaron con 3 lavados de 5 min en TBS-Tw. A continuación la nitrocelulosa se incubó 1 hora con una dilución apropiada del segundo anticuerpo diluido en TBS-leche (conjugado anti-IgG de ratón-biotinilado o conjugado anti-IgG humana-biotinilado, ambos en una dilución 1:400 preparados en cabra (kit ABC Vecta Stain, Vector Laboratories,)). Luego de 3 lavados de 5 min en TBS-Tw, se colocó el complejo avidina-biotina-peroxidasa y se incubó por 1 h más. El exceso de complejo se eliminó con 3 lavados de 3 min en TBS. Para el revelado, se agregaron 12 mg de 4-cloro-1-naftol (Merck) disueltos en 4 ml de metanol frío y 14 µl de H₂O₂ 30 % a 20 ml de TBS. Esta solución se volcó inmediatamente sobre el filtro y se incubó en la oscuridad hasta la aparición de las bandas (1 a 10 min.). La reacción se detuvo lavando el filtro con agua. Cuando fue necesario competir la reactividad inespecífica de los sueros contra proteínas de *E. coli* (por ejemplo, en la detección de proteínas de fusión), se agregó a la solución del primer anticuerpo, 20% de lisado de *E coli* Y1089 lisógena para λgt11 salvaje.

2.13. PREPARACION DE PROTEINAS DE *T. cruzi*.

Los ribosomas de *T. cruzi* se prepararon a partir de 1 gr de epimastigotes, cepa Tulahuen 2. Los parásitos se resuspendieron en 10 ml de "buffer" L y se lisaron por 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento (nitrógeno líquido-agua corriente). Esta fracción fue utilizada como antígeno total de *T. cruzi*. El homogenato se centrifugó a 12000 x g durante 30 min a 4°C y los ribosomas se obtuvieron por centrifugación del sobrenadante sobre capas de 1.5 y 2M de sacarosa en buffer TMK a 105.000 x g durante 2 h. a 4°C (rotor Ti 50). Finalmente se lavaron en TMK y se resuspendieron en 600 µl del mismo "buffer". Luego se fraccionó en tubos de 1.5 ml y se congeló a -20°C. La concentración de proteínas se determinó como se describe en el ítem 2.9.5.

2.14. PREPARACION DE PROTEINAS DE CORAZON

Se extrajo el corazón (previamente perfundido) de 2 ratones BALB/c de 4 semanas de edad. Para la obtención de cardiocitos, los corazones fueron tratados con colagenasa (1 mg/ml) durante 10 min a 37° C y posteriormente disgregados mecánicamente. La suspensión se incubó nuevamente con colagenasa, se filtró y se centrifugó 10 min a 4000 rpm. El pellet de células fue lavado dos veces con PBS 1X y finalmente resuspendido en 2 ml de PBS.

2.15. ANIMALES

Para los experimentos *in vivo*, se utilizaron ratones de seis a ocho semanas de vida de la cepa Balb/c y Swiss, los cuales fueron mantenidos según las condiciones establecidas en "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (U.S. Dept. of Health, 1985).

2.16. PROTOCOLOS DE INMUNIZACION

Grupos de ratones fueron inmunizados por ruta intraperitoneal con las proteínas MBP-TcP2 β , MBP-TcP0 y MBP-MmP0. Se utilizó adyuvante incompleto de Freund (IFA) o adyuvante completo de Freund (CFA) según el experimento. Como control se utilizaron ratones inmunizados con MBP en presencia de adyuvante o adyuvante solo. Se obtuvo muestras de suero a los 21 (S1), 35 (S2), 49 (S3) y 63 (S4) días luego de iniciado el esquema de inmunización.

2.17. ANTIGENOS UTILIZADOS

2.17.1. Antígenos del sistema MBP

Las proteínas MBP, MBP-TcP2 β , MBP-TcP0 y MBP-MmP0 se clonaron en el plásmido pMal. En este sistema se producen proteínas de fusión MBP-antígeno que pueden ser purificadas por columnas de afinidad sefarosa-maltosa. El PM de las proteínas de fusión se calcula sumando al PM de MBP (42 Kda) el PM esperado para cada fragmento clonado (Fig. 6).

2.17.2. Antígenos del sistema GST

Las proteínas GST, GST-TcP2 β , GST-TcP0 y GST-MmP0 se clonaron en el plásmido pGex. En este sistema se producen proteínas de fusión GST-antígeno que pueden ser purificadas por columnas de afinidad glutatión-agarosa. El PM de las proteínas de fusión se calcula sumando al PM de GST (26 Kda) el PM esperado para cada fragmento clonado (Fig. 6).

2.17.3. Péptidos sintéticos

Los péptidos fueron sintetizados por Neosystem (Strasbourg, Francia), a partir de la secuencia aminoacídica del extremo C-terminal de las proteínas TcP2 β , TcP0 y de las proteínas ribosomales P1/P2 humanas. La secuencia de los mismos es la siguiente: R13 (EEEDDDMGFGLFD), H13 (EESDDDMGFGLFD), R11 (EDDDMGFGLFD), H11 (SDDDMGFGLFD), R10 (DDDMGFGLFD), R7 (MGFGLFD),

P015 (EEEDDDDDDFGMGALF), P0-14i (AAAESEEEEDDDDDDF) P0b (AESDE), P07 (FGMGALF) y P08 (EEEDDDDD) (Fig. 6). Para determinar la reactividad de los sueros contra los receptores cardíacos se utilizaron los siguientes péptidos correspondientes al segundo rulo extracelular:

- B1:(HWWRESDEARRCYNDPKCCDFVTNR)
- B2: (HWYRATHQEAINCYANETCCDFFTNQ)
- M2: (VRTVEDGECY IQFFSNAAVTFGTAI)

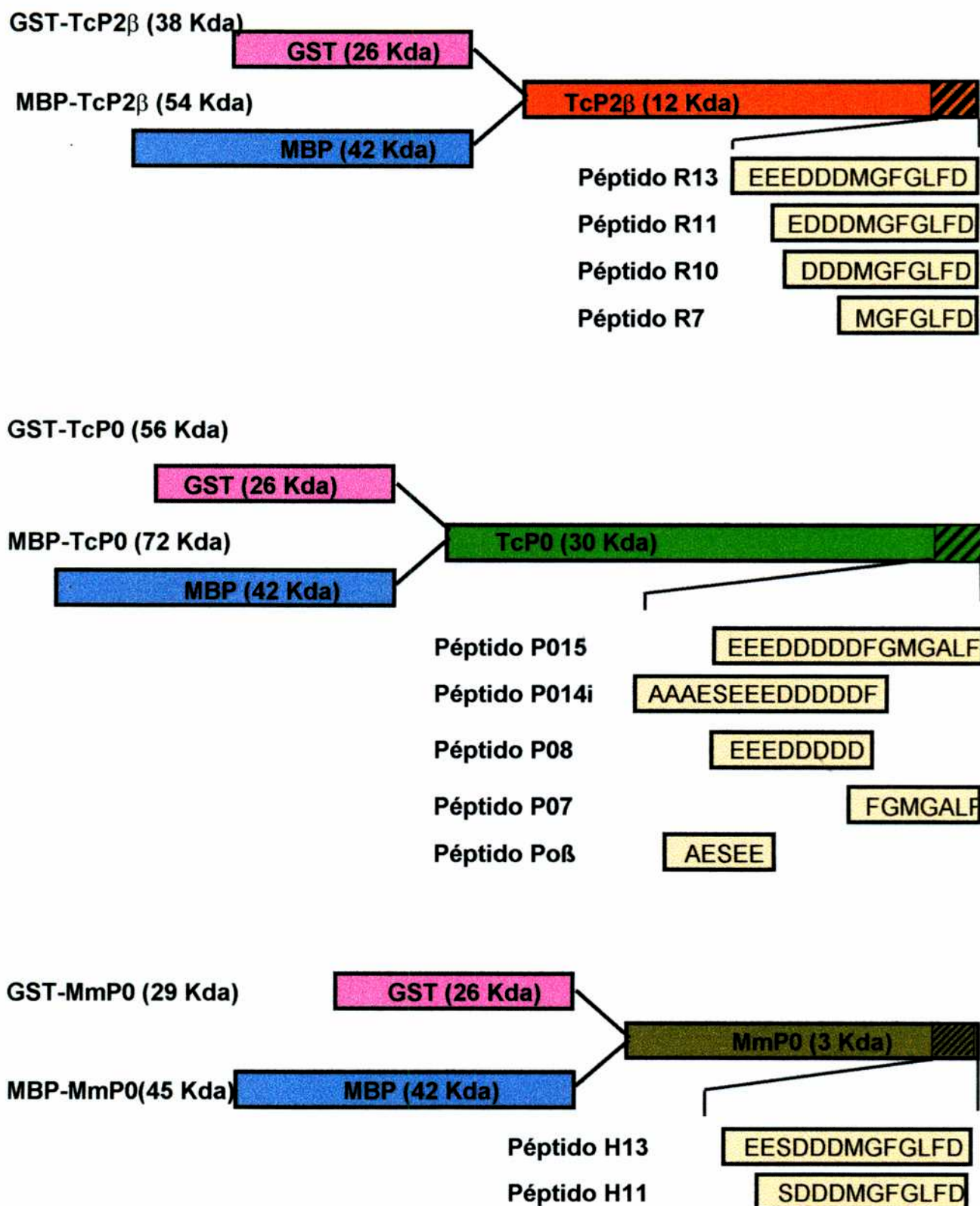


Figura 6. *Proteínas recombinantes y péptidos utilizados.* Se puede observar que las proteínas TcP2β, TcP0 y MmP0 se encuentran clonadas de forma tal que pueden ser expresadas acopladas tanto a MBP como a GST. Debajo de cada proteína, se observan los péptidos empleados correspondientes al extremo C-terminal de cada una de ellas.

2.18. SUEROS

2.18.1. Sueros de pacientes chagásicos

Los sueros de pacientes chagásicos se obtuvieron de individuos infectados con *T. cruzi*, provenientes de la zona endémica del norte y centro de la Argentina los cuales fueron examinados en el Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía (Director Dr. M. Rosenbaum) por el grupo de médicos coordinados por el Dr. P. Chiale. En dicho hospital se determinó la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* por fijación de complemento, hemaglutinación indirecta e inmunofluorescencia indirecta. En nuestro laboratorio, cada uno de los sueros fue ensayado por ELISA contra los antígenos JL7 y R13.

2.18.2. Sueros de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico

Los sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico fueron obtenidos por la Dra. M.J. Svetatz, en la ciudad de Rosario, Santa Fe. Además se utilizaron sueros lúpicos de individuos europeos. Estos fueron caracterizados en la "Unité d'Immunohematologie et Immunopatologie" del Instituto Pasteur (París), dirigida por el Dr. G. Dighiero. Sólo se utilizaron los sueros lúpicos con actividad anti-proteínas ribosomales P.

2.18.3. Sueros de ratones infectados con *T. cruzi*.

Los sueros de ratones infectados con *T. cruzi* (Tekiel, 1997) fueron gentilmente cedidos por la Dra. Stella Maris González Cappa (Dpto. de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina, UBA). Se emplearon sueros de ratones Rockland infectados con la cepa CA-1 de *T. cruzi* 5 y 9 meses post-infección.

2.19. DETERMINACION DE ANTICUERPOS POR LA TECNICA DE ELISA

Los antígenos utilizados (péptidos, proteínas recombinantes y extractos celulares) fueron diluídos en "buffer" carbonato (0.1 M carbonato de sodio, pH: 9.6). Mediante la construcción de curvas de calibración (DO_{415} vs μg de antígeno) se determinó la cantidad óptima para cubrir cada pocillo. Estos ensayos determinaron las concentraciones óptimas para cada tipo de antígeno:

- a) Péptidos sintéticos acoplados a BSA: 2 μM
- b) Péptidos sintéticos no acoplados: 2 μg por pocillo
- c) Proteínas recombinantes con βgal : 1 μg por pocillo
- d) Proteínas recombinantes con GST: 0,1 μg por pocillo

El bloqueo se realizó con 100 μl /pocillo de PBS-leche. Los sueros fueron diluídos apropiadamente en PBS-leche. Como segundo anticuerpo se utilizó anticuerpos anti-IgG de ratón (Sigma) o anti-IgG humana (Sigma) conjugados con fosfatasa alcalina y diluídos en PBS-leche (1:3500 y 1:4000 respectivamente). El revelado de la placa se realizó con 50 μl /pocillo de una solución 1 mg/ml de p-nitro fenol fosfato (Sigma). Una hora después de colocado el revelador se determinó la densidad óptica a 415 nm en un lector de microplacas Immunoskan 340 (Labsystems, Finlandia).

Para determinar los títulos de anticuerpos contra los distintos antígenos se procedió a realizar diluciones seriadas al medio de los sueros a partir de la dilución 1/50. Se calculó el título contra un determinado antígeno como la inversa de la mayor dilución con reactividad positiva para ese antígeno.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos involucrados en la respuesta contra los distintos antígenos se emplearon anticuerpos específicos contra los distintos isotipos (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, cadena κ , cadena λ y cadena μ) acoplados a fosfatasa alcalina (Caltag

Laboratories, Burlingame, CA). Para determinar la reactividad del scFv contra R13 se utilizó como segundo anticuerpo el AM 9E10 dirigido contra c-myc. (Sigma)

2.19.1. Ensayos de inhibición de la reacción de ELISA

Se utilizó el protocolo descrito para la realización del ELISA directo pero los sueros fueron preincubados con concentraciones crecientes de diferentes péptidos durante 12 h a T.amb. y toda la noche a 4°C. Como control negativo de la inhibición se utilizó un péptido de 13 aminoácidos denominado PVMT (AEAALUKMALMKV), correspondiente a una proteína del virus del mosaico del tabaco que no presenta ninguna homología de secuencia con los péptidos utilizados. El porcentaje de inhibición (% de Inhibición) se calculó con respecto a la reactividad del suero preincubado con leche (Mesri, 1990).

2.20. TECNICA DE REEMPLAZO POR ALANINAS (ALANINE REPLACEMENT)

El mapeo de la región C-terminal de la proteína TcP2 β se realizó empleando el kit SPOTs® (Genosys Biotechnologies Inc, Inglaterra). Estos ensayos se realizaron en colaboración con el laboratorio del Dr. Marc Van Regenmortel y del Dr. Johan Hoebeke (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg Cedex, Francia). En primer término se sintetizó sobre una membrana una batería de 14 péptidos representando la secuencia de R13 y sus análogos reemplazados por Alanina en distintas posiciones. Para ello, se disolvió aminoácidos Fmoc en N-metil-pirrolidinone (NMP) y se colocó sobre la membrana alícuotas de 0.9 μ l del primer aminoácido correspondiente a la región C-terminal. Este procedimiento se repitió luego de 15 min y posteriormente la membrana fue lavada dos veces con dimetilformamida (DMF). En el último lavado, se agregaron 800 μ l de anhídrido acético para acetilar el extremo N-terminal. Luego de dos lavados, la membrana se dejó secar al aire antes de iniciar un nuevo ciclo de acoplamiento de los aminoácidos Fmoc. Una vez finalizados todos los ciclos la membrana fue incubada con 20 ml de metanol, lavada tres veces con TBS y bloqueada (Genosys Blocking Buffer) durante 12 h a T. amb. La membrana fue incubada con 5 ml del primer anticuerpo diluido en TBS-leche durante dos horas. Luego de lavar tres veces la membrana con TBS-Tw

sensible a la luz (Hyperfilm, Amersham) durante distintos períodos de tiempo entre 5 y 45 segundos. El film fue escaneado con un scanner Microtek y la intensidad de las bandas cuantificadas en forma digital.

Estos ensayos se realizaron en colaboración con el laboratorio del Dr. Marc Van Regenmortel y del Dr. Johan Hoebeke (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg Cedex, Francia).

2.21. OBTENCION DE LINFOCITOS Y EVALUACION DE LA LINFOPROLIFERACIÓN FRENTE A PROTEÍNAS RIBOSOMALES P Y PEPTIDOS RELACIONADOS

Se obtuvieron esplenocitos ratones inmunizados con MBP o MBP-TcP0. Las células se obtuvieron forzando el tejido a pasar a través de una malla de acero y luego a través de una aguja 26G. Las células se lavaron por centrifugación, se resuspendieron en medio RPMI 1640 adicionado con buffer HEPES 25 mM, 10% suero fetal bovino, glutamina, mercaptoetanol 5×10^{-5} M y gentamicina (10^6 células/ml) y se cultivaron en placas de 96 pocillos (Immunoplate I, A/S Nunc, Roskilde, Dinamarca) en presencia de GST, GST-TcP0, R13, P015 y un péptido no relacionado durante 96 h. La proliferación celular se determinó por el agregado de ^3H Timidina durante las últimas 16 horas de cultivo y posterior detección de la Timidina incorporada en contador de centelleo líquido. Se definió el índice estimulador como el cociente entre las cpm medidas en presencia de los diferentes antígenos y las cpm medidas en presencia de GST o el péptido no relacionado.

2.22. CLONADO DE REGIONES VARIABLES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

El anticuerpo monoclonal 17.2. fue obtenido por el laboratorio de la Dra. Hontebeyrie (Instituto Pasteur, París, Francia) en el marco de un proyecto colaborativo con nuestro laboratorio. Los ratones de los cuales se obtuvo los linfocitos para obtener el hibridoma fueron inmunizados con la proteína MBP-TcP2 β preparada según se describe en los ítems 2.8 y 2.9. Una vez obtenido el hibridoma el Instituto Pasteur envió a nuestro laboratorio alícuotas del sobrenadante de cultivo y del ARN del mismo.

Las regiones variables de los anticuerpos monoclonales fueron clonadas bajo la forma de un scFv. Esta construcción se asemeja al fragmento Fab ya que carece de las regiones constantes del anticuerpo y retiene la propiedad de unión al antígeno (Fig. 7). La principal diferencia reside en que el sitio de unión al antígeno es monovalente ya que una copia de la región variable de la cadena pesada está unida a una copia de la cadena liviana por un fragmento de 15 aminoácidos.

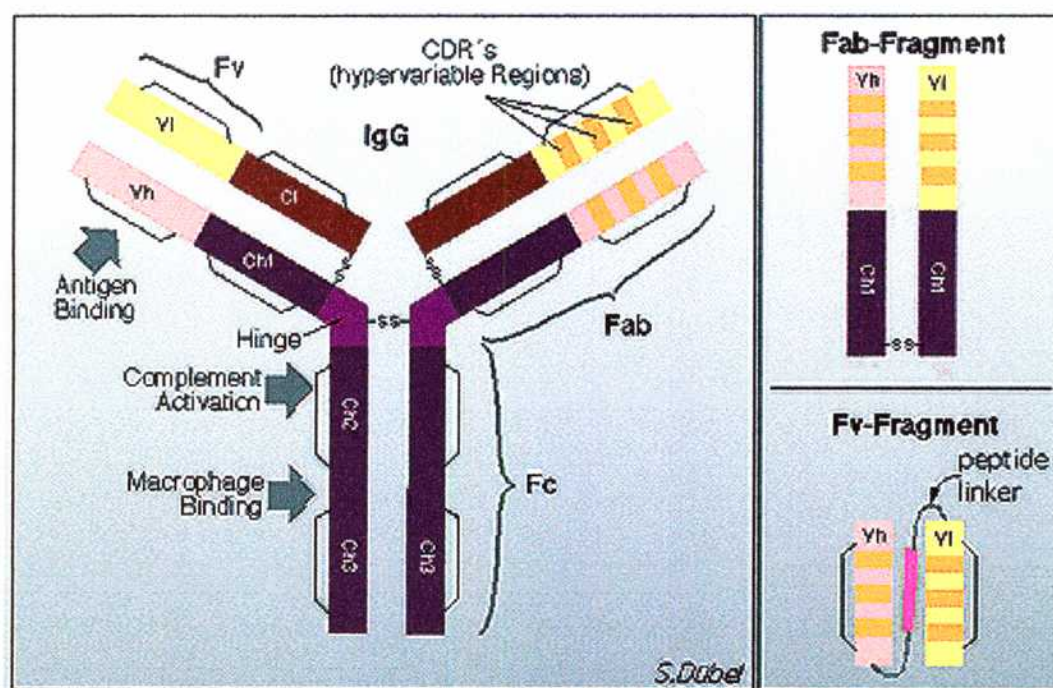


Figura 7. Esquema comparativo de una IgG completa, un Fab y un scFv (Fv). Se observa las distintas regiones características de un anticuerpo. En especial las regiones hipervariables (en naranja, CDR) presentes tanto en la IgG, el Fab y el scFv.

El clonado de las regiones variables de un AM en un scFv permite la expresión de abundantes cantidades de éste en un sistema procarionte así como también provee el marco adecuado para manipular mediante técnicas de biología molecular la secuencia nucleotídica del anticuerpo. La construcción del scFv involucra 3 pasos de PCR. En la PCR 1 las regiones VH y VL son amplificadas a partir del cDNA. En la PCR 2 se agregan los sitios de clonado y el fragmento ligador. En la PCR 3 se fusionan los fragmentos VH y VL en un único fragmento. Este fragmento luego de ser purificado se digiere con las enzimas de restricción Nco I y Not I para su ligación en el plásmido pUC118-Myc (Fig. 4 y 8) (Lefranc, 1997).

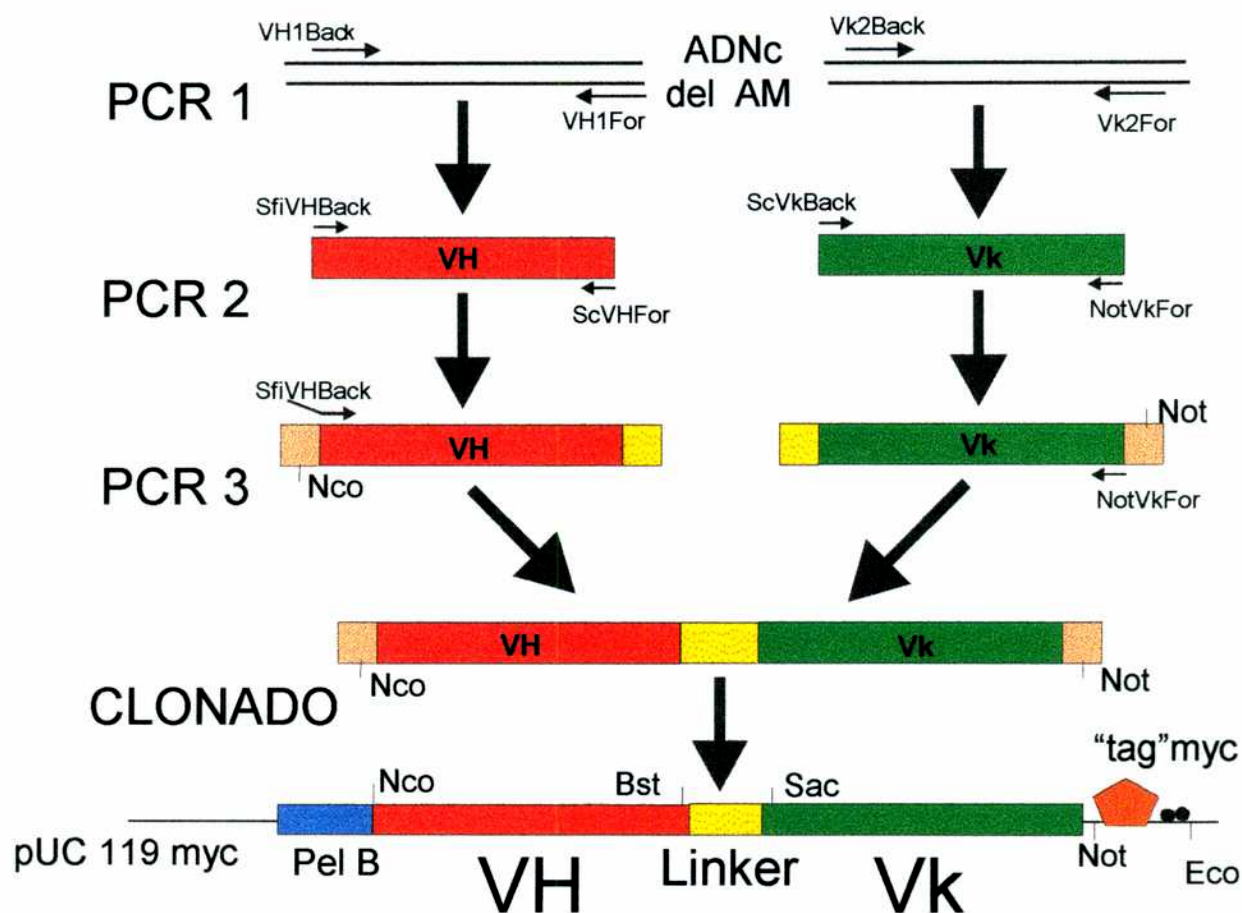


Figura 8. Clonado de las regiones variables de un AM en un vector procarionte.

2.22.1. Extracción del ARN de los hibridomas y preparación del ADNc

La extracción del ARN se realizó utilizando el kit Rneasy de Quiagen. Se centrifugaron 1×10^7 células durante 5 min a $300 \times g$. Luego de descartar el sobrenadante, las células se procesaron siguiendo las indicaciones del kit. El ARN obtenido se cuantificó determinando la absorbancia a 260 nm (una unidad equivale a $40 \mu\text{g/ml}$ de ARN).

Para obtener el ADNc se realizó una reacción de RT-PCR utilizando $5 \mu\text{g}$ del ARN de los hibridomas. La reacción se realizó de la siguiente forma:

Buffer Moloney Murine Virus RT 5X	4 µl
Inhibidor de RNAsas	1 µl
DNTP (25 mM)	1,5 µl
Hexámeros (200 ng/ul)	1 µl
MMV (200 U/ul)	3 µl
RNA	5 µl
Agua	4,5 µl
	20 µl

Se utilizó el siguiente programa:
10 minutos a 25 °C , 40 minutos a 42 °C , 5 minutos a 95 °C

En otros casos se realizó una reacción de RT-PCR empleando los oligonucleótidos específicos en lugar de los hexámeros. En estos casos se empleó el kit Acces RT-PCR System (Promega). Este método posee la ventaja de realizar las dos reacciones (Síntesis de ADNc y amplificación por PCR) en un solo paso ya que contiene la transcriptasa reversa AMV (Avian Myeloblastosis Virus) y una polimerasa termoestable proveniente de Thermus flavus (Tfl). De esta forma la reacción se realiza en menos tiempo y fundamentalmente se evitan contaminaciones ya que toda la reacción se realiza en un solo tubo. La reacción se realizó de la siguiente forma:

	Volumen	Concentración Final
Agua (libre de RNAsa)	10 µl	
Buffer AMV / Tfl 5X	5 µl	1X
Mezcla de dNTPs (10 mM cada uno)	0,5 µl	0,2 mM
Primer 5´	50 pmol 2,5 µl	1 µM
Primer 3´	50 pmol 2,5 µl	1 µM
Mg SO ₄ 25 mM	1 µl	1 mM
AMV Transcriptasa Reversa (5U/ul)	0,5 µl	0,1 U/µl
Tfl DNA Polimerasa (5U/ul)	0,5 µl	0,1 U/µl
Muestra de RNA	2 µl	
Inhibidor de RNAsa	0,5 µl	
Volumen final	25 µl	

Los oligonucleótidos específicos empleados en esta reacción se describen en el punto 2.22.2. Para calcular los nanogramos de primer equivalente a 50 pmol se realiza la siguiente ecuación:

$$X\text{ ng} = 50\text{ pmol/numero de bases del primer}$$

Se utilizó el siguiente programa:

Síntesis de la primera hebra de DNAC	1 ciclo 48° C 45 minutos	] 40 ciclos
Desnaturalización del ADN	1 ciclo 94° C 2 minutos	
Síntesis de la segunda hebra de DNAC y	30 seg. a 94°C	
amplificación por PCR	1 min. a 62°C	
Elongación	2 min. a 68°C	
	1 ciclo 68° C 10 minutos	

2.22.2.Amplificación de las regiones variables

El ADNc obtenido en la reacción con la transcriptasa reversa se utilizó para amplificar las regiones variables de la cadena liviana (VL) y pesada (VH) de un anticuerpo monoclonal de acuerdo al método descripto descripto a continuación.

PCR 1

Buffer Taq Pol 10X	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
DNTP (2,5 mM)	5 µl
Primer For (10 µM)	2,5 µl
Primer Back (10 µM)	2,5 µl
Agua	28,5 µl
ADNc	<u>5 µl</u>
	50 µl

Se realizó el siguiente programa:

Desnaturalización del ADN	1 min. a 94°C	] 30 ciclos
Pegado de los oligonucleótidos	1 min. a 60 °C	
Síntesis de ADN	1 min. a 72°C	
Completado de cadenas	10 min. a 72° C	

Para la amplificación de VL se utilizan los oligonucleótidos Vk2 For y Vk2 Back y para la amplificación de VH se utilizan los oligonucleótidos VH1 For y VH1 Back.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la PCR1 es:

Vk2For	5´	CCGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCC	3´
	5´	CCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCC	3´
	5´	CCGTTTGATTTCCAACTTTGTCCC	3´
	5´	CCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC	3´

VH1For 5' TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC 3'

VH1Back 5' AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG 3'

(S= C o G ; M= A o C ; R= A o G ; W= A o T)

PCR2

Buffer Taq Pol 10X	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
DNTP (2,5 mM)	5 µl
Primer For (10 µM)	2,5 µl
Primer Back (10 µM)	2,5 µl
Agua	28,5 µl
ADN	<u>5 µl</u> 50 ul

Se utilizó el siguiente programa:

Desnaturalización del ADN	1 min. a 94°C	] 30 ciclos
Pegado de los oligonucleótidos	1 min. a 50 °C	
Síntesis de ADN	1 min. a 72°C	
Completado de cadenas	10 min. a 72° C	

Para la amplificación de VL se utilizaron los oligonucleótidos NotVkFor y SCVkBack y para la amplificación de VH se utilizaron los oligonucleótidos SCVH For y SfiVH Back. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la PCR2 es:

Primers PCR 2

SCVHFor
5'AGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACC TGAGGAGACGGTGACCG 3'

SfiVHBack
5' TACTCGCGGCCCAACCGGCCATGGCCCAGGTSMARCTGCAGSAGTC 3'

NotVkFor
5' GATATGAGATACTGCGGCCGC CCGTTTGATTTCAGCTTGGTGCC 3'
5' GATATGAGATACTGCGGCCGC CCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCC 3'
5' GATATGAGATACTGCGGCCGC CCGTTTGATTTCCAACTTTGTCCC 3'
5' GATATGAGATACTGCGGCCGC CCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC 3'

SCVkBBack
5' GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCCGACATTGAGCTCACCCAG 3'

PCR 3

Esta reacción de PCR permite unir en una sola molécula las regiones VH y VL. Esta reacción se realiza en dos etapas. En la primera se mezclan los fragmentos VH y VL en ausencia de “primers”. Esta etapa consta de 10 ciclos de PCR en los cuales por un mecanismo de “Overlap extension” los fragmentos VH y VL hibridan y forman un solo fragmento. En la segunda etapa se agregan los primers SfiVHBack y NotVkFor para producir un aumento exponencial del fragmento formado previamente.

Buffer Taq Pol 10X	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
DNTP (2,5 mM)	5 µl
Agua	33,5 µl
VH purificado	2 µl
Vk purificado	2 µl
Taq polimerasa	1 µl
	50 µl

Se utilizó el siguiente programa:

Desnaturalización del ADN	2 min. a 94°C	] 30 ciclos
Pegado de los oligonucleótidos	1 min. a 50 °C	
Síntesis de ADN	1 min. a 72°C	

Luego se agregó 2, 5 µl de cada primer (SfiVHBack y NotVkFor) y se realizó el siguiente programa:

Desnaturalización del ADN	1 min. a 94°C	] 15 ciclos
Hibridación / Elongación	2 min. a 72 °C	

El fragmento de ADN obtenido en la PCR 3 fue purificado, cortado con las enzimas Not I y Nco I y posteriormente ligado al plásmido pUC-myc.

2.22.3. Análisis de las secuencias de las regiones variables

Las secuencias correspondientes a las regiones variables de la cadena pesada y liviana de los anticuerpos monoclonales fueron comparadas y revisadas empleando distintas bases de datos.

<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/seqtest.html>
http://www.ibt.unam.mx/paginas/almagro/V_mice.html
<http://immuno.bme.nwu.edu/>
<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html>

2.23. EXPRESION DEL scFv

Para lograr la expresión del scFv se procedió de acuerdo a lo descrito por Lefranc (1997). Se inoculó 50 ml de medio LB-amp conteniendo 0,1% de glucosa con 0,5 ml de un cultivo saturado de una bacteria conteniendo el plásmido recombinante. Se incubó a 37°C con agitación durante 3 horas. Luego se agregó IPTG hasta una concentración final de 1 mM y se incubó a 28°C con agitación durante 3 horas. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4000 rpm durante 30 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 5 ml de buffer de esferoplastos y se agitó en hielo durante 30 min. El lisado se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante corresponde a la fracción periplásmica. La expresión del scFv se determinó en ensayos de Western blot empleando como primer anticuerpo un AM dirigido contra el "tag" c-myc.

2.24. ANALISIS HISTOPATOLOGICO

El material proveniente de tejido cardíaco y músculo esquelético de los ratones inmunizados y normales se fijó en líquido de Bouin y se incluyó en Paraplast y posteriormente en metacrilato. Los cortes de 5 mm de espesor se colorearon con hematoxilina-eosina y se analizaron en la forma previamente descripta por Ruiz (1985).

2.25. ANALISIS ELECTROCARDIOGRAFICOS

Para realizar los análisis electrocardiográficos se emplearon dos técnicas. Los primeros registros se tomaron de acuerdo a lo descrito por Laguens (1980) y Ruiz (1985). En este caso los ratones fueron anestesiados colocándolos por un corto período en una atmósfera con éter. Como electrodos se utilizaron agujas de metal de 10 x 5 y se registraron las derivadas DII, DIII y aVF. En el otro diseño experimental empleado, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital administrado por ruta intraperitoneal. La dosis necesaria para lograr el grado de anestesia deseado fue de 0.06 mg/g de peso corporal utilizando el método de Pilgrim y De Ome (1955). Como electrodos se emplearon pinzas cocodrilo modificadas para no dañar las extremidades del ratón. Además se colocó en los extremos de los electrodos crema de keratina para mejorar el contacto con la piel del ratón (Fig. 9).

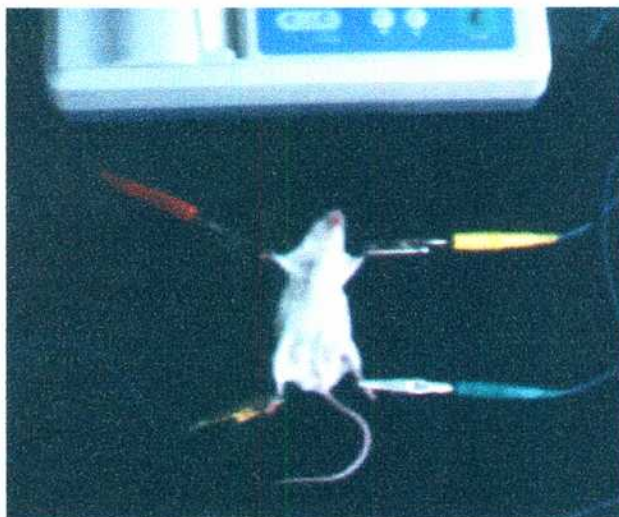


Figura 9. *Toma del electrocardiograma*

Los registros se realizaron con un electrocardiógrafo Fukuda-Denshi FX-2111 con corriente alterna. Se registraron las derivadas DI, DII, DIII aVL, aVR y aVF en cada ratón con una velocidad del papel de 50 mm/seg. y con una amplitud de 20 mm/mV. De la misma forma se determinó el trazado

trazado electrocardiográfico de ratones normales. El análisis electrocardiográfico incluyó la medición de la frecuencia cardíaca, el intervalo P-R y la duración y amplitud del complejo QRS y la onda P (Fig. 10).

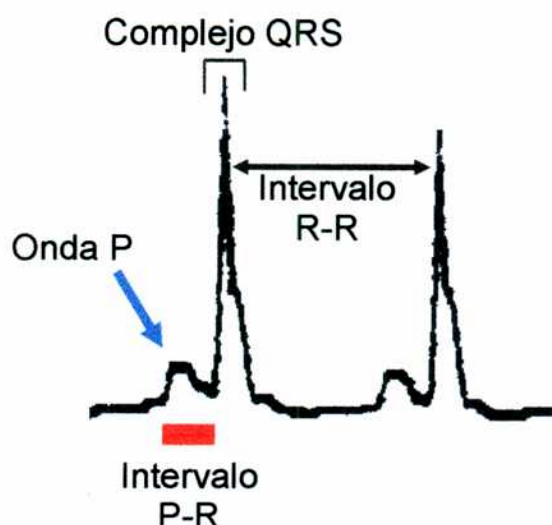


Figura 10. *Parámetros de importancia en el electrocardiograma del ratón.*

En el electrocardiograma de ratón la onda T que representa la repolarización de los ventrículos se encuentra embebida o fusionada con el complejo QRS. Por este motivo no se pudo obtener datos de la onda T ni del segmento S-T. Debido a esta particularidad, en la mayoría de los casos la amplitud medida del QRS corresponde en realidad al complejo QRST. Los ECG se analizaron a doble ciego en forma independiente por dos observadores para detectar alteraciones en el ritmo, en la conducción o en la repolarización. Las anomalías encontradas se clasificaron de acuerdo a lo descrito por Tranchesi (1981) y Te-Chuan Chou (1996).

2.26. ENSAYO DE ACTIVIDAD FUNCIONAL

2.26.1. Aislamiento y cultivo de cardiocitos

Se extrajo el corazón de ratas Wistar neonatas muertas por decapitación y se colocó en una solución de PBS 1% glucosa. Luego de varios lavados los corazones se cortaron en pequeños trozos y se lavaron dos veces en PBS 1%

solución enzimática de 0,25% Tripsina, 5% DNAsa, 35 unidades/ml. colagenasa en PBS pH 7,4 y se dejó agitando suavemente a 37 °C durante 8 minutos. Luego se agregaron 4 ml de una solución de 2% suero fetal bovino (GIBCO), 1% Glucosa, 5% DNAsa en PBS para detener la digestión. Las células se centrifugaron 5 minutos a 1000 rpm. y el precipitado se resuspendió en medio de cultivo D-MEM/F12 con 5% de suero fetal bovino. Se sembraron $2,5 \times 10^5$ de células por placa de Petri P60 y se cultivaron a 37°C en atmósfera 5% CO₂.

2.26.2. Determinación de la frecuencia de contracción

En cada placa de Petri se marcaron al menos 10 campos donde se midió la frecuencia de contracción durante 15 segundos para todos los tratamientos realizados en esa placa. La frecuencia de contracción basal se midió a 37°C usando una platina termostatzada instalada en un microscopio invertido. Los cambios en la frecuencia espontánea de latido se midieron 1 hora después del agregado de los anticuerpos. La especificidad de los resultados observados se confirmó mediante el uso de agonistas/antagonistas específicos (Ferrari, 1995).

2.26.3. Preparación de IgG

Las IgG séricas se purificaron mediante una precipitación en sulfato de amonio 40%, posterior redisolución en buffer fosfato a una dilución 1:1 y diálisis por 24 horas a 4°C en buffer fosfato.

2.27. ELECTROCARDIOGRAMAS EN CORAZONES AISLADOS DE CONEJO

El método para registrar el ECG en corazones aislados de conejo fue descrito en detalle por Perez *et al.* (1984). Se utilizaron corazones provenientes de conejos jóvenes de 1,5-2 kg. muertos por dislocación cervical. Se extrajeron los corazones y se los colocó verticalmente con la aurícula hacia arriba en un recipiente de vidrio con solución de Tyrode precalentada a 36° C. Los corazones fueron canulados por la aorta con solución de Tyrode para lograr una perfusión continua. Para realizar el ECG se colocaron dentro del recipiente tres electrodos de vidrio conteniendo 1M de NaCl. Dos de los electrodos se conectaron a un amplificador (3

A 9, Tektronix, Inc., Beaverton, OR) y el tercero fue conectado a tierra. El protocolo experimental consistió de registros control tomados durante 30 min en presencia de solución de Tyrode. Luego se realizó la perfusión con suero total (dilución 1/100), con la fracción de IgGs purificadas (0,02-0,06 mg/ml) o con la fracción depleta de IgGs (0,2-0,6 mg/ml). Estas perfusiones se realizaron por un lapso no mayor a 30 min. Las fracciones de anticuerpos fueron diluidas en solución de Tyrode. Luego de la perfusión con las IgGs se realizó un lavado con solución de Tyrode durante 30 min. Durante todo el procedimiento se registró en forma continua el ECG en un osciloscopio (561 Tektronix, Inc.). Cada cinco minutos se tomaron registros expandidos. El análisis del ECG incluyó: frecuencia de la onda P, presencia de bloqueos de conducción AV y otras arritmias. Estos ensayos también se realizaron luego de preincubar los sueros o las fracciones de IgGs con distintos antígenos y péptidos. Los ensayos destinados a comparar el efecto sobre el ECG producido por una fracción de anticuerpos en presencia o ausencia de los distintos agregados fueron realizados empleando el mismo corazón de conejo.

2.28. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos correspondientes a muestras con distribución normal fueron analizados mediante el Test T de Student, mientras que los que no siguieron distribución normal fueron analizados mediante el Test de Suma de Rangos de Wilcoxon. Ambos test fueron aplicados a partir del paquete estadístico EPISTAT. En los ensayos de proliferación celular se empleó el Test no paramétrico de Mann-Whitney.

3. Resultados

3.1. CLONADO DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P DE *T. cruzi*

Al iniciar el presente trabajo de Tesis los antígenos JL5, JL52 y JL7 de *T. cruzi* se encontraban clonados en el fago λ gt11 (Levin, 1989). El clonado en este vector permite determinar las propiedades inmunológicas de los antígenos a través del ensayo de placas de lisis (Fig. 1A). La obtención de bacterias lisógenas para esos fagos permite además obtener un extracto proteico enriquecido en la proteína en cuestión (Fig. 1B, calle 3), con el cual realizar ensayos de Western blot (Fig. 1B, calle 4) y ELISA (Fig. 1C).

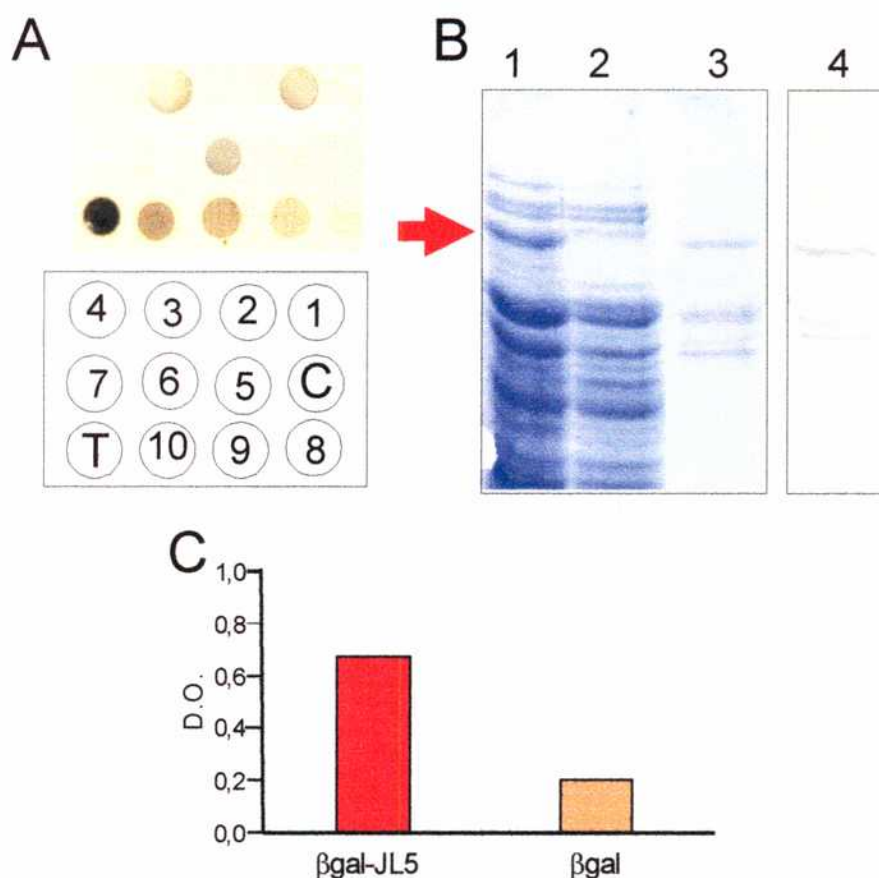


Figura 1. Ensayos inmunológicos empleando antígenos de *T. cruzi* clonados en el vector λ gt11. **(A)** Ensayo de placas de lisis. En este caso la membrana contiene proteínas provenientes de 10 fagos recombinantes (1-10), proteína β gal proveniente del fago λ gt11 salvaje (C) y proteínas totales de *T. cruzi* (T). La membrana fue revelada con suero de un paciente chagásico. **(B)** SDS-PAGE (calles 1-3) y Western blot (calle 4) utilizando extractos proteicos de bacterias lisógenas para el antígeno β gal-JL5. Calle 1: cultivo inducido con IPTG. Calle 2: cultivo no inducido. Calle 3 y 4: extracto enriquecido en la proteína β gal-JL5. La membrana de la calle 4 fue revelada utilizando el suero de un paciente chagásico. **(C)** Reactividad de sueros chagásicos contra un extracto enriquecido en la proteína β gal-JL5 y β gal determinada por ELISA. Cada barra representa la media de la D.O. obtenida para cada antígeno.

Estos ensayos fueron de gran utilidad en un principio, pero carecen de una buena sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. Además, el clonado en este vector no permite la obtención de las proteínas purificadas, lo cual impide llevar a cabo estudios tendientes a analizar otros aspectos de la respuesta inmune contra estas proteínas.

Por lo tanto, el primer objetivo de este trabajo de Tesis fue subclonar las proteínas de *T. cruzi* en vectores de expresión apropiados que permitieran una rápida y eficiente purificación de estos antígenos. Para ello, se escogieron los plásmidos de expresión pMal y pGex. Dichos plásmidos expresan la proteína foránea acoplada a una proteína portadora, proteína de unión a maltosa (MBP, del inglés "Maltose Binding Protein" en el caso de pMal y glutatión-s-transferasa (GST) en el caso de pGex. Esta proteína portadora es utilizada para unir la proteína recombinante a columnas de afinidad permitiendo la purificación de grandes cantidades de la proteína recombinante.

3.1.1. Clonado de las proteínas ribosomales P en el plásmido pMal

Los antígenos JL5 y JL52 codifican el extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P2 β y P0 de *T. cruzi*, respectivamente (Levin, 1989) (Fig. 2). Los antígenos S23 y CH3 también codifican las proteínas P2 β y P0 de *T. cruzi*, respectivamente (Fig. 2) (Levy Yeyati 1992; Schijman, 1992b). La diferencia entre los primeros antígenos caracterizados (JL5 y JL52) y los últimos (S23 y CH3) es el tamaño de los mismos: JL5 y JL52 codifican fragmentos de 38 y 75 aminoácidos de los extremos C-terminales de dichas proteínas, mientras que los antígenos S23 y CH3 codifican casi la totalidad de la proteína (Fig. 2). Por este motivo se utilizó el ADNc de S23 y CH3 para subclonar las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* en vectores de expresión.

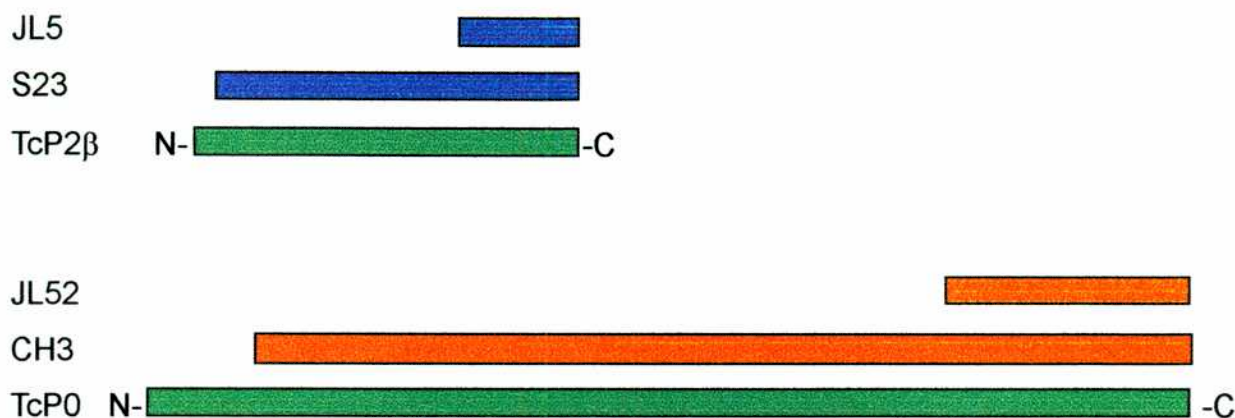


Figura 2. Esquema de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*. En color azul se observan los recombinantes JL5 y S23 (38 y 105 aminoácidos, respectivamente). En color naranja se observan los recombinantes JL52 y CH3 (75 y 291 aminoácidos, respectivamente). Los recombinantes se comparan con sus respectivas proteínas nativas TcP2β y TcP0 (en color verde, 110 y 321 aminoácidos, respectivamente).

El subclonado de los ADNc en el plásmido de expresión pMal se realizó mediante amplificación por PCR de los insertos de los fagos recombinantes λgt11-S23 y λgt11-CH3. En un principio las reacciones de PCR se realizaron empleando los primers P21-P26. Estos oligonucleótidos contienen secuencias adyacentes al sitio Eco RI del fago λgt11. Los fragmentos amplificados utilizando los primers citados pueden ser clonados en el sitio Eco RI de pMal en forma no direccional. Con el fin de realizar un clonado direccional, se diseñaron los primers S1 y S2. Estos oligonucleótidos también hibridan con la zona de clonado pero contienen sitios de restricción internos para las enzimas Bam HI y Hind III. La introducción en los primers S1 y S2 de 2 y 3 mutaciones con relación a la secuencia de λgt11 respectivamente, determinó que fuera necesario disminuir la temperatura de apareamiento (T_m) en la reacción de PCR. Por lo tanto, las T_m empleadas fueron de 60 °C y 55 °C para los primers P21-P26 y para S1-S2, respectivamente. En la figura 3 se muestra el análisis de las amplificaciones realizadas sobre los fagos recombinantes. La reacción de PCR correspondiente al fago λgt11-S23 (Fig. 3, calle 3) se realizó con los primers P21-P26 y la correspondiente al fago λgt11-CH3 con los primers S1-S2 (Fig. 3, calle 2). El tamaño de los amplicones fue aproximadamente de 600 y 1000 pb para S23 y CH3 respectivamente, lo cual coincidió con lo determinado previamente.

Posteriormente, los distintos amplicones fueron purificados a partir de los fragmentos del gel de agarosa. El fragmento purificado correspondiente a λ gt11-S23 fue digerido con Eco RI y el correspondiente al fago λ gt11-CH3 con Bam HI-Hind III. En forma paralela, el plásmido pMal se digirió en forma independiente con Eco RI o con Bam HI-Hind III. El plásmido digerido con Eco RI fue posteriormente desfosforilado. Después de estos tratamientos tanto el vector como los insertos fueron nuevamente purificados a partir de geles de agarosa. Luego de cuantificar el rendimiento de cada purificación se realizaron las reacciones de ligación. El fragmento S23-Eco RI fue ligado al plásmido pMal-Eco RI y el inserto CH3 Bam HI y Hind III al plásmido pMal-Bam HI-Hind III. Finalmente, se procedió a transformar bacterias *E. coli* DH5 α con los productos de ligación. Las bacterias transformadas con el producto de ligación pMal + S23 fueron sembradas en placas con IPTG/X-gal a fin de realizar una primera selección de las colonias recombinantes por el método de α -complementación. El análisis del ADNp de las colonias blancas determinó que ninguna de ellas poseía el inserto S23. Al repetir esta experiencia y obtener el mismo resultado se sospechó que la proteína recombinante podría ser tóxica para la bacteria al ser sobreexpresada en medio sólido. La transformación fue repetida pero sembrando las bacterias en placas sin IPTG/X-gal. Las colonias obtenidas fueron repicadas en paralelo a dos placas con y sin IPTG/X-gal respectivamente. Este experimento puso en evidencia la existencia de colonias blancas que crecían más lentamente en las placas con IPTG/X-gal. Luego de subcultivar estas colonias en medio líquido, se extrajo su ADNp y se analizó la presencia del inserto mediante mapeos de restricción. Este ensayo confirmó que la mayoría de las bacterias que crecieron más lentamente en placas con IPTG-Xgal poseían el plásmido pMal-S23 recombinante, demostrando que efectivamente la expresión de la proteína ribosomal resultaba en cierta medida tóxica para la bacteria. Los estudios con enzimas de restricción realizados para identificar las colonias conteniendo el plásmido pMal-S23 fueron similares a los que se describen a continuación, efectuados durante el clonado de CH3.

Al realizar el clonado de CH3 se investigó la presencia del plásmido recombinante en colonias seleccionadas al azar, dejando de lado la realización de ensayos de α -complementación debido a la posible toxicidad de la proteína ribosomal. En la figura 4 se observa el análisis realizado sobre cinco colonias provenientes de la ligación de pMal con el fragmento CH3. El ADNp fue obtenido de

acuerdo a lo indicado en **Materiales y Métodos** y posteriormente digerido con Eco RI. Se observó que de la digestión de los plásmidos analizados en las calles 1, 3 y 4 se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1000 pb lo cual coincidió con el tamaño del amplicón del fago λ gt11-CH3 (Fig. 3, calle 2 y Fig. 4, calle 7). Con el fin de confirmar la identidad del ADNc clonado y la correcta expresión de la proteína recombinante, las colonias cuyos plásmidos se analizaron en la figura 2 fueron subcultivadas en medio líquido y posteriormente se agregó IPTG para inducir la expresión de la proteína recombinante. Los extractos proteicos de estos cultivos se analizaron por SDS-PAGE y Western blot. En la figura 5 A puede observarse que en los clones 1, 3 y 4 se indujo, en presencia de IPTG, (calles 1+, 3+ y 4+) la expresión de una proteína de aproximadamente 75 KDa. La expresión de esta proteína está controlada por el promotor tac del plásmido ya que no se observó su expresión en ausencia de IPTG (calles 1, 3 y 4). El tamaño de la proteína expresada por los clones 1, 3 y 4 fue el esperado, considerando el tamaño del inserto CH3 (1000 pb, 291 aminoácidos aproximadamente) y los 42 KDa correspondientes a la proteína portadora MBP codificada en el plásmido pMal. El estudio del ADNp así como de la expresión de proteínas indicaron que las colonias 1, 3 y 4 poseen el plásmido recombinante. La antigenicidad de la proteína de 75 KDa se analizó por Western blot, incubando los extractos proteicos de los clones crecidos en presencia de IPTG con el suero de un paciente chagásico previamente caracterizado como reactivo contra la proteína TcPO. La proteína inducida en los clones 1, 3 y 4 fue reconocida por los anticuerpos presentes en el suero (Fig. 5 B, calles 1+, 3+ y 4+). Por otra parte, no se detectó reactividad contra ninguna proteína del extracto correspondiente al clon 2 o de una bacteria transformada con pMal salvaje (Fig. 5B, calles 2+ y wt+). La proteína de 75 KDa expresada en los clones 1, 3 y 4 fue reconocida además por anticuerpos policlonales anti-MBP (resultados no presentados). En conclusión, los clones 1, 3 y 4 expresaron una proteína inducible por IPTG, con características de peso molecular y antigenicidad acordes a las esperadas para la proteína de fusión MBP-CH3.

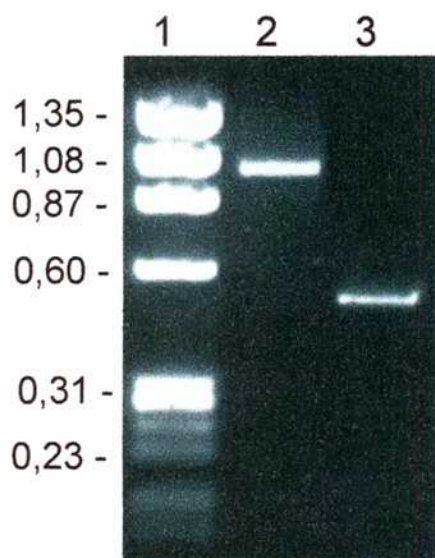


Figura 3. Amplificación por PCR del ADNc de S23 y CH3. Alícuotas de las reacciones de PCR realizadas sobre los fagos λ gt11-CH3 (calle 2) y λ gt11-S23 (calle 3) fueron analizadas en un gel de agarosa 1,2%. En la calle 1 se observan los marcadores de peso molecular (en kilobases).

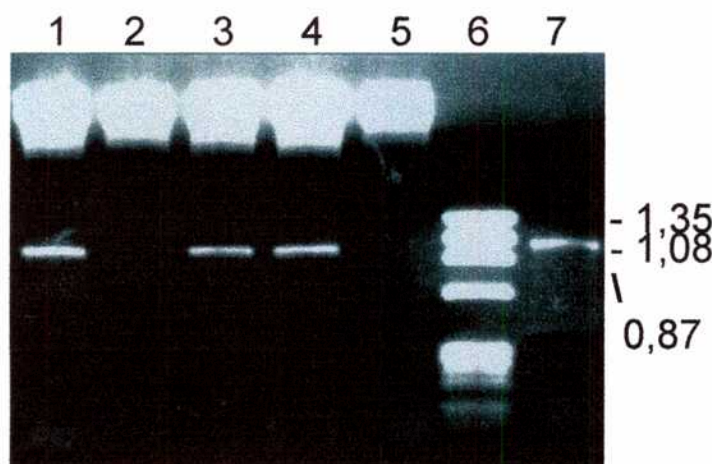


Figura 4. Análisis de plásmidos correspondientes al subclonado de pMal-CH3. Alícuotas de ADNp proveniente de bacterias transformadas con el plásmido pMal-CH3 fueron digeridas con Hind III y Bam HI, y analizadas en un gel de agarosa 1,2%. En las calles 1-5 se observan los productos de digestión de los clones 1 al 5. Calle 7: producto de la reacción de PCR sobre el fago λ gt11-CH3. En la calle 6 se observan los marcadores de peso molecular (en kilobases).

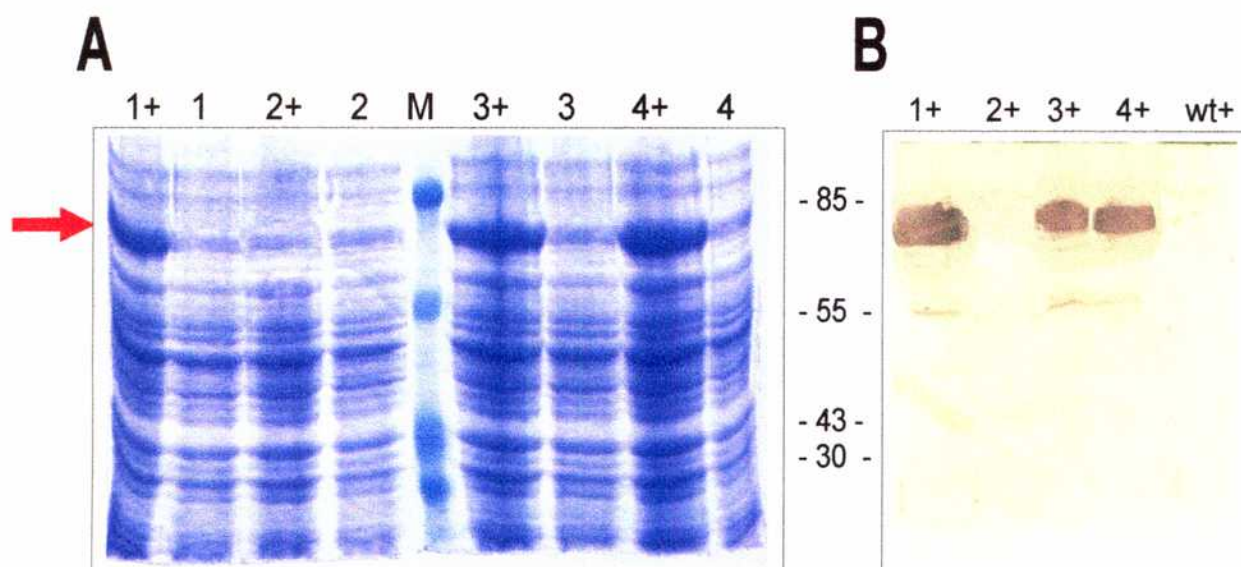


Figura 5. Expresión de la proteína recombinante MBP-CH3. (A) SDS-PAGE (tinción con azul de coomassie de extractos proteicos de los clones 1, 2, 3 y 4 crecidos en presencia (+) o en ausencia de IPTG. (B) Western blot de cultivos de los clones 1, 2, 3 y 4 crecidos en presencia de IPTG, revelado con el suero de un paciente chagásico previamente caracterizado como reactivo contra la proteína TcP0.

Dado que el subclonado de S23 y CH3 en pMal se realizó a partir de productos de PCR, se procedió a secuenciar los insertos para descartar la posible generación de mutaciones en el proceso de clonado. La secuenciación del inserto de pMal-S23 reveló la presencia de dos mutaciones con respecto a la secuencia conocida de S23 (Schijman, 1992b). Dichas mutaciones consistieron de la inserción de una citosina en la posición 1 de S23, lo cual genera un cambio en el marco de lectura (Fig. 6). Sin embargo, el marco de lectura correcto es restablecido 40 bases río abajo por la delección de una citosina que constituye la segunda mutación encontrada.

```

          L  A  A  Y  A  L  V  G  L  S  G  G  T
          CTT GCC GCT TAC GCT CTT GTT GGC TTA TCT GGG GGG ACC

1  GAA TTC CCT TGC CGC TTA CGC TCT TGT TGG CTT ATC TGG GGG GAC
1  P   C   R   L   R   S   C   W   L   I   W   G   D

46 CCCC TTG AAG TCT GCC GTT GAG GCC GTA TTG AAG GCT GCC GGC GTT
14 P   L   K   S   A   V   E   A   V   L   K   A   A   G   V

91 CCT GTT GAT CCT TCT CGC GTG GAT GCA CTT TTT GCC GAG TTT GCA
29 P   V   D   P   S   R   V   D   A   L   F   A   E   F   A

136 GGC AAG GAC TTT GAT ACG GTA TGC GCT GAA GGC AAA TCG AAG CTT
44 G   K   D   F   D   T   V   C   A   E   G   K   S   K   L

181 GTA GGA GGG GTT GCA CGT CCC AAT GCT GCC ACC GCT TCT GCA CCC
59 V   G   G   V   A   R   P   N   A   A   T   A   S   A   P

226 ACT GCC GCT GCC GCC GCC TCT GGT GGT GCC GCC GCG CCT GCT GCA
74 T   A   A   A   A   A   S   G   G   A   A   A   P   A   A

271 GCT GCG GAA GAG GAG GAG GAC GAT GAC ATG GGA TTT GGT CTT TTT
89 A   A   E   E   E   E   D   D   D   M   G   F   G   L   F

316 GAC TAA agacaaatgcttattttattttatttttgattttgtttctgtgttgcct
104 D   *

374 gaagaggcgctagagtcctgtgaataaaagaattc

```

Figura 6. Secuencia correspondiente al inserto del plásmido pMal-S23. Secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia deducida de aminoácidos de S23. En minúscula se señala la región 3' no codificante. Los dos sitios de restricción Eco RI se encuentran subrayados. Con recuadro verde se observa la inserción de citosina y con recuadro amarillo la delección de citosina. En rojo se observa la secuencia correcta de TcP2β correspondiente a la región alterada de S23.

Estas mutaciones no afectan el tamaño de la proteína producida pero sí en parte su secuencia ya que los 13 aminoácidos ubicados entre ambas mutaciones no corresponden a la proteína ribosomal. Salvo las dos mutaciones citadas la secuencia no presentó otras alteraciones y en consecuencia el resto de la secuencia proteica, incluyendo la región antigénica ubicada en el extremo C-terminal conservó los aminoácidos correctos. Debido a la naturaleza no antigénica del extremo N-terminal (Levitus, 1991), se consideró que estos cambios no eran relevantes para los objetivos de este trabajo.

La secuencia del inserto del plásmido pMal-CH3 no mostró ninguna diferencia con la informada originalmente (Schijman, 1992).

3.1.1.1. Purificación de las proteínas recombinantes con MBP

Las proteínas recombinantes MBP-S23 y MBP-CH3 fueron purificadas a partir de cultivos en medio líquido inducidos con IPTG. La concentración de IPTG se varió entre 0,1 mM y 1 mM y el tiempo de inducción entre 1 y 4 horas a fin de lograr las condiciones de cultivo de mayor rendimiento para cada proteína recombinante. La inducción por IPTG del promotor "tac" en este tipo de plásmidos de expresión permite la síntesis de niveles importantes de proteína recombinante (mayores al 20% del total de proteínas bacterianas) (Fig. 5A (calles 1+, 3+ y 5+)). Una vez transcurrido el período de inducción con IPTG el cultivo se cosechó y las bacterias fueron lisadas por sonicación y centrifugadas. La proteína recombinante fue separada del resto de las proteínas solubles y purificada por columnas de afinidad sefarosa-maltosa. En la figura 7, se observa la concentración proteica de las fracciones correspondientes a la purificación de la proteína recombinante MBP-S23. Las primeras fracciones poseen una elevada concentración proteica y corresponden al percolado y a las primeras fracciones de lavado de la columna con "buffer". Las fracciones L10 y E1 indican el fin del lavado y el comienzo de la elución con maltosa 10 mM, respectivamente. Las proteínas recombinantes eluyen inmediatamente luego del agregado de maltosa como lo indica el aumento de la concentración de proteínas en las fracciones E2 y E3.

Alícuotas de las fracciones eluidas de la columna fueron analizadas por SDS-PAGE (Fig. 8). El percolado muestra un perfil proteico complejo que coincide con los niveles elevados de proteínas determinados en la figura 7. Luego del agregado de maltosa (calles E2-E3), eluye una banda de PM apenas superior a los 55 Kda, correspondiente a la proteína recombinante MBP-S23. Las fracciones en las cuales eluyó la proteína recombinante fueron agrupadas y se determinó la concentración final de la misma. Las proteínas MBP-CH3 y MBP fueron purificadas de la misma manera (resultados no mostrados). El antígeno clonado fue posteriormente separado de la proteína portadora MBP mediante la digestión con la proteasa Xa. Esta enzima reconoce la secuencia Asp-Gly-Arg ubicada entre MBP y la secuencia clonada, produciendo así la separación de ambos péptidos (Fig. 9, calle 3). La digestión con factor Xa permitió confirmar la identidad del fragmento clonado ya que sólo el fragmento de 11 Kda que corresponde a S23 fue reconocido en un Western blot por el suero de un paciente chagásico con alto título de anticuerpos contra TcP2 β (Fig. 9, calle 5). De esta forma, se confirmó que la reacción observada contra la proteína entera no estaba dirigida contra MBP. Una vez determinadas las condiciones para realizar la digestión con factor Xa se incrementó proporcionalmente la cantidad de enzima y de proteína MBP-S23 con el objetivo de obtener grandes cantidades del péptido S23 purificado. Sin embargo, se observó que al aumentar la masa de proteína la eficiencia de corte de la enzima Xa disminuía a un 20-40% (resultado no mostrado). A pesar de haber ensayado distintos protocolos no se hallaron las condiciones que aumentarían la eficiencia de la digestión. Luego de la digestión se procedió a separar los fragmentos mediante una columna de amilosa.

Las proteínas expresadas por los plásmidos pMal-S23 y pMal-CH3 serán denominadas de aquí en adelante MBP-TcP2 β y MBP-TcP0 respectivamente.

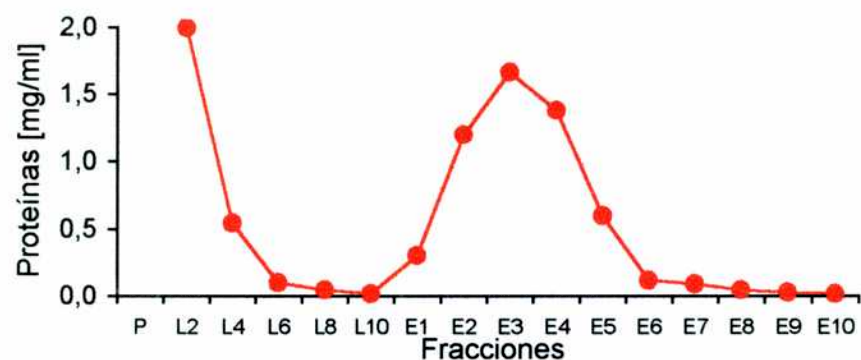


Figura 7. Perfil de elución de la columna de afinidad correspondiente a la purificación de MBP-S23. La letra P indica el percolado y la letra L indica las fracciones correspondientes al lavado de la columna con "buffer". La letra E indica las fracciones correspondientes a la elución de la proteína utilizando maltosa 10 mM. Sobre el eje Y se observa la concentración proteica de cada fracción.

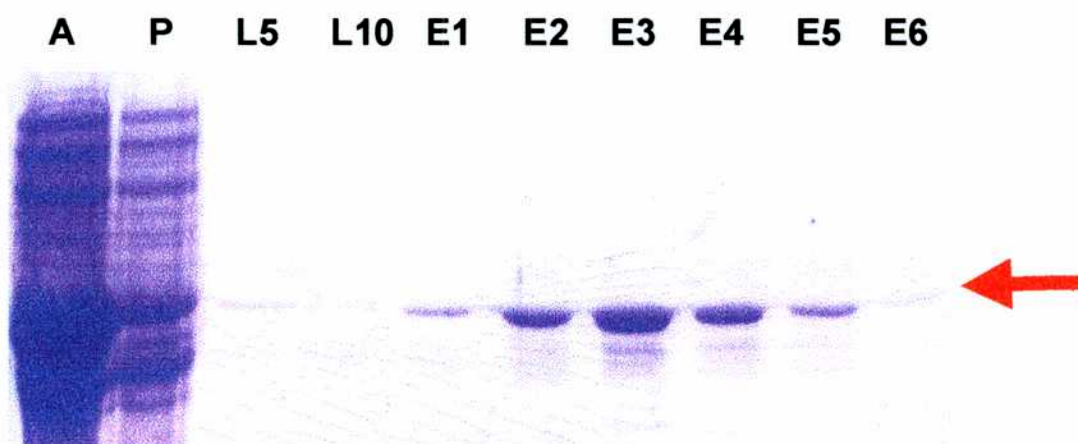


Figura 8. Purificación de la proteína recombinante MBP-S23. Alícuotas de distintas fracciones obtenidas de la columna de afinidad fueron analizadas por SDS-PAGE. Las letras A y P indican el extracto crudo y el percolado respectivamente. La letra L indica las fracciones correspondientes al lavado de la columna con "buffer" y la letra E las fracciones correspondientes a la elución de la proteína utilizando maltosa 10 mM.

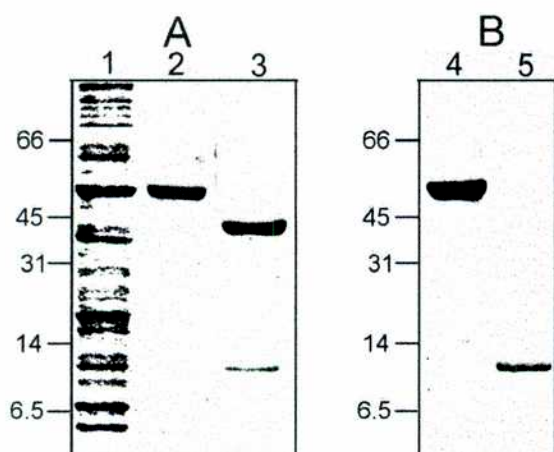


Figura 9. Digestión de la proteína recombinante MBP-S23 con la proteasa Xa. Análisis por SDS-PAGE 10% (A) y Western blot (B) del extracto crudo del cultivo de bacterias que contienen el plásmido pMal-S23 (calle 1), la proteína MBP-S23 purificada antes (calles 2 y 4) o después de la digestión con factor Xa (calle 3 y 5). El Western blot fue revelado con un suero chagásico con alto título de anticuerpos contra TcP2β.

3.1.2. Clonado de las proteínas ribosomales P en el plásmido pGex

Los ADNc de los antígenos S23 y CH3 fueron transferidos desde el plásmido pMal al plásmido pGex. El subclonado en pGex se realizó escindiendo los insertos de los plásmidos pMal-S23 y pMal-CH3 por corte con la enzima Eco RI. Posteriormente, dichos fragmentos fueron insertados en fase en el sitio Eco RI del plásmido pGex-1 λ T. En ambos clonados se obtuvo un elevado número de colonias en el control de autoligación. Se emplearon distintas técnicas para identificar las colonias que contuvieran el plásmido deseado. La identificación de las colonias con el plásmido pGex-S23 se realizó por Quick miniprep. En la figura 10A se observa que en las colonias de las calles 1, 5 y 6 el ADNp superenrollado (flecha azul) posee mayor tamaño que el correspondiente al plásmido salvaje (calle 8). La diferencia de tamaño es consistente con la presencia del inserto S23. Por su parte, las colonias positivas para pGex-CH3 fueron identificadas mediante "Colony PCR" (Fig. 10B) empleando oligonucleótidos adyacentes al sitio de clonado de pGex. En la figura 10B se observa la amplificación de una banda de aproximadamente 1000 pb (flecha azul) en las colonias analizadas en las calles 1, 3 y 5. El tamaño de esta banda es consistente con la presencia del plásmido pGex-CH3 en dichas bacterias. En ambos casos, la inserción de las secuencias de interés en pGex se confirmó mediante digestión con enzimas de restricción del ADNp de las colonias seleccionadas (Fig.10C). La expresión correcta de las proteínas GST recombinantes fue confirmada al igual que en el caso de las recombinantes MBP mediante SDS-PAGE (Fig. 11) y Western blot (resultados no mostrados) de los cultivos bacterianos inducidos con IPTG. En la figura 11 se observa la inducción de la expresión de las proteínas GST-S23 y GST-CH3 luego del agregado de IPTG.

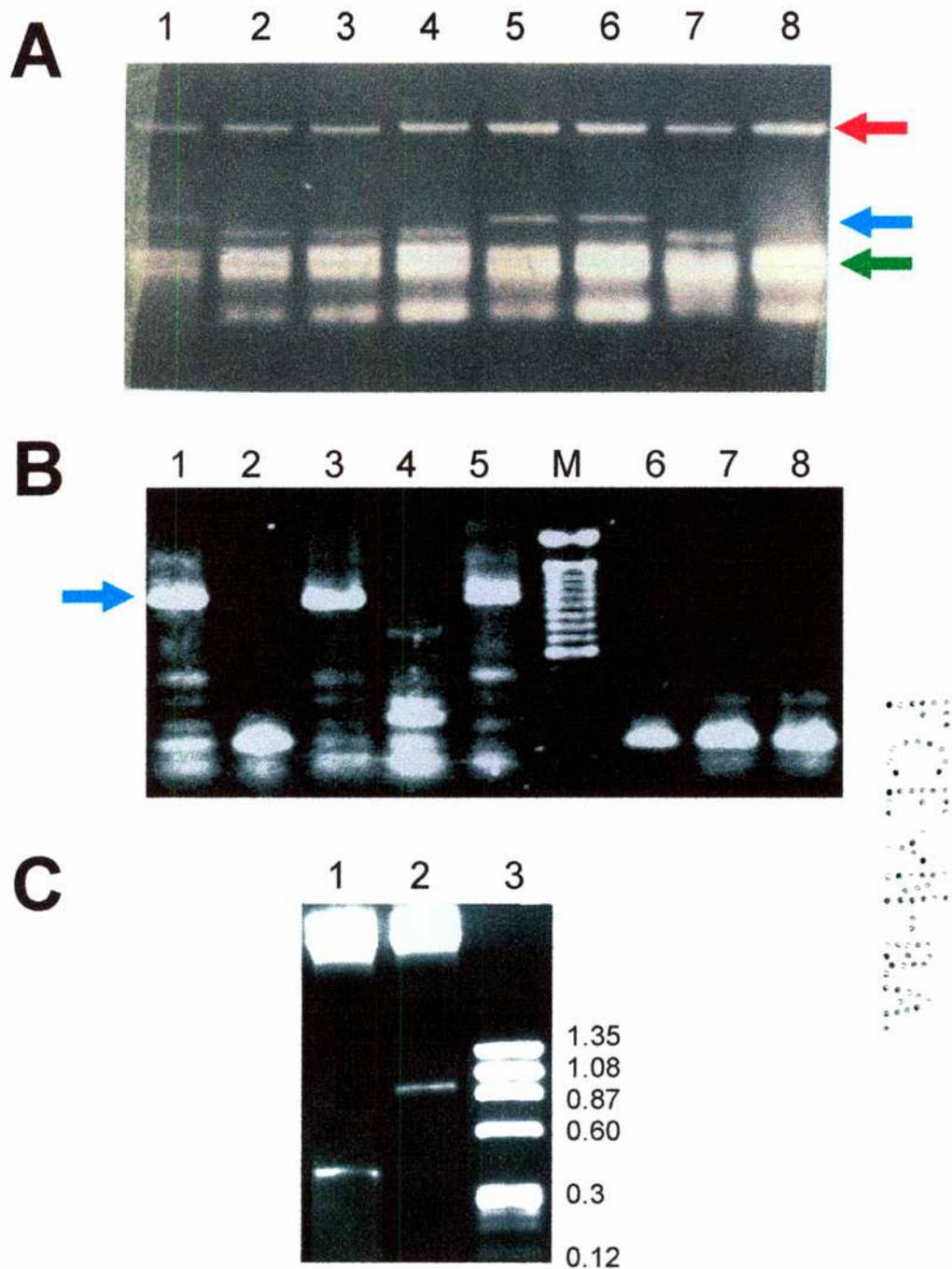


Figura 10. Análisis de colonias transformadas con los plásmidos pGex recombinantes. (A) Análisis por Quick Miniprep de colonias derivadas del subclonado de pGex-S23. La flecha azul indica la posición del ADNp superenrollado y las flechas roja y verde indican la posición del ADN cromosómico y del ARN ribosomal respectivamente. (B) Análisis por Colony PCR de colonias obtenidas en el subclonado de pGex-CH3. Calles 1-8: Alícuotas de la reacción de PCR realizada sobre 8 colonias distintas. En la calle M se observa la posición del marcador de peso molecular (100 pb "ladder"). (C) Digestión con enzimas de restricción del ADNp de bacterias conteniendo los plásmidos pGex-S23 (calle 1) y pGex-CH3 (calle 2). Calle 3: Marcadores de peso molecular (en kilobases).

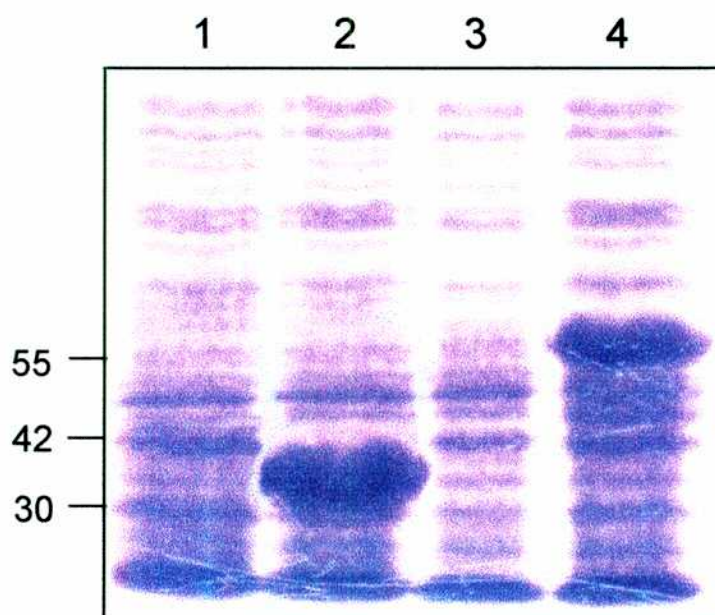


Figura 11. Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes GST-S23 y GST-CH3. Lisados de bacterias que contienen el plásmido pGex-S23 (calle 1 y 2) o el plásmido pGex-CH3 (calles 3 y 4), crecidos en ausencia (calles 1 y 3) o en presencia (calle 2 y 4) de IPTG, fueron analizados por SDS-PAGE 10%. A la izquierda se observan los marcadores de peso molecular.

3.1.2.1. Purificación de las proteínas recombinantes con GST

Los pasos seguidos para purificar las proteínas clonadas en el plásmido pGex fueron similares a los empleados para la purificación de las proteínas clonadas en el plásmido pMal. Al igual que en el sistema pMal, las proteínas carecen de señal de exportación y permanecen solubles en el citoplasma. Sin embargo, en muchos casos se ha informado que algunas proteínas tienden a formar agregados insolubles denominados cuerpos de inclusión (Ausubel, 1987). En función de este antecedente, para ambas preparaciones de proteínas recombinantes (GST-S23 y GST-CH3) se analizó tanto el sobrenadante como el pellet obtenidos luego de la sonicación de los cultivos. La proteína GST-S23 permaneció soluble en el sobrenadante y por lo tanto se procedió a su purificación como se describe en Materiales y Métodos.

Sin embargo, la mayor parte de la proteína GST-CH3 fue recuperada en el pellet debido a la formación de cuerpos de inclusión (Figura 12, calle 3). Esta forma insoluble de la proteína no podía ser aplicada a la columna de afinidad y requería por lo tanto tratamientos adicionales tendientes a aumentar su solubilidad. Se intentó solubilizar la proteína mediante el agregado en pasos sucesivos de concentraciones

decrecientes de HCl Guanidina o glicerol alternadas con agua. Se esperaba que la realización en forma repetida de este tratamiento volvería finalmente soluble en agua (o al menos, en bajas concentraciones de HCl Guanidina o glicerol) a la proteína. Sin embargo, la mínima concentración de HCl Guanidina o glicerol requerida para solubilizar la proteína no fue lo suficientemente baja. Asimismo, se realizaron cultivos bacterianos a bajas temperaturas (30° C) con el objetivo de lograr una mejor solubilidad de las proteínas a través de un lento crecimiento de las bacterias lo cual tampoco dio resultados positivos.

Como se puede observar en la figura 12 no toda la proteína recombinante forma cuerpos de inclusión ya que algo de ella permanece en la fracción soluble (calle 2). A partir de esta observación se intentó obtener mayor cantidad de proteína soluble disminuyendo la velocidad y el tiempo de centrifugación después de la sonicación. En la figura 12 se observan las proteínas presentes en el sobrenadante luego de centrifugar la muestra a distintas velocidades. Se puede observar que al disminuir la velocidad de centrifugación aumenta la cantidad de proteínas presentes en el sobrenadante. Finalmente, se escogió el sobrenadante de la centrifugación a 5000 g (Figura 12, calle 6) ya que éste contenía una apreciable cantidad de proteína recombinante y en él se observaba una notoria eliminación de restos celulares insolubles. De esta forma esta fracción se utilizó como material de partida para la cromatografía de afinidad. En este sistema se utilizaron columnas de afinidad glutatión-agarosa y la elución se realizó con glutatión reducido como se describe en **Materiales y Métodos**. El rendimiento de esta purificación fue inferior al obtenido para la purificación de GST-S23 pero permitió obtener suficiente proteína purificada para estudios posteriores.

Las proteínas expresadas por los plásmidos pGex-S23 y pGex-CH3 serán denominadas de aquí en adelante GST-TcP2 β y GST-TcP0 respectivamente.

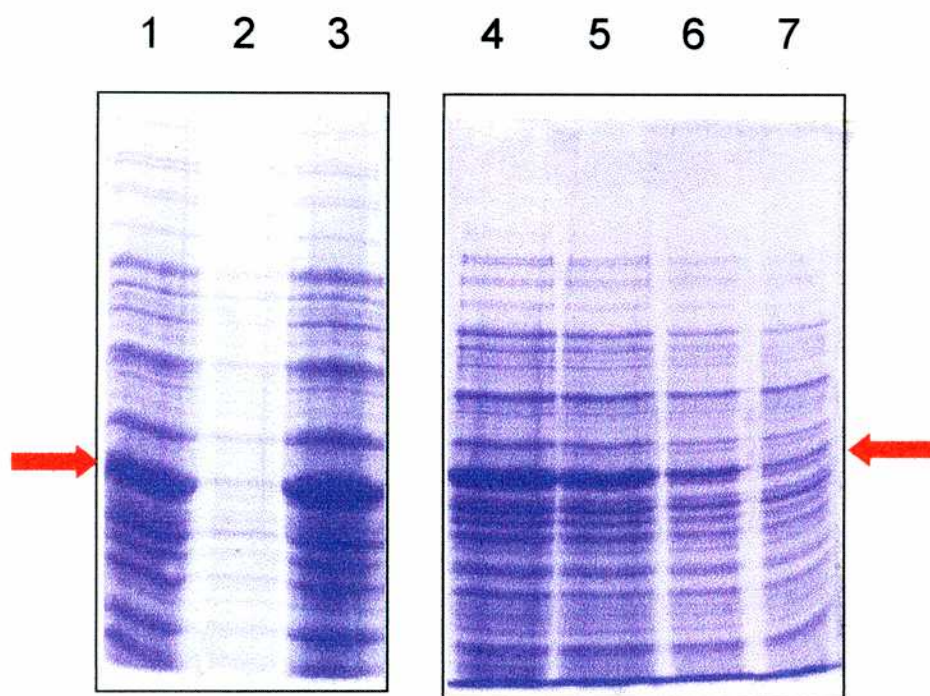


Figura 12. *Análisis mediante SDS-PAGE de las condiciones ideales de centrifugación del extracto proteico conteniendo la proteína recombinante GST-CH3. Calle 1 y 4: Extracto proteico sin centrifugar. Calle 2 y 3: sobrenadante y pellet de la centrifugación a 10000 g (30 minutos). Calle 5-7: Sobrenadante de la centrifugación a 2000 g (calle 5), 5000 g (calle 6) y 9000 g (calle 7) durante 5 minutos. La flecha roja indica la posición de la proteína GST-CH3.*

3.2. CLONADO DE AUTOANTIGENOS

3.2.1. Clonado de las proteínas ribosomales P de mamífero

Dado el alto nivel de homología existente entre las proteínas P humanas y las de ratón, se realizó el clonado de estas últimas a partir de una biblioteca de ADNc de ratón construida en λ gt11. Como sonda se utilizó el suero de un paciente con Lupus Eritematoso Sistémico con alto título de anticuerpos dirigidos contra el extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P humanas. Además, este suero era negativo para otros autoanticuerpos frecuentemente encontrados en pacientes con LES (anticuerpos contra las proteínas nucleares Ro, La, Sm, Histonas, etc).

En el primer rastreo se plaquearon 30.000 fagos de acuerdo a lo descrito en **Materiales y Métodos**. De este rastreo se aislaron 5 fagos que fueron reconocidos por el suero lúpico. Dichos fagos fueron sucesivamente rastreados hasta finalmente obtener dos fagos puros denominados Ral1 y Ral5. Posteriormente, se confirmó que estos fagos contenían ADNc correspondiente a proteínas P ya que en ensayos de placas de lisis las proteínas sintetizadas por ambos fagos fueron reconocidas por otros sueros de pacientes con LES P positivos (Fig. 13).

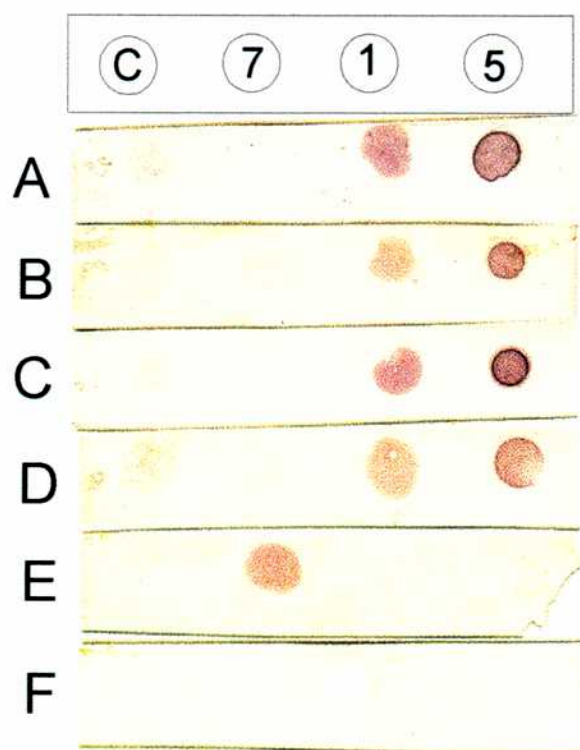


Figura 13. Reactividad de sueros de pacientes lúpicos *P* positivos contra las proteínas β gal-Ral1 y β gal-Ral5 en ensayos de placas de lisis. Los fagos λ gt11 salvaje (C), JL7 (7), Ral1 (1) y Ral5 (5) fueron ensayados por la técnica de placas de lisis contra 4 sueros de pacientes con LES *P* positivos (Sueros A-D), un suero de un paciente chagásico (E) y un dador normal (F).

Posteriormente se realizaron reacciones de PCR sobre ambos fagos utilizando los oligonucleótidos S1 y S2 como se describe en Materiales y Métodos. De esta forma se determinó que los fagos λ gt11-Ral1 y λ gt11-Ral5 poseían insertos de aproximadamente 200 pb. Estos fragmentos de PCR fueron luego subclonados en el plásmido pMal empleando la metodología utilizada en el clonado de pMal-S23. Una vez identificadas las colonias positivas se procedió a secuenciar ambos insertos para confirmar la identidad de los antígenos.

En las figuras 14 y 15 se observa la secuencia nucleotídica y la correspondiente secuencia deducida de aminoácidos de Ral1 y Ral5, respectivamente. La comparación de las secuencias con bases de datos reveló que Ral1 y Ral5 poseen un elevado porcentaje de identidad con la proteína ribosomal P0 y P1 humana respectivamente (Rich, 1987).

A

1	GGA	TCC	GCG	<u>GAA</u>	<u>TTC</u>	CCT	GCA	GCC	CCT	GCC	AAA	33
1							A	A	P	A	K	5
34	GCT	GAA	GCA	AAG	GAA	GAG	TCG	GAG	GAA	TCA	GAT	66
6	A	E	A	K	E	E	S	E	E	S	D	16
67	GAG	GAT	ATG	GGA	TTC	GGT	CTC	TTC	GAC	TAA	TCC	99
17	E	D	M	G	F	G	L	F	D	*		26
100	CGC	CAA	AGC	AAC	CAA	GTC	AGC	CTG	CTT	AAT	TTG	132
133	AGA	AAG	ATG	GAA	ATA	AAG	GCT	TAC	TTC	TCT	TAA	165
166	AAA	AAA	AAA	AA								176

B

AAPAKVEAKEESEESDEDMGFGLFD	317	P0 Humana (HuP0)
AAPAKAEAKEESEESDEDMGFGLFD	317	P0 de ratón (MmP0)
AAPAKAEAKEESEESDEDMGFGLFD	26	Ral1
AAPAK EAKEESEESDEDMGFGLFD		Consenso
Identidad: 96% Homología: 96%		

Figura 14. *Secuencia correspondiente al inserto del plásmido pMal-Ral1. (A)* Secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia deducida de aminoácidos de Ral1. En negrita se observa la señal de poliadenilación y subrayado uno de los sitios Eco RI de clonado. **(B)** Comparación de la secuencia proteica de Ral1 con la proteína ribosomal P0 humana y de ratón (Krowczynska, 1989)

A

1	G	GAT	CCT	GCT	CCA	TCC	ACT	GCC	GCC	GCC	CCA	GCT	GAG	37
1				A	P	S	T	A	A	A	P	A	E	10
38	GAG	AAG	AAA	GTG	GAG	GCA	AAG	AAG	GAA	GAG	TCC	GAG	GAG	76
11	E	K	K	V	E	A	K	K	E	E	S	E	E	23
77	TCT	GAA	GAT	GAC	ATG	GGC	TTT	GGT	CTT	TTT	GAC	TAA	ACT	115
24	S	E	D	D	M	G	F	G	L	F	D	*		35
116	GCT	TTT	GTT	AAG	TTA	GCC	AAT	AAA	GAG					142

B

APSTAAAPAEKKVEAKKEESEESDDDMGFGLFD 114 P1 humana (HuP0)
APSTAAAPAEKKVEAKKEESESESEDDDMGFGLFD 114 P1 de ratón (MmP1)
APSTAAAPAEKKVEAKKEESESESEDDDMGFGLFD 34 Ral5
APSTAAAPAEKKVEAKKEESEES DDMGFGLFD Consenso
Identidad: 97% Homología: 100%

Figura 15. Secuencia correspondiente al inserto del plásmido pMal-Ral5. **(A)** Secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia deducida de aminoácidos de Ral5. **(B)** Comparación de la secuencia proteica de Ral5 con la proteína ribosomal P1 humana y de ratón (Número de Acceso: P47955).

Una vez confirmado que Ral1 y Ral5 codificaban para el extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P0 y P1 de ratón, respectivamente, ambos ADNc fueron subclonados en el plásmido pGex. Para ello, los insertos de los plásmidos recombinantes pMal-Ral1 y pMal-Ral5 fueron digeridos con la enzima Eco RI y clonados en el plásmido pGex, tal como se describió para el recombinante S23.

Las proteínas expresadas por los plásmidos pMal-Ral1 y pGex-Ral1 serán denominadas de aquí en adelante MBP-MmP0 y GST-MmP0 respectivamente.

3.3. PARAMETROS RELEVANTES PARA EL DESARROLLO DE UN MODELO DE ESTUDIO DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P

3.3.1. Determinación de antígenos apropiados para el estudio *in vitro* de la respuesta inmune inducida por inmunización con las proteínas ribosomales P

Se determinó el tipo de antígenos que serían utilizados para estudiar la respuesta inmune inducida por inmunización con las proteínas P recombinantes. En primer lugar se evaluó la posibilidad de utilizar las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* en su forma recombinante acopladas a MBP ya que éstas habían sido utilizadas con éxito para determinar la presencia de anticuerpos anti-P en sueros de pacientes chagásicos (Kaplan, 1997). Se inmunizaron ratones Balb/c por vía intraperitoneal con 100 µg de la proteína MBP-TcP2β purificada. Posteriormente se realizaron otras cuatro inoculaciones separadas entre sí por 15 días. La primer inoculación se realizó en presencia de adyuvante completo de Freund (CFA) y las restantes con adyuvante incompleto de Freund (IFA). Como control se utilizaron grupos de ratones inmunizados con MBP, adyuvante de Freund y no inoculados. A los 10 días de la última inoculación, se obtuvo suero de los ratones inmunizados y controles y se determinó por Western blot la reactividad contra la proteína MBP (Fig. 16A, calle 1) y MBP-TcP2β (Fig. 16A calle 2). Como puede observarse en la figura 16A, tanto el suero de los ratones no inmunizados (panel I) así como el suero de los ratones inmunizados con adyuvante de Freund (panel II) no reconocieron ninguna de las dos proteínas. Por el contrario, los sueros provenientes de ratones inmunizados con MBP (Fig. 16A, panel III) y con MBP-TcP2β (Fig. 16A, panel IV) reaccionaron con ambas proteínas.

La presencia de anticuerpos dirigidos contra MBP, no permitió discernir si la respuesta medida contra MBP-TcP2β se debía a anticuerpos específicos contra la proteína de *T. cruzi* o sólo a los anticuerpos anti-MBP. Posteriormente se evaluó si la respuesta específica contra TcP2β podría ser calculada como diferencia entre la reacción contra MBP-TcP2β y contra MBP. Para ello se midió la reactividad contra ambas proteínas por ELISA.

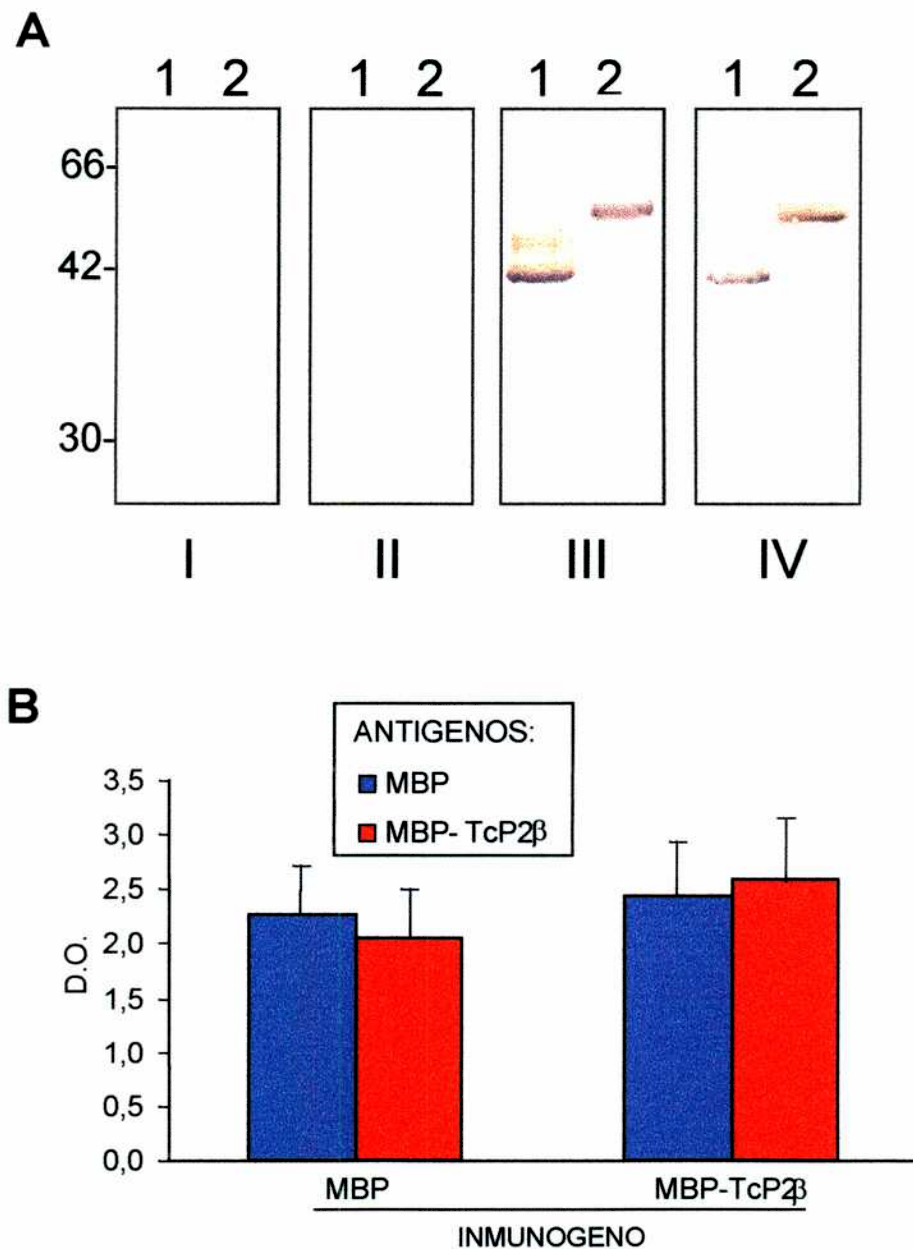


Figura 16. Reactividad de los anticuerpos presentes en el suero de ratones inmunizados contra las proteínas recombinantes (Sistema MBP). **(A)** La reactividad contra las proteínas MBP (calle 1) y MBP-TcP2β (calle 2) (2 µg/calle) fue analizada por Western blot. Los filtros se revelaron utilizando el suero (dilución 1:200) proveniente de ratones no inmunizados (panel I), ratones inmunizados con: adyuvante (panel II), MBP (panel III) y MBP-TcP2β (panel IV). A la izquierda se indica la posición de los marcadores de peso molecular. **(B)** Determinación por ELISA de la reactividad contra MBP y MBP-TcP2β (Antígenos) en el suero de ratones inmunizados con MBP y MBP-TcP2β (Inmunógeno). Cada barra representa la media de la D.O. determinada contra cada antígeno para cada grupo de sueros.

Los niveles de anticuerpos contra ambas proteínas resultaron elevados, no observándose diferencias significativas entre ambos (Fig. 16 B) ($p > 0,5$, Test T de Student). Este resultado fue independiente de la cantidad de antígeno colocado en la placa de ELISA. Mas aún, la reactividad contra MBP-TcP2 β no difirió con relación a la observada en el suero proveniente de animales inmunizados con MBP ($p > 0,5$, Test T de Student). Debido a la presencia de anticuerpos dirigidos contra MBP y dado que la proteína MBP-TcP2 β no pudo ser eficazmente digerida con la proteasa Xa (como se mostró en 3.1.1.1.) se descartó la posibilidad de utilizar esta proteína para estudiar la respuesta inmune anti-TcP2 β en los ratones inmunizados.

Dado que al momento de realizar este ensayo las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* aún no estaban clonadas en el plásmido pGex, se utilizó la proteína de fusión del sistema β -galactosidasa β gal-JL5 como antígeno para determinar la respuesta inmune anti-P (Fig. 17). En la figura 17A se observa que los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados con MBP-TcP2 β no reconocen la proteína portadora β gal (panel IV, calle 1) mientras que sí reaccionan con la proteína recombinante β Gal-JL5 (panel IV, calle 2). El suero proveniente de ratones no inmunizados (panel I), inmunizados con adyuvante de Freund (panel II) e inmunizados con MBP (panel III) no reconoce la proteína β gal-JL5 ni β gal. A pesar de las dificultades que presenta la purificación de este tipo de proteínas recombinantes, se desarrolló un ELISA mediante el cual se determinó la existencia de anticuerpos contra β gal-JL5 (Fig. 17B).

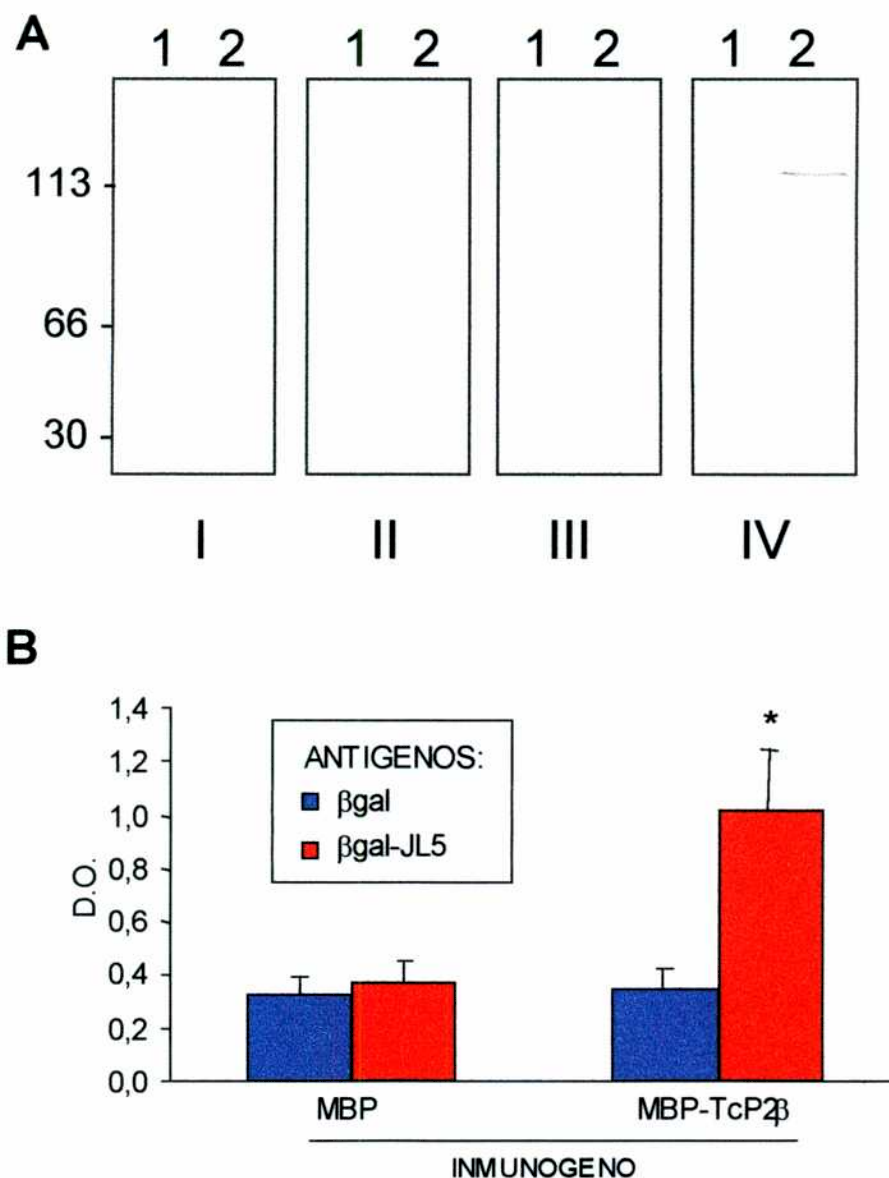


Figura 17. Reactividad de los anticuerpos presentes en el suero de ratones inmunizados contra las proteínas recombinantes (Sistema β gal). **(A)** La proteína β gal (calle 1) y la proteína recombinante β gal-JL5 (calle 2) (20 μ g/calle) fueron utilizadas como antígeno en ensayos de Western blot. Los filtros se revelaron utilizando el suero (dilución 1:200) proveniente de ratones no inmunizados (panel I) e inmunizados con adyuvante de Freund (panel II), MBP (panel III) y MBP-TcP2 β (panel IV). A la izquierda se indica la posición de los marcadores de peso molecular. **(B)** Determinación por ELISA de la reactividad contra β gal y β gal-JL5 (Antígenos) en el suero de ratones inmunizados con MBP y MBP-TcP2 β (Inmunógeno). Cada barra representa la media de la D.O. determinada contra cada antígeno para cada grupo de sueros. (*: $p < 0,01$, Test T de Student)

Sin embargo, el ELISA desarrollado con la proteína β gal-JL5, no presentó los requisitos de sensibilidad y especificidad deseados. Por lo tanto, se realizó el clonado de la proteína TcP2 β en el plásmido pGex como

se indica en el ítem 3.1.2. La obtención de la proteína TcP2 β purificada bajo la forma de una proteína de fusión con GST permitió diseñar un ensayo de ELISA para cuantificar exactamente la reactividad contra TcP2 β . Dada la baja reactividad de los sueros de ratones contra la proteína GST, el empleo de esta proteína como antígeno en ELISA dio como resultado un ensayo más sensible, específico y reproducible que el obtenido con la proteína β gal-JL5 (Fig. 18). Por lo tanto, de aquí en adelante la determinación de la reactividad contra GST-TcP2 β fue el método de elección para determinar la reactividad contra TcP2 β .

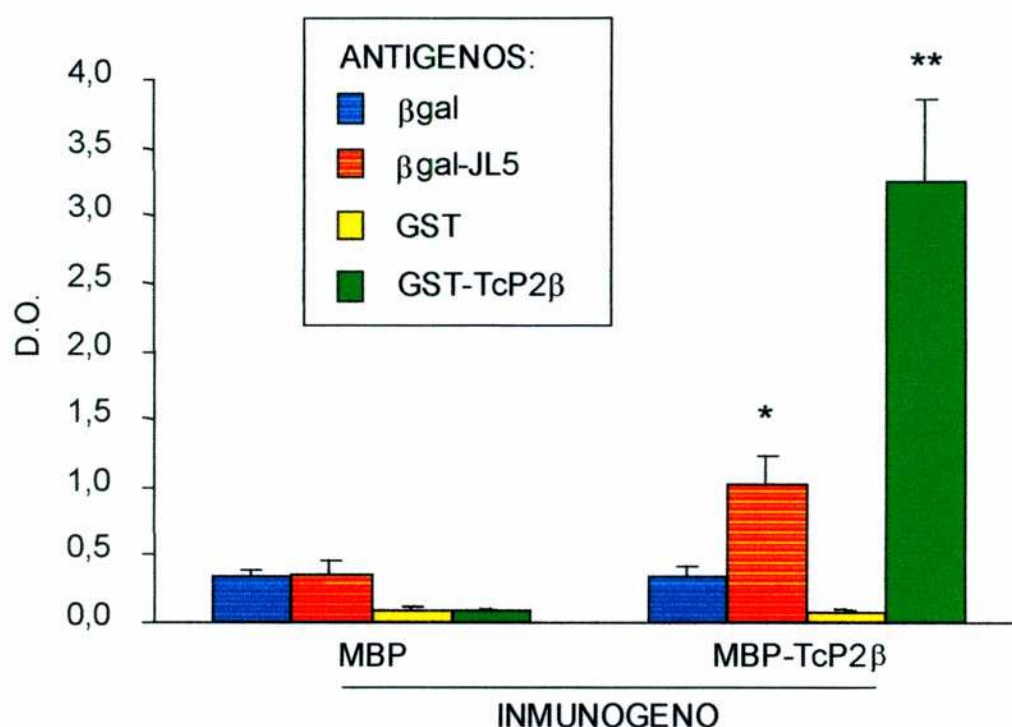


Figura 18. Determinación de reactividad contra TcP2 β empleando las proteínas β gal-JL5 y GST-TcP2 β como antígenos. Sueros provenientes de ratones inmunizados con MBP o MBP-TcP2 β (Inmunógeno) fueron ensayados por ELISA contra las proteínas β gal, β gal-JL5, GST y GST-TcP2 β (Antígenos). Cada barra representa la media de la D.O. determinada contra cada antígeno para cada grupo de sueros. (*: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, Test T de Student)

En función de estos resultados, y dado que las inmunizaciones con MBP-TcP0 y MBP-MmP también podrían producir anticuerpos contra MBP, los insertos de TcP0 y MmP fueron subclonados en el plásmido pGex como se detalla en los ítems 3.1.2. y 3.2.1. respectivamente.

3.3.2. Determinación del esquema de inmunización

Posteriormente, a fin de determinar el protocolo de inmunización más adecuado se inocularon grupos de ratones por vía intraperitoneal con 100 µg de la proteína MBP-TcP2β empleando distintos esquemas de inmunización. Los esquemas utilizados fueron los siguientes:

- 1) Los ratones recibieron 6 inoculaciones en presencia de CFA, separadas entre sí por 7 días.
- 2) Los ratones recibieron 5 inoculaciones espaciadas entre sí 15 días. La primera inoculación se administró en presencia de CFA mientras que las cuatro siguientes fueron sin adyuvante.
- 3) Los ratones recibieron 5 inoculaciones espaciadas entre sí 15 días. La primera inoculación se administró en presencia de CFA mientras que las cuatro siguientes fueron con IFA.
- 4) Igual que el protocolo 3 pero todas las inoculaciones se realizaron en presencia de IFA.

Para cada uno de los cuatro esquemas de inmunización se inoculó en paralelo 4 grupos de ratones con la proteína MBP. Diez días luego de la última inoculación se obtuvo suero de los ratones inmunizados y controles. Dichos sueros fueron analizados por Western blot (resultados no mostrados) y ELISA contra la proteína GST-TcP2β. El resultado de este análisis determinó que los sueros de los animales inmunizados de acuerdo a los protocolos 3 y 4 presentaron los niveles más elevados de anticuerpos contra las proteínas P (Fig. 19, $p < 0,01$). En función de estos resultados se decidió adoptar el protocolo 4 para los estudios posteriores. La elección del protocolo 4 se basó en que éste utiliza IFA como adyuvante en lugar de CFA como en el caso del protocolo 3.

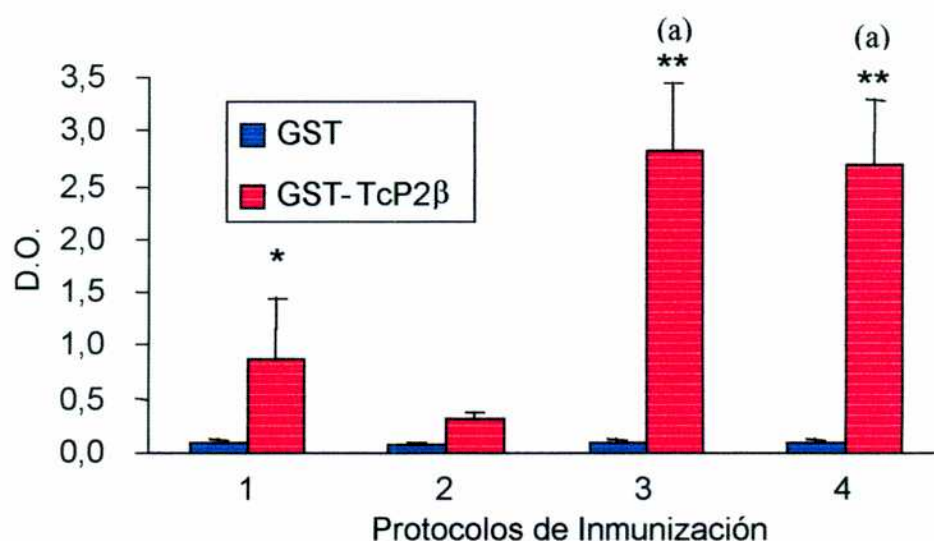


Figura 19. Comparación de la respuesta contra GST-TcP2β en ratones inoculados de acuerdo a distintos esquemas de inmunización. Sueros provenientes de ratones inmunizados con la proteína MBP-TcP2β fueron analizados por ELISA contra la proteína GST-TcP2β y GST. Cada barra representa la media de la D.O. determinada contra cada antígeno para cada grupo de sueros. (*: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, (a): $p < 0,01$ comparado con Protocolo 1, Test T de Student).

3.3.3. Determinación de la dosis de antígeno

Luego se determinó la dosis de antígeno apropiada para obtener la mayor respuesta inmune contra la proteína MBP-TcP2β. Para ello, se inmunizaron grupos de ratones con 5, 10, 25, 50 y 100 µg de proteína recombinante de acuerdo al protocolo 4. Los resultados de este ensayo demostraron que la respuesta contra GST-TcP2β no difirió significativamente, para las distintas dosis de antígeno inoculado ($p > 0,5$, Test T de Student).

A partir de los resultados obtenidos en estos ensayos, se estableció el modelo de inmunización apropiado con las proteínas MBP recombinantes. Este modelo se utilizó en los estudios posteriores y consistió en:

- Esquema de inmunización: Los ratones recibieron 5 inoculaciones espaciadas entre sí 15 días. Todas las inoculaciones se realizaron en presencia de IFA.
- Vía de inoculación y dosis de antígeno: intraperitoneal, 50 µg de proteína.

Asimismo, de los resultados obtenidos se dedujo que la forma más adecuada para caracterizar la respuesta humoral inducida en los ratones inmunizados era la utilización de las proteínas GST recombinantes en ensayos de ELISA.

3.4. ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL INDUCIDA POR LA INMUNIZACION CON PROTEINAS RIBOSOMALES P

Con el objeto de caracterizar la respuesta inmune contra las proteínas ribosomales P en un modelo animal se inmunizaron ratones Balb/c con las proteínas recombinantes MBP-TcP2 β , MBP-TcP0 y MmP0 purificadas. La proteína recombinante MBP-MmP1 no fue utilizada en los ensayos de inmunización debido a su gran homología con la proteína MBP-MmP0. Como control se utilizaron grupos de ratones inmunizados con MBP y no inoculados. Los ratones fueron inmunizados por ruta intraperitoneal con cinco inoculaciones (días 1, 14, 28, 42 y 56) conteniendo 50 μ g de las proteínas recombinantes citadas. Se obtuvo muestras de suero antes de las inmunizaciones (S0) y a los 21 (S1), 35 (S2), 49 (S3) y 63 (S4) días de iniciado el experimento.

Los sueros provenientes de los animales inmunizados obtenidos los días 49 (S3) (resultados no mostrados) y 63 (S4) se utilizaron en ensayos de Western blot contra las proteínas GST-TcP2 β , GST-TcP0, GST-MmP0 y GST. La inmunización con las proteínas recombinantes MBP-TcP2 β y MBP-TcP0 indujo anticuerpos específicos contra los inmunógenos utilizados ya que no se observó reacción cruzada contra las otras proteínas recombinantes ensayadas. En la figura 20 se observa que los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados con MBP-TcP2 β (panel A) no reconocieron las proteínas GST, GST-MmP0 y GST-TcP0 mientras que sí reaccionaron con GST-TcP2 β (calle 3). En forma similar, el suero proveniente de ratones Balb/c inmunizados con MBP-TcP0 (panel B) reaccionó con GST-TcP0 (calle 4) y no con GST, GST-MmP0 y GST-TcP2 β . Por el contrario, los sueros obtenidos de ratones inmunizados con MBP-MmP0 (panel C), MBP (panel D), IFA y no inmunizados (resultados no mostrados), no reconocieron ninguna de las proteínas recombinantes.

Posteriormente, se evaluó la reactividad de los sueros provenientes de ratones inmunizados contra una preparación de proteínas ribosomales de *T.cruzi* y contra proteínas totales del parásito por ensayos de Western blot. Como se observa en la figura 21, los sueros de los ratones inmunizados con MBP-TcP2 β son monoespecíficos ya que sólo reconocen la proteína ribosomal P1/P2 de 10-12 KDa en ambas preparaciones de proteínas parasitarias (Panel A, calles 1 y 2).

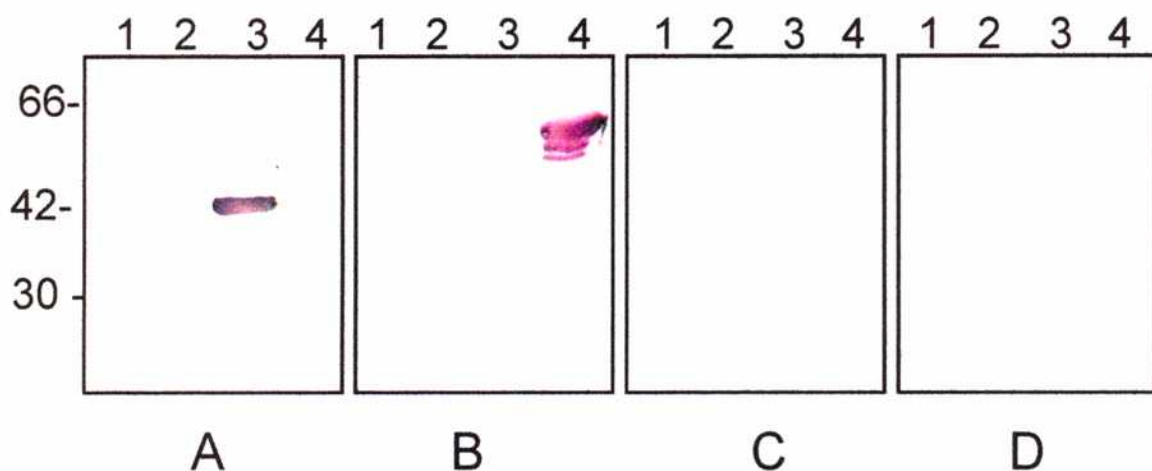


Figura 20. Detección de anticuerpos anti-proteínas ribosomales *P* en el suero de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β y MBP-TcP0. Las proteínas recombinantes GST (calle 1), GST-MmP0 (calle 2), GST-TcP2 β (calle 3) y GST-TcP0 (calle 4) fueron analizadas por SDS-PAGE 10% y posteriormente transferidas a nitrocelulosa. Los filtros fueron revelados utilizando el suero (dilución 1:1000) proveniente de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β (panel A), MBP-TcP0 (panel B), MBP-MmP0 (panel C) y MBP (panel D). A la izquierda del panel A se observa la ubicación de los patrones de PM (en Kda).

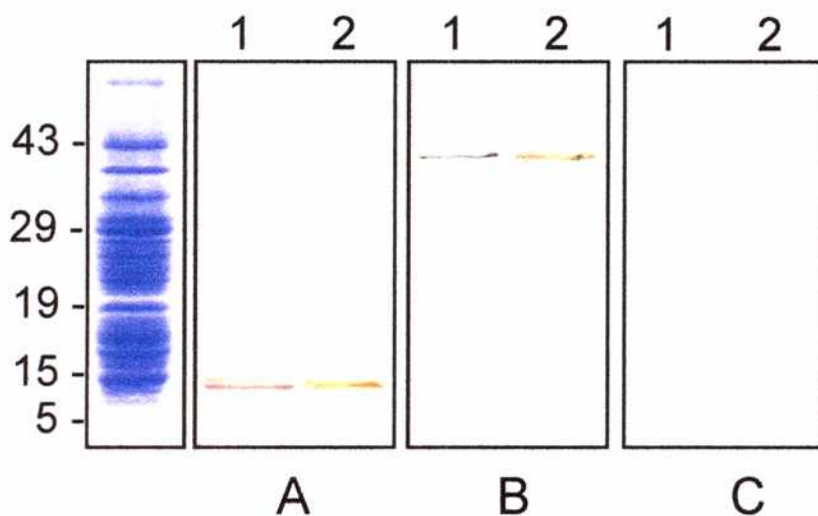


Figura 21. Reactividad de los anticuerpos presentes en el suero de ratones inmunizados contra proteínas de *T. cruzi*. Proteínas totales de *T. cruzi* (70 μ g/calle, calle 1) y una preparación de ribosomas de *T. cruzi* (30 μ g/calle, calle 2) fueron analizadas por SDS-PAGE y transferidas a filtros de nitrocelulosa. Los filtros se revelaron utilizando el suero (dilución 1:400) proveniente de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β (panel A), MBP-TcP0 (panel B) y MBP (panel C). A la izquierda del panel A se observa el SDS-PAGE 15% correspondiente a la preparación de ribosomas de *T. cruzi* y la ubicación de los patrones de PM (en Kda).

Por su parte, los sueros de los ratones inmunizados con MBP-TcP0 sólo reaccionan con la proteína TcP0 de 38 KDa (Panel B, calles 1 y 2). Los sueros provenientes de ratones inmunizados con MBP (panel C) o de ratones no inmunizados (resultados no mostrados) no reaccionaron con ninguna proteína parasitaria. Estos resultados indican que los anticuerpos reconocen epítopes compartidos por la proteína recombinante y la proteína original de *T. cruzi*. Este ensayo también permitió determinar que los anticuerpos contra las proteínas P no poseen reacción cruzada con otras proteínas de *T. cruzi*.

3.5.1. Estudio de la respuesta humoral inducida por la inmunización con la proteína MBP-TcP2 β

Grupos de ratones de la cepa Balb/c fueron inoculados con la proteína recombinante MBP-TcP2 β como se describe en el ítem 3.4. En experimentos paralelos se inocularon ratones Swiss siguiendo el mismo esquema de inmunización. A fin de determinar hacia qué regiones de la proteína TcP2 β estaban dirigidos los anticuerpos inducidos por la inmunización (Figuras 18 a 21) se diseñaron 10 péptidos sintéticos parcialmente superpuestos que en su conjunto abarcan los 110 aminoácidos de la proteína. Estos péptidos fueron empleados en ensayos de ELISA. En la figura 22 A se observa que el péptido 10 correspondiente a los 18 aminoácidos del extremo C-terminal es el único reconocido en forma significativa ($p < 0,001$) por el suero proveniente de los ratones inmunizados. Los péptidos 4, 7 y 8 fueron reconocidos por 2/20, 5/20 y 4/20 sueros respectivamente. En la figura 22 B se observa que la reactividad contra el péptido 10 es totalmente inhibida por la preincubación de los sueros con el péptido R13. Este resultado indica que el péptido R13 correspondiente a los 13 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína TcP2 β es el principal epítipo lineal de la respuesta anti-P en los ratones inmunizados con MBP-TcP2 β .

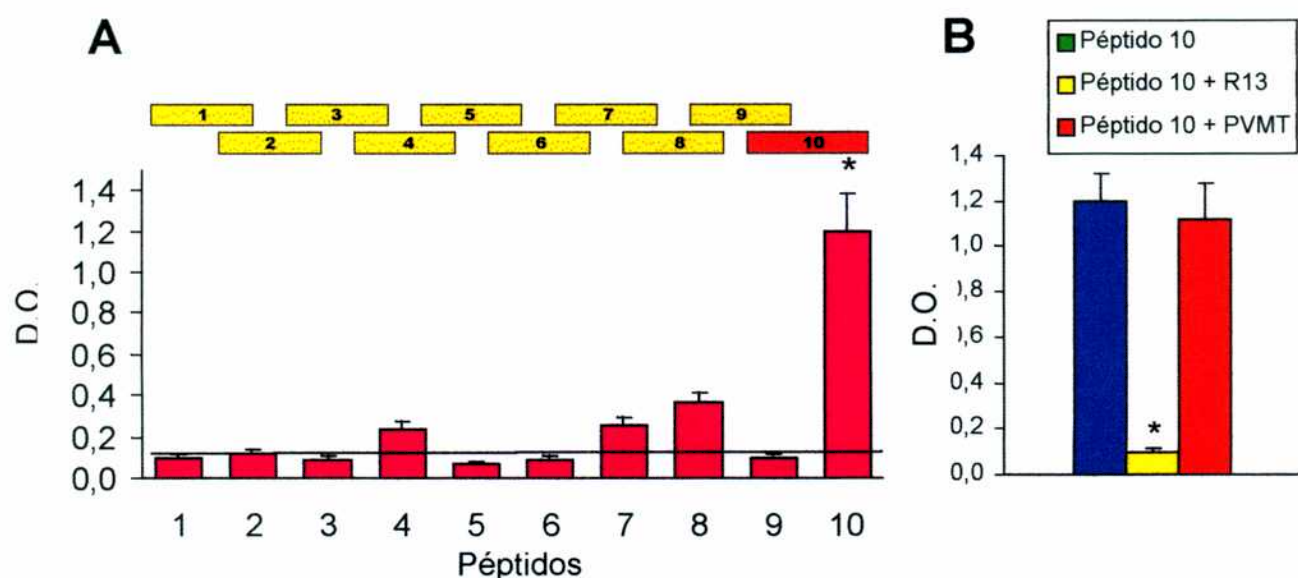


Figura 22. Mapeo de epítopes de la respuesta contra TcP2β en ratones inmunizados con MBP-TcP2β. **(A)** Sueros provenientes de ratones inmunizados con MBP-TcP2β (n=20) fueron ensayados por ELISA contra los péptidos 1-10 correspondientes a la proteína TcP2β. Cada barra representa la media de la D.O. determinada contra cada péptido. La línea punteada indica la media de la D.O. determinada en sueros de ratones controle **(B)** El suero proveniente de ratones inmunizados con la proteína recombinante MBP-TcP2β fue preincubado durante 12 hs. con 20 μM del péptido R13 o PVMT. Luego de esta incubación los sueros se utilizaron en ensayos ELISA contra el péptido 10. Cada barra representa la media de la D.O. determinada en cada caso. (*: $p < 0,001$ Test T de Student)

Luego se estudió la evolución de la respuesta inmune en cada ratón por medio de la determinación del título de anticuerpos contra la proteína recombinante GST-TcP2β y contra el péptido R13 en las muestras de suero obtenidas a lo largo del protocolo de inmunización. En la figura 23 puede observarse que el título de anticuerpos de tipo IgG contra GST-TcP2β aumentó significativamente ($p < 0,001$) luego de la segunda inmunización, y alcanzó una respuesta máxima luego de la tercera inmunización ya que el título contra TcP2β no difirió significativamente entre el sangrado 2 y el 4 (S2 y S4) ($p > 0,5$). Por el contrario, para la inducción de anticuerpos anti-R13 fueron necesarias al menos 4 inmunizaciones. Además, los títulos anti-R13 fueron inferiores a los observados contra GST-TcP2β (S4: 1600 vs. 19200 en Balb/c y 400 vs. 12800 en Swiss). Asimismo, se observó que no todos los ratones inmunizados presentaron anticuerpos contra R13 a diferencia de lo que ocurrió con GST-TcP2β.

La utilización de dos cepas de ratones permitió observar otra diferencia entre ambas respuestas. Mientras que la respuesta anti-GST-TcP2 β fue similar en ambas cepas de ratones, se observaron variaciones en la respuesta contra R13. En la muestra S4 la mediana del título contra R13 fue 1600 en Balb/c y 400 en Swiss ($p < 0,001$). Esta diferencia no sólo se manifestó en los títulos anti-R13 sino también en la prevalencia de la respuesta. Solamente el 27% (12/44) de los sueros provenientes de ratones Swiss reaccionaron contra el péptido R13, mientras que en los ratones Balb/c la frecuencia de sueros positivos fue de 58% (23/40).

En estos ensayos de ELISA tampoco se observó reacción contra las proteínas GST-TcP0, GST-MmP0 y GST y los sueros provenientes de ratones control no reaccionaron contra ninguno de los antígenos ensayados (resultados no mostrados).

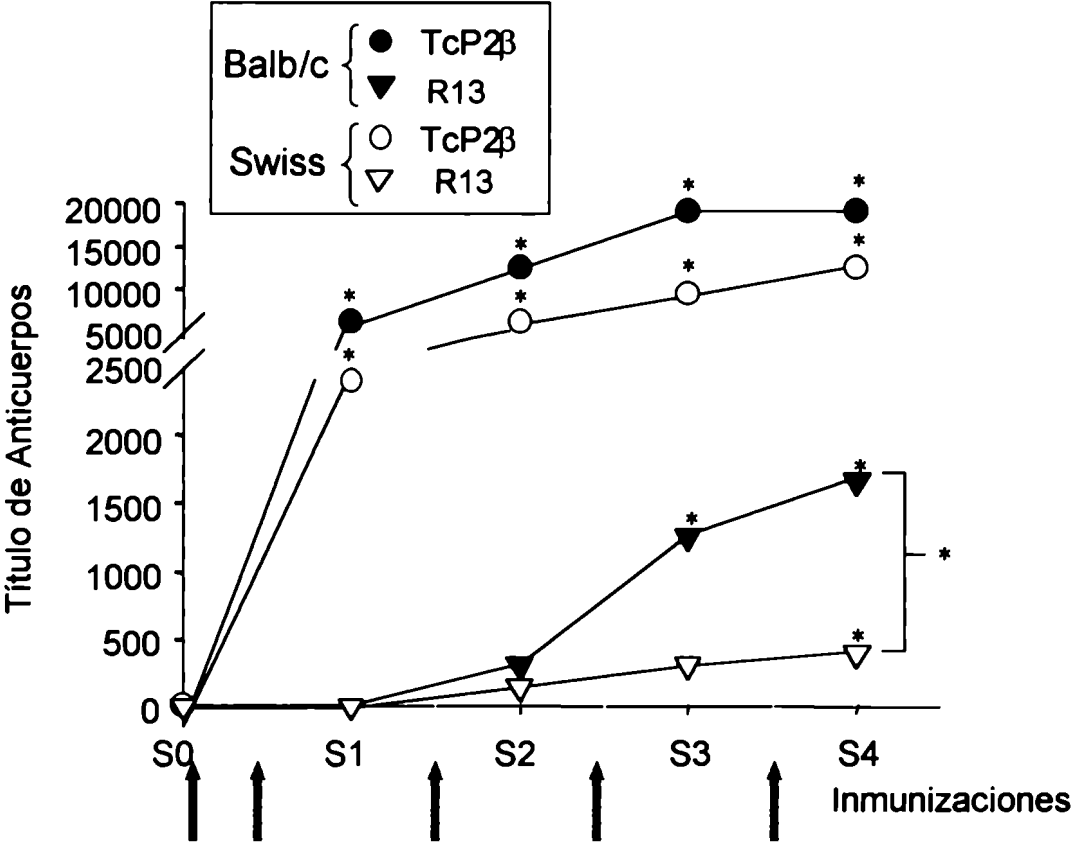


Figura 23. Evolución del título de anticuerpos anti-GST-TcP2 β y anti-R13 en el suero de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β . Cada punto representa la mediana del título de anticuerpos determinado para cada grupo de ratones a lo largo del ensayo de inmunización. En blanco y negro se representan los títulos determinados en los ratones Balb/c y Swiss respectivamente. (*: $p < 0,001$, Test de Suma de Rangos de Wilcoxon)

Para evaluar con mayor profundidad el grado de asociación entre la respuesta contra GST-TcP2β y la respuesta contra R13 se compararon los títulos de anticuerpos alcanzados contra ambos antígenos en el suero de ratones Balb/c R13 positivos. Se estableció la existencia de una correlación, estadísticamente significativa ($r = 0.72$, $p < 0,05$), entre los títulos de anticuerpos contra la proteína recombinante TcP2β y su epítipo R13 a nivel de sueros individuales. En forma paralela, se determinó qué porcentaje de la reacción anti-TcP2β se debía al componente R13. Estas determinaciones se realizaron preincubando los sueros de los ratones inmunizados con el péptido R13 antes de realizar la determinación de reactividad contra GST-TcP2β. El porcentaje de inhibición de la reactividad contra GST-TcP2β causado por R13 varió entre los distintos sueros ensayados entre el 5 y el 42%. Estos resultados confirmaron que parte de la reacción contra GST-TcP2β se debe a la respuesta contra R13.

Posteriormente se realizó el mapeo epitópico de la respuesta contra el extremo C-terminal de TcP2β determinando la reactividad contra la siguiente serie de péptidos (Fig. 24).

SECUENCIA	PEPTIDO	PROTEINA
EEEDDDMGFGLFD	R13	TcP2β
EDDDMGFGLFD	R11	TcP2β
DDDMGFGLFD	R10	TcP2β/ MmP
MGFGLFD	R7	TcP2β/ MmP
EESDDDMGFGLFD	H13	MmP
SDDDMGFGLFD	H11	MmP
EEEDDDDDFGMGALF	P015	TcP0

Figura 24. Péptidos correspondientes al extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P. Los péptidos R13 y R11 corresponden a TcP2β, y los péptidos H13 y H11 corresponden a MmP0. Los péptidos R10 y R7 presentan la secuencia común al extremo C-terminal de ambas (TcP2β y MmP0). El péptido P015 corresponde al extremo C-terminal de TcP0.

En la figura 25 se observa el perfil de reactividad contra los péptidos ensayados. Los sueros provenientes de los ratones Balb/c inmunizados con MBP-TcP2β presentaron significativos niveles de anticuerpos ($p < 0,001$) contra R13 y R11 en relación a los observados en grupos controles. Por el contrario, no se observaron diferencias en la reactividad contra los péptidos R10 y R7 con respecto a

los grupos controles. Este resultado indica que el epítipo reconocido por los sueros de los animales inmunizados es el péptido R11/R13. Los sueros de los ratones inmunizados presentaron además significativos niveles de anticuerpos ($p < 0,01$) contra el péptido P015 correspondiente al extremo C-terminal de la proteína ribosomal P0 de *T. cruzi*. No se observó ninguna correlación entre los niveles de anticuerpos contra P015 y la reactividad anti-R13 a nivel de ratones individuales.

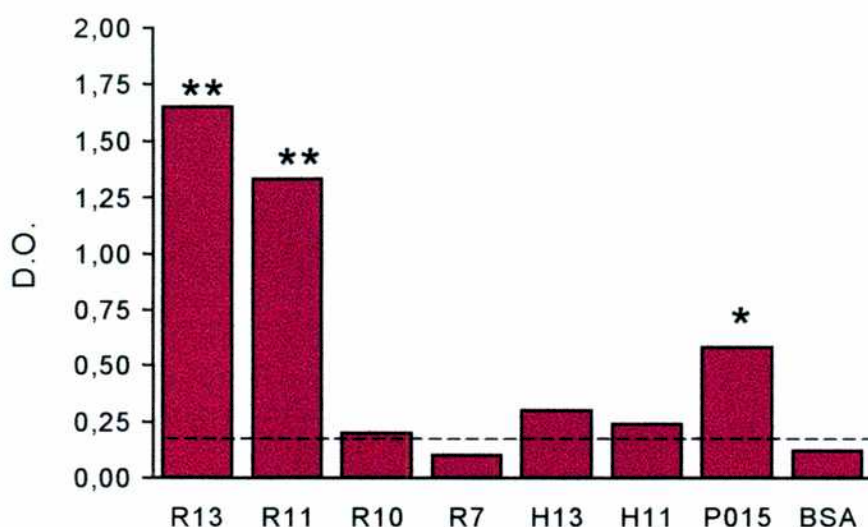


Figura 25. Mapeo epitópico de la reacción contra el extremo C-terminal de TcP2 β . Cada columna representa la mediana de la D.O. determinada contra cada péptido en el suero de los ratones Balb/c inmunizados con MBP-TcP2 β . La línea punteada representa la mediana de la densidad óptica obtenida para el suero de los ratones control (ratones inmunizados con MBP) ensayados contra los distintos péptidos. (*: $p < 0,01$, **: $p < 0.001$, Test de Suma de Rangos de Wilcoxon).

La homología del péptido R13 con su correspondiente mamífero (péptido H13, humano y ratón) es mayor del 90% debido a un cambio no conservativo de S por E localizado 11 aminoácidos antes del extremo C-terminal (Fig. 24). Por tal motivo, se utilizaron los péptidos H13 y H11 para determinar la existencia de anticuerpos contra la región C-terminal de la proteína ribosomal P de ratón y de esta forma establecer la inducción de anticuerpos autorreactivos. Como se observa en la figura 28 la reactividad de los sueros provenientes de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β contra los péptidos H13 y H11 no difirió significativamente de la observada en ratones control. Sin embargo el análisis individual de estos sueros permitió determinar la existencia de 11/40 sueros con reactividad positiva contra H13 y H11 (resultados no mostrados).

Con el fin de confirmar la especificidad de la reacción anti-R13 se realizaron ensayos de ELISA de inhibición. En estos ensayos, el suero de los ratones inmunizados fue preincubado con cantidades crecientes de distintos péptidos sintéticos. En la figura 26 se observa que la preincubación con el péptido no relacionado PVMT no modificó la reactividad contra R13 mientras que la preincubación con el péptido R13 inhibió totalmente la reacción. En el caso en que la preincubación se realizó con el péptido H13 se observó una leve inhibición que alcanzó el 20%. Este resultado confirma que parte de los anticuerpos anti-R13 son capaces de reaccionar en forma cruzada con H13. Llamativamente, la preincubación con el péptido P015 inhibió aproximadamente el 70% de la reacción contra R13. Este elevado nivel de inhibición no fue el esperado en función de la reactividad contra P015 determinada en los ensayos de ELISA directo. La inhibición con los restantes péptidos no difirió de la esperada en función de los resultados obtenidos en el ELISA directo.

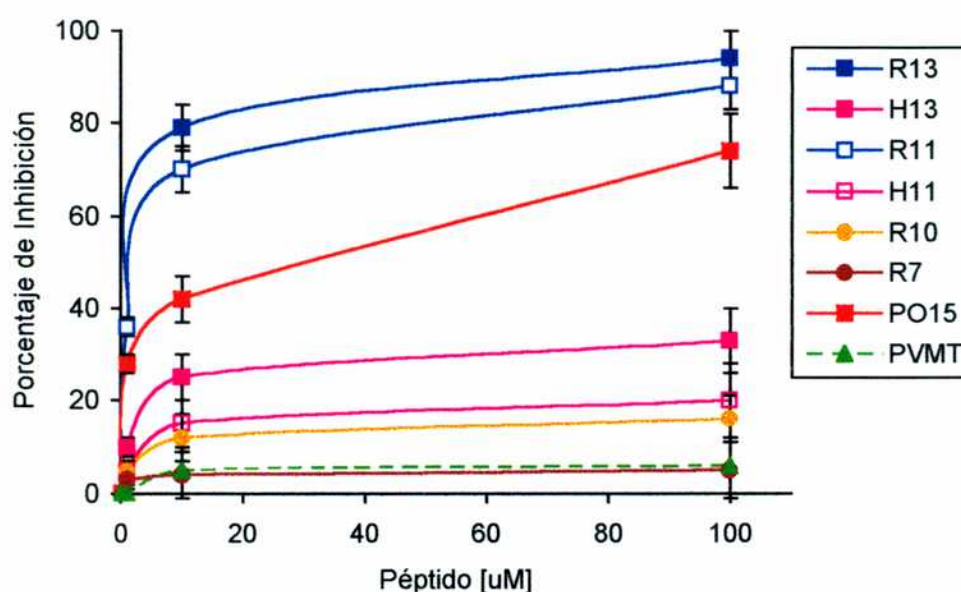


Figura 26. *Inhibición de la reactividad anti-R13.* El suero proveniente de ratones inmunizados con la proteína recombinante MBP-TcP2 β fue preincubado durante 12 hs. con cantidades crecientes de los péptidos indicados. Luego de esta incubación los sueros se utilizaron en ensayos ELISA contra el péptido R13. Cada punto representa la media de los valores de inhibición obtenidos para sueros individuales.

Finalmente se determinó el perfil de isotipos de los anticuerpos involucrados en la respuesta anti-TcP2 β (Fig. 27 A) y anti-R13 (Fig. 27 B) en el suero de los ratones Balb/c. Como puede observarse en ambos casos la respuesta fue de tipo IgG1, IgG2a e IgG2b para ambos antígenos. No se detectó la presencia de

anticuerpos IgG3 contra ninguno de los antígenos estudiados. Los resultados obtenidos con los sueros provenientes de ratones Swiss (resultados no mostrados) fueron similares a los descritos en los ratones Balb/c.

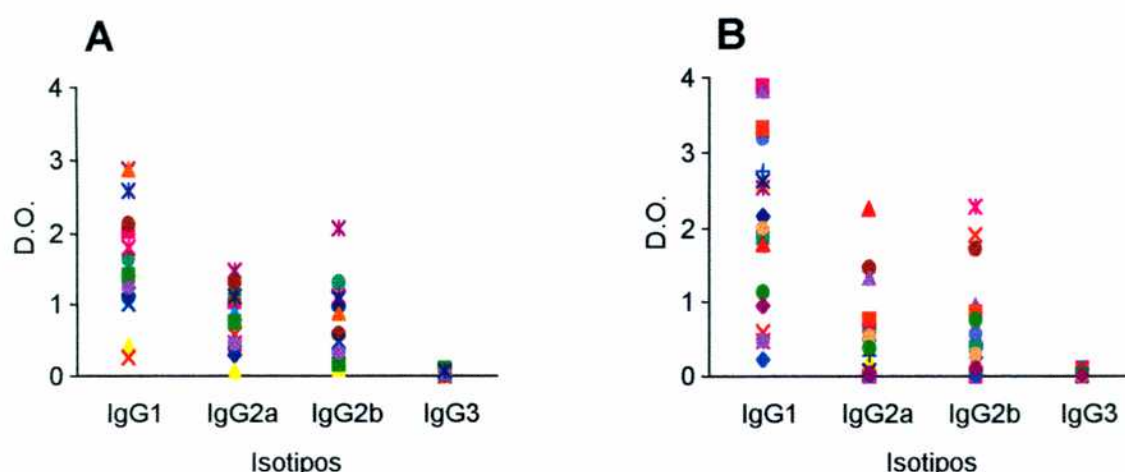


Figura 27. Determinación de isotipos de los anticuerpos anti-TcP2β (A) y anti-R13 (B) en ratones inmunizados con MBP-TcP2β. Cada punto representa la densidad óptica obtenida para cada suero individual en cada uno de los isotipos estudiados.

3.4.2. Estudio de la respuesta inmune inducida por la inmunización con la proteína MBP-TcP0

Grupos de ratones de la cepa Balb/c fueron inoculados con la proteína recombinante MBP-TcP0 siguiendo el esquema indicado en 3.4. En experimentos paralelos se inocularon ratones de la cepa Swiss. El estudio de la respuesta inmune se realizó en forma análoga a la descrita para los ratones inmunizados con MBP-TcP2β. En este caso, se determinaron los títulos de anticuerpos contra GST-TcP0 y contra P015, principal epítipo de la respuesta anti-TcP0 en la Enfermedad de Chagas (Schijman, 1992a; Ferrari, 1995). Al igual que en el caso de TcP2β, a los 21 días se observó una significativa ($p < 0,001$) respuesta contra la proteína recombinante GST-TcP0 (Fig. 28). El título de anticuerpos contra GST-TcP0 aumentó luego de la segunda inmunización y llegó al máximo luego de la tercera inmunización. El aumento del título de anticuerpos contra P015 fue más lento (Fig. 28) y los títulos alcanzados fueron menores a los observados con GST-TcP0 (S4: 6400 para P015 vs 51200 para TcP0), estableciéndose la existencia de una correlación estadísticamente significativa ($r=0,77$ $p < 0,01$) entre ambas respuestas a nivel de sueros individuales. La respuesta contra estos antígenos fue similar en las dos cepas de ratones empleadas.

La totalidad de los ratones (32/32 Balb/c y 44/44 Swiss) desarrollaron anticuerpos contra GST-TcP0 y en la mayoría se observaron anticuerpos contra P015 (29/32 Balb/c y 36/44 Swiss). A través de ensayos de inhibición se determinó que la preincubación de los sueros con el péptido P015 inhibe un elevado porcentaje de la reacción anti-TcP0 (resultados no mostrados). En los sueros de estos ratones no se detectaron anticuerpos contra las proteínas GST-TcP2 β , GST-MmP0 y GST (resultados no mostrados).

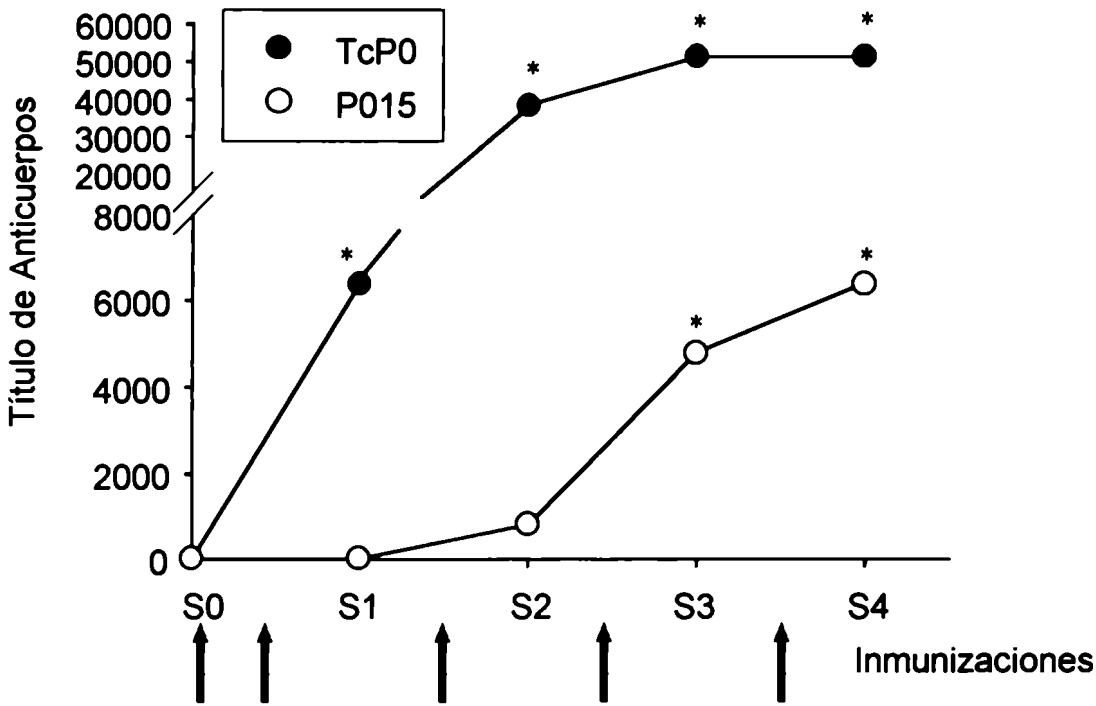


Figura 28. Evolución del título de anticuerpos anti-GST-TcP0 y anti-P015 en el suero de ratones inmunizados con MBP-TcP0. Cada valor representa la mediana del título de anticuerpos determinado para cada grupo de ratones (Balb/c) a lo largo del ensayo de inmunización. (*: $p < 0,001$, Test de Suma de Rangos de Wilcoxon)

Posteriormente se realizó el mapeo epitópico de la respuesta contra el extremo C-terminal de TcP0. Se determinó la reactividad contra los siguientes péptidos sintéticos (Fig. 29):

SECUENCIA	PEPTIDO	PROTEINA
EEEDDDDDFGMGALF	P015	TcP0
EDDDDDFGMGALF	P013	TcP0
FGMGALF	P07	TcP0
EEEDDDDD	P08	TcP0
AAAESEEEEDDDDDF	P0-14i	TcP0
AESEE	P0b	TcP0
EEEDDDMGFGLFD	R13	TcP2 β
EESDDDMGFGLFD	H13	MmP0

Figura 29. Péptidos correspondientes al extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P0. Los péptidos P015, P013, P07, P08, P014i, P0b corresponden al extremo C-terminal de la proteína ribosomal P0. Los péptidos R13 y H13 corresponden a al extremo C-terminal de TcP2 β y MmP0, respectivamente.

La inmunización de ratones Balb/c con MBP-TcP0 indujo niveles significativos de anticuerpos contra P015 y P013 (Fig. 30) ($p < 0.001$) en relación a los observados en ratones control (inmunizados con MBP, IFA o no inmunizados). La reactividad contra P015 fue mayor que contra P013 y no se observó reactividad contra los péptidos P0b, P07, P08 y P014i. La respuesta observada en ratones Swiss fue muy similar y sólo cabe destacar que se observó una fuerte reacción contra P014i en 9/44 sueros de ratones Swiss. En un bajo número de ratones Swiss se observó reacción contra los péptidos P07, P08 (resultados no mostrados).

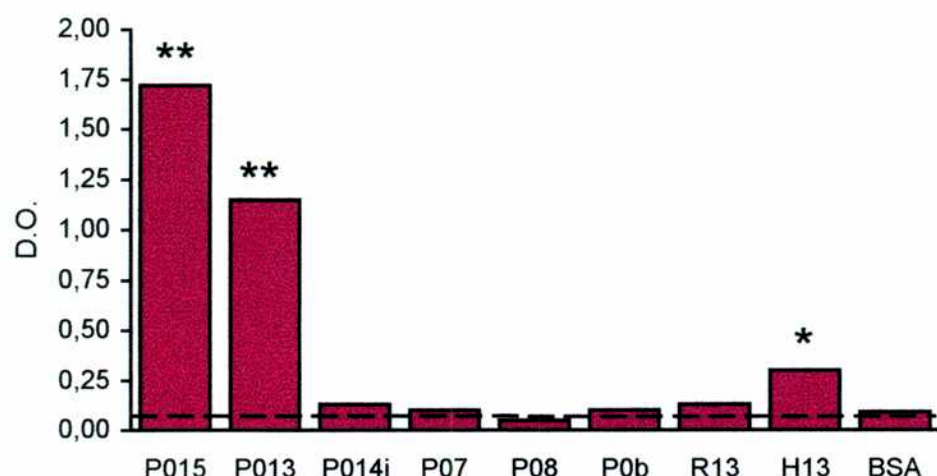


Figura 30. Mapeo epitópico de la reacción contra el extremo C-terminal de TcP0. Cada columna representa la mediana de la D.O. determinada contra cada péptido en el suero de los ratones Balb/c inmunizados con MBP-TcP0. La línea punteada representa la mediana de la densidad óptica obtenida para el suero de los ratones control (ratones inmunizados con MBP). (*: $p < 0,01$, **: $p < 0.001$, Test de Suma de Rangos de Wilcoxon).

La reactividad cruzada entre la proteína ribosomal P2 β de *T. cruzi* y la proteína ribosomal P autóloga se analizó determinando la reacción contra R13 y H13. Como se observa en la figura 30 los sueros de ratones inmunizados con MBP-TcP0 presentaron niveles significativos de anticuerpos ($p < 0,01$) contra el péptido H13 mientras que no se detectaron anticuerpos contra el péptido R13. No se observó correlación entre la presencia de anticuerpos contra P015 y H13 a nivel de ratones individuales.

La especificidad de los anticuerpos contra el extremo C-terminal de la proteína ribosomal P0 fue confirmada por ensayos de ELISA de inhibición. La preincubación de los sueros con el péptido no relacionado TMVP no modificó la reacción contra el péptido P015. En la figura 31 se observa que la preincubación de los sueros con el péptido P015 inhibió totalmente la reacción anti-P015 mientras que la preincubación de los sueros con el péptido H13 inhibió la respuesta anti-P015 en un 35 %, confirmando los resultados obtenidos en el ELISA directo.

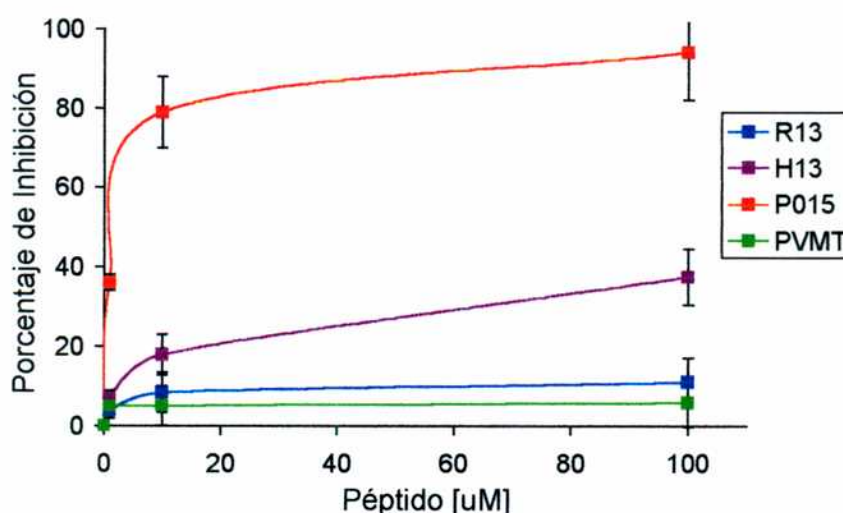


Figura 31. Inhibición de la reactividad contra el péptido P015. El suero proveniente de ratones inmunizados con la proteína MBP-TcP0 fue preincubado durante 12 horas con cantidades crecientes de los péptidos indicados. Luego, se midió la reacción anti-P015 mediante un ensayo de ELISA. Cada punto representa la media de los valores de inhibición obtenidos para sueros individuales.

Posteriormente, se determinó el perfil de isotipos de los anticuerpos involucrados en la respuesta anti-TcP0 (Fig. 32 A) y anti-P015 (Fig. 32 B). La respuesta contra ambos antígenos fue de tipo IgG1, IgG2a e IgG2b. En la respuesta anti-P015 no se detectaron anticuerpos IgG3. Los isotipos involucrados en la respuesta contra ambos antígenos fueron semejantes en las dos cepas de ratones empleadas (resultados no mostrados).

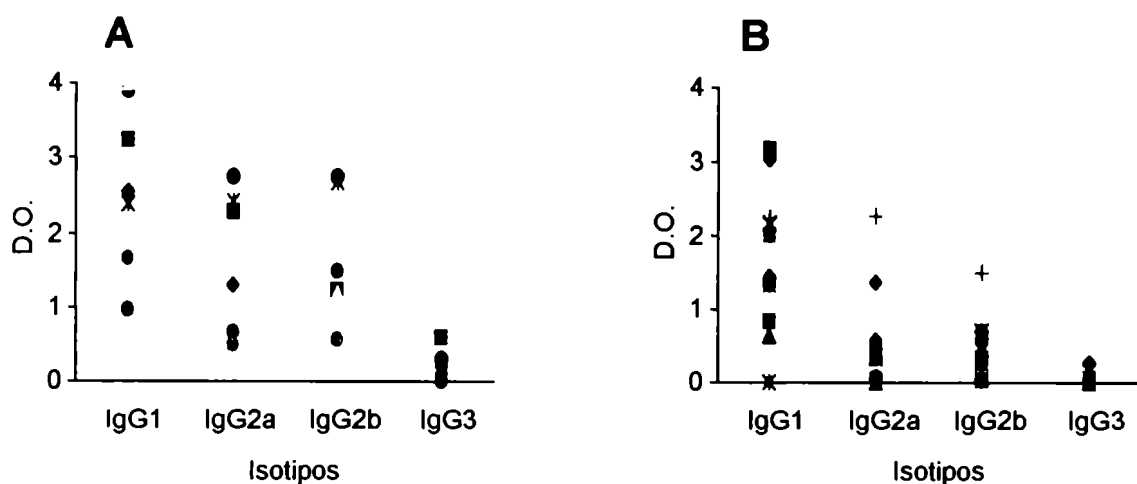


Figura 32. Determinación de los isotipos de anticuerpos anti-TcP0 (A) y anti-P015 (B) en ratones inmunizados con MBP-TcP0. Cada punto representa la densidad óptica obtenida para cada suero en cada uno de los isotipos estudiados.

Finalmente, se evaluó el rol de la inmunidad mediada por células en la respuesta inducida por inmunización con TcP0. Para ello diez días después de la última inmunización se obtuvieron células de bazo, y se las estimuló *in vitro* con los antígenos GST-TcP0, GST, P015 o R13. En la figura 33 se muestra la proliferación celular frente a los distintos antígenos ensayados. Células provenientes de ratones inmunizados con MBP-TcP0 mostraron una significativa proliferación al ser cultivados en presencia de GST-TcP0 o el péptido P015 ($p < 0.05$, $p < 0.01$ respectivamente). Por el contrario no se observó respuesta en células de ratones inmunizados con MBP. Asimismo se observó que células de ratones inmunizados con TcP0 fueron expandidas *in vitro* luego de la estimulación con el péptido R13 (correspondiente a la región C terminal de la proteína ribosomal TcP2 β) ($p < 0,05$).

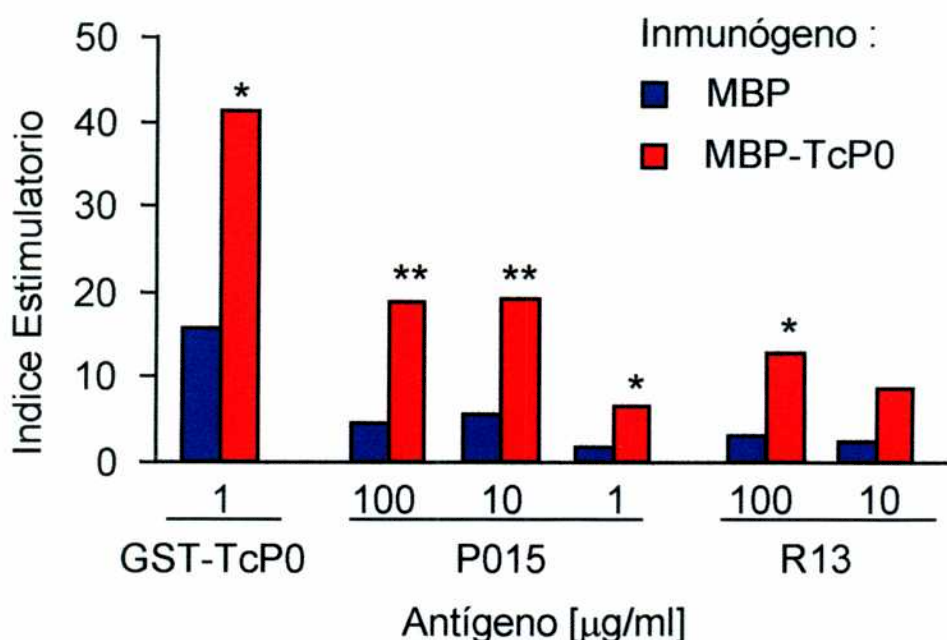


Figura 33. Respuesta secundaria *in vitro* contra MBP-TcP0 y péptidos relacionados. Las células fueron estimuladas con las concentraciones indicadas de los péptidos P015 y R13 y la proteína GST-TcP0. Cada barra representa la mediana del índice estimulador obtenido en cada grupo de células. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Test no paramétrico de Mann-Whitney).

3.4.3. Estudio de la respuesta humoral inducida por inmunización con la proteína MBP-MmP0

Ratones de la cepa Balb/c y Swiss fueron inoculados con la proteína recombinante MBP-MmP0. Al estudiar el suero de los ratones Balb/c se observó que sólo 2/13 ratones desarrollaron anticuerpos contra GST-MmP0 y que ninguno desarrolló anticuerpos contra H13 (resultados no mostrados). Por el contrario, el análisis de los sueros de ratones Swiss reveló que 20/20 sueros presentaron elevados niveles de anticuerpos contra la proteína GST-MmP0 y 12/20 reaccionaron contra H13. En la figura 34 se observa la evolución del título de anticuerpos contra GST-MmP0 y contra H13 en el suero de los ratones Swiss inmunizados con MBP-MmP0. El título de anticuerpos contra GST-MmP0 aumentó rápidamente mostrando diferencias significativas en S1 ($p < 0,001$) y alcanzando en S4 una mediana de 51200. La inducción de niveles significativos de anticuerpos anti-H13 requirió por el contrario cuatro inmunizaciones ($p < 0,001$). La mediana del título de anticuerpos contra H13 fue menor a la observada contra GST-MmP0 (S4: 800).

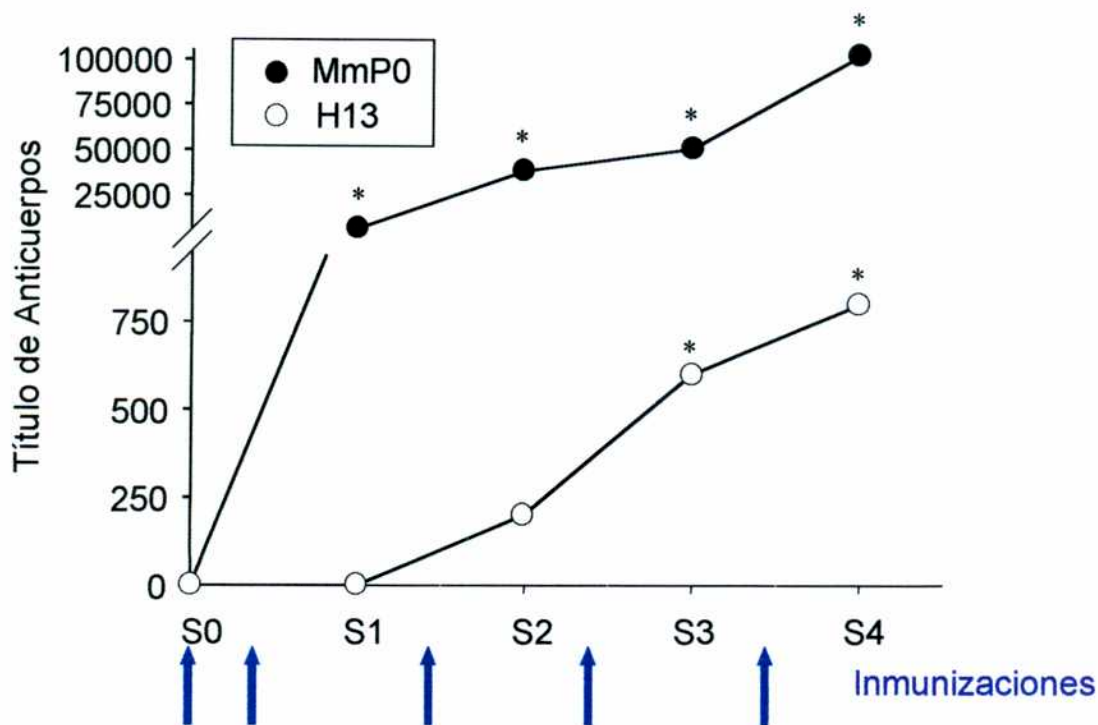


Figura 34. Evolución del título de anticuerpos anti-GST-MmP0 y anti-H13 en el suero de los ratones inmunizados con MBP-MmP0. Cada punto representa la mediana del título determinado para cada grupo de ratones Swiss a lo largo del ensayo de inmunización (*: $p < 0,001$, Test de Suma de Rangos de Wilcoxon).

A continuación se realizó el mapeo epitópico de la respuesta contra la región C-terminal de las proteínas P utilizando los péptidos indicados en la figura 24. En la figura 35 se observa que los sueros presentaron niveles igualmente significativos ($p < 0,001$) de anticuerpos contra los péptidos H13, H11, R13, R11, R10 y R7. Este resultado indica que el mínimo epítipo reconocido es el péptido R7.

Estos resultados fueron confirmados mediante ensayos ELISA de inhibición. Se observó que al preincubar el suero con los péptidos R13, H13, R10 y R7 se alcanza un elevado y a la vez similar porcentaje de inhibición de la reacción anti-H13 (Fig. 36). Los porcentajes de inhibición de los distintos péptidos fueron similares cuando en el ensayo de ELISA se utilizó R13 como antígeno (resultados no mostrados).

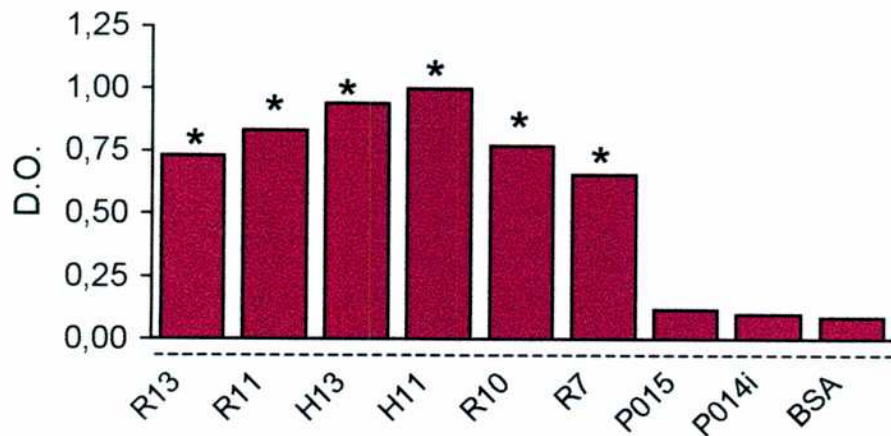


Figura 35. Mapeo epitópico de la reacción contra el extremo C-terminal de las proteínas P. Cada barra representa la mediana de la D.O. determinada contra cada péptido en el suero de los ratones Swiss inmunizados con MBP-MmP0. La línea punteada representa la mediana de la densidad óptica obtenida para el suero de los ratones control (ratones inmunizados con MBP) ensayados contra los distintos péptidos. (*: $p < 0.001$, Test de Suma de Rangos de Wilcoxon)

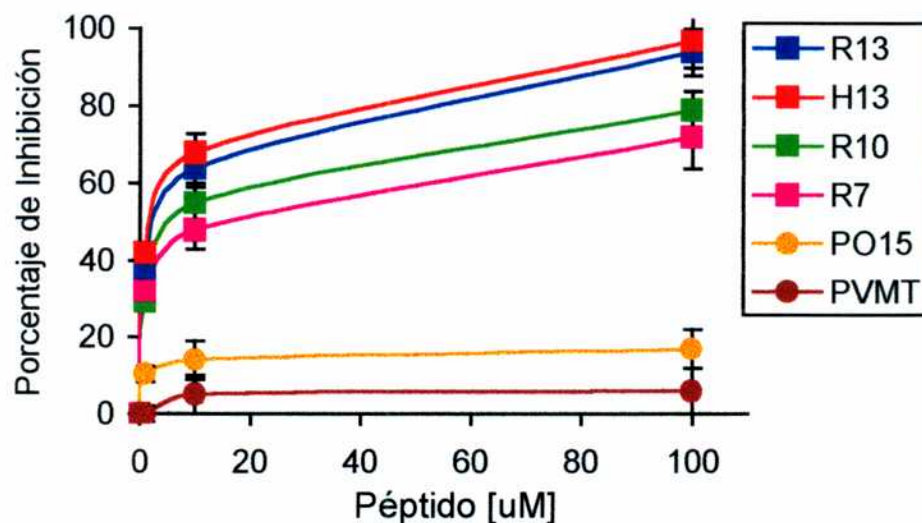


Figura 38. Inhibición de la reactividad contra el péptido H13. El suero proveniente de ratones Swiss inmunizados con la proteína MBP-MmP0 fue preincubado durante 12 horas con cantidades crecientes de los péptidos indicados. Los sueros se utilizaron posteriormente en un ensayo de ELISA contra H13. Cada punto representa la media de los valores de inhibición obtenidos para sueros individuales. El porcentaje de inhibición (% de inhibición) se calculó con respecto a la reactividad del suero preincubado con leche.

Por último, se determinó el perfil de isotipos de los anticuerpos involucrados en la respuesta anti- MmP0 (Fig. 37 A) y anti-H13 (Fig. 37 B). La respuesta contra MmP0 fue mayoritariamente de tipo IgG1, IgG2a e IgG2b. Sin embargo la respuesta anti-H13 fue exclusivamente de tipo IgG1.

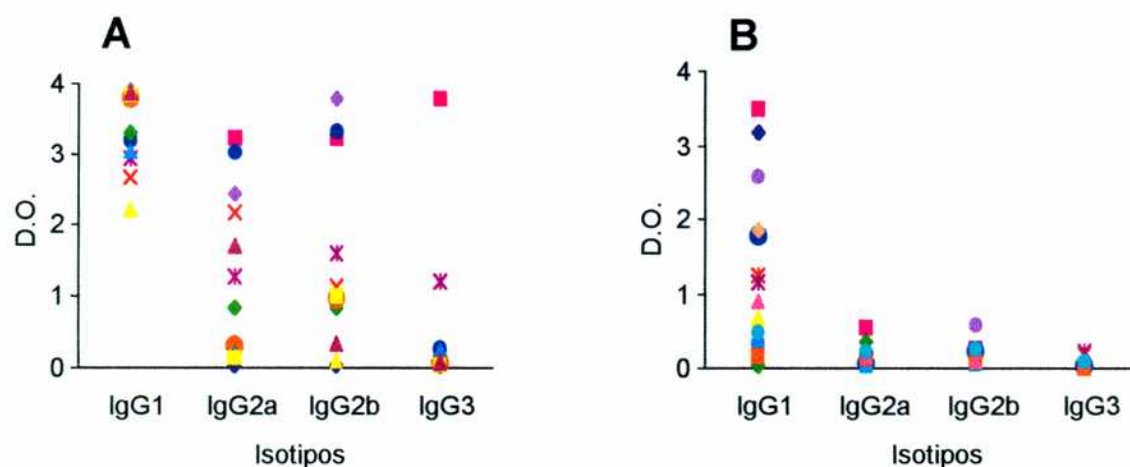


Figura 37. Determinación de los isotipos de anticuerpos anti-MmP0 (A) y anti-H13 (B) en ratones inmunizados con MBP-MmP0. Cada punto representa la densidad óptica obtenida para cada suero individual en cada uno de los isotipos estudiados.

3.5. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA Y CLONADO DE LAS REGIONES VARIABLES DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 17.2

En el marco de una colaboración, el grupo de la Dra. Hontebeyrie (Instituto Pasteur, París, Francia) obtuvo un anticuerpo monoclonal (AM) reactivo contra el péptido R13 denominado 17.2. Alícuotas del sobrenadante de cultivo y ARNm correspondiente a este AM fueron enviadas a nuestro laboratorio a fin de caracterizar el perfil de reactividad contra las proteínas ribosomales P y determinar sus semejanzas con el perfil de reactividad del antisuero policlonal obtenido de los ratones inmunizados con MBP-TcP2 β .

En primer lugar se verificó que el AM 17.2 reaccionaba con GST-TcP2 β en ensayos de Western blot (resultados no mostrados) y se determinó que el isotipo de este AM es IgG1/k (Fig. 38).

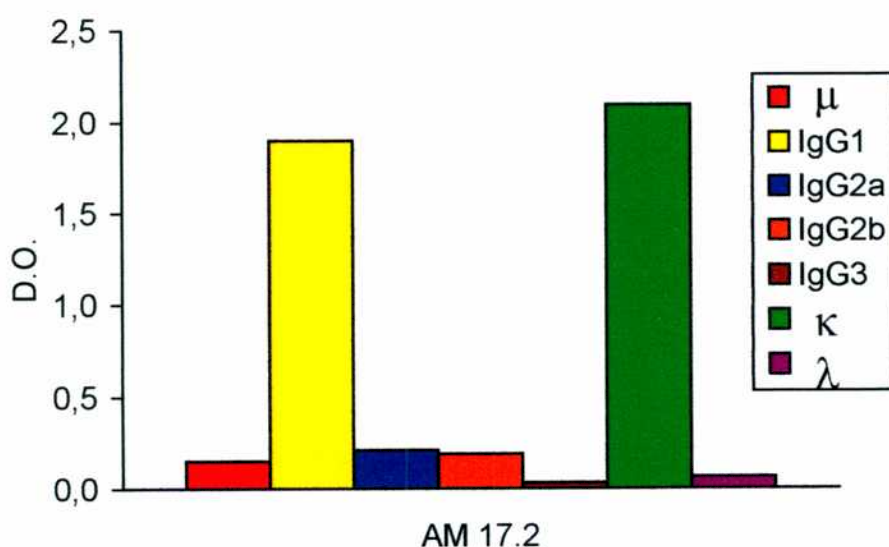


Figura 38. *Determinación del isotipo del AM 17.2.* Cada columna representa la D.O. determinada en el sobrenadante de cultivo del AM 17.2 contra el péptido R13 empleando como segundo anticuerpo los anticuerpos anti-isotipo indicados.

Mediante ensayos de ELISA directo y ELISA de inhibición se realizó el mapeo epitópico del AM 17.2. En la figura 39 se observa la reactividad contra distintos péptidos correspondientes al extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P.

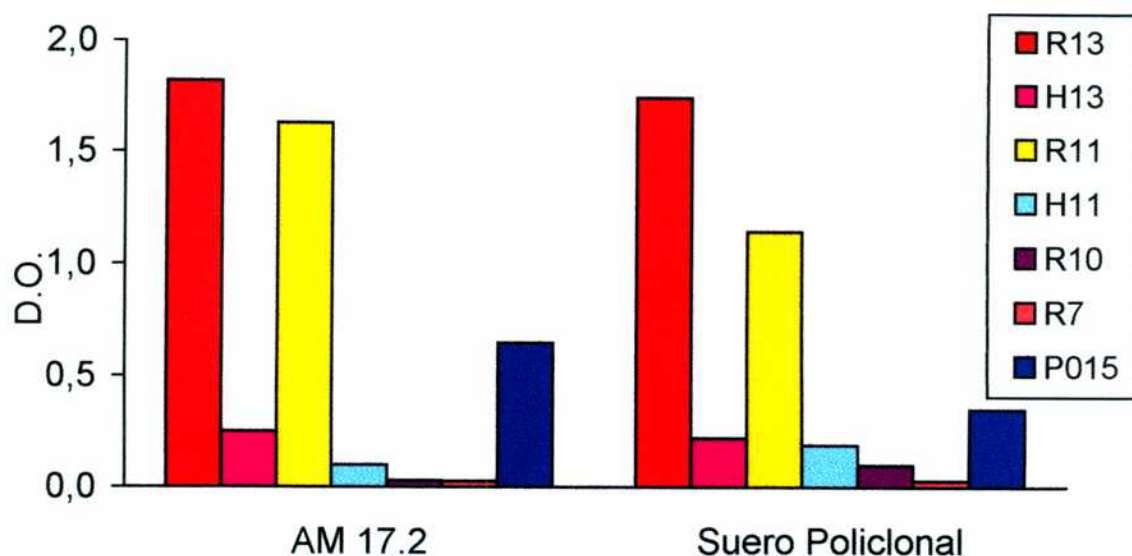


Figura 39. Reactividad del AM 17.2 contra el extremo C-terminal de las proteínas ribosomales *P*. Cada columna representa la D.O. determinada por ELISA contra cada péptido en el sobrenadante de cultivo del AM 17.2. y en un pool de sueros de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β (Suero Policlonal).

Se observó que el AM 17.2. presentó el mismo perfil de reactividad que el suero policlonal proveniente de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β . El AM 17.2 reaccionó fuertemente contra los péptidos R13 y R11 y no contra los péptidos R7 y R10. La reacción contra los péptidos H13 y H11 (derivados de la secuencia de MmP0) fue baja. El AM presentó asimismo reactividad cruzada contra el péptido P015. Los ensayos de ELISA de inhibición mostraron, al igual que el ELISA directo, la reacción cruzada entre P015 y R13 ya que la preincubación del AM con P015 inhibió el 60 % de la reactividad anti-R13 (Fig 40). En este tipo de ensayo, la reacción cruzada entre R13 y H13 se observó más claramente que en el ELISA directo ya que H13 inhibió aproximadamente el 40 % de la reacción anti-R13.

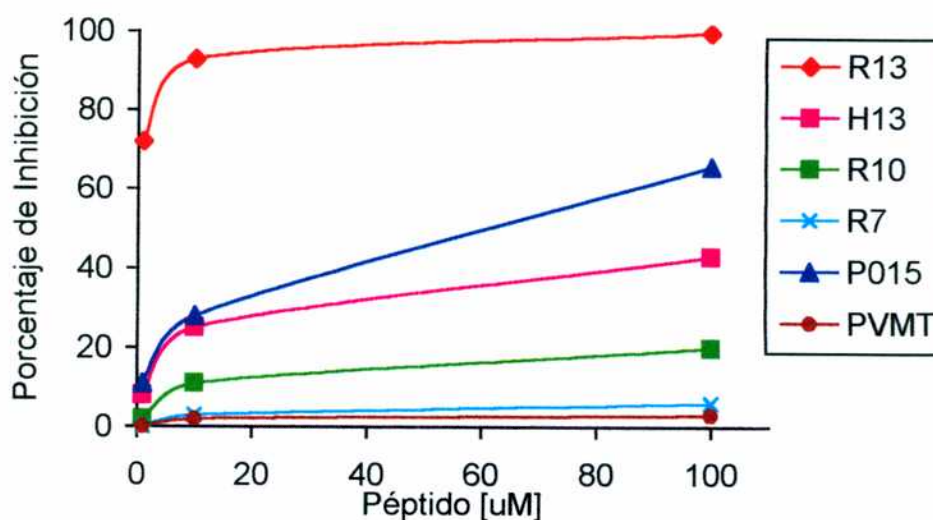


Figura 40. *Inhibición de la reactividad anti-R13 del AM 17.2.* El sobrenadante de cultivo del AM 17.2 fue preincubado durante 12 hs. con cantidades crecientes de los péptidos indicados. Luego se determinó por ELISA la reactividad contra el péptido R13.

Las regiones variables correspondientes a la cadena pesada (VH) y liviana (VL) del AM 17.2 fueron clonadas en un vector de expresión procarionte (pUC-myc) mediante la construcción de un scFv (Fragmento variable de cadena simple) (Materiales y Métodos, Fig. 7). A partir del ARNm del AM se obtuvo el ADNc y luego de una serie de reacciones de PCR (Materiales y Métodos, Fig. 8) se amplificaron las regiones VH y VL (Fig. 41). Los fragmentos VH y VL obtenidos de la PCR1 fueron analizados en geles de agarosa 1,5% y purificados. Dichos fragmentos fueron utilizados como templado para realizar la segunda reacción de PCR (PCR2). Los fragmentos VH y VL obtenidos de la PCR2 fueron purificados y utilizados como templado en la tercera reacción de PCR (PCR3). Esta reacción consta de dos etapas. La primera de ellas se realiza en ausencia de oligonucleótidos y por un mecanismo denominado "Overlap Extension" se produce la unión de los dos fragmentos en un único fragmento. Esta unión se produce debido a la complementariedad existente entre el extremo 5' del fragmento VH y el extremo 3' del fragmento VL. Esta región de complementariedad constituye la región bisagra entre ambas cadenas. En la segunda etapa de la reacción se agregan los "primers" SfiVH Back y NotVK For para producir un aumento de la señal. En la figura 41 se observa el producto de la PCR 3 (calle 3), el cual luego de ser purificado (calle 4) fue digerido con las enzimas de restricción Nco I y Not I (calle 5).

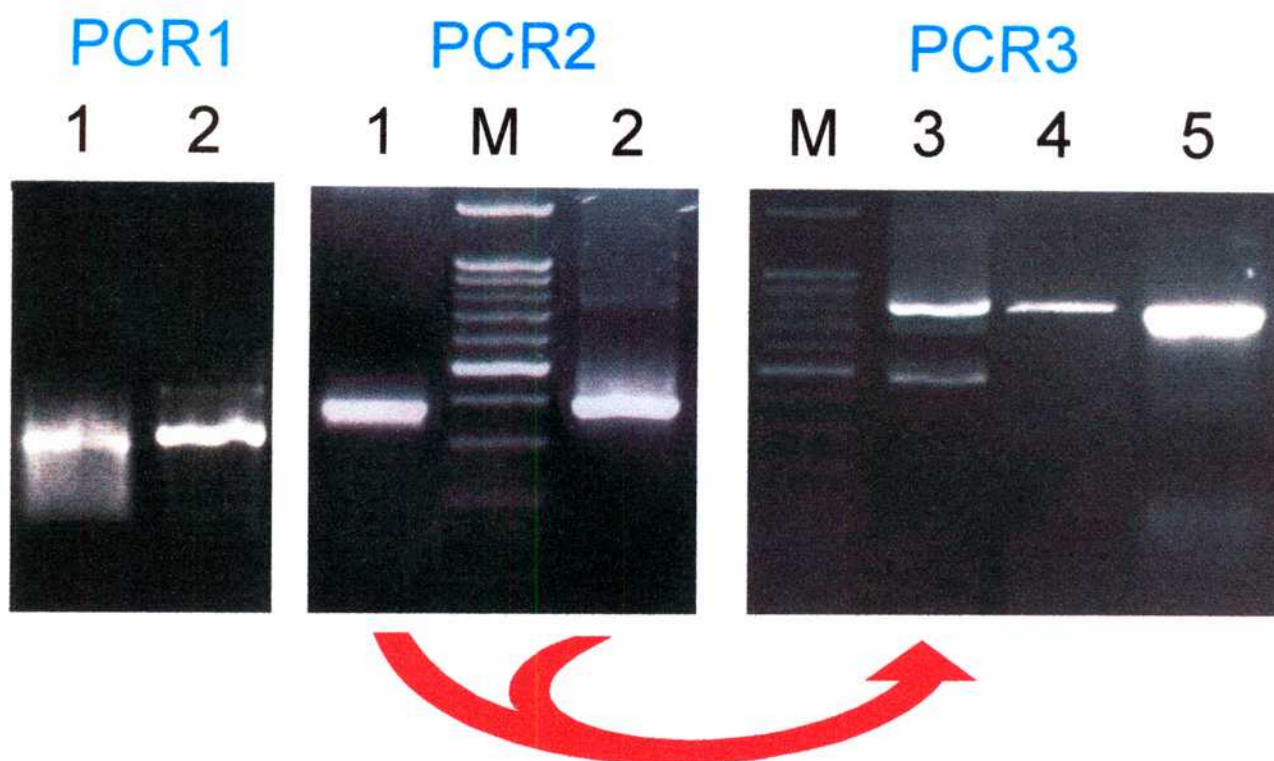


Figura 41. Amplificación por PCR de las regiones variables del AM 17.2. Calle 1: fragmento VL, Calle 2: fragmento VH, Calle 3: fragmento VH-VL, Calle 4: fragmento VH-VL purificado, Calle 5: fragmento VH-VL cortado con las enzimas Nco I y Not I. Calle M: marcador de peso molecular (100 pares de bases "ladder").

Paralelamente el plásmido pUC-myc fue digerido con las mismas enzimas de restricción con el objetivo de ligar el fragmento proveniente de la PCR3. Luego de identificar las colonias que contenían el plásmido recombinante (conteniendo el scFv) se secuenció el inserto. En la figura 42 se observa la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia deducida de aminoácidos del scFv derivado del AM 17.2.

1	ATG	GCC	CAG	GTG	AAG	CTG	CAG	GAG	TCA	GGA	CCT	GGC	CTG	GTG	42
1	M	A	Q	V	K	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	14
43	GCG	CCC	TCA	CAG	AGC	CTG	TCC	ATC	ACA	TGC	ACC	GTC	TCA	GGG	84
15	A	P	S	Q	S	L	S	I	T	C	T	V	S	G	28
85	TTC	TCA	TTA	ACT	AGC	TAT	GGT	GTA	CAC	TGG	GTT	CGC	CAG	CCT	126
29	F	S	L	T	S	Y	G	V	H	W	V	R	Q	P	42
127	CCA	GGA	AAG	GGT	CTG	GGG	TGG	CTG	GTA	GTG	ATA	TGG	AGT	GAT	168
43	P	G	K	G	L	G	W	L	V	V	I	W	S	D	56
169	GGA	AGC	ACA	ACC	TAT	AAT	TCA	GCT	CTC	AAA	TCC	AGA	CTG	AGC	210
57	G	S	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	R	L	S	70
211	ATC	AGC	AAG	GAC	AAC	TCC	AAG	AGC	CAA	GTT	TTC	TTA	AAA	ATG	252
71	I	S	K	D	N	S	K	S	Q	V	F	L	K	M	84
253	AAC	AGT	CTC	CAA	ACT	GAT	GAC	ACA	GCC	ACG	TAC	TAC	TGT	GCC	294
85	N	S	L	Q	T	D	D	T	A	T	Y	Y	C	A	98
295	AGA	GAG	CCT	CCC	ACG	ACG	TAC	GTT	TCT	TAC	TGG	GGC	CAA	GGG	336
99	R	E	P	P	T	T	Y	V	S	Y	W	G	Q	G	112
337	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGA	GGC	GGT	TCA	GGC	GGA	378
113	T	T	V	T	V	S	S	G	G	G	G	S	G	G	126
379	GGT	GGC	TCT	GGC	GGT	GGC	GGA	TCG	GAC	ATT	GAG	CTC	ACC	CAG	420
127	G	G	S	G	G	G	G	S	D	I	E	L	T	Q	140
421	TCT	CCA	TCC	TCT	TGC	AAG	TCA	AGT	CAG	AGC	CTC	TTA	GAT	AGT	462
141	S	P	S	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	D	S	154
463	GAT	GGA	AAG	ACA	TAT	TTG	AAT	TGG	TTG	TTA	CAG	AGG	CCA	GGC	504
155	D	G	K	T	Y	L	N	W	L	L	Q	R	P	G	168
505	CAG	TCT	CCA	AAG	CGC	CTA	ATC	TAT	CTG	GTG	TCT	AAA	CTG	GAC	546
169	Q	S	P	K	R	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	182
547	TCT	GGA	GTC	CCT	GAC	AGG	TTC	ACT	GGC	AGT	GGA	TCA	GGG	ACA	588
183	S	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	196
589	GAT	TTC	ACA	CTG	AAA	ATC	AGC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	TTG	630
197	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	210
631	GGA	GTT	TAT	TAT	TGC	TGG	CAA	GGT	TCA	CAT	TTT	CCG	TAC	ACG	672
211	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	S	H	F	P	Y	T	224
673	TTC	GGA	GGG	GGG	ACA	AAG	CTG	GAA	ATA	AAA	CGG	GCG	GCC	GCA	714
225	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R	A	A	A	238
715	GAA	CAA	AAA	CTC	ATC	TCA	GAA	GAG	GAT	CTG	AAT				747
239	E	Q	K	L	I	S	E	E	D	L	N				249

Figura 42. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del scFv-17.2

En la figura 43 A se indica la región variable de la cadena pesada (119 aminoácidos), la región variable de la cadena liviana (101 aminoácidos), el péptido ligador (15 aminoácidos) y el "tag" c-myc (14 aminoácidos). En la figura 43 B y 43 C se señalan las 3 regiones hipervariables (CDR) y las 3 regiones conservadas (FR) de VH y VL respectivamente.

A

```

1  M A Q V K L Q E S G P G L V A P S Q S L S I T C T      25
26 V S G F S L T S Y G V H W V R Q P P G K G L G W L      50
51 V V I W S D G S T T Y N S A L K S R L S I S K D N      75
76 S K S Q V F L K M N S L Q T D D T A T Y Y C A R E      100
101 P P T T Y V S Y W G Q G T T V T V S S G G G S G      125
126 G G G S G G G S D I E L T Q S P S S C K S S Q S      150
155 L L D S D G K T Y L N W L L Q R P G Q S P K R L I      175
176 Y L V S K L D S G V P D R F T G S G S G T D F T L      200
201 K I S R V E A E D L G V Y Y C W Q G S H F P Y T F      225
225 G G G T K L E I K R A A A E Q K L I S E E D L N      249

```



B

```

FR1  MAQVKLQESGPGLVAPSQSLSITCTVS  G F S L T S Y G V H  CDR1
FR2  WVRQPPGKGLGWL  V I W S D G S T T Y N S A L K S  CDR2
FR3  RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTATYYCAR  E P P T T Y V S Y  CDR3
      WGQGTTVTVSS

```

C

```

FR1  DIELTQSPSSC  K S S Q S L L D S D G K T Y L N  CDR1
FR2  WLLQRPGQSPKRLIY  L V S K L D S  CDR2
FR3  GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAED L G V Y Y C
CDR3  W Q G S H F P Y T  FGGGTKLEIKR

```

Figura 43. Estructura del scFv derivado del AM 17.2. **(A)** Se observan las distintas regiones del scFv: VH, VL, linker y el "tag" c-myc. **(B y C)** Ubicación y detalle de la secuencia de las tres regiones hipervariables (CDR) y de las regiones conservadas (FR) de la cadena pesada (B) y liviana (C) del scFv.

Posteriormente, se indujo la expresión del scFv para verificar si éste poseía la capacidad de reaccionar con el péptido R13 al igual que el AM del cual se originó. En estos ensayos se utilizó como control un scFv anti-p53, ya que éste posee el "tag" c-myc pero no está dirigido contra las proteínas P. Se observó mediante SDS-PAGE y Western blot que las bacterias conteniendo el plásmido codificante del scFv sintetizaron una proteína de aproximadamente 25 Kda (Fig. 44). El peso molecular obtenido coincidió con el esperado para el scFv.

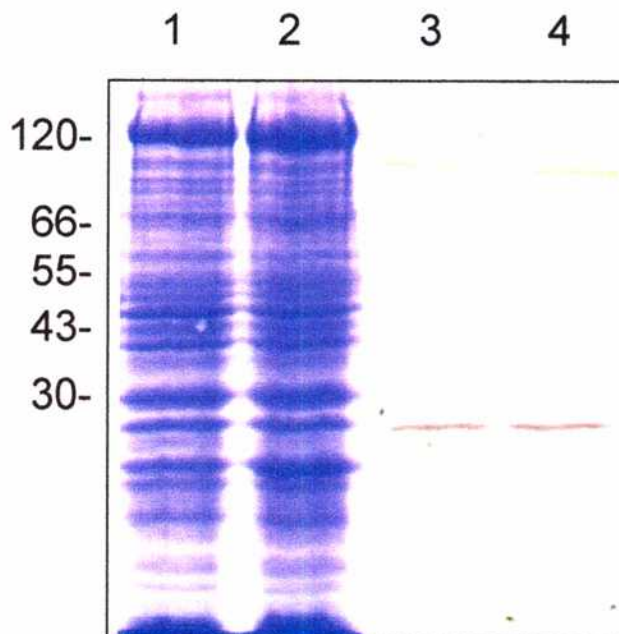


Figura 44. *Expresión del scFv derivado del AM 17.2.* Un cultivo de bacterias conteniendo el plásmido que codifica para el scFv-17.2 o para el scFv anti-p53 (utilizado como control de expresión) fue inducido por el agregado de IPTG. Un extracto proteico de dichas bacterias fue analizado por SDS-PAGE 12% y Western blot. En el ensayo de Western blot el filtro fue revelado empleando el anticuerpo monoclonal 9E10 específico contra c-myc.

Luego se determinó la reactividad del scFv-17.2 contra el péptido R13 mediante ensayos de ELISA. En la figura 45 se observa que el scFv derivado del AM 17.2 reaccionó contra el péptido R13. Como control de especificidad de esta reacción se observa que el péptido R13 no fue reconocido por el scFv anti-p53.

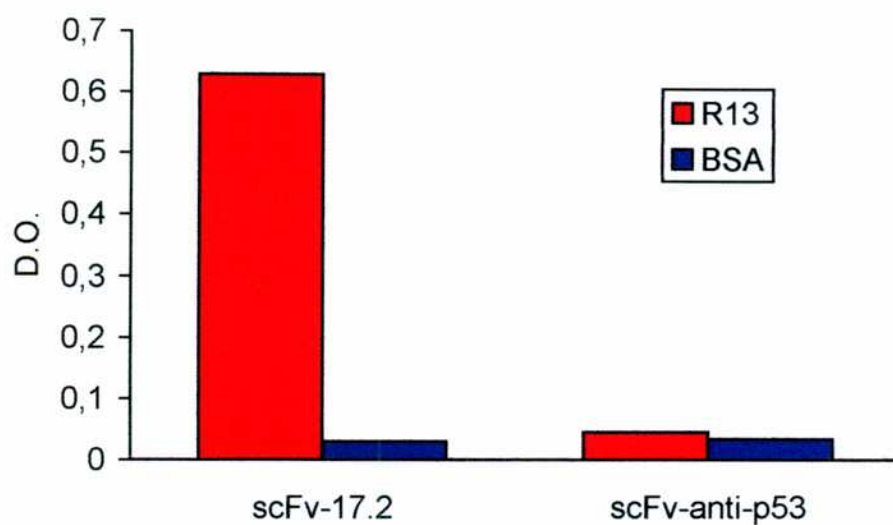


Figura 45. *Determinación de la reactividad del scFv-17.2 contra R13.* Los extractos proteicos de bacterias conteniendo el plásmido que codifica para el scFv-17.2 o para el scFv anti-p53 fueron ensayados por ELISA contra el péptido R13 y contra BSA. Cada barra representa la D.O. obtenida contra cada péptido.

3.6. COMPARACION DE LA RESPUESTA OBTENIDA POR INMUNIZACION CON LAS PROTEINAS P RECOMBINANTES CON RESPECTO A LA RESPUESTA INMUNE DURANTE LA INFECCION POR *T. cruzi*

Luego de caracterizar la respuesta inmune inducida mediante la inmunización con las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*, ésta se comparó con la respuesta generada contra dichas proteínas durante la infección humana y experimental en ratones. En primer lugar, se establecieron los epítopes involucrados en la respuesta contra TcP2 β en sueros de pacientes chagásicos y ratones Rockland infectados experimentalmente con la cepa CA-1 de *T. cruzi*. Para ello, se determinó la reactividad de estos sueros contra los diez péptidos (Fig. 22 A) derivados de la secuencia de TcP2 β . En la figura 46 se observan los niveles de anticuerpos contra cada péptido y su comparación con los niveles obtenidos en sueros de ratones Balb/c inmunizados con MBP-TcP2 β (resultados mostrados previamente en Fig. 22). Puede observarse claramente que tanto durante la infección por *T. cruzi* (en humanos y en ratones) como luego de la inoculación de la proteína recombinante la respuesta inmune está dirigida fundamentalmente contra el péptido 10, es decir contra el extremo C-terminal de TcP2 β (Fig. 46). Los niveles de anticuerpos detectados fueron significativamente diferentes ($p < 0,001$) de los valores hallados en sueros normales. En ninguna de las dos infecciones (humana o experimental en ratón) se observó reacción contra los otros nueve péptidos. A diferencia de los anticuerpos producidos durante la infección natural o experimental, la inmunización con MBP-TcP2 β provocó un aumento aunque no significativo en la respuesta contra los péptidos 4, 7 y 8.

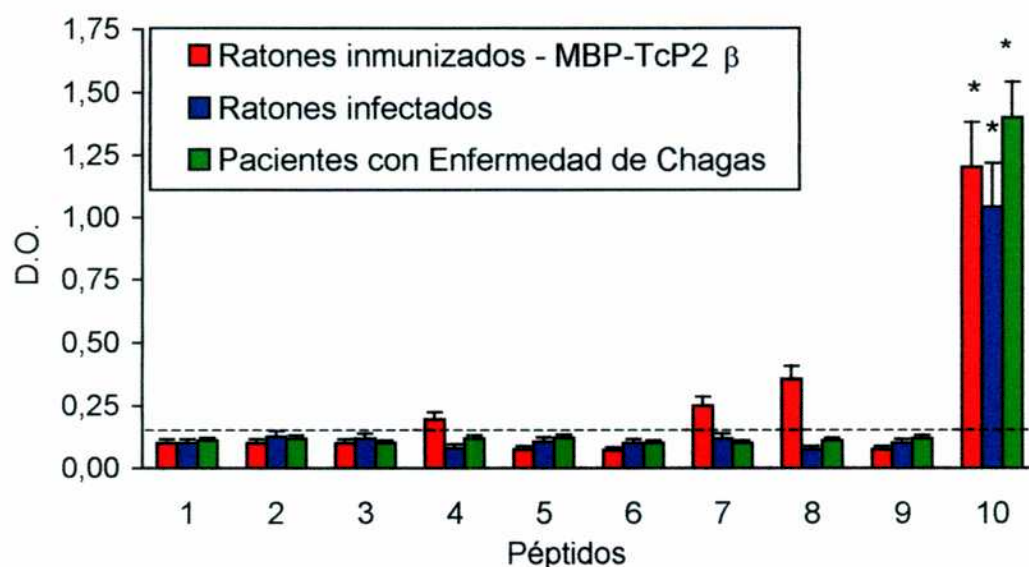


Figura 46. Mapeo de epítopes de la respuesta contra TcP2 β generada durante la infección natural, la infección experimental en ratones y la inmunización con MBP-TcP2 β . Sueros provenientes de pacientes con Enfermedad de Chagas (n=10), de ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi* (n=12) y de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β (n=20) fueron ensayados por ELISA contra los diez péptidos derivados de la proteína TcP2 β . Cada columna representa la media de la D.O. obtenida contra cada péptido para cada grupo de sueros (*: $p < 0,001$, Test T de Student). La línea punteada indica la media de la D.O. obtenida en sueros de ratones control o dadores normales contra cada péptido.

Al comparar la respuesta contra diferentes péptidos pertenecientes al extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P se observó una gran similitud en el perfil de reactividad de los sueros de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β con respecto al observado en el suero de pacientes chagásicos y en el suero de ratones Rockland infectados con la cepa CA-1 de *T. cruzi*. En todos los casos la respuesta estuvo dirigida fundamentalmente contra el péptido R13 no observándose reactividad contra los péptidos R10 y R7 (Fig. 47 A). Este perfil de reactividad difiere totalmente del observado en pacientes lúpicos P positivos (LES) en los cuales se reconoce el autoepítope R7. Este tipo de respuesta autoinmune es similar a la observada en los ratones de la cepa Swiss inmunizados con MBP-MmP0 (Fig. 47 B).

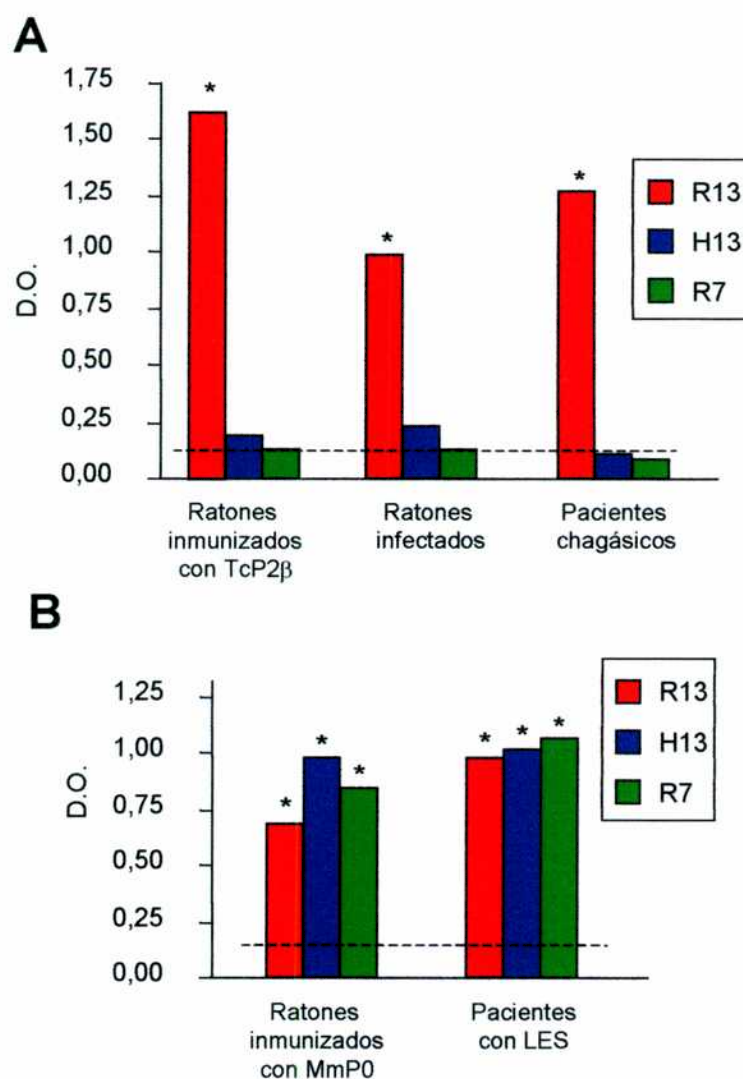
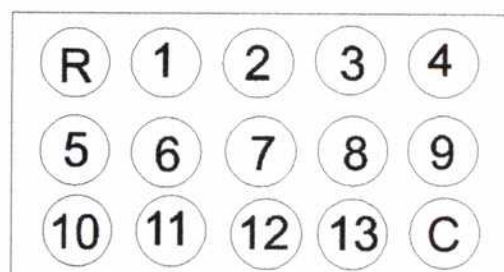
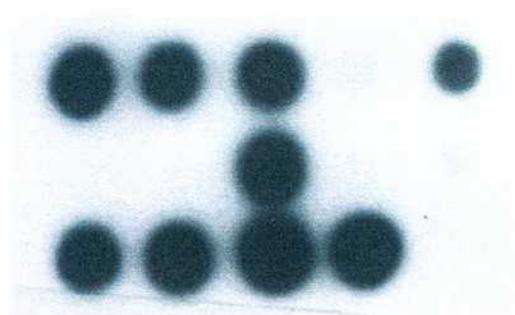
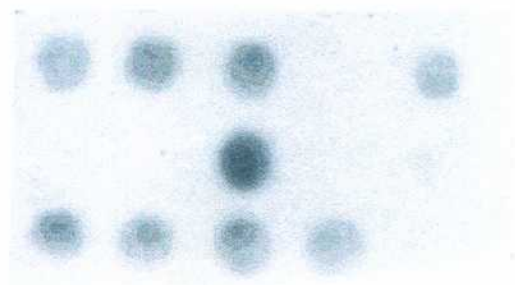


Figura 47. Reactividad contra el extremo C-terminal de las proteínas *P*. Cada barra representa la mediana de la D.O. determinada contra cada péptido para cada grupo de sueros (*: $p < 0.01$, Test de Suma de Rangos de Wilcoxon).

Posteriormente se determinaron los aminoácidos del péptido R13 involucrados en la unión de los anticuerpos inducidos durante la infección por *T. cruzi* o mediante inmunización con la proteína ribosomal TcP2 β . Para ello se estudió la reactividad de estos anticuerpos contra el extremo C-terminal de TcP2 β mediante la técnica de reemplazo de alaninas (Fig. 48).

A

R	EEEDDDMGFGLFD
1	AEEDDDMGFGLFD
2	EAEEDDDMGFGLFD
3	EEAEDDDMGFGLFD
4	EEEAEEDMGFGLFD
5	EEEDADMGFGLFD
6	EEEDDAMGFGLFD
7	EEEDDDAGFGLFD
8	EEEDDDMAFGLFD
9	EEEDDDMGAGLFD
10	EEEDDDMGFALFD
11	EEEDDDMGFGAFD
12	EEEDDDMGFGLAD
13	EEEDDDMGFGLFA
C	inespecífico

**B****C****D**

EE**E**DD**D**M**G**FGLFD

Figura 48. Mapeo epitópico de la reacción anti-R13 por la técnica de reemplazo por alaninas. **(A)** Secuencia aminoacídica de los péptidos ensayados y ubicación de cada péptido en el filtro. El péptido R contiene la secuencia original de R13 sin ninguna sustitución. **(B)** Filtro revelado utilizando suero de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β (dil 1/400) **(C)** Filtro revelado utilizando suero de un paciente chagásico (dil 1/200). **(D)** Aminoácidos del extremo C-terminal de TcP2 β esenciales para el reconocimiento por parte de los anticuerpos (en rojo).

La reactividad contra los distintos péptidos derivados de R13 con sustituciones de alanina fue similar en el suero de un ratón inmunizado con MBP-TcP2 β (Fig. 48 B) y en el suero proveniente de un individuo con Enfermedad de Chagas (Fig. 48 C). Las sustituciones de los aminoácidos Glu1, Glu2, Asp4, Met7,

Gli10, Leu11, Phe12 y Asp13 no afectaron la unión de los anticuerpos. Por el contrario, las sustituciones en los aminoácidos Glu3, Asp5, Asp6, Gli8 y Phe9 inhibieron totalmente la unión del anticuerpo. En función de estos resultados fue posible determinar los aminoácidos del péptido R13 esenciales para la unión a los anticuerpos (Fig. 48 D). Resultados similares fueron obtenidos al evaluar los aminoácidos de R13 involucrados en la unión al anticuerpo monoclonal 17.2 (resultados no mostrados).

Al analizar la respuesta contra el extremo C-terminal de la proteína TcP0 se observó una gran similitud en el perfil de reactividad de sueros de ratones inmunizados con TcP0 con respecto a sueros de pacientes chagásicos y de ratones infectados con *T. cruzi*. En los tres modelos la respuesta estuvo dirigida contra los péptidos P015 y P013 (Fig. 49).

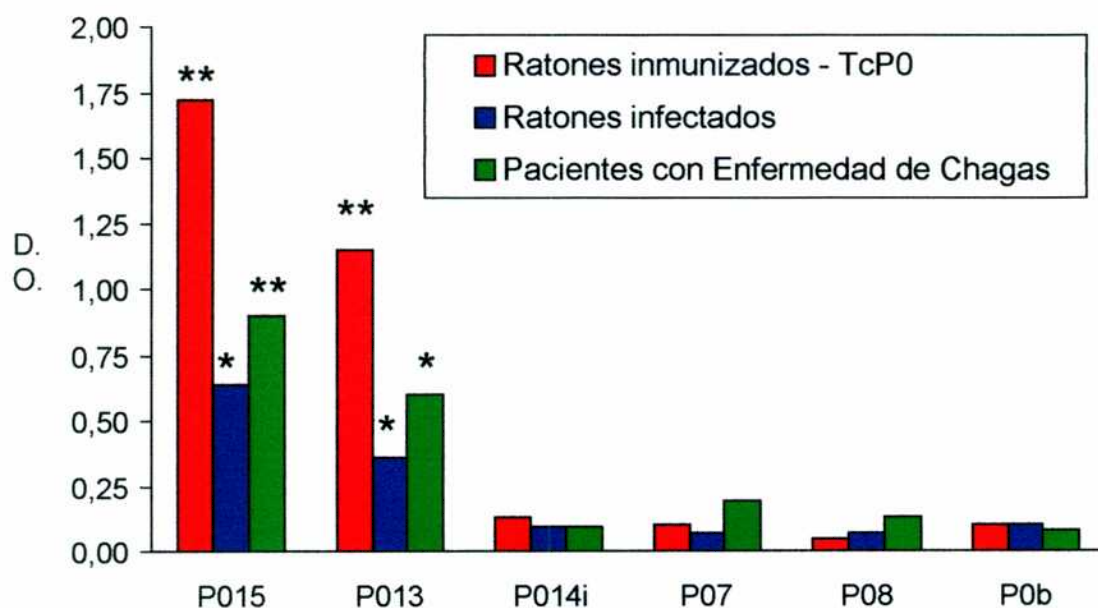


Figura 49. Caracterización de la respuesta contra el extremo C-terminal de TcP0 en la infección natural, la infección experimental en ratones y en ratones inmunizados con MBP-TcP0. Sueros provenientes de pacientes con Enfermedad de Chagas (n=22), de ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi* (n=12) y de ratones inmunizados con MBP-TcP0 fueron ensayados por ELISA contra péptidos correspondientes al extremo C-terminal de TcP0. Cada barra representa la mediana de la D.O. obtenida contra cada péptido para cada grupo de sueros (*: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, Test de Suma de Rangos de Wilcoxon).

3.7. ROL DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PROTEINAS RIBOSOMALES P DE *T. cruzi* EN LAS ALTERACIONES CARDIACAS GENERADAS POR SUEROS DE PACIENTES CHAGASICOS

El rol de los anticuerpos contra las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* se estudió en el modelo de corazón aislado de conejo. En este modelo se produce bradicardia y/o bloqueo de la conducción aurículo ventricular (AV) al perfundir el corazón aislado de conejo con suero o IgG provenientes de pacientes chagásicos con cardiopatía (Fig. 50, Farias de Oliveira, 1997). En la figura 50 se observa que el suero de dos pacientes induce un aumento del intervalo P-P y un bloqueo de la conducción AV de segundo grado.

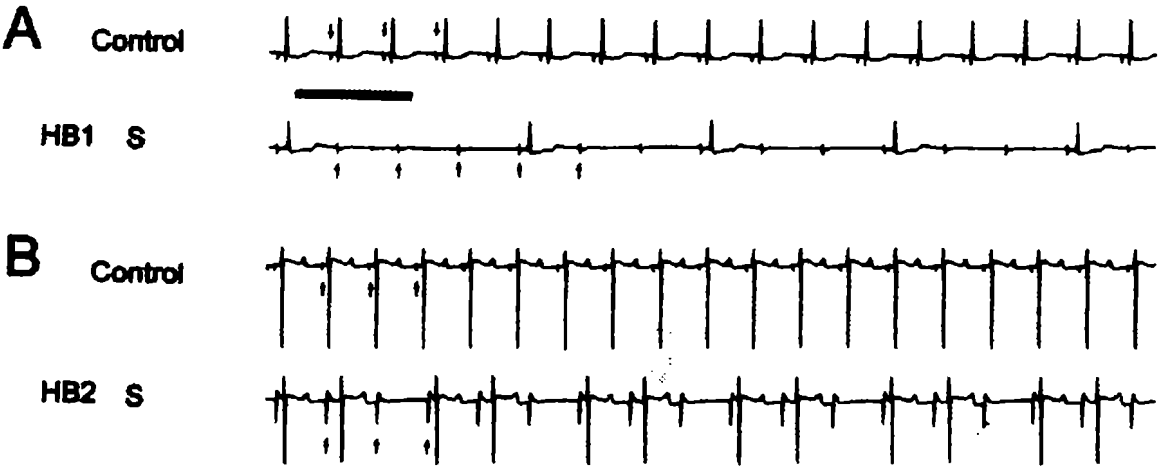


Figura 50. Efecto de los sueros de pacientes HB1 (A) y HB2 (B) sobre la actividad eléctrica de corazones aislados de conejos. Los registros de cada par fueron obtenidos utilizando el mismo corazón. Las flechas indican la onda P. El registro superior de cada par representa el ECG control tomado durante la perfusión con solución de Tyrode. Los registros inferiores se obtuvieron en presencia de suero diluido 1:100. Barra de calibración: 1 segundo.

A fin de determinar los antígenos cardíacos reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con Enfermedad de Chagas, dichos sueros fueron incubados con un péptido correspondiente al segundo rulo extracelular del receptor muscarínico M2. La incubación del suero o la fracción IgG con este péptido, inhibió totalmente el bloqueo AV (Fig. 51), indicando que las alteraciones observadas se deben a la unión de anticuerpos presentes en el suero al receptor muscarínico.

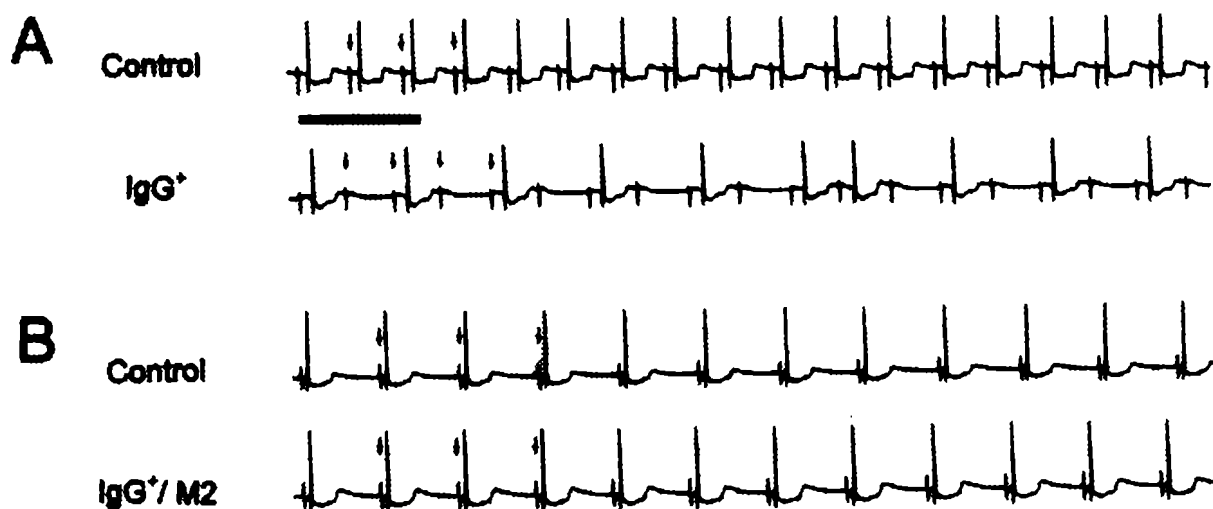


Figura 51. Incubación del suero con el péptido correspondiente al segundo rulo extracelular del receptor muscarínico. **(A)** Registros obtenidos durante la perfusión del corazón con solución de Tyrode (control) e IgG de un paciente chagásico (IgG⁺). **(B)** Registro obtenido durante la perfusión con IgG preincubadas con el péptido correspondiente al segundo rulo extracelular del receptor muscarínico (IgG⁺/M2). Las flechas indican la onda P.

Luego, se evaluó la reacción cruzada entre antígenos cardíacos y antígenos de *T. cruzi*. Para ello, en primer lugar se incubó el suero de pacientes chagásicos con tripomastigotes obtenidos de ratones infectados. Cuando el suero fue incubado con tripomastigotes vivos, no se observaron modificaciones en el bloqueo AV (Fig. 52 A). Por el contrario, cuando el suero fue incubado con lisado de tripomastigotes no se observó bloqueo de la conducción ni disminución del ritmo cardíaco (Fig. 52 B). Estos resultados sugieren que los antígenos intracelulares de *T. cruzi* y no los extracelulares tienen reacción cruzada con los antígenos cardíacos reconocidos por los anticuerpos funcionalmente activos presentes en el suero de los pacientes chagásicos.

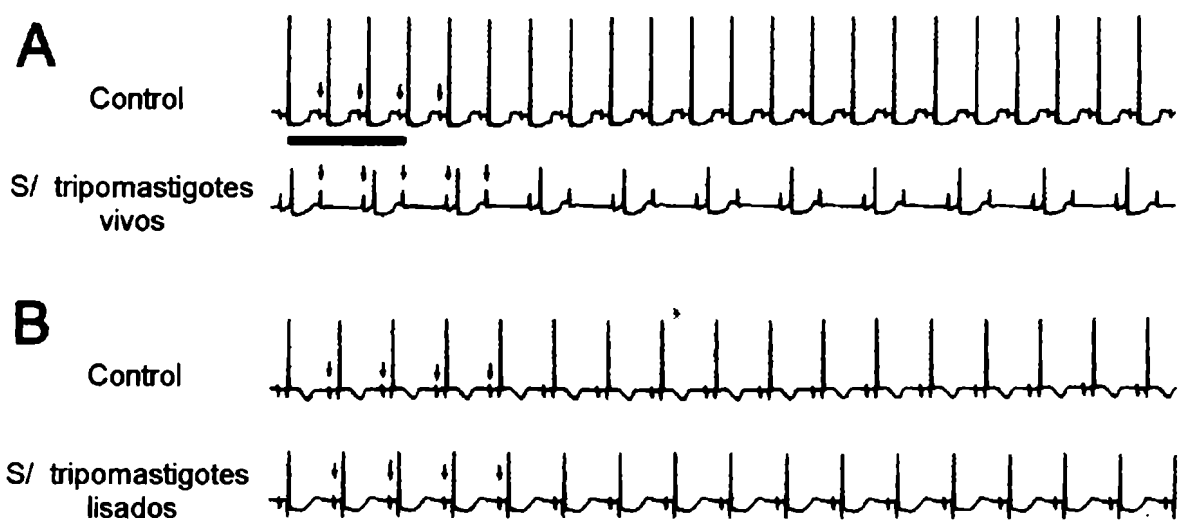


Figura 52. Efecto de la preincubación de los sueros de pacientes chagásicos con tripomastigotes de *T. cruzi*. El suero HB1 se preincubó con 2×10^6 tripomastigotes vivos (A) o lisados (B). En el registro de A se observa bloqueo de conducción de segundo grado. Barra de calibración: 1 segundo.

A fin de evaluar la participación de las proteínas ribosomales P en la reacción cruzada contra antígenos intracelulares de *T. cruzi*, el suero de pacientes chagásicos con cardiomiopatía fue preincubado con la proteína recombinante MBP-TcP2 β y con péptidos correspondientes a su extremo C-terminal. Como control se preincubó el suero con MBP y con un péptido derivado de la proteína de choque térmico humana (HSP70). En la figura 53 A se observa que la preincubación con la proteína portadora sola (MBP) no modificó la inducción de bloqueo AV por las IgG de pacientes chagásicos. Por el contrario la incubación del suero con MBP-TcP2 β anuló la capacidad de inducir bloqueo AV (Fig. 53 B). En la figura 53 C y 53 D se muestran experimentos similares realizados con la fracción IgG de 2 pacientes incubadas con los péptidos R13 y R7 respectivamente. La incubación con R13 inhibió el bloqueo AV y la bradicardia, mientras que la incubación con R7 no indujo modificaciones en el bloqueo AV. Resultados similares se obtuvieron al incubar otros sueros chagásicos con los péptidos o las proteínas recombinantes (resultados no mostrados).

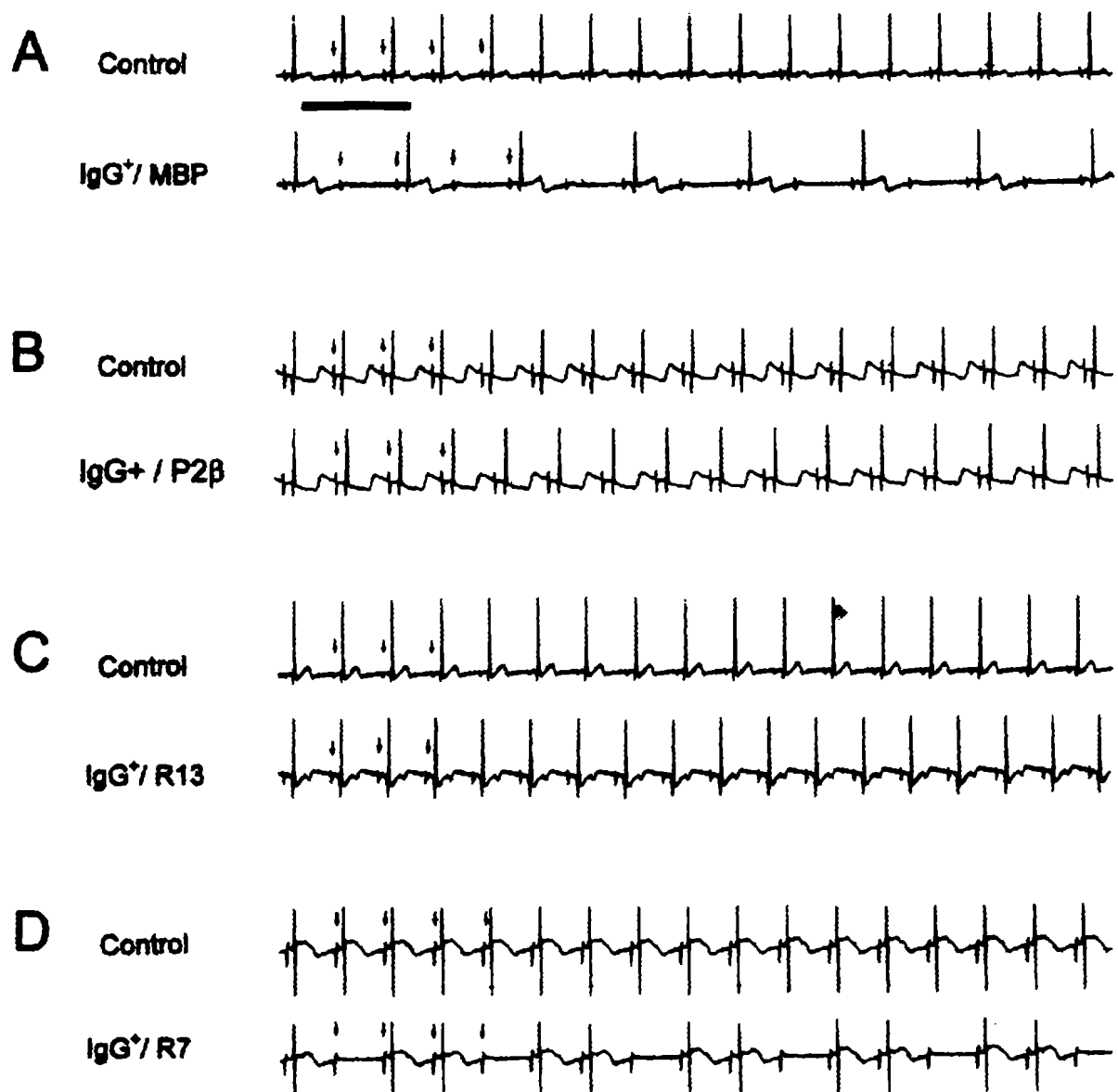


Figura 53. *Incubación de la fracción IgG con TcP2 β y péptidos relacionados.* Las IgG del suero HB1 fueron preincubadas con MBP (A), TcP2 β (B), R13 (C) o con R7 (D). En todos los casos se tomó un registro control durante la perfusión con solución de Tyrode. Barra de calibración: 1 segundo.

Asimismo, se estudió el efecto de TcP0 sobre el bloqueo AV inducido por el suero de pacientes chagásicos. En la figura 54 se observa que la incubación del suero de un paciente con la proteína MBP-TcP0 y el péptido P015 correspondiente a su extremo C-terminal produjo inhibición del bloqueo AV.



Figura 54. Incubación del suero HB1 con TcP0 y péptidos relacionados. Las IgG del suero HB1 fueron preincubadas con TcP0 (**A**) o P015 (**B**). En todos los casos se tomó un registro control durante la perfusión con solución de Tyrode. Barra de calibración: 1 segundo.

3.8. EFECTO DE LA INMUNIZACION CON PROTEINAS P RECOMBINANTES EN LA INDUCCION DE ANTICUERPOS CON ACTIVIDAD FUNCIONAL CONTRA RECEPTORES CARDIACOS

En función de las evidencias que indicarían la existencia de reacción cruzada entre las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* y receptores cardíacos, se investigó la presencia de anticuerpos contra los receptores cardíacos β -adrenérgicos y muscarínicos en los sueros de los ratones inmunizados con las proteínas P recombinantes. En la figura 55 se observa la existencia de niveles significativos de anticuerpos dirigidos contra el segundo rulo de los receptores adrenérgicos $\beta 1$ y $\beta 2$ ($p < 0,01$) y muscarínicos M2 ($p < 0,05$) en el suero de ratones inmunizados con MBP-TcP0. Esta respuesta no fue observada en el suero de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β y MBP-MmP0 (resultados no mostrados). Estos resultados indicarían que la inmunización con la proteína MBP-TcP0 es capaz de inducir autoanticuerpos contra los receptores cardiovasculares mencionados.

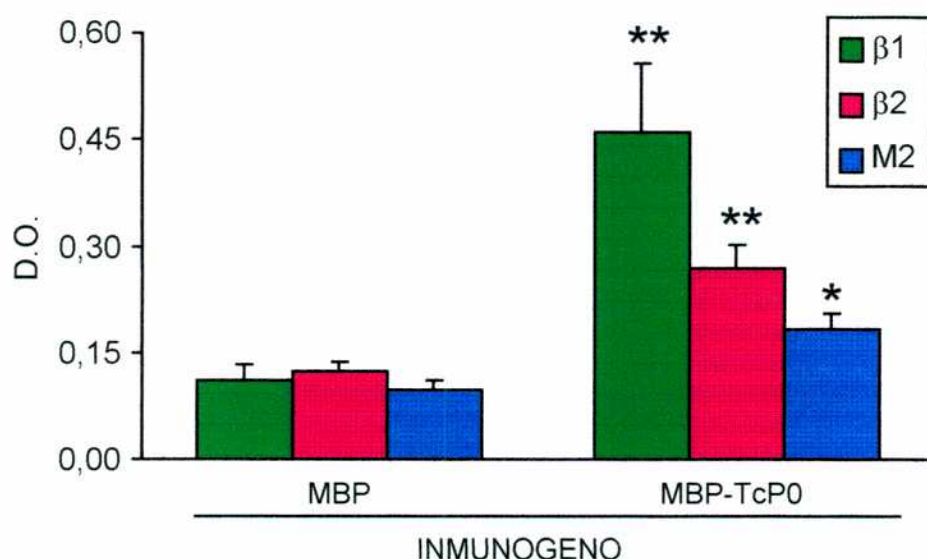


Figura 55. Determinación de la reactividad contra péptidos correspondientes a los receptores adrenérgicos $\beta 1$ y $\beta 2$ y muscarínico M2 en ratones inmunizados con MBP-TcP0. Cada columna representa la media de la D.O. contra los péptidos indicados obtenida para cada grupo de sueros. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Test-T de Student).

Posteriormente se determinó el posible efecto funcional del suero de los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes sobre la frecuencia de contracción de un cultivo de cardiomiocitos de rata neonata que laten espontáneamente *in vitro*. Para ello se obtuvieron las IgG de cada uno de los sueros a analizar, las cuales fueron agregadas al cultivo de cardiocitos y se determinó el

cambio registrado en la frecuencia de contracción. Para determinar los receptores involucrados en el cambio de la frecuencia de contracción, cultivos paralelos fueron incubados con las IgG en presencia de los antagonistas propranolol (antagonista $\beta 1$ y $\beta 2$ adrenérgico) y atropina (antagonista M2 colinérgico). En la figura 56 puede observarse que las fracciones IgG de tres de cuatro sueros de ratones inmunizados con MBP-TcP0 provocaron un claro efecto cronotrópico positivo sobre los cardiocitos en cultivo ($p < 0,01$). Este aumento de la frecuencia de contracción fue inhibido con propranolol.

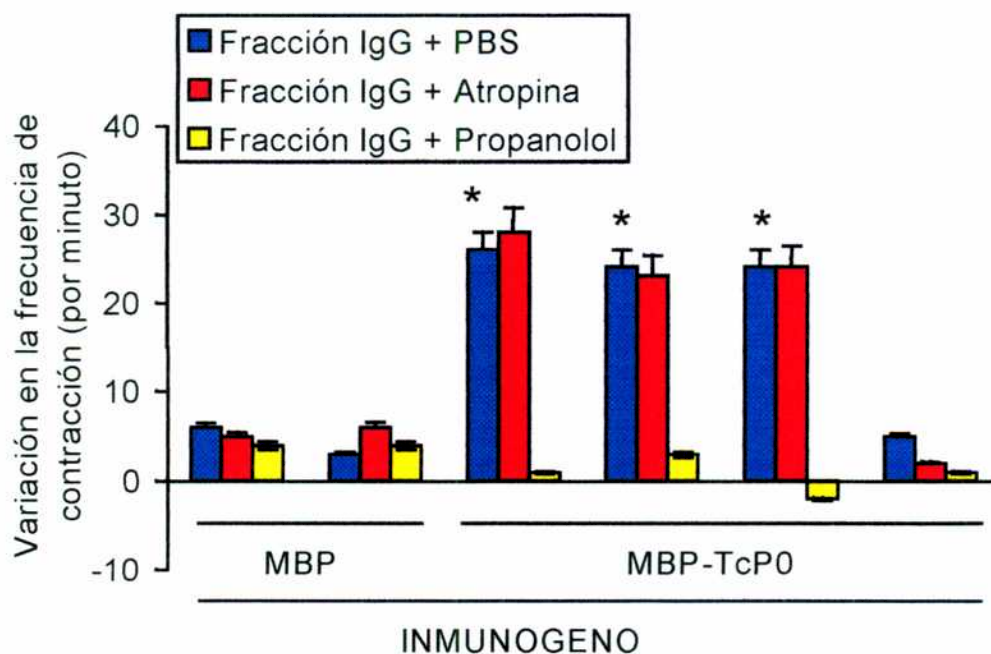


Figura 56. Determinación del efecto cronotrópico de IgGs provenientes de ratones inmunizados. Cada columna representa la media de las contracciones por minuto contadas en diez campos y las barras el desvío estándar de la determinación. En todos los tratamientos el cambio en la frecuencia de contracción fue calculado con relación a la frecuencia de contracción basal. (*: $p < 0,01$, Test T de Student).

El agregado de la fracción IgG proveniente de ratones inmunizados con MBP (Fig. 56), MBP-TcP2 β y MBP-MmP0 (resultados no mostrados) no produjo ningún cambio en la frecuencia de contracción. Estos resultados indican que la inmunización con TcP0 indujo la producción de autoanticuerpos que serían capaces de interaccionar con receptores adrenérgicos $\beta 1$ y de producir cambios en la fisiología de las células cardíacas.

Posteriormente se investigó el reconocimiento de proteínas cardíacas por los sueros de ratones inmunizados con las proteínas recombinantes en ensayos de Western blot. Para ello se preparó un extracto proteico a partir de cardiocitos de

ratón. A modo de control se determinó la reactividad de sueros provenientes de ratones inmunizados con MBP (Fig. 57, calles 1 y 2). Los sueros de los ratones inmunizados con MBP-MmP0 reconocieron las mismas proteínas que el suero de los ratones inmunizados con MBP (resultados no mostrados). En la figura 57 puede observarse que los sueros provenientes de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β y MBP-TcP0 reaccionaron con algunas proteínas que no fueron reconocidas por el suero de los animales control. Los sueros de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β reaccionaron con una proteína de aproximadamente 130 Kda y otra de 85 Kda (Fig. 57, calles 3-5). Los sueros de ratones inmunizados con MBP-TcP0 (Fig. 57, calles 6-9), reaccionaron fuertemente contra una proteína de aproximadamente 68 Kda y contra un grupo de aproximadamente 3 ó 4 proteínas de peso molecular entre 52 y 66 Kda. Algunos sueros provenientes de ratones inmunizados con MBP-TcP0 no reconocieron estas proteínas y reaccionaron con una proteína de 55 Kda (Fig. 57, calle 10). A pesar que los pesos moleculares de todas estas proteínas son muy cercanos, la proteína de 55 Kda reconocida por estos sueros no forma parte del grupo de proteínas reconocidas por los sueros analizados en las calles 6 a 9. Las diferencias en el reconocimiento de proteínas cardíacas observadas en los distintos grupos de ratones indica que la inmunización con las distintas proteínas P induce distintos patrones de autorreactividad.

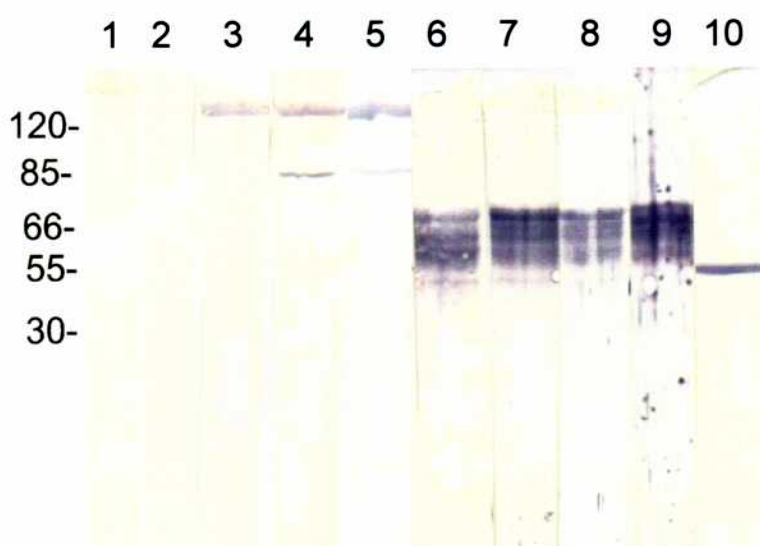


Figura 57. Reactividad contra proteínas cardíacas en el suero de ratones inmunizados con proteínas ribosomales P. Un extracto proteico de cardiocitos de ratón fue separado por SDS-PAGE y transferido a nitrocelulosa. Los filtros fueron revelados con suero proveniente de ratones inmunizados con MBP (calles 1 y 2), MBP-TcP2 β (calles 3-5) o MBP-TcP0 (calles 6-10). A la izquierda se observa los marcadores de peso molecular (en KDa).

3.9. EFECTO DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P SOBRE LA FUNCION CARDIACA DE RATONES INMUNIZADOS

Los posibles efectos de la respuesta inmune inducida por la inoculación de proteínas ribosomales sobre la función cardiaca, fueron evaluados mediante la realización de electrocardiogramas (ECG). En una primera serie de experimentos se realizaron ECG diez días después de la última inmunización siguiendo los protocolos descritos por Laguens (1980) y Ruiz (1985). Para la realización de estos ECG se utilizó éter etílico como anestésico. Los ECG realizados a 5 ratones no inoculados (Fig. 60, panel A), 7 ratones inmunizados con MBP (Fig. 58, panel B) y 7 ratones inmunizados con IFA (resultados no mostrados) fueron normales, ya que todos los parámetros analizados coincidieron con los valores de referencia para el ECG de ratón (Goldbarg, 1968; Sadigurksy, 1986; Andrade, 1987). Por el contrario, los ECG de 13 de los 20 ratones inmunizados con MBP-TcP2 β presentaron trazados distintos de los controles. El patrón de la alteración fue similar en los 13 ratones y consistió en un ensanchamiento del complejo QRS (Fig. 58, paneles C y D). Los ECG de estos ratones fueron considerados patológicos ya que la duración del complejo QRS fue en todos los casos mayor a 0.04 seg, resultado que difirió significativamente ($p < 0.01$, Test T de Student) de la duración media del QRS (0.02 seg.) observada en los ratones normales e inmunizados con MBP.

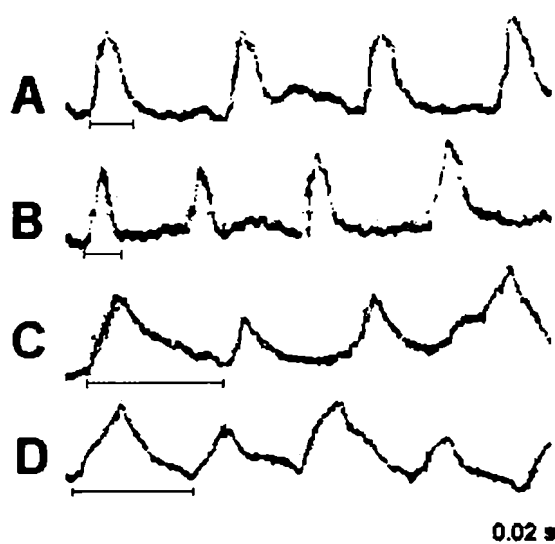


Figura 58. *Electrocardiograma de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β .* Electrocardiogramas realizados sobre ratones no inoculados (A), inmunizados con MBP (B) y MBP-TcP2 β (C y D). Las barras debajo de cada registro indican la longitud del complejo QRS.

A pesar que los resultados obtenidos en estos experimentos fueron promisorios, la calidad en los registros electrocardiográficos iniciales no fue óptima. Esto se debió probablemente al anestésico utilizado. La utilización de éter etílico no permite un nivel de anestesia regular y constante durante las determinaciones ya que es necesario colocar al ratón en una atmósfera de éter en forma intermitente para prolongar el tiempo de anestesia sin provocar su muerte. Las variaciones en el nivel de anestesia generan permanentemente cambios en la frecuencia cardíaca que pueden a su vez alterar el registro electrocardiográfico. Además, se observó que este tipo de anestesia provocaba movimientos musculares voluntarios e involuntarios en el ratón que generaban un ruido de fondo apreciable en el registro. Por este motivo, en la mayoría de los registros no se pudo observar la onda P ya que la amplitud de esta onda fue similar al ruido de fondo del registro. Por lo tanto, no pudo analizarse la amplitud y duración de la onda P, ni la duración del segmento P-R, ambos parámetros de importancia para el análisis de un ECG. Además se observó la existencia de variaciones entre los ECG de diferentes ratones normales.

A fin de mejorar la calidad del registro se realizaron nuevos experimentos en los cuales se utilizó pentobarbital como anestésico en lugar de éter etílico (Fig. 59 A). Además, se utilizó un electrocardiógrafo Fukuda Denshi FX-2111, que permitió realizar registros con corriente alterna, reduciendo el ruido de fondo del registro. La elección del pentobarbital se debió a que su uso no produce alteraciones en el ECG (Pilgrim, 1955). A diferencia del éter, esta droga se administra por vía intraperitoneal y la dosis depende de la masa corporal. Esta forma de administración permitió alcanzar niveles de anestesia homogéneos en los diferentes ratones. A pesar que el uso de pentobarbital como anestésico para ratones se encuentra muy difundido, no teníamos conocimiento de ningún estudio acerca de las variaciones de frecuencia cardíaca durante el período de anestesia. Por lo tanto, antes de sistematizar la realización del ECG se estudió la respuesta cardíaca a través de ECG desde el momento de la administración del pentobarbital hasta la recuperación de la anestesia. Con excepción de modificaciones en la frecuencia cardíaca (inherentes al fenómeno de anestesia) no se observaron alteraciones en el ECG de ratones normales. En la figura 59B se observa la modificación de la frecuencia cardíaca en función del tiempo durante el período de anestesia. Se observó una disminución máxima del 40% en la frecuencia cardíaca a los 40 minutos de administrado el anestésico, que coincide con el período más profundo de anestesia. A diferencia de

los ensayos realizados con éter, el ratón se duerme cinco minutos luego de administrado el anestésico y permanece dormido durante más de una hora. Para estandarizar la toma del ECG se determinó, que los mismos se efectuarían durante los primeros 10 minutos del período de anestesia. La elección de esta ventana temporal se debe a que en este período la frecuencia cardíaca es similar a la del ratón despierto y a que la pequeña disminución de la frecuencia cardíaca (menor al 5%) es prácticamente constante en todos los ratones. Con el fin de solucionar el problema generado por la variación del ECG observada entre los distintos ratones, se tomaron 3 ECG a lo largo del protocolo de inmunización. De esta forma los ECG tomados hacia el final del experimento (ECG2 y ECG3) pudieron ser comparados con el ECG inicial o normal (ECG1) del mismo ratón tomado antes de comenzar el ensayo. El segundo y tercer ECG se realizaron después de 2 y 4 inmunizaciones respectivamente.

A



B

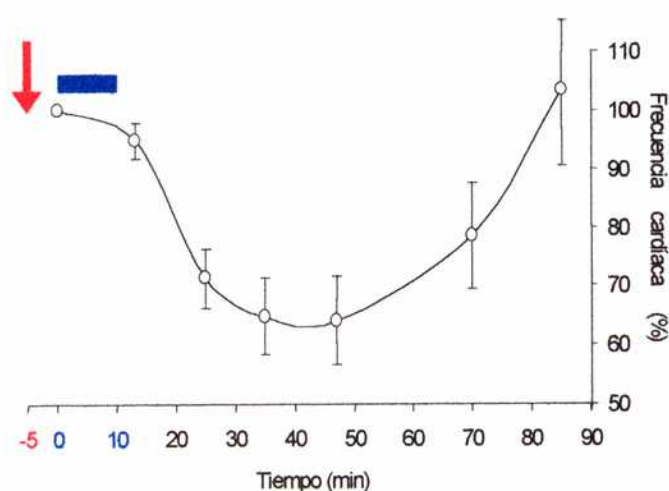


Figura 61. *Electrocardiograma de ratones normales utilizando pentobarbital como anestésico. (A) Toma del ECG. (B) Efecto del pentobarbital sobre la frecuencia cardíaca. Ratones Balb/c fueron anestesiados (flecha) y posteriormente monitoreados mediante la toma de electrocardiogramas durante el período de anestesia. A la derecha se observan los cambios en la frecuencia cardíaca expresados como porcentaje en relación a la frecuencia inicial. La barra azul indica la ventana temporal escogida para realizar los ECG en los experimentos posteriores.*

Al realizar el ECG de ratones inmunizados con MBP-TcP2 β empleando pentobarbital como anestésico no se observó, a diferencia de los registros tomados utilizando éter, un aumento en la duración del complejo QRS. Los restantes parámetros del ECG tampoco difirieron de los valores obtenidos en ratones normales (Tabla I). Los valores coincidieron con los valores informados previamente (Goldbarg, 1968; Sadigursky, 1986).

Tabla I. *Valores de los parámetros del ECG de ratones normales*

Parámetro	Valor
Duración del complejo QRS	0,02 seg
Amplitud del complejo QRS	0,04-0,08 mV
Duración del intervalo PR	0,03-0,04 seg
Duración de la onda P	0,02 seg
Amplitud de la onda P	0,05-0,1 mv

La única variación observada fue un aumento significativo del valor promedio de la frecuencia cardíaca en el ECG3 (472 latidos por minuto) con respecto al ECG1 (410 latidos por minuto) en los ratones inmunizados con MBP-TcP2 β ($p < 0,01$, Test T de Student) (Fig. 60 A-B). La frecuencia cardíaca de los ratones inmunizados con MBP presentó un aumento estadísticamente no significativo entre el ECG1 y el ECG3. El aumento en la frecuencia cardíaca fue similar al observado en ratones control a los cuales se les inyectó 5 ng del agonista β -adrenérgico isoproterenol (Fig 60 C-D).

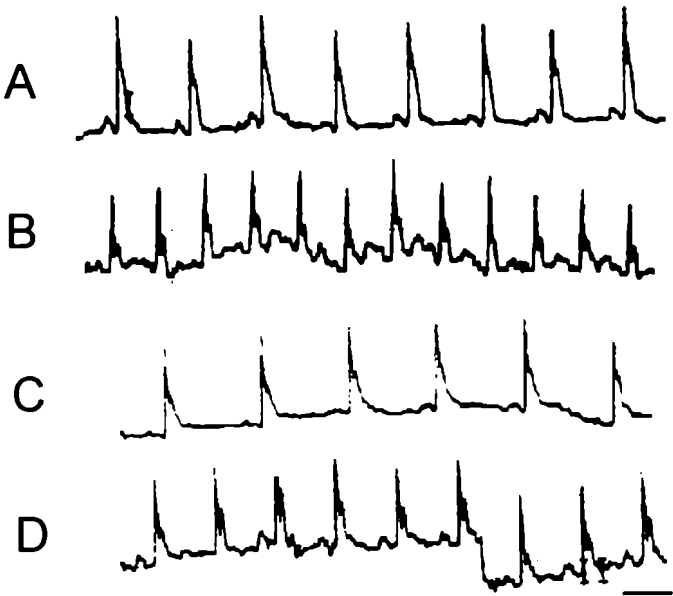


Figura 60. *Aumento de la frecuencia cardíaca en ratones inmunizados con MBP-TcP2 β . (A) ECG1. (B) ECG3. (C y D) Registros electrocardiográficos tomados antes y después (dos minutos) de inyectar isoproterenol por vía intraperitoneal a un ratón normal. La barra ubicada en el extremo inferior derecho indica 1 segundo.*

El seguimiento de la función cardíaca a través de ECG en ratones inmunizados con MBP-TcP0 reveló alteraciones electrocardiográficas en 7 de 12 ratones analizados. Se observaron tres alteraciones principales: alteraciones en la generación del impulso eléctrico (3 ratones), alteraciones en la repolarización (3 ratones) y alteraciones de la conducción del impulso (1 ratón) (Tabla II, Fig. 61 a 64).

Tabla II. *Descripción de las alteraciones electrocardiográficas observadas*

Alteración electrocardiográfica	Ratones afectados
Alteraciones en la generación del impulso (arritmias)	3 (25 %)
Onda P anómala	1
Disociación auriculo-ventricular	2
Capturas sinusales	1
Alteraciones en la repolarización	3 (25 %)
Onda T anómala	1
Infra/Supradesnivel intervalo S-T	2
Aumento del intervalo Q-T	2
Alteraciones de la conducción	1 (8 %)
Aumento del intervalo P-R	1
Infradesnivel Intervalo P-R	1
Total de ratones con alteraciones electrocardiográficas	7 (58 %)

Todos los ratones que presentaron alguna de las alteraciones electrocardiográficas descritas presentaron elevados títulos de anticuerpos contra TcP0 y P015. En la figura 61 se compara el ECG2 (A) y el ECG3 (B) de uno de los ratones que presentó arritmias hacia la novena semana del experimento (ECG3). En la figura 61 B (derivada I) se observa una variación permanente en la duración del segmento P-R (barras rojas) como consecuencia de una disociación del ritmo auricular y ventricular. En este caso la frecuencia auricular es mayor a la frecuencia ventricular, ya que el segmento P-R se acorta en forma paulatina hasta que la onda P se superpone con el complejo QRS. En este momento el segmento P-R alcanza su valor mínimo. Luego, la onda P emerge a la derecha del complejo QRS alcanzando el segmento P-R su valor máximo. Asimismo, se observan acortamientos del segmento R-R (flechas azules) debido a capturas sinusales. Este fenómeno puede observarse claramente en las derivadas I y aVL, y más aún en la derivada II donde se observan 3 capturas en un lapso de tan sólo 5 segundos.

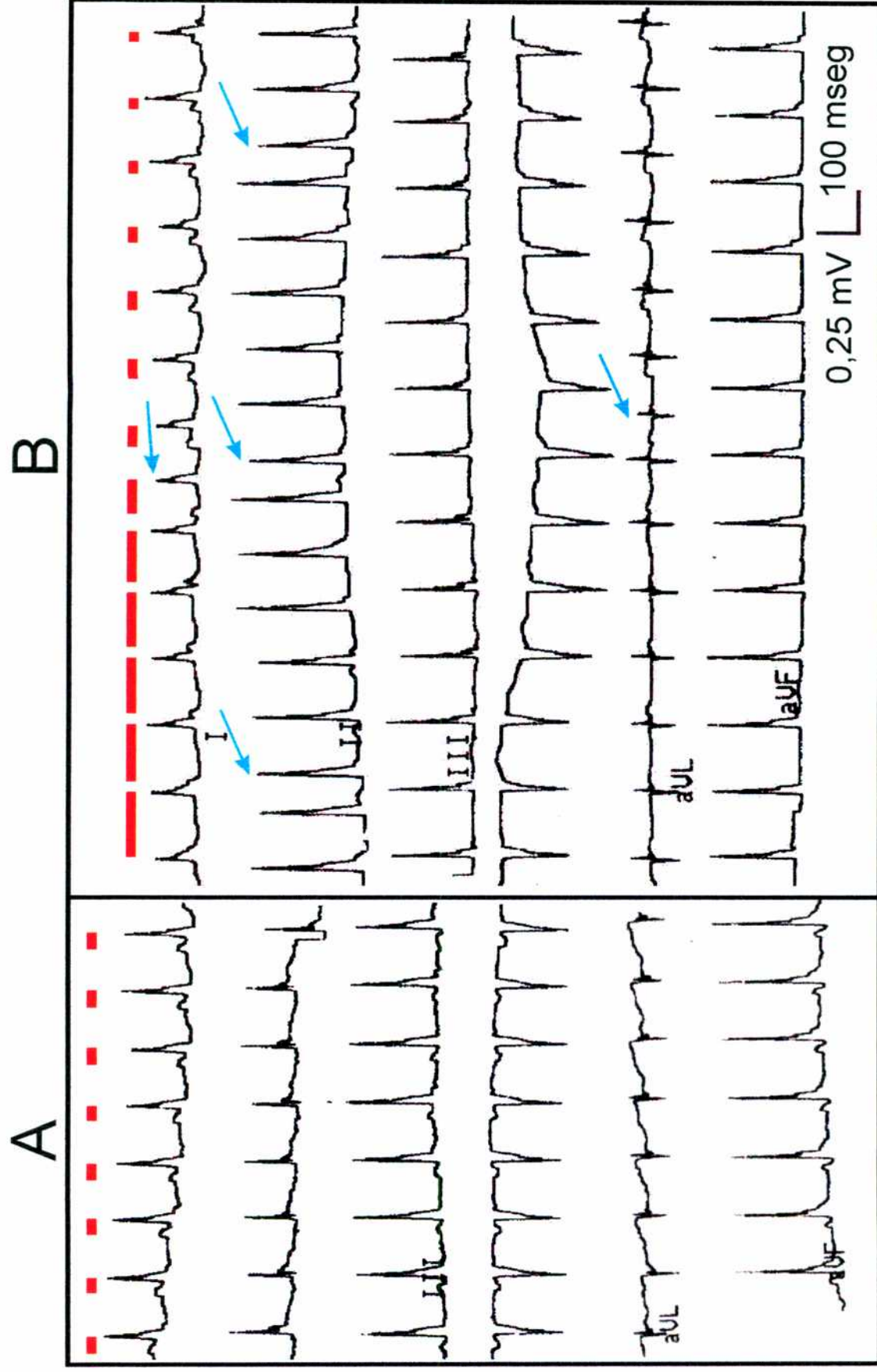


Figura 61. Generación de arritmias en un ratón inmunizado con MBP-TcPO. Se observan las 6 derivaciones del ECG2 (A) y el ECG3 (B) de un ratón inmunizado con MBP-TcPO. Las flechas azules indican las capturas sinusales. Las barras rojas indican el segmento P-R.

En la figura 62 puede observarse otro tipo de arritmia detectada en ratones inmunizados con TcP0. Esta alteración consiste en un cambio paulatino en la morfología de la onda P. Esta alteración probablemente se debe a cambios en la localización del foco del marcapasos cardíaco.

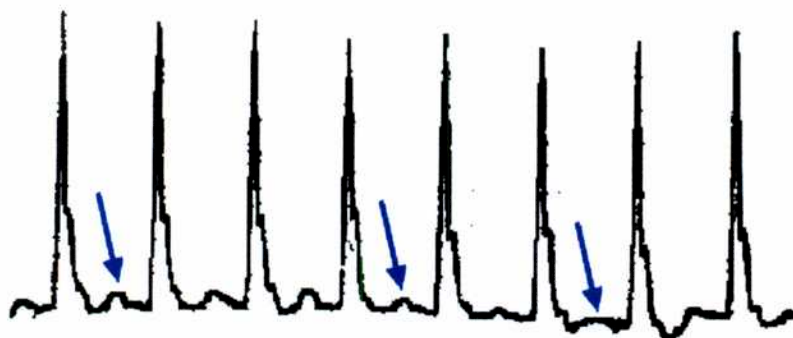


Figura 62. Arritmias observadas en ratones inmunizados con MBP-TcP0. Las flechas indican las diferentes morfologías de la onda P.

En la figura 63 B (derivada II) se observa el ECG de un ratón que sufrió alteraciones de la conducción intraventricular. Se observa en forma simultánea un aumento en la duración del segmento P-R acompañado de un infradesnivel del mismo. Como corresponde a este tipo de alteración, en la derivada opuesta (aVR) se observa el supradesnivel del segmento P-R (Fig. 63 B).

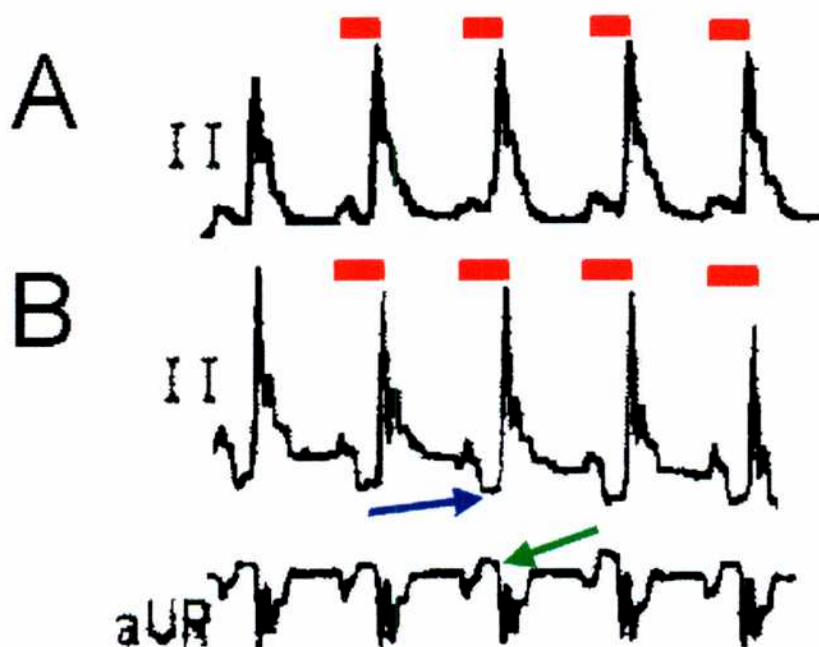


Figura 63. Alteración en la conducción intraventricular observada en ratones inmunizados con MBP-TcP0. (A) ECG2, (B) ECG3. Las barras rojas indican la duración del segmento P-R. Las flechas azules y verdes señalan el infradesnivel y el supradesnivel del segmento P-R respectivamente.

Otro tipo de alteración observada en los ratones inmunizados con MBP-TcP0 fue la presencia de alteraciones en la repolarización. Una de las manifestaciones de estas alteraciones fue la existencia de una onda T positiva de gran amplitud a la derecha del complejo QRS (Fig. 64 A). Esta alteración fue notable ya que en los ECG de ratones la onda T aparece siempre incluida dentro del QRS. Otra manifestación de estas alteraciones en la repolarización fueron las anomalías en el segmento Q-T. En la figura 64 B-C se observa un aumento en la duración del segmento S-T acompañado de un infradesnivel (B) o un supradesnivel (C) del mismo.

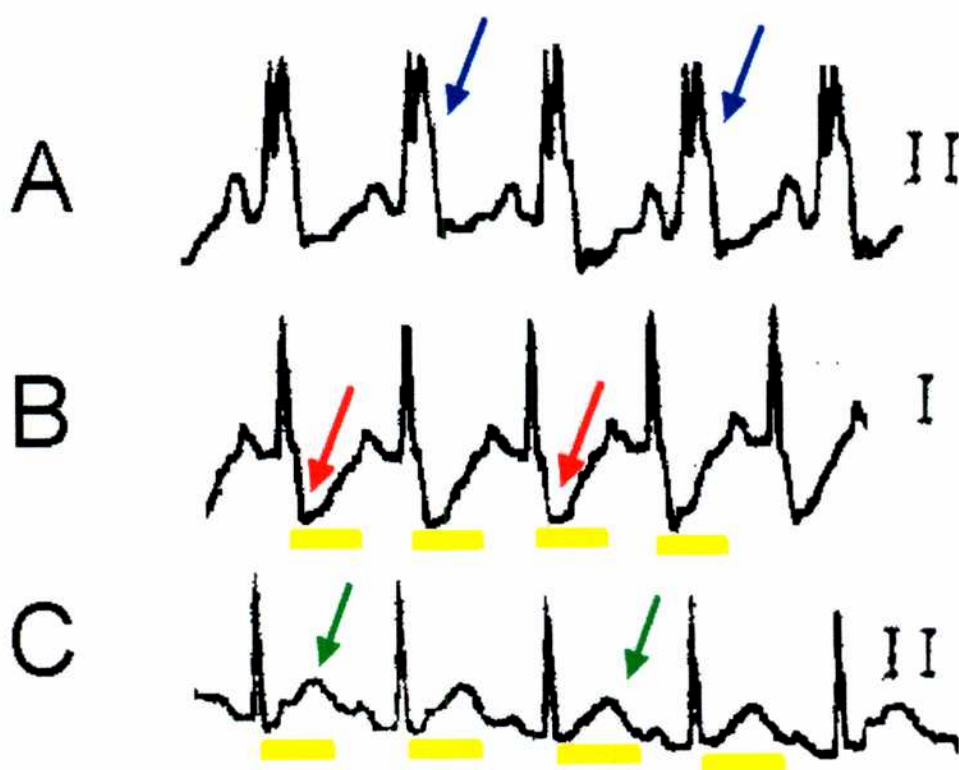


Figura 64. Alteraciones en la repolarización observadas en ratones inmunizados con MBP-TcP0. **(A)** Las flechas azules indican la presencia de ondas T de gran amplitud. **(B-C)** La barra amarilla señala la duración del segmento Q-T. Las flechas rojas indican el infradesnivel (B) y las flechas verdes el supradesnivel (C) del segmento Q-T.

De acuerdo a la hipótesis de nuestro trabajo buscamos signos de patología cardíaca en los ratones inmunizados. El análisis histopatológico demostró la ausencia de fibrosis e infiltrados inflamatorios en los corazones de los ratones inmunizados con MBP-TcP2 β o con MBP-TcP0. Sin embargo se observó un ensanchamiento del espacio perinuclear y la presencia de un gran número de estructuras redondeadas de diferente tamaño en cardiocitos de ratones inmunizados con MBP-TcP0 (Fig. 65). Estas estructuras no tienen apariencia de lipofuxina y corresponderían a mitocondrias. En ese caso su número y tamaño sería anormal.

Figura 65. *Alteraciones en la estructura celular de cardiocitos en ratones inmunizados con MBP-TcP0.*

4. Discusión

Una de las características más llamativas de la miocardiopatía chagásica crónica es la falta de correlación entre el número de parásitos detectados en los tejidos lesionados y la severidad de los síntomas clínicos. Esta observación, junto con la existencia de un largo período de latencia que precede al daño tisular, llevaron a postular la hipótesis de un mecanismo autoinmune como una posible explicación de la patogénesis de la enfermedad (Kierszembbaum, 1986, 1999). De acuerdo a esta hipótesis, la infección por *T. cruzi* induciría la producción de linfocitos y anticuerpos autorreactivos con capacidad de generar las lesiones cardíacas observadas en la Enfermedad de Chagas. Así, no sería necesaria la presencia de parásito vivo en las lesiones, ya que las proteínas parasitarias podrían ser capaces de estimular al sistema inmune.

Trabajos realizados algunas décadas atrás demostraron la generación de lesiones cardíacas por inmunización de animales con parásito muerto o con distintas fracciones proteicas de *T. cruzi*. Posteriormente, estos estudios se dirigieron a determinar cuáles de estas fracciones poseían la capacidad de inducir lesiones (Texeira, 1974; Ruiz, 1985). Texeira demostró que varias de estas fracciones subcelulares eran capaces de inducir pequeños focos de miocarditis al ser inoculados en conejos. Más específicamente la fracción denominada F6 indujo regiones de miocarditis con infiltrados linfocitarios y lisis de fibras cardíacas. Ruiz *et al.* (1985) inmunizaron ratones con una fracción similar a la F6, denominada Mc y demostraron la inducción de una severa miocarditis con signos típicos de una reacción autoinmune órgano específica. Las fracciones F6 y Mc consistían básicamente de acúmulos de ribosomas y polirribosomas. Sin embargo, a pesar de ser altamente homogéneas y de contener sólo el 3% de las proteínas totales del parásito, las fracciones F6 y Mc poseían más de 80 proteínas distintas (Texeira, 1974). Esta característica constituyó el principal inconveniente de estos modelos experimentales y de otros similares en los cuales los inmunógenos utilizados consistieron de fracciones o mezclas proteicas cuya composición no se halla perfectamente definida (Lopetegui, 1983 y 1983a; Ruiz, 1985). Por lo tanto, estos modelos no permitieron determinar exactamente qué proteínas de *T. cruzi* estarían involucradas en la patogénesis de la Enfermedad de Chagas.

Varios años más tarde, el rastreo de una biblioteca de ADNc de *T. cruzi* empleando el suero del paciente JL (fallecido a causa de Miocardiopatía Chagásica Crónica) permitió aislar, entre otros, los clones recombinantes JL5 y JL52. Estos clones codifican para las proteínas ribosomales P2 β y P0 de *T. cruzi* respectivamente (Levy Yeyati, 1992, Schijman, 1992). Luego se determinó la existencia de una asociación entre la presencia de elevados niveles de anticuerpos contra el extremo C-terminal de P2 β (péptido R13) y las formas más severas de cardiomiopatía chagásica (Schejtman, 1990). Posteriormente, se comprobó la existencia de reacción cruzada entre las proteínas ribosomales P y el segundo rulo extracelular del receptor β -adrenérgico, observándose además que los anticuerpos anti-proteínas P poseían un efecto funcional sobre cardiocitos de rata neonata en cultivo (Kaplan, 1997). Asimismo, se determinó que los anticuerpos de pacientes chagásicos dirigidos contra las proteínas P de *T. cruzi* son capaces de inducir una respuesta autoinmune funcional contra receptores cardiovasculares humanos a través de un mecanismo de mimetismo molecular (Kaplan, 1997). Estos resultados aportaron evidencias que permitieron postular la existencia de un rol de las proteínas ribosomales P en la patogénesis de la enfermedad.

Dado el número de evidencias que señalan la importancia de las proteínas ribosomales P en la Enfermedad de Chagas (Levin, 1993, Kaplan 1997), resulta llamativo que estas proteínas no posean ninguna relevancia inmunológica en otras enfermedades infecciosas tanto parasitarias (Leishmaniasis, Malaria, Schistosomiasis, etc) como no parasitarias. Sin menoscabar la importancia de los diferentes ciclos de vida y formas de infección de cada patógeno, muy probablemente la gran relevancia de la respuesta inmune contra las proteínas ribosomales P en la Enfermedad de Chagas se deba a las secuencias de aminoácidos particulares que presentan estas proteínas en *T. cruzi* y a la forma en que se presentan. Los estudios genéticos e inmunológicos llevados a cabo en los últimos diez años han demostrado que la familia de proteínas P de *T. cruzi* posee propiedades únicas. En primer lugar, *T. cruzi* es la única especie en la cual se han observado mas de diez proteínas P diferentes de las cuales hasta el momento se han caracterizado cuatro tipos (P1, P2 α , P2 β y P0). La proteína P0 de *T. cruzi* es la única dentro de los eucariotas que posee un

extremo C-terminal diferente de la secuencia consenso C-terminal presente en todas las proteínas ribosomales P. Otra característica muy importante es la falta de la serina ubicada a 11 aminoácidos del extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P1 y P2 de *T. cruzi*. Este aminoácido ha sido reemplazado en el parásito por un residuo glutámico, generando una secuencia más hidrofílica (EEEDDD), que es fundamental para la antigenicidad del epítipo R13 en la enfermedad de Chagas (Levin, 1993). Coincidentemente, este epítipo presenta un 90% de homología con el péptido H11, un autoepítipo clásico de Lupus Eritematoso Sistémico. Esta secuencia hidrofílica es la que presenta además homología con una región de gran carga negativa en el segundo rulo extracelular de los receptores cardíacos (Ferrari, 1995).

Estos antecedentes nos impulsaron a investigar el rol de los anticuerpos anti-proteínas P en la patogénesis de la miocardiopatía chagásica en un modelo experimental en ratones. El modelo desarrollado en este trabajo se caracterizó por la ausencia de *T. cruzi* ya que los anticuerpos anti-P fueron inducidos por inmunización con proteínas P recombinantes. A diferencia de los modelos experimentales utilizados por Texeira (1974) y Ruiz (1985), en los cuales los inmunógenos fueron fracciones o mezclas proteicas de composición desconocida, el desarrollo de las técnicas de clonado molecular permitió la inmunización de ratones con una única proteína de *T. cruzi* purificada y completamente caracterizada. En caso que los anticuerpos anti-proteínas P fueran capaces de producir algún tipo de alteración en el funcionamiento cardíaco, debería ser posible observarla en ratones forzados a producir anticuerpos anti-P en forma abundante y continua.

Consecuentemente, la etapa inicial de este trabajo involucró el subclonado de las proteínas ribosomales P2 β y P0 de *T. cruzi* (TcP2 β y TcP0). Para ello fue necesario subclonar las proteínas en vectores de expresión (Fig. 4 y 10), ya que el sistema de expresión de λ gt11 disponible al inicio de este trabajo sólo permitía obtener fracciones enriquecidas (y no purificadas) de la proteína recombinante (Fig 1). Además, estas fracciones enriquecidas en las proteínas β gal recombinantes contenían concentraciones de urea 8 M, lo cual impedía su inoculación en ratones. Para expresar las proteínas P se escogieron los vectores

pGex y pMal. En estas condiciones las bacterias recombinantes producen las proteínas citadas acopladas a MBP y a GST, respectivamente. Estos sistemas de expresión permitieron la obtención de las proteínas recombinantes con alto grado de pureza (Fig. 7 y 8). Las ventajas de este sistema de expresión resultan evidentes al comparar el grado de pureza de la proteína MBP-S23 (Fig. 8) con respecto al obtenido al purificar la proteína β gal-JL5 (Fig. 1B). La pureza de las proteínas MBP y GST recombinantes permitió utilizarlas para inmunizar ratones y como reactivos en ensayos inmunológicos.

Antes de proceder a un estudio sistemático de la respuesta inducida por la inmunización se realizaron varios ensayos que permitieron fijar distintos parámetros del modelo animal de inmunización (Fig. 16-19). Así, se determinó el protocolo de inmunización adecuado y la forma de estudiar *in vitro* la respuesta inmune generada en los ratones inmunizados.

Al estudiar los sueros de los ratones inmunizados con la proteína MBP-TcP2 β se determinó la inducción de una fuerte respuesta inmune humoral ya que a las 10 semanas del comienzo de las inmunizaciones todos los ratones presentaron altos títulos de anticuerpos contra GST-TcP2 β (Fig. 20 y 23).

Luego se estudió la localización de los epítopes reconocidos por los anticuerpos anti-P inducidos por la inmunización con MBP-TcP2 β mediante el análisis de la reactividad contra 10 péptidos derivados de la secuencia de TcP2 β . La secuencia de éstos péptidos se superpone parcialmente de forma tal de cubrir en su conjunto la totalidad de la proteína TcP2 β . Estos ensayos permitieron determinar que el péptido 10, correspondiente al extremo C-terminal de la proteína es el único reconocido por los anticuerpos (Fig. 22). Este perfil de respuesta fue similar al observado en ratones infectados con *T. cruzi* y en pacientes chagásicos (Fig. 46). Este resultado presenta mayor relevancia aún, ya que recientemente se determinó que la inmunización intramuscular de ratones con ADNp conteniendo la secuencia de TcP2 β no induce anticuerpos contra el péptido 10 y sí contra los péptidos 1, 4, 7 y 8 (resultados no mostrados). Estos resultados indicarían que la inmunización con

la proteína recombinante reproduce con mayor exactitud la respuesta contra las proteínas P que ocurre durante la infección.

Al estudiar la reactividad de los sueros contra el extremo C-terminal se determinó que los anticuerpos estaban dirigidos contra el péptido R13 (Fig. 25). Sin embargo, a pesar de que la totalidad de los ratones desarrollaron anticuerpos contra TcP2 β sólo un porcentaje inferior al 50% presentó anticuerpos contra R13. Esta diferencia coincidió con el hecho de que los títulos de la respuesta anti-R13 fueron notablemente inferiores a los de la respuesta anti-TcP2 β (Fig. 23). Esta diferencia de reactividad entre R13 y TcP2 β sumado a los resultados del mapeo epitópico de TcP2 β indicarían la presencia de anticuerpos en el suero de los ratones inmunizados contra epítopes conformacionales ubicados a lo largo de TcP2 β .

Llamativamente, el porcentaje de respuesta contra R13 varió entre las dos cepas de ratones analizadas. Mientras que el 59% de los ratones BALB/c inmunizados reaccionó contra R13, sólo en el 27% de los ratones Swiss se observó dicha reacción. Estos resultados indicarían la existencia de ciertas restricciones de tipo genético vinculadas al desarrollo de una respuesta inmune contra el epítipo R13. Estos resultados refuerzan la noción que si bien la inmunización con TcP2 β produce una respuesta humoral rápida y elevada contra TcP2 β no ocurre lo mismo con la respuesta contra el epítipo C-terminal R13, quizás debido a su gran homología con la secuencia de la región C-terminal de la proteína ribosomal P autóloga.

La especificidad de la reacción contra la región C-terminal de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* inducida por la inmunización con proteínas recombinantes resultó semejante a la observada en el suero de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica y en ratones infectados (Fig. 47). Este perfil de reactividad se caracteriza por una alta reactividad contra R13 (EEEDDDMGFGLFD) y R11 y por la inexistencia de reactividad contra R10 y R7. Esto refuerza la idea de que la región ácida de R13 es el principal blanco de la respuesta primaria contra las proteínas ribosomales P en la enfermedad de Chagas. La respuesta contra el péptido derivado de la

región C-terminal de las proteínas ribosomales P mamíferas (H13: EESDDDMGFGFLFD), determinada tanto por ELISA directo como por ELISA de inhibición, fue siempre inferior a la observada contra R13 (Fig. 25). Los resultados de inhibición demostraron que el componente anti H13 es responsable sólo del 20% de la reactividad anti-R13 (Fig. 26). Los experimentos realizados ponen de manifiesto la gran especificidad de la respuesta contra el extremo C-terminal de la proteínas ribosomales P del parásito, que difiere en sólo un aminoácido de la secuencia de las proteínas ribosomales P mamíferas. Los estudios de reemplazo de alanina no sólo confirmaron los resultados del mapeo epitópico por ELISA sino que determinaron que la secuencia reconocida por los anticuerpos anti-R13 es la secuencia EXDDXGF (Fig. 48). El hecho que el suero de pacientes chagásicos reconozca la misma secuencia EXDDXGF confirma la gran similitud entre el anticuerpo humano y el inducido por inmunización en ratones. Estos resultados confirman las predicciones realizadas sobre la vital importancia de la sustitución de glutámico por serina en la antigenicidad del péptido R13.

Otra característica de la respuesta inducida por la inmunización con TcP2 β es la reactividad cruzada entre R13 y P015 (Fig. 25 y 26). En este aspecto, no resulta sencillo establecer un paralelismo con el suero de pacientes con Enfermedad de Chagas. Esto se debe a que los anticuerpos anti-P015 presentes en el suero de los pacientes chagásicos son inducidos por la proteína TcP0. Sin embargo, se ha observado que los anticuerpos anti-R13 inmunopurificados a partir de sueros chagásicos poseen en algunos casos reactividad cruzada contra P015 (Levitus, 1991). Estos resultados indican la existencia de cierto grado de reactividad cruzada entre TcP2 β y TcP0 a nivel de su extremo C-terminal.

En función de estudios previos realizados con sueros de pacientes con Enfermedad de Chagas y dada la gran similitud entre éstos y los sueros de los ratones inmunizados con TcP2 β se estudió en éstos últimos la reactividad contra receptores cardíacos. Los resultados obtenidos mediante ensayos de ELISA y ensayos de actividad funcional indicarían que los sueros de los ratones inmunizados con TcP2 β no poseen anticuerpos contra los receptores adrenérgicos β 1 y β 2 y muscarínico M2. Sin embargo, se

observó un aumento de la frecuencia cardíaca en los ratones inmunizados con TcP2 β (Fig. 60 A-B). Llamativamente, este fenómeno taquicárdico pudo ser reproducido al inyectar los ratones con el agonista adrenérgico isoproterenol (Fig. 60 C-D). Este resultado sugeriría que los anticuerpos inducidos por la inmunización con TcP2 β podrían poseer cierto grado de reactividad con el receptor β -adrenérgico o contra otro receptor capaz de generar este tipo de respuesta biológica.

Otro indicio que también sugiere la posibilidad de que esta reacción cruzada efectivamente exista es la homóloga distribución de los aminoácidos en la secuencia **AESDE** del receptor β -adrenérgico o **EGDEV** del receptor muscarínico M2 con la secuencia **EXDDXGF** (secuencia de reconocimiento del péptido R13). Otro resultado que apoya la hipótesis en favor de la reactividad cruzada entre los receptores cardiovasculares y R13 proviene de los estudios llevados a cabo con sueros de pacientes con enfermedad de Chagas en el modelo de corazón aislado de conejo. Estos estudios demostraron que la preincubación de los sueros chagásicos con TcP2 β o R13 inhibió completamente el bloqueo aurículo-ventricular generado por activación de receptores muscarínicos (Fig. 53).

Los resultados obtenidos en ensayos fisiológicos, se contraponen con los resultados obtenidos por ELISA. Al respecto, cabe destacar que los resultados negativos de ELISA no deben ser tomados como concluyentes, debido a la baja sensibilidad de la medición de reactividad contra los receptores por este método. A modo de ejemplo, se puede mencionar que los sueros de los ratones inmunizados con TcP0 con actividad funcional reaccionaron con estos péptidos pero la densidad óptica obtenida fue baja (Fig. 55). Esto marca la necesidad de ahondar en el estudio de la reacción anti-receptores. En ese sentido, la utilización del AM 17.2 obtenido en colaboración con la Dra. Joskowicz (Instituto Pasteur) podría ser de gran utilidad.

Al estudiar la reactividad del AM 17.2 contra la proteína TcP2 β se determinó que representa exactamente la reactividad contra el extremo C-

terminal de las proteínas P observada en los animales inmunizados con MBP-TcP2 β (Fig. 39 y 40). Dada la similitud entre el perfil de reactividad del AM y los anticuerpos anti-P de pacientes chagásicos, el clonado de las regiones variables de este AM (Fig. 41) permitirá profundizar otros aspectos de la interacción de este anticuerpo con su epítipo. Al respecto la identificación de los aminoácidos de R13 involucrados en la unión al anticuerpo (Fig. 48) y la obtención de la secuencia de aminoácidos de los CDR del AM (Fig. 43) permitirán establecer un modelo para determinar las bases moleculares de esta interacción.

La inmunización con la proteína MBP-TcP0 indujo elevados niveles de anticuerpos contra GST-TcP0 (Fig. 20 y 28). En este sentido, los resultados de esta inmunización fueron similares a los obtenidos en la inmunización con TcP2 β . El mapeo epitópico de esta respuesta determinó que los anticuerpos se dirigen contra el extremo C-terminal de TcP0, específicamente contra el péptido P015 (Fig. 30 y 31). A diferencia del modelo de inmunización con MBP-TcP2 β , en este caso no se observaron diferencias en la respuesta contra la proteína entera (TcP0) y el epítipo C-terminal P015. A pesar que los títulos contra TcP0 fueron más elevados que contra P015 (Fig. 28), la prevalencia de la respuesta anti-P015 fue elevada y similar en las dos cepas de ratones analizadas. Este resultado demuestra la existencia de grandes diferencias en los mecanismos genéticos involucrados en el control de las respuestas anti-P y sobre todo en la forma en que son procesados, presentados y reconocidos ambos péptidos. Mientras que entre la región C-terminal de TcP2 β y las proteínas P autólogas existe gran homología, la región C-terminal de TcP0 es completamente diferente de las proteínas P mamíferas. Así, luego de la inmunización con TcP0 el sistema inmune reconoce en el péptido P015 una secuencia totalmente ajena y reacciona contra él como contra cualquier antígeno no propio.

El uso de péptidos sintéticos permitió un detallado análisis de la reactividad contra la región C terminal de TcP0. En todos los casos la respuesta se dirigió contra P015 y en menor medida contra P013. La falta de reactividad contra los

(Fig. 54). En este estudio se demostró que el bloqueo AV generado en corazón de conejo por anticuerpos presentes en el suero de pacientes chagásicos con reactividad anti-muscarínica es inhibido por TcP0 y P015 (Fig. 54).

De acuerdo a la hipótesis del trabajo buscamos signos de patología cardíaca en los ratones inmunizados. El análisis histopatológico demostró la ausencia de fibrosis e infiltrados inflamatorios en los corazones de los ratones inmunizados con MBP-TcP0. Sin embargo, se observaron alteraciones a nivel de su estructura celular, posiblemente a nivel de las mitocondrias.

El seguimiento de la actividad cardíaca de los ratones inmunizados con MBP-TcP0, se realizó mediante tres electrocardiogramas a lo largo del esquema de inmunización. Al comparar el ECG3 (tomado al final del protocolo de inmunización) con el ECG inicial de cada ratón y con los registros de ratones normales se observó que 7 de 12 (58%) ratones analizados presentaron alteraciones electrocardiográficas. Estas alteraciones eléctricas consistieron de trastornos en la generación del impulso nervioso (arritmias) y alteraciones en la conducción intraventricular y en la repolarización (Fig. 61-64 y Tabla II). A pesar que no es sencillo comparar los ECG de ratones inmunizados con los de pacientes chagásicos con cardiopatía, las alteraciones detectadas son similares a algunas de las que caracterizan a la Miocardiopatía Chagásica Crónica (Rosembaum, 1964). En los ratones infectados crónicamente con *T. cruzi* las alteraciones electrocardiográficas más frecuentes son los bloqueos AV y otras alteraciones de la conducción (Postan, 1987; Andrade, 1987). También se ha observado en ratones infectados la generación de arritmias y cambios en la repolarización (Postan, 1987; Andrade, 1987).

Es importante destacar que todos los ratones que presentaron alteraciones electrocardiográficas presentaron elevados títulos de anticuerpos contra TcP0 y P015. Sin embargo, algunos ratones con alto título de anticuerpos contra dichos antígenos no presentaron ningún tipo de alteración del ECG. Esto fue semejante a lo que ocurre en los modelos murinos de infección crónica por *T. cruzi*. En estos modelos, a pesar que el establecimiento de la infección fue acabadamente demostrado y que los ratones presentaron elevados títulos de anticuerpos contra *T.*

péptidos P0b, P07, P08 y P014i confirmó que la reactividad contra esta región de la proteína está dirigida fundamentalmente contra el conjunto de los 13-15 aminoácidos C-terminales (péptidos P013 y P015) (Fig. 30 y 31). La inmunización con la proteína MBP-TcP0 reprodujo el perfil de respuesta contra TcP0 observado en sueros de pacientes chagásicos y en ratones infectados con *T. cruzi* (Fig. 49). El hecho que el anticuerpo reconoce simultáneamente aminoácidos ubicados tanto en las regiones N y C terminal de P015 y no fragmentos de éste por separado (péptidos P07 y P08) indicaría que P015 es un epítope de tipo conformacional ya que su tamaño excede el tamaño promedio de los epítopes B.

Otro resultado interesante que surgió del análisis de los sueros de ratones inmunizados con TcP0 fue la reacción positiva de estos sueros contra H13 (Fig. 30 y 31). Dado que el péptido H13 posee homología con R13 resultó llamativa la ausencia de reacción contra R13 en estos sueros. Una posible explicación sería que el sitio de reconocimiento de estos anticuerpos con reactividad cruzada con H13 involucre la serina ubicada a 16 aminoácidos del extremo C-terminal de P015. De esta forma la reacción cruzada podría deberse al reconocimiento de la región ESDDD de H13. De todas formas la falta de reactividad contra R13 debe ser confirmada con métodos más sensibles.

Otro de los aspectos estudiados en los ratones inmunizados con MBP-TcP0 fue la respuesta celular contra TcP0. En este sentido, es notable que el péptido P015 además de constituir el epítope B fundamental de la respuesta contra TcP0 también contiene un epítope T. En este caso si se observó mimetismo entre P015 y R13, ya que las células también proliferaron frente a R13.

Se determinó además que los anticuerpos inducidos por la inmunización con MBP-TcP0 reaccionaron contra péptidos correspondientes al segundo rulo de los receptores adrenérgicos $\beta 1$ y $\beta 2$ y muscarínico M2 (Fig. 55). Mas aún, algunos de estos sueros produjeron efectos cronotrópicos positivos sobre cultivos primarios de cardiocitos de rata neonata demostrando así su actividad funcional (Fig. 56). Estos resultados coinciden con la actividad funcional que poseen los anticuerpos anti-proteínas P provenientes de pacientes chagásicos (Ferrari, 1995) y con los resultados obtenidos en el estudio realizado sobre corazones aislados de conejo

cruzi, sólo un 60% de los ratones presentaron alteraciones electrocardiográficas (Andrade, 1987). Algo similar ocurre en la Enfermedad de Chagas, donde un cierto porcentaje de pacientes infectados nunca presenta señales de compromiso cardíaco. De todas maneras, al comparar las alteraciones generadas por la inmunización con los modelos de infección crónica en ratones y humanos no debe olvidarse que el modelo descrito en este trabajo consiste en la inmunización con una proteína pura de *T. cruzi* y que durante la infección por *T. cruzi* las alteraciones del ECG se presentan conjuntamente con inflamación y fibrosis del tejido cardíaco.

En los electrocardiogramas realizados a tiempos más cortos desde el inicio del protocolo de inmunización (ECG2) no se observaron alteraciones, a pesar de la presencia de elevados títulos de anticuerpos anti-TcP0. Este resultado podría indicar que las alteraciones del ECG serían producidas por un efecto crónico de las inmunoglobulinas sobre los cardiocitos. Al respecto, es importante destacar que los protocolos de inmunización utilizados son de corta duración (aproximadamente el 30% del tiempo de vida de los ratones) y que quizás esquemas de inmunización más largos como los realizados por Matsui *et al.* (1997) en conejos, podrían producir resultados patológicos más marcados.

A raíz de las alteraciones observadas en los ECG de los ratones inmunizados con TcP0, fue necesario indagar en los mecanismos por los cuales los anticuerpos contra esta proteína producen las alteraciones descriptas y caracterizar los blancos de esta reacción autoinmune. Los ensayos de Western blot demostraron que los sueros de los ratones inmunizados con MBP-TcP0 reaccionan fuertemente contra un grupo de proteínas cardíacas que poseen un peso molecular entre 52 y 68 Kda (Fig. 57). Llamativamente, estos pesos moleculares son similares a los del receptor adrenérgico $\beta 1$ (65 Kda) y el receptor muscarínico M2 (52 Kda). De ser así, estos resultados coincidirían con los ensayos de ELISA, los ensayos de actividad funcional y los ensayos llevados a cabo en corazón aislado de conejo (Fig. 56 y 54) que señalan la existencia de reactividad cruzada entre TcP0 y receptores cardíacos.

La existencia de anticuerpos contra receptores cardiovasculares en sueros de pacientes chagásicos se conoce desde hace varios años (Borda, 1984 y 1996, Goin, 1994 y 1997). Posteriormente, la presencia de estos anticuerpos se asoció a

la respuesta contra las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* (Ferrari, 1995; Elies, 1996) Los resultados presentados en este trabajo confirman dicha reactividad cruzada e indican que los anticuerpos anti-P poseen la capacidad de producir alteraciones eléctricas en células cardíacas. En ese sentido, este es el primer modelo animal en el cual mediante inmunización con proteínas pertenecientes a un agente infeccioso se reproducen aspectos fisiopatológicos de la infección crónica.

Llamativamente las alteraciones electrocardiográficas detectadas en los ratones inmunizados con TcP2 β y TcP0 son diferentes. Esto indica que los mecanismos involucrados en las modificaciones de la fisiología cardíaca causados por ambas proteínas son distintos y aparentemente exclusivos de cada inmunización. En 1985 Ruiz *et al.* propusieron que los mecanismos involucrados en la generación de la miocarditis y las alteraciones electrocardiográficas son diferentes, ya que estas patologías pueden ser producidas por distintas fracciones subcelulares cuando se inoculan en ratones. Esta hipótesis puede ampliarse, para proponer que en la infección natural y experimental las alteraciones observadas en la electrofisiología cardiovascular son consecuencia del accionar de varias poblaciones de anticuerpos que reconocen distintas estructuras de superficie, con distintos efectos sobre el corazón. De esa forma, las complejas alteraciones detectables en el ECG de los pacientes podrían considerarse la sumatoria de los efectos producidos por cada una de estas poblaciones de anticuerpos reaccionando en forma cruzada con la superficie de las células cardíacas.

Los resultados obtenidos indican que, al menos en el modelo estudiado, la importancia de los anticuerpos anti-TcP0 en la generación de alteraciones electrocardiográficas es mayor que la de los anticuerpos anti-TcP2 β . Por este motivo, actualmente se está trabajando en la obtención de un anticuerpo monoclonal contra P015 en colaboración con el laboratorio del Dr. Baldi (IBYME). La obtención de alteraciones en el ECG generadas a través de la transferencia pasiva del AM contra P015 permitirá demostrar en forma inequívoca el rol de los anticuerpos anti-proteínas P en la miocardiopatía chagásica.

Más aún, la obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales así como la cristalización del complejo AM-péptido permitirán comprender las bases moleculares de la interacción entre los anticuerpos y sus epítopes. El conocimiento de esta interacción permitirá diseñar péptidos de alta afinidad destinados a neutralizar el efecto perjudicial de los anticuerpos autorreactivos, evitando o retrasando la producción de alteraciones cardíacas. El uso de péptidos neutralizantes podría constituir en el futuro una nueva terapia para los pacientes con miocarditis chagásica crónica.

5. Conclusiones

1. Las proteínas ribosomales P2 β y P0 de *T. cruzi* (TcP2 β y TcP0) así como las proteínas ribosomales P1 y P0 de ratón (MmP1 y MmP0) fueron clonadas en vectores de expresión y purificadas para su utilización en la inmunización de ratones y en diferentes tipos de ensayos inmunológicos.
2. Los anticuerpos inducidos por la inmunización con la proteína recombinante TcP2 β estuvieron principalmente dirigidos contra su extremo C-terminal, específicamente contra los últimos 13 aminoácidos (péptido R13).
3. Los anticuerpos inducidos por la inmunización con la proteína recombinante TcP2 β presentaron reactividad cruzada contra los péptidos P015 y H13 correspondientes al extremo C-terminal de las proteínas P0 de *T. cruzi* y de ratón respectivamente.
4. Los anticuerpos inducidos por la inmunización con la proteína recombinante TcP0 estuvieron principalmente dirigidos contra su extremo C-terminal, específicamente contra los últimos 15 aminoácidos (péptido P015).
5. Los anticuerpos inducidos por la inmunización con la proteína recombinante TcP0 presentaron reactividad cruzada contra el péptido H13 correspondiente al extremo C-terminal de la proteína P0 de ratón.
6. El desarrollo de una respuesta autoinmune por inmunización de ratones con la proteína MmP0 (proteína ribosomal P autóloga) estuvo determinado por la constitución genética de la cepa de ratón utilizada. La inmunización de ratones de la cepa Swiss indujo anticuerpos contra la proteína P autóloga con características similares a los observadas en Lupus Eritematoso Sistémico.
7. El AM 17.2 obtenido en colaboración con el Instituto Pasteur reproduce el perfil de reactividad contra el extremo C-terminal de TcP2 β observado en los sueros de ratones inmunizados con la proteína recombinante.
8. Las regiones variables del AM 17.2 fueron clonadas en vectores procariotas bajo la forma de scFv. Esto permitió conocer las secuencias de los CDR del AM. El scFv derivado del AM 17.2 fue expresado en bacterias y se demostró su capacidad de reaccionar contra el péptido R13.

9. Los anticuerpos inducidos por la inmunización con proteínas recombinantes presentaron un perfil de reactividad contra el extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* semejante al observado en el suero de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica y en el suero de ratones crónicamente infectados.
10. Se determinó que la secuencia EXDDXGF del péptido R13 es esencial para su reconocimiento por los anticuerpos presentes en el suero de pacientes con Enfermedad de Chagas o ratones inmunizados con la proteína TcP2 β .
11. Se determinó que los anticuerpos dirigidos contra las proteínas ribosomales P2 β y P0 de *T. cruzi* están involucrados en el bloqueo aurículo-ventricular generado por el suero de pacientes chagásicos en el modelo de corazón aislado de conejo.
12. La inmunización con las proteínas recombinantes TcP2 β y TcP0 indujo la síntesis de anticuerpos dirigidos contra antígenos cardíacos.
13. La inmunización con la proteína recombinante TcP0 indujo la producción de anticuerpos capaces de interaccionar con receptores adrenérgicos β 1 y de producir cambios en la fisiología de células cardíacas.
14. La inmunización con la proteína recombinante TcP0 generó alteraciones de la función cardíaca en el 58% de los ratones. Las mismas fueron evidenciadas por presencia de arritmias y alteraciones en la repolarización y conducción. Estas alteraciones fueron observadas en ratones con elevados títulos de anticuerpos contra TcP0 y P015.
15. La inmunización con la proteína recombinante TcP2 β generó un incremento de la frecuencia cardíaca no observándose otro tipo de alteraciones.
16. La inmunización con las proteínas recombinantes TcP2 β o TcP0 no indujo la aparición de infiltrados inflamatorios en corazón. Los ratones inmunizados con TcP0 presentaron alteraciones a nivel mitocondrial cuya relevancia histopatológica está siendo determinada.



6. Bibliografía

Acosta A.M., Sadigursky M., & Santos Buch C.A. Anti striated muscle antibody activity produced by *T.cruzi*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 172: 364-369. 1983.

Acosta A.M. & Santos Buch C.A. Autoimmune miocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. Circulation 71: 1255-1261. 1985.

Affranchino J.L., Ibañez C.F., Luquetti A.O., Peterson U. & Frasch A.C.C. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. Mol. Biochem. Parasitol. 34: 221-228. 1989.

Altclas J, Jaimovich G, Milovic V, Klein F, Feldman L Chagas' disease after bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant;18(2):447-8. 1996.

Amann E. & Brosius J. "ATG vectors" for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. Gene 40: 183-190. 1985.

Amato MS, Amato Neto V, Uip DE Evaluation of the quality of life in patients with Chagas' disease undergoing a heart transplant. Rev Soc Bras Med Trop 30(2):159-60. 1997.

Andrade Z. & Andrade S. American trypanosomiasis. En Pathology of protozoan and helminthic disease. Marcial Rojas R. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore, pp.69. 1971.

Andrade Z. & Andrade S. Patología. En: *T.cruzi* e Doença de Chagas. Brener Z. & Andrade Z. Guanabara Koogan Ediciones, Río de Janeiro, pp 199-248. 1979.

Andrade Z.A. The canine model of Chagas' disease. Mem. Inst. Osw. Cruz 79: 77-83. 1984.

Andrade S, Sadigursky M. The conduction system of the heart in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: histopathological lesions and electrocardiographic correlations. Mem Inst Oswaldo Cruz;82(1):59-66. 1987.

Apt W, Aguilera X, Arribada A, Perez C, Miranda C, Sanchez G, Zulantay I, Cortes P, Rodriguez J, Juri D. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. Am J Trop Med Hyg 59(1):133-8. 1998.

Araujo FG, Israelski DM, de Titto EH Human Chagas' disease: evolution of the antibody response and recognition of antigens of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 83 Suppl 1:522-6. 1988.

Ausubel F. Current protocols in molecular biology. Ed. John Wiley & Sons, Inc. 1987.

Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. Mol Biochem Parasitol. 48(2):211-21. 1991.

Baig, M. K., O. Salomone, A. L. P. Caforio, J. H. Goldman, M. Amuchastegui, T. Caiero, and W. J. McKenna. Human chagasic disease is not associated with an antiheart humoral response. *Am. J. Cardiol.* 79:1135-1137. 1997.

Barreto, MP Epidemiologia, en *Trypanosoma cruzi* e doenca de Chagas, Z. Brener & Z. Andrade (eds). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 1979.

Bocchi EA, Bellotti G, Mocelin AO, Uip D, Bacal F, Higuchi ML, Amato-Neto V, Fiorelli A, Stolf NA, Jatene AD, Pileggi F Heart transplantation for chronic Chagas' heart disease. *Ann Thorac Surg* 61(6):1727-33. 1996.

Bolomo N., Milei J., Cossio P.M., Segura E., Laguens P.M. Fernandez L.M. & Arana R.M. Experimental Chagas' disease in a south american primate (*Cebus* sp.). *Medicina (Buenos Aires)* 40: 667-672. 1980.

Bonfa E. & Elkon K. Clinical and serological associations of the antirribosomal P protein antibody. *Arthritis Rheum.* 29: 981-985. 1986.

Borda E., Pascual J., Cossio P., De la Vega M., Arana R. & Sterin-Borda L. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to β -adrenergic receptor of myocardium and modulates their activity. *Clin. Exp. Immunol.* 5: 679. 1984.

Borda E, Sterin-Borda L Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 54(2):149-56. 1996.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:248-254. 1976.

Brandariz S., Schijman A., Vigliano C., Arteman P., Viotti R., Beldjord C. & Levin M.J. Detection of parasite DNA in Chagas' heart disease. *Lancet* 346:1370-1371. 1995.

Brener Z. O parasito: relacoes hospedeiro-parasito. En *T.cruzi* e Doenca de Chagas. Brener Z. & Andrade Z. Guanabara Koogan Edicoes, Rio de Janeiro, pp 1-41. 1979.

Brener, Z. A descoberta. *Mem Inst Oswaldo Cruz (Suppl II)* 84: 1-6, 1989.

Brener Z, Gazzinelli RT Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 114(2):103-10. 1997.

Cancado JA, Salgado AA, Marra UD, Alvares JM, Machado JR Clinical therapeutic trial in chronic Chagas' disease using nifurtimox in 3 schedules of long duration. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 17(2):111-27. 1975.

Carpintero DJ. Use of thioctic acid for prevention of the adverse effects induced by benznidazole in patients with chronic Chagas' infection. *Medicina (B Aires)*;43(3):285-90. 1983.

- Carvalho MF, de Franco MF, Soares VA Amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* detected in a renal allograft. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 39(4):223-6. 1997.
- Chagas C. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schyzotrypanum cruzi* N.gen. N.sp., o agente etiológico da nova entidade morbida do homen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1: 159-218, 1909.
- Chagas, C.. Moléstia de Chagas ou tiroidite parasitária. Nova doença humana transmitida pelo "barbeiro". Segunda Conferencia Academia Nacional de Medicina. Tipogr. Leuzinger (Rio de Janeiro) . 1911.
- Chagas C. Estado actual da trypanosomiase. Rev. Hyg. Biol. Sao Paulo 5:58. 1934.
- Chan, P. K., Aldrich, M., Cook, R., Busch, H. Amino acid sequences of protein B23 phosphorylation site. J. Biol. Chem. 261: 1868-1872. 1989.
- Chiale PA, Halpern MS, Nau GJ, Tambussi AM, Przybylski J, Lazzari JO, Elizari MV, Rosenbaum MB. Efficacy of amiodarone during long-term treatment of malignant ventricular arrhythmias in patients with chronic chagasic myocarditis. Am Heart J 107(4):656-65. 1984.
- Cooper, R. Characterization of a candidate gene for GP72, an insect stage-specific antigen of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 49: 45-60. 1991.
- Cossio, P. M., C. Diez, A. Szarfman, E. Kreutzer, B. Candiolo, and M. Arana. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin which reacts with endocardium and vascular structures. Circulation 49:13-21. 1974.
- Costa F, Franchin G, Pereira-Chiocola VL, Ribeirao M, Schenkman S, Rodrigues MM Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Vaccine 16(8):768-74. 1998.
- Cotrim PC, Paranhos GS, Mortara RA, Wanderley J, Rassi A, Camargo ME, da Silveira JF Expression in *Escherichia coli* of a dominant immunogen of *Trypanosoma cruzi* recognized by human chagasic sera. J Clin Microbiol 28(3):519-24. 1990.
- 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. Organization and expression of the gene encoding an aimmunodominant repetitive antigen associated to the cytoeskeleton of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 71: 89-98. 1995.
- Coura JR Current prospects of specific treatment of Chagas' disease. Bol Chil Parasitol 51(3-4):69-75. 1996.
- Coura JR, de Abreu LL, Willcox HP, Petana W Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas' disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation. Rev Soc Bras Med Trop 30 (2):139-44. 1997.

Cunha-Neto E., Duranti M., Gruber A., Zingales B., de Messias I., Stolf N., Belloti G., Patarroyo M., Pilleggi F. 6 Kalil J.. Autoimmunity in Chagas' disease cardiopathy: Biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:3541-3545. 1995.

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

Davila, DF, R. O. Rossell, and J. H. Donis. Cardiac parasympathetic abnormalities: cause or consequence of Chagas heart disease. Parasitol. Today 5:327-329. 1989.

Davila DF, Inglessis G, Mazzei de Davila CA Chagas' heart disease and the autonomic nervous system. Int J Cardiol 30;66(2):123-7. 1998.

de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. Lancet 23;348(9039):1407-13. 1996.

de Carvalho VB, Sousa EF, Vila JH, da Silva JP, Caiado MR, Araujo SR, Macruz R, Zerbini EJ Heart transplantation in Chagas' disease. 10 years after the initial experience. Circulation 15;94(8):1815-7. 1996.

de Castro SL The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop;53(2):83-98. 1993.

de Diego JA, Palau MT, Gamallo C, Penin P Are genotypes of *Trypanosoma cruzi* involved in the challenge of chagasic cardiomyopathy? Parasitol Res;84(2):147-52. 1998.

de Faria JB, Alves G Transmission of Chagas' disease through cadaveric renal transplantation. Transplantation 56(6):1583-4. 1993.

Degrave, W., Levin, M.J., da Silveira, J.F. Parasite genome projects and the *Trypanosoma cruzi* initiative. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92 , 859-862, 1997.

De Titto EH, Segura EL, Braun M Cellular immunity in Chagas' disease patients. Lymphoproliferative response to subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. Immunol Lett 6(3):161-7. 1983.

De Titto EH, Braun M, Lazzari JO, Segura EL Cell-mediated reactivity against human and *Trypanosoma cruzi* antigens according to clinical status in Chagas' disease patients. Immunol Lett;9(5):249-54. 1985.

Diez C, Manattini S, Imaz MS, Zanuttini JC, Marcipart APCR (polymerase chain reaction) in neonatal Chagas disease. An alternative for its early diagnosis? Medicina (B Aires);58(4):436-7. 1998.

- D' Imperio Lima, M. R., M. Joskowicz, A. Coutinho, T. Kipnis, and H. Eisen. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Eur. J. Immunol. 15:201-203. 1985.
- D'Imperio Lima M.R., Eisen H., Minoprio P., Joskowicz M. & Coutinho A. Persistence of polyclonal activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. J. Immunol. 137: 353. 1986.
- Eisen, H., and S. Kahn. Mimicry in *Trypanosoma cruzi* fantasy and reality. Curr. Opin. Immunol. 3:507-510. 1991.
- Elias D, Tikochinski Y, Frankel G, Cohen IR. Regulation of NOD mouse autoimmune diabetes by T cells that recognize a TCR CDR3 peptide. Int Immunol. Jun;11(6):957-66. 1999.
- Elies R., Ferrari I., Wallukat G., Lebesgue D., Chiale P., Elizari M., Rosenbaum M., Hoebeke J. & Levin M. Structural and Functional Analysis of the B Cell Epitopes Recognized by Anti-Receptor Autoantibodies in Patients with Chagas' Disease. J. Immunol. 157:4203-4211. 1996.
- Elizari MV, Chiale PA J Cardiovasc Electrophysiol 4(5):596-608 Cardiac arrhythmias in Chagas' heart disease. 1993.
- Elkon K.B., Parnassa A.P. & Lee Foster C. Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. J. Exp. Med. 162: 459-471. 1985.
- Engel JC, Doyle PS, Hsieh I, McKerrow JH Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Exp Med 17;188(4):725-34. 1998.
- Engman D.M., Krause J.H., Kirchoff L.V. & Donelson J.E. A novel flagellar Ca²⁺-binding protein in trypanosomes. J. Biol. Chem. 264: 18627. 1989.
- Engman D.M., Dragon E.A. & Donelson J.E. Human humoral immunity to hsp70 during *T.cruzi* infection. J. Immunol. 144: 3987. 1990.
- Farias de Oliveira S, Pedrosa RC, Nascimento JH, Campos de Carvalho AC, Masuda MO. Sera from chronic chagasic patients with complex cardiac arrhythmias depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. Circulation 16;96(6):2031-7. 1997.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degraive W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. Am J Trop Med Hyg 58(6):807-11. 1998.
- Ferrari I., Levin, M.J., Wallukat G., Elies R., Lebesgue D., Chiale P., Elizari M., Rosenbaum M. & Hoebeke J. Molecular mimicry between the Immunodominant Ribosomal Protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a Functional Epitope on the Human β 1-Adrenergic Receptor. J. Exp. Med. 182:59-65. 1995.

- Ferreira H de O. Treatment of the undetermined form of Chagas disease with nifortimox and benzonidazole. *Rev Soc Bras Med Trop* 23(4):209-11. 1990.
- Ferreira MS, Nishioka S de A, Silvestre MT, Borges AS, Nunes-Araujo FR, Rocha A Reactivation of Chagas' disease in patients with AIDS: report of three new cases and review of the literature. *Clin Infect Dis* 25(6):1397-400. 1997.
- Fragata Filho AA, da Silva MA, Boainain E Ethnologic treatment of acute and chronic Chagas' Disease. *Rev Paul Med* 113(2):867-72. 1995.
- Frasch, A. C. C., Cazzulo, J. J., Aslund, L., Pettersson, U. Comparison of Genes Encoding *Trypanosoma cruzi* Antigens. *Parasitol. Tod.* vol. 7, no 6. 1991.
- Freitas P. Amato, V. Sonntag, R. Biancalana, A. Nussenzweig, V. Barreto, J. Primeiras verificacoes de transmissao accidental da molestia de Chagas ao homen por transfusao de sangue. *Rev Paul Med* 40: 36-40, 1952.
- Fu, L., Y. Magnusson, C. Berge, A. Liljeqvist, F. Waagstein, A. Hjalmarson, and J. Hoebeke. Localization of a functional autoimmune epitope on the second extracellular loop of human muscarinic receptor m2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 91:1964-1968. 1993.
- Goin J.C., Borda E., Perez Leiros C., Storino R. & Sterin-Borda L. Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease. *J. Auton. Nerv. Syst.* 47:45-52. 1994.
- Goin JC, Venera G, Biscoglio de Jimenez Bonino M, Sterin-Borda L Circulating antibodies against nicotinic acetylcholine receptors in chagasic patients. *Clin Exp Immunol* 110(2):219-25. 1997.
- Goin, J. C., C. Perez Leiros, E. Borda, and L. Sterin-Borda. Interaction of human chagasic IgG with the second extracellular loop of the human heart muscarinic acetylcholine receptor: functional and pathological implications. *FASEB J.* 10:77-83. 1997.
- Goldbarg AN, Hellerstein HK, Bruell JH y Daroczy AF. Electrocardiogram of the normal mouse, *Mus musculus*: general considerations and genetic aspects. *Cardiovasc. Res.*, 2: 93-99. 1968.
- Goldenberg, S. Use of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen in the immunological diagnosis of Chagas' disease. *Mem. Inst. Butantan* 53 (Supl 1), 71-76. 1991.
- Gomes ML, Galvao LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg* 60(2):205-10. 1999.
- Gonzalez Cappa SM, Sanz OP, Muller LA, Molina HA, Fernandez J, Rimoldi MT, Sica RE *Am J Trop Med Hyg* 36(1):41-5 Peripheral nervous system damage in experimental chronic Chagas' disease. 1987.

- Grauert, M. R., M. Houdayer, and M. Hontebeyrie-Joskowicz. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. Clin. Exp. Immunol. 93:85-92. 1993.
- Gruber, A., and B. Zingales. *Trypanosoma cruzi* characterization of 2 recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. Exp. Parasitol. 76:1-12. 1993.
- Guerreiro, C. y Machado, A. Da reacao de Bordet e Gengou na molestia de Carlos Chagas como elemento diagnostico. Brasil Med. 27: 225-226, 1913.
- Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cardenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza B, Aufderheide AC. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. kinetoplast of *Trypanosoma cruzi*. Am J Phys Anthropol 108(4):401-7. 1999.
- Haedo AH, Chiale PA, Bandieri JD, Lazzari JO, Elizari MV, Rosenbaum MB Comparative antiarrhythmic efficacy of verapamil, 17-monochloracetylajmaline, mexiletine and amiodarone in patients with severe chagasic myocarditis: relation with the underlying arrhythmogenic mechanisms. J Am Coll Cardiol. 7(5):1114-20. 1986.
- Hall R., Hyde J., Goman M., Simmons D., Hope I. & Stocker J. Major surface antigen of a human malaria parasite cloned and expressed in bacteria. Nature 311: 379-382. 1984.
- Higuchi, M. L., De Brito, T., Martins Reis, M., Barbosa, A., Bellotti, G., Pereira-Barreto, A.C., Pileggi, F. 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, : 101-106. 1993.
- Hoare, C. A. The Trypanosomes of Mammals, Blakwell Scientific Publications. 1972.
- Hontebeyrie-Joskowicz M., Said G., Milon G., Marchal G. & Eisen H. 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. 1987.
- Hudson L. Autoimmune phenomena in chronic chagasic cardiopathy. Parasitol. Today 1: 6. 1985.
- Huynh, T., Young, R. & Davis, R. Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11. En DNA cloning: A practical approach. Vol. I, Cap.2 D.M. Glover (Ed.). IRL Press, Oxford. 1985.
- Ibañez, C., Affranchino, J., Macina, R., Reyes, M., Leguizamón, S., Camargo, M., Aslund, L., Pettersson, U., Frasch, A. Multiple *T. cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. Mol. Biochem. Parasitol., 30: 27-34. 1988.

- Jardim E, Takayanagui OM Chagasic meningoencephalitis with detection of *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid of an immunodepressed patient. J Trop Med Hyg 97(6):367-70. 1994.
- Jones, E. M., Coley, D. G., Tostes, S., Lopes, E. R., Vnencak-Jones, C. L., McCurley, T. L. Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. Am. J. Trop. Med. Hyg. 48: 348-357. 1993.
- Kaplan D., Ferrari I., López Bergami P., Mahler E., Levitus G., Chiale P., Hoebeke J., Van Regenmortel M. & Levin M.J. Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas' disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:10301-10306. 1997.
- Kellerman O.K. & Ferenci, T. Maltose binding protein from *E.coli*. Methods in enzymology,90: 459-463. 1982.
- Kerner N., Liégeard P., Levin M. & Hontebeyrie-Joskowicz M.. *Trypanosoma cruzi*: Antibodies to a Map-like protein in Chronic Chagas' Disease cross-react with Mammalian cytoskeleton. Exp. Parasitology 73:451-459. 1991.
- Khoury E.L., Ritacco V., Cossio P.M., Laguens R. Szarfman A. Diez C., & Arana R.M. Circulating antibodies to peripheral nerve in American Trypanosomiasis (Chagas' disease). Clin. Exp. Immunol. 36: 8-15. 1979.
- Khoury, E. L., C. Diez, P. M. Cossio, and R. M. Arana. Heterophile nature of EVI antibody in *Trypanosoma cruzi* infection. Clin. Immunol. Immunopathol. 27:283-288. 1983.
- Kierszenbaum F. Autoimmunity in Chagas' disease. J. Parasitol. 72: 201-211. 1986.
- Kierszenbaum, F. Chronic chagasic tissue lesions in the absence of *Trypanosoma cruzi*: a proposed mechanism. Parasitol. Today 12:414-415. 1996.
- Kierszenbaum F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. Clin Microbiol Rev. 12(2):210-23. 1999.
- Kingman, S. South America declares war on Chagas disease. New Sci. (19 October), 16-17. 1991.
- Kirchhoff, L. 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. 1987.
- Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. Adv. Parasitol. 6: 63-116. 1968.
- Koren, E., Wolfson Reichlin, M., Koscec, M., Fugate, R.D. & Reichlin, M. Autoantibodies to the ribosomal P proteins react with a plasma membrane-related target on human cells. J. Clin. Invest. 89: 1236-1241. 1992.

Krettli AU, Brener Z Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. J Immunol 128(5):2009-12. 1982.

Krowczynska,A.M., Coutts,M., Makrides,S. and Brawerman,G. The mouse homologue of the human acidic ribosomal phosphoprotein PO: a highly conserved polypeptide that is under translational control. Nucleic Acids Res. 17 (15), 6408, 1989.

Kumar R., Kline I.K. & Abelman W.H. Experimental *T.cruzi* myocarditis. Relative effects upon the right and left ventricles. Am. J. Pathol. 57: 31-47. 1969.

Lafaille, J., Lins, J., Krieger, M., Sauton-Padrón, T., De Souza, W., Goldemberg, S.. Structure and expression of two *T. cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive antigens. Mol. Biochem. Parasitol., 35: 127-136. 1989.

Laguens R.P., Cabeza Meckert P., Basombrío M.A., Chambo G.J., Cossio P.M., Arana R.M. & Gelpi R. Chronic infection of the mouse with *T.cruzi*: an experimental model for Chagas' disease. Medicina (Buenos Aires) 40 (1): 33-39. 1980.

Laguens R.P., Cabeza Meckert P.M. & Gelpi R. Chronic Chagas' disease in the mouse. Morphologic and electrocardiographic patterns of the cardiopathy. Medicina. 41:35-39, 1981.

Lambrecht F.L. Biological variations in trypanosomes and their relations to the epidemiology of Chagas' disease. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 7: 346-352. 1965.

Laranja F.S., Dias E., Nobrega G., and Miranda A. Chagas 'disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. Circulation 14: 1035-1060, 1956.

Lazzari JO, Pereira M, Antunes CM, Guimaraes A, Moncayo A, Chavez Dominguez R, Hernandez Pieretti O, Macedo V, Rassi A, Maguire J, Romero A Diagnostic electrocardiography in epidemiological studies of Chagas' disease: multicenter evaluation of a standardized method. Rev Panam Salud Publica 4(5):317-30. 1998.

Ledesma Patiño, O., Ribas Meneclier, C., Kalalo, E., Lugones, H., Marteleur Acevedo, A., Barbieri, G. Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas. Simposio Satélite, Noviembre. Organismo Oficial del Congreso Nacional de Medicina. 1992.

Lefranc G. Ingénierie des anticorps-banques combinatoires. Ed. Lefranc M.P. y Lefranc G. INSERM, 1997.

Levi GC, Lobo IM, Kallas EG, Amato Neto V Etiological drug treatment of human infection by *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 38(1):35-8. 1996.

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. & Segura E. Identification of mayor *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41: 530-538, 1989.

Levin M.J., Da Silveira J.F., Frasch A.C.C., Camargo M.E., Lafon S., Degraeve W.M. & Rangel-Aldao R. Recombinant *T.cruzi* antigens and Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. FEMS Microbiol. Immunol. 89: 11-20. 1991.

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 Immunol. Med. Microbiol. 7: 205. 1993.

Levin M., Vazquez M., Kaplan D. & Schijman A. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein family: Classification and antigenicity. Parasitol. Today 9: 381-384, 1993a.

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

Levy Yeyati P. "Antígenos del estadio trypomastigote sanguíneo de la cepa RAI de *Trypanosoma cruzi* de la cepa Boitron de *Leishmania braziliensis braziliensis*: Respuesta humoral, anti-HSP70 en la enfermedad de Chagas y Leishmaniasis". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA, 1992.

Lopetegui, R., Sosa Miatello, C. and Fiorotto, E.R. Anti- ribosome humoral antibodies elicited in *Trypanosoma cruzi* infected mice. Comm. Biol. 2, 195-202. 1983.

Lopetegui, R., Sosa Miatello, C. and Fiorotto, E.R. *Trypanosoma cruzi* and mouse myocardium ribosomes. Antibody detection in experimental Chagas infection. Comm. Biol. 2, 79-85. 1983.

Lopez Bergami, P.; Cabeza Meckert, P.; Kaplan, D.; Levitus, G.; Elias F.; Quintana, F.J.; Van Regenmortel; Laguens, R. & Levin, M.J. Immunization with recombinant *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2 β protein induces changes in the electrocardiogram of immunized mice. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 18:75-85. 1997

Losavio A., Jones M.C., Sanz O.P., Mirkin G., González Cappa S.M., Muchnik S. & Sica R.E.P. A sequential study of the peripheral nervous system involvement in experimental Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41:539-547. 1989.

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

Luquetti, A. O. Etiological treatment for Chagas Disease. Parasitology Today, 13 (4): 127-128. 1997.

Macedo A.M. y Pena S.D.J. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas Disease. Parasitology Today, 14:3:119-124. 1998.

Margariños Torres C. Sobre a anatomia patologica da Doença de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 3: 276-293, 1941.

Matsui S., Fu M., Katsuda S., Hayase M., Yamaguchi N., Teraoka K., Kurihara T., Takekoshi N., Murakami E., Hoebeke J. & Hjalmarson A. Peptides derived from Cardiovascular G-protein-coupled Receptors Induce Morphological Cardiomyopathic Changes in Immunized Rabbits. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29:641-655. 1997.

Mazza, S. Casos agudos benignos de de enfermedad de Chagas comprobados en la Provincia de Jujuy. *MEPRA* 17: 3-11, 1934.

Mazza, S. Montana, A. Benitez, C. Juzín, E. Transmisión de *Schizotrypanum cruzi* al niño por la leche de la madre con enfermedad de Chagas. *Publ. MEPRA* 28: 41-46, 1936.

Mazza S. Comprobaciones de *Triatoma platensis*, *Eutriatoma oswaldoi*, *Pastronylus 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. 1943.

Mc Cormick T.S. & Rowland E.C. *Trypanosoma cruzi*: cross-reactive anti-heart autoantibodies produced during infection in mice. *Exp. Parasitol.* 69: 393-401. 1989.

Mc Cormick, T. S., and E. C. Rowland. *Trypanosoma cruzi*: recognition of a 43-kDa muscle glycoprotein by autoantibodies present during murine infection. *Exp. Parasitol.* 77:273-281. 1993.

Mendoza I, Guiniger A, Kushni E, Sosa E, Velazco V, Marques J, Pimenta J, Moleiro F, Sgammini H Consensus of the electrophysiology committee of "USCAS" on the treatment of ventricular arrhythmias in Chagas disease. *Arq Bras Cardiol.* 62(1):41-3. 1994.

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

Mijares, A., L. Verdot, N. Peineau, B. Vray, J. Hoebeke, and J. Argibay. Antibodies from *Trypanosoma cruzi* infected mice recognize the second extracellular loop of the beta 1-adrenergic and M2-muscarinic receptors and regulate calcium channels in isolated cardiomyocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 164:107-112. 1996.

Minoprio P., Burlen O., Pereira P., Guilbert B., Hontebeyrie-Joskowicz M. & Coutinho A. Most B cells in acute *T.cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* 28: 553-561. 1988.

Minoprio, P., S. Itohara, C. Heusser, S. Tonegawa, and A. Coutinho. Immunobiology of *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol. Rev.* 112:183-207. 1989.

Molina, H. A., and F. Kierszenbaum. A study of human myocardial tissue in Chagas' disease: distribution and frequency of inflammatory cell types. *Int. J. Parasitol.* 17:1297-1305. 1987.

Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha AJ, Loeberberg D, Urbina JA Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob Agents Chemother* 44(1):150-5. 2000.

Moller, W. The ribosome and translation factors. *Biochimie*, 73, 1093-1100. 1991.

Moncayo A, Luquetti AO Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85(4):489-95. 1990.

Moncayo A, Luquetti AO Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi*. In Eleventh Programme Report of the UNDP. World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Disease (TDR), pag 67-75, World Health Organization. 1993.

Moncayo A Progress towards the elimination of transmission of Chagas disease in Latin America. *World Health Stat Q*;50(3-4):195-8. 1997.

Morel C, Simpson L Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Am J Trop Med Hyg* Sep;29(5 Suppl):1070-4. 1980.

Mosca W. & Plaja J. Delayed hypersensitivity to heart antigens in Chagas' disease as measured by in vitro lymphocyte stimulation. *J. Clin. Microbiol.* 14: 1-5. 1985.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27(7):1477-82. 1989.

Moya PR, Paolasso RD, Blanco S, Lapasset M, Sanmartino C, Basso B, Moretti E, Cura D Treatment of Chagas' disease with nifurtimox during the first months of life. *Medicina*;45(5):553-8. 1985.

Naranda T, Ballesta JP. Phosphorylation controls binding of acidic proteins to the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1;88(23):10563-7. 1991.

Nussenzweig, V Sonntag, R. Biancalana, A. Freitas P. Amato, V. Acao da Violeta de Genciana sobre o *Trypanosoma cruzi* in vitro: sua importancia na esterilizacao do sangue destinado a transfusao. *Rev Paul Med* 42: 57-58, 1953.

Oldstone M.B. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 5: 819. 1987.

Oldstone MB. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J* 12(13):1255-65. 1998.

Olivares-Villagomez D, McCurley TL, Vnencak-Jones CL, Correa-Oliveira R, Colley DG, Carter CE Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. Am J Trop Med Hyg 59(4):563-70. 1998.

Paranhos-Bacalla, G., Santos, M., Cotrim, P., Rassi, A., Jolivet, M., Camargo, M., Franco da Sylveira, J. Detection of antibodies in sera from Chagas' disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. Parasite Immunology, 16: 165-169. 1994.

Paulin J. J., Keith C. H. & Tarleton R. L. A monoclonal antibody to alpha-tubulin recognized host cell and *T.cruzi* tubulins. J. Protozool. 35: 123-129. 1988.

Pereira-Chioccola VL, Costa F, Ribeirao M, Soares IS, Arena F, Schenkman S, Rodrigues MM Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein. Parasite Immunol 21(2):103-10. 1999.

Perez MA, Sarabanda AV, Padilha WL, Masuda MO. Effect of salicylate on normal and digoxin-intoxicated isolated rabbit heart. Braz J Med Biol Res;17(2):189-96. 1984.

Perez A. & Segura E.L. Blood transfusion and transmission of Chagas' infection in Argentina. Rev. Argent. Transf. 15: 127- 132, 1989.

Perez Leiros, C., L. Sterin-Borda, E. S. Borda, J. C. Goin, and M. Hosey. Desensitization and sequestration of human m2 muscarinic acetylcholine receptors by autoantibodies from patients with Chagas' disease. J. Biol. Chem. 272:12989-12993. 1997.

Petry K. & Eisen H. Chagas' disease: a model for the study of autoimmune diseases. Parasitol. Today. 5:111-121, 1989.

Pilgrim H. & DeOme K. Intraperitoneal pentobarbital anesthesia in mice. Exp. Med. Surg. 13, 401-403, 1955.

Postan, M., A. W. Cheever, J. A. Dvorak, and J. P. McDaniel. A histopathological analysis of the course of myocarditis in C3H/He mice infected with *Trypanosoma cruzi* clone Sylvio X10/4. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80:50-55. 1986.

Postan, M., J. J. Bailey, J. A. Dvorak, J. P. McDaniel, and E. W. Pottala. Study of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. III. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37:541-548. 1987.

Ramirez C, Shimmin LC, Newton CH, Matheson AT, Dennis PP Structure and evolution of the L11, L1, L10, and L12 equivalent ribosomal proteins in eubacteria, archaeobacteria, and eucaryotes. Can J Microbiol 35(1):234-44. 1989.

Rassi A, Neto VA, de Siqueira AF, Leite MS Nifurtimox as a prophylactic drug to prevent reactivation in chronic chagasic patients treated with corticoid for associated diseases. *Rev Soc Bras Med Trop* 31(3):249-55. 1998.

Remacha M, Saenz-Robles MT, Vilella MD, Ballesta JP Independent genes coding for three acidic proteins of the large ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 263(19):9094-101. 1988.

Retondaro FC, Dos Santos Costa PC, Pedrosa RC, Kurtenbach E. Presence of antibodies against the third intracellular loop of the m2 muscarinic receptor in the sera of chronic chagasic patients. *FASEB J* 13(14):2015-20. 1999.

Revelli S., Amerio N., Valenti J.L., Balbarrey H. & Morini J.C. Enfermedad de Chagas crónica en la rata. Características serológicas, electrocardiográficas e histopatológicas. *Medicina (Buenos Aires)* 40 (1):69-76. 1980.

Ribeiro dos Santos R, Laus J.L., Mengel J.O. & Savino W. Chronic chagasic cardiopathy: role of CD4 T cells in the anti-heart autoreactivity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85: 367-369. 1990.

Ribeiro dos Santos, R., M. A. Rossi, J. L. Laus, J. S. Silva, W. Savino, and J. Mengel. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 175:29-39. 1992.

Ribeiro dos Santos R., Marquez J.O. & Koberle F. Antibodies against neurons in chronic Chagas` disease. *Tropenmed. Parasit.* 30: 19-23. 1979.

Rich B.E. & Steiz J.A. Human acidic ribosomal proteins P0, P1 and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis and assembly. *Mol. Cell. Biol.* 7: 4065-4074. 1987.

Romaña C. Enfermedad de Chagas. López Libreros Editores, Buenos Aires, 1963.

Rosenbaum M.B. Chagasic myocardiopathy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 7: 99-225, 1964.

Rosenbaum MB, Chiale PA, Haedo A, Lazzari JO, Elizari MV Ten years of experience with amiodarone. *Am Heart J* 106(4 Pt 2):957-64. 1983.

Rossi M.A., Goncalves S. & Ribeiro dos Santos R. Experimental *T.cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *Am. J. Pathol.* 114: 209-216. 1984.

Rossi, M. A. Aortic endothelial cell changes in the acute septicemic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rats: scanning and transmission electron microscopy study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57:321-327. 1997.

Ruiz A.M., Esteva M., Cabeza Meckert P., Laguens R.P. & Segura E.L. Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica.* 42:299-309, 1985.

Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, Candia N, Calcena MF, Figueredo A Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 59(3):487-91. 1998.

Sadigursky M, Andrade SG Electrocardiographic changes in experimental chronic murine Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res*;19(3):379-88. 1986.

Sambrook J., Fritsch E.F., & Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory press, 1989.

Santos-Buch C.A. & Acosta A. Pathology of Chagas' disease. En: Immunology and pathogenesis of Trypanosomiasis. Ed. Ian Tizard., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1985.

Santos Buch C.A., Acosta A.M., Zweerink H.J. & Sadigursky M. Primary muscle disease: definition of a 25 Kd polypeptide myophatic specific Chagas antigen. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 37: 334-350. 1985a.

Sartori AM, Shikanai-Yasuda MA, Amato Neto V, Lopes MH Follow-up of 18 patients with human immunodeficiency virus infection and chronic Chagas' disease, with reactivation of Chagas' disease causing cardiac disease in three patients. *Clin Infect Dis* 26(1):177-9. 1998.

Sartori AM, Lopes MH, Benvenuti LA, Caramelli B, di Pietro A, Nunes EV, Ramirez LP, Shikanai-Yasuda MA. Reactivation of Chagas' disease in a human immunodeficiency virus-infected patient leading to severe heart disease with a late positive direct microscopic examination of the blood. *Am J Trop Med Hyg* 59(5):784-6. 1998.

Scheidt KA, Roush WR, McKerrow JH, Selzer PM, Hansell E, Rosenthal PJ Structure-based design, synthesis and evaluation of conformationally constrained cysteine protease inhibitors. *Bioorg Med Chem* 6(12):2477-94. 1998.

Schejtman D., Levitus G., Chiale P.A., Levin M.J., Elizari M.V. & Rosenbaum M.B. Determinantes antigénicos diferenciales de *Trypanosoma cruzi* en pacientes chagásicos crónicos con y sin cardiomiopatía. Premio Fundación Dr. Pedro Cossio, XVII Congreso Argentino de Cardiología, Buenos Aires, 1990.

Schenkman S, Eichinger D, Pereira ME, Nussenzweig V Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. *Annu Rev Microbiol* 48:499-523. 1994.

Schenone H, Rojas A, Alfaro E, Concha L, Aranda R Longitudinal study of the persistence of the therapeutic action of nifurtimox and benznidazole in patients with chronic chagas infection. *Bol Chil Parasitol* 36(3-4):59-62. 1981.

Schijman, AG, Dusetti, NJ, Vazquez, MP, Lafon, S, Levy-Yeyati, P, Levin, MJ. Nucleotide cDNA and complete deduced amino acid sequence of a *Trypanosoma cruzi* P ribosomal protein (P-JL5). *Nucl. Acids Res.* 18, 3399, 1990.

Schijman, AG, Levin, MJ. Nucleotide sequence of the cDNA encoding a *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P0 protein: a novel C-terminal domain in *T. cruzi* ribosomal P proteins. Nucl. Acids Res. 20, 2894, 1992.

Schijman A.G., Levitus G. & Levin M.J. 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. 1992a.

Schijman A. "Familia de proteínas ribosomales P en *Trypanosoma cruzi*. Identificación de las proteínas TcP0, TcP2a y TcP2b. Clonado de sus ARNm y caracterización genómica parcial". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA, 1992b.

Schmuñiz G. A. & Szarfman A. La Enfermedad de Chagas Congénita. Medicina (Buenos Aires) 37:47-53. 1977.

Schofield C. J. A Cost-benefit analysis of Chagas disease control. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 86: 285-295, 1991.

Schofield, CJ y Dujardin JP. Chagas disease vector control in Central America. Parasitol. Today 13 (4): 141-144. 1997.

Schofield CJ, Dias JC The Southern Cone Initiative against Chagas disease. Adv Parasitol;42:1-27. 1999.

Shikanai-Yasuda MA, Lopes MH, Tolezano JE, Umezawa E, Amato Neto V, Barreto AC, Higaki Y, Moreira AA, Funayama G, Acute Chagas' disease: transmission routes, clinical aspects and response to specific therapy in diagnosed cases in an urban center. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 32(1):16-27. 1990.

Sica R.E., Filipini D, Panizza M., Fumo T., Baso S., Lazzari J. & Molina H.A. Involvement of the peripheral sensory nervous system in human chronic Chagas disease. Medicina (Buenos Aires) 46:662-668. 1986.

Skeiky J., Benson D.R., Parsons M., Elkon K.B. & Reed S.D. Cloning and expression of *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P0 protein and epitope analysis of anti-P0 autoantibodies in Chagas' disease patients. J. Exp. Med. 176: 201-211. 1992.

Snary D., Flint J., Wood J.N., Scott M.T. & Miles M.A. A monoclonal antibody with specificity for *Trypanosoma cruzi*, central and peripheral neurones and ganglia. Clin. Exp. Immunol. 54: 617-624. 1983.

Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg 59(4):526-9. 1998.

Stolf AM, Umezawa ES, Zingales B Simultaneous identification of *Trypanosoma cruzi* surface and internal antigens reactive to different immunoglobulin classes (radio-immunoblotting). Rev Inst Med Trop Sao Paulo 32(5):379-83. 1990.

Stolf NA. Human heart transplantation in Brazil. *Arq Bras Cardiol.* 63(3):247-50. 1994.

Tanowitz, H. B., D. K. Kaul, B. Chen, S. A. Morris, S. M. Factor, L. M. Weiss, and M. Wittner. Compromised microcirculation in acute murine *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Parasitol.* 82:124-130. 1996.

Tarleton RL, Sun J, Zhang L, Postan M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun* 62(5):1820-9. 1994 .

Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol* 8(1):13-22. 1996.

Tarleton, R. L., L. Zhang, and M. O. Downs. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas' disease is a parasite-specific response to host infected tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3832-3937. 1997.

Tarleton R.L. y L. Zhang Chagas Disease Etiology: Autoimmunity or Parasite Persistence? *Parasitology Today*, , 15:3:94-99. 1999.

Te-Chuan Chou y Knilans T.K. *Electrocardiography in Clinical Practice-Adult and Pediatric*. Fourth Edition. W.B. Saunders Company. 1996.

Teixeira A.R. & Santos-Buch C.A. The immunology of experimental Chagas' disease: I. Preparation of *T. cruzi* antigens and humoral antibody response to these antigens. *J. Immunol.* 113: 859-869. 1974.

Teixeira A.R., Teixeira M. & Santos-Buch C.A. The immunology of experimental Chagas' disease: IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *Am. J. Pathol.* 80: 163-180. 1975.

Teixeira A.R., Teixeira G., Macedo V. & Prata A. *Trypanosoma cruzi*-sensitized T lymphocyte mediated ⁵¹Cr release from human heart cells in Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 1097-1107. 1978.

Tekiel VS, Mirkin GA, Gonzalez Cappa SM Chagas' disease: reactivity against homologous tissues induced by different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 115 (Pt 5):495-502. 1997.

Ternynck T., Bleux G., Gregoire J., Avrameas S. & Kanellopoulos C. Comparison between autoantibodies arising during *T. cruzi* infection in mice and natural autoantibodies. *J. Immunol.* 144: 1504-1511. 1990.

Tibbetts R.S., Mc Cormick T.S., Rowland E.C., Miller S.D. & Engman D.M. Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *T. cruzi* infected mice. *J. Immunol.* 152: 1493-1499. 1994.

Todd C.W., Todd N.R. & Guimaraes A.C. Do lymphocytes from chagasic patients respond to heart antigens? *Infect. Immun.* 40: 832. 1983.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.76: 4350-4354. 1979.

Tranchesi J. El electrocardiograma normal y patológico. Editorial Beta. 1981.

Unterkircher C. Avrameas S. y Ternyck T. Autoantibodies in the sera of *Trypanosoma cruzi*-infected individuals with or without clinical Chagas' disease. J. Clin. Lab. Anal. 7: 60-69. 1993.

Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, Zingales B, Levin MJ, Sousa O, Rangel-Aldao R, da Silveira JF Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. J. Clin Microbiol 37(5):1554-60. 1999.

Urbina JA, Payares G Molina J Sanoja C Liendo A Lazard K Piras M Piras R Perez N Wincker P and Ryley JF. Cure of short- and long-term experimental CD using D0870. Science 273: 969-971. 1996.

Urbina JA, Payares G Sanoja C Contreras L Liendo A Piras M Piras R. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against TC: in vitro and in Vivo studies. Antimicrob. Agents Chemoter Antimicrob Agents Chemother. 42(7):1771-7. 1998.

Urbina JA Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. J Mol Med. 77(3):332-8. 1999.

U.S. Department of Health and Human Services. Guide for the care and use of laboratory animals. Public Health Service, National Institutes of Health, NIH Publication, Bethesda, Maryland, 86: 23. 1985.

Van Voorhis W.C. & Eisen H. F1-160: a surface antigen of *T.cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. J. Exp. Med. 169: 641-652.1989.

Van Voorhis, W. C., L. Schlekewy, and H. Letrong. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the FI-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5993-5997. 1991

Vazquez, MP, Schijman, AG, Levin, MJ. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P1 type protein. Nucl. Acids Res. 20, 2599, 1992.

Vazquez, MP, Schijman, AG, Panebra, A, Levin, MJ. Nucleotide sequence of a cDNA encoding another *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P2 type protein (TcP2b). Nucl. Acids Res. 20, 2893, 1992.

Vazquez MC, Riarte A, Pattin M, Lauricella M Chagas' disease can be transmitted through kidney transplantation. Transplant Proc 25(6):3259-60. 1993.

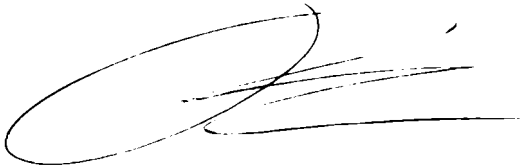
Vidales F.J., Sanchez Madrid F. & Ballesta J.P.G. The acidic proteins of eukaryotic ribosomes: a comparative study. Biochem. Biophys. Acta, 656: 28-35. 1981.

- Viotti R., Vigliano C., Armenti, A. & Segura E. Treatment of chronic Chagas disease with Benznidazole: Clinical and serological evolution of patients with long-term follow up. *Am. Heart. J* 127 (1): 151-162. 1994.
- Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M. E., Rassi, A. Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISBT Brazil '92, Sao Paulo, Brazil. 1992.
- Wendel S. Transfusion-transmitted Chagas' disease. *Curr Opin Hematol.* Nov; 5 (6):406-11. 1998.
- Williams G.T., Fielder L., Smith H. & Hudson L. Adsorption of *T.cruzi* to mammalian cells *in vitro*. *Acta Trop.* 42: 33-38. 1985.
- Wizel B, Garg N, Tarleton RL Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 66 (11):5073-81. 1998.
- Wood J.N., Hudson L., Jessel T.M. & Yamamoto M. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *T.cruzi* parasites. *Nature (London)* 296: 34-38. 1982.
- Wool IG, Chan YL, Gluck A, Suzuki K The primary structure of rat ribosomal proteins P0, P1, and P2 and a proposal for a uniform nomenclature for mammalian and yeast ribosomal proteins. *Biochimie* 73(7-8):861-70. 1991.
- World Bank, World Development Report 1993: Investing in Health. Oxford Univ. Press, Oxford, 1993.
- World Health Organization. Tropical Disease Research, Progress 1991-1992. pp 67-75. 1993.
- Wrightsmann R., Krassner S. & Watson J. Genetic control of response to *T.cruzi* in mice : Multiples genes influencing parasitemia and survival. *Infect. Immun.* 36: 637-644. 1982.
- Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis* 180(2):480-6. 1999.
- Zingales, B.; Rondinelli, E.; Degrave, W.; da Silveira, J.F.; Levin, M.J.; Le Paslier, D.; Modabber, F.; Dobrokhoto, B.; Swindle, J.; Kelly, J.; Aslund, L.; Hoheisel, J.D.; Ruiz, A.; Cazzulo, J.J.; Petterson, U.; Frasch, C.A. The *Trypanosoma cruzi* genome initiative. *Parasitol. Today* 13, 16-22, 1997.
- Zwirner N.W., Malchiodi E.L., Chiaramonte M.G. & Fossati C.A. 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. 1994.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Levin', with a long horizontal stroke extending to the right.

Firma del director de Tesis

Dr. Mariano Levin

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'P. López Bergami', with a large loop at the beginning and several horizontal strokes.

Firma del autor de la Tesis

Lic. Pablo López Bergami