

## Tesis de Posgrado

# Análisis funcional del antígeno repetitivo presente en la transialidasa de *Trypanosoma cruzi*

Buscaglia, Carlos Andrés

2000

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Buscaglia, Carlos Andrés. (2000). Análisis funcional del antígeno repetitivo presente en la transialidasa de *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3249\\_Buscaglia.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3249_Buscaglia.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Buscaglia, Carlos Andrés. "Análisis funcional del antígeno repetitivo presente en la transialidasa 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\\_3249\\_Buscaglia.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3249_Buscaglia.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Instituto de Investigaciones Bioquímicas



**Análisis Funcional del Antígeno Repetitivo Presente en  
la *trans*-sialidasa de *Trypanosoma cruzi***

Lic. Carlos Andrés Buscaglia

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Director: Dr. Alberto Carlos C. Frasch

2000

№ 3248  
2209



a Gabriela, por sobre todo

a mis padres, por su ejemplo y apoyo invaluable

a mi familia (de sangre y política), por valorar mi trabajo aún sin comprenderlo. Y en especial a la generación del 2000: Floppy, Nati, Lorenzo Antonio, Mr. Magoo y Joaquín

a mis amigos: Jedy y Carina, El Gran Capitán, Joao y Daya, Careto, Huguito goleador y Josefina, Federico, Di Noia et al, Chorgui, los Peques, los Chulos y los muchachos de la 11.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Carlos Frascch, por la oportunidad que me brindó y por la dirección de mi trabajo

Al Dr Oscar Campetella, porque me “rescató” en un momento difícil y me alentó permanentemente con sus tiernos improperios

A todos mis compañeros del IIB (UNSAM), pasados y presentes. En especial a Alejandro, Iván, Marcelo, Carlitos, Laura, Fabiola, Tamara, Paula, Juan M., Julieta, Mayra, Roxana, Vanina, Denise, Fernán, Patricia, Ramiro, Ileana, Gabriel, Diego, Viviana, Susana, Cecilia, Juan U., El Colo y Guillermo.

A los Dres. Daniel Sánchez, Juan J. Cazzulo, Guido Pollevick, Susana Leguizamón, Fernando Pitossi, Patricia Sorroche (Htal. Italiano), Pablo Argibay, Rodolfo Ugalde y Oscar Burrone (ICGEB, Trieste)

Al casi Dr. Fabio Fraga

A todo el personal de apoyo técnico del IIB (UNSAM), por solucionar todos los problemas

Al CONICET, por el soporte económico

## ABREVIATURAS

Abs	absorbancia
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)
ADN	ácido desoxiribonucleico
APC	célula presentadora de antígenos
BSA	seroalbúmina bovina
cpm	cuentas por minuto
dpi	días post inmunización
DTT	ditiotreitól
E64	<i>trans</i> -epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidinio) butano
EDTA	ácido etilén-di-amino tetra-acético
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ev	endovenoso
g	aceleración de la gravedad
GPI	glicosilfosfatidil inositol
GST	glutación S-transferasa
ip	intraperitoneal
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
kDa	kilodalton
ld	leche descremada
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
Mr	masa molecular relativa
O.N.	overnight
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBMC	célula mononucleada de sangre periférica
PBS	buffer fosfato de sodio
PEG	polietilén glicol
pI	punto isoeléctrico
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pNPP	<i>para</i> -nitrofenilfosfato disódico
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
SAPA	Shed Acute Phase Antigen
SD	desviación estándar
SDS	dodecilsulfato de sodio
TBS	buffer Tris salino
TIA	ensayo de inhibición de la <i>trans</i> -sialidasa
TLCK	N $\alpha$ -p-tosil-L-lisina-clorometil cetona
Tris	tris-(hidroximetil) aminometano
UI	unidades internacionales

## RESUMEN

El protozoario *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, expresa en su superficie moléculas con actividad *trans*-sialidasa. Esta actividad novedosa constituye la única vía de captación de residuos de ácido siálico en el parásito. La adquisición de estos azúcares en glicoconjugados aceptores de superficie es indispensable para el reconocimiento y/o la infección de células de mamífero. La *trans*-sialidasa presente en el estadio infectivo de *T. cruzi* tiene una estructura quimérica, compuesta por una región responsable de la actividad catalítica y un dominio repetitivo altamente inmunogénico (SAPA). Esta proteína es también secretada espontáneamente a sangre del hospedador mamífero con propósitos inciertos.

En el transcurso de la presente Tesis, hemos realizado un análisis funcional del antígeno SAPA. Más precisamente, hemos evaluado el rol que podría estar cumpliendo este dominio en la interacción de la *trans*-sialidasa con el sistema inmune y en la biodisponibilidad de la molécula secretada.

Con este propósito, generamos y expresamos en bacterias distintas *trans*-sialidasas recombinantes conteniendo o no al dominio SAPA. Las mismas fueron administradas en ratones siguiendo distintos protocolos de inmunización a fin de analizar el curso de la respuesta inmune humoral contra uno y otro dominio. Por otro lado, realizamos un análisis farmacocinético de las distintas enzimas purificadas.

De tal manera, demostramos que la presencia del dominio SAPA cumpliría un rol dual durante la infección; en un primer momento, estabilizando la actividad *trans*-sialidasa en sangre, lo cual podría estar asociado al mecanismo de infección y/o a las alteraciones del sistema inmune que se verifican durante la fase aguda de la enfermedad. En etapas más tardías, la presencia del dominio SAPA induce la formación de anticuerpos capaces de neutralizar la actividad *trans*-sialidasa. La respuesta inmune inicial dirigida contra el dominio SAPA y/o la estabilización en sangre de la molécula secretada en su conformación nativa podrían estar mediando la difusión de la respuesta humoral hacia epitopes presentes en la región catalítica. De hecho, también demostramos que los anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa están dirigidos contra epitope/s discontinuo/s en la secuencia primaria de la enzima.

Estos resultados son coincidentes con los datos clínicos, en los que se observa una fase inicial de la infección en la que puede llegar a detectarse actividad *trans*-sialidasa en circulación (asociado a altos niveles de parasitemia) y una fase tardía caracterizada por la presencia de anticuerpos inhibitorios de dicha actividad (asociado a bajas o nulas parasitemias). La inducción de anticuerpos inhibitorios mediada por SAPA contradice el rol inmunodistractor propuesto para este antígeno repetitivo, y sugiere un mecanismo seleccionado en la interacción parásito-hospedador para el establecimiento de una infección crónica.

La estabilización de la actividad *trans*-sialidasa en sangre requiere de un número mínimo de unidades repetitivas y no depende de las secuencias no repetitivas presentes en el antígeno SAPA. El mecanismo molecular por el cual estas repeticiones aumentan la vida media de la *trans*-sialidasa en circulación no ha podido ser dilucidado, aunque no está mediado por una mayor resistencia a la degradación por proteasas séricas ni por unión de estas repeticiones a alguna proteína endógena. De manera interesante, el dominio SAPA es también capaz de estabilizar la conformación nativa de otra proteína en sangre, en absoluto relacionada a la *trans*-sialidasa, por lo cual se sugiere una posible aplicación biotecnológica.

Palabras clave:        *Trypanosoma cruzi*  
  
                              *Trans*-sialidasa  
  
                              Antígenos repetitivos  
  
                              Anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa  
  
                              farmacocinética



## ABSTRACT

The protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease, expresses *trans*-sialidase molecules on its surface. The acquisition of sialic acid residues in *T. cruzi* could only be accomplished by virtue of this novel enzymatic activity. The sialylation of surface glycoconjugates is required in order to interact with and/or to infect mammalian cells. The *trans*-sialidase displayed by the infective form of the parasite resembles a naturally occurring chimera, made up of a catalytic region and a highly immunogenic, repetitive domain (SAPA). This protein is also spontaneously shed into the bloodstream of the mammalian host with unknown purposes.

In the course of the present PhD work, we have performed a functional analysis of the antigen SAPA. In this respect, we have evaluated the possible role of this repetitive domain on the interaction between *trans*-sialidase and the immune system and on the bioavailability of the secreted molecule.

For this purpose, we have constructed and expressed in bacteria different recombinant *trans*-sialidases, either containing or lacking the repetitive extension. These enzymes were used to perform different immunization protocols in mice in order to analyze the humoral immune response against each region. On the other hand, we have analyzed the pharmacokinetics of the purified *trans*-sialidases.

We demonstrate that SAPA have a dual effect, first stabilizing the enzymatic activity in blood, which might be related to the infectious process and/or the modulation of the immune system. On a second step, the presence of SAPA repeats *in cis* promotes the generation of antibodies able to neutralize the *trans*-sialidase activity. The early immune response against SAPA and/or the stabilization in blood of the enzyme on its native conformation might be involved in the spreading of the humoral response towards epitopes present on the catalytic region. In fact, we also demonstrate that antibodies able to inhibit *trans*-sialidase activity recognize discontinuous epitope(s) within the enzymatic region.

These results are similar to those obtained *in vivo* during the course of infection. After an initial phase characterized by *trans*-sialidase activity in blood (and high levels of parasitemia) circulating antibodies able to inhibit *trans*-sialidase could be detected. The appearance of these antibodies correlate with the establishment of an indeterminate phase where parasites are barely detected in blood. At variance with present views, SAPA does not act as an immunodistractor but instead promote the generation of inhibitory antibodies. This mechanism could have been selected for in the parasite-host interaction to modulate the infection.

The stabilization of *trans*-sialidase activity in blood depends on a minimum number of repetitive units and not on non-repetitive sequences present in SAPA. The molecular basis of this stabilization are not yet understood. Even though, SAPA repeats do not protect the catalytic domain

against serum proteases neither mediate the binding to an endogenous molecule. Interestingly, SAPA repeats also increases the half-life in blood of a protein unrelated to *trans*-sialidase. Thus, its biotechnological potential could be envisaged.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*

*Trans*-sialidase

Repetitive Antigens

*Trans*-sialidase inhibitory antibodies

Pharmacokinetics

***INTROD***

## INTRODUCCION

### 1-Enfermedad de Chagas

#### 1.1- Descripción general de la enfermedad

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana (Chagas, 1909), es una de las parasitosis más importantes de Latinoamérica. Se calcula que existen actualmente 16 a 18 millones de personas infectadas y que otros 70 millones de personas viven en riesgo permanente de infección (WHO, 1997).

El agente etiológico de la enfermedad es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. La transmisión del parásito por sus vectores naturales es aún el mecanismo más importante de infección en las zonas endémicas. Los insectos hematófagos transmisores de *T. cruzi* pertenecen a los géneros *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius*, todos ellos incluidos en la familia Reduviidae (Usinger et al., 1966). La implementación del uso masivo de insecticidas y el mejoramiento sanitario y educacional de la población son herramientas valiosas para la interrupción del ciclo de infección peridomiciliario (WHO, 1997). Entre las vías de transmisión no vectoriales, las más importantes son la vía transplacentaria y las transfusiones sanguíneas (WHO, 1997).

#### 1.2- Etapas de la enfermedad

La enfermedad se inicia con una fase aguda, asociada a una sintomatología muy variada (fiebre, irritabilidad, cefaleas, mialgias y/o adenopatías) que dificulta su diagnóstico (WHO, 1997). Durante esta etapa, se verifica una gran proliferación intracelular del parásito y una parasitemia que puede ser elevada. Las manifestaciones clínicas más severas, incluso la muerte, ocurren principalmente en niños de hasta dos años de edad.

El tratamiento de la enfermedad sólo es efectivo durante esta etapa y se basa en la administración de nifurtimox o benznidazol. De todas maneras, la eficacia de este tratamiento apenas si alcanza a un 56% en pacientes con infección reciente (Sgambatti de Andrade et al., 1996) y a un 19% en pacientes crónicos (Viotti et al., 1994). Recientemente se reportaron alentadores resultados en ratones tratados con la droga D0870, un análogo inhibitorio de la biosíntesis de esteroides en el parásito (Urbina et al., 1996).

La evolución de la etapa aguda comprende un período de 50-70 días, luego del cual la respuesta inmune del paciente parece ser capaz de controlar la infección. La enfermedad entra entonces en una fase indeterminada, en la que desaparecen las manifestaciones clínicas y la parasitemia evidente. Durante esta etapa, sin embargo, rara vez ocurre la seronegativización del paciente (Sgambatti de Andrade et al., 1996).

Al cabo de 10 a 20 años, alrededor de un 35% de los pacientes chagásicos desarrollan manifestaciones clínicas características de la fase crónica de la enfermedad. El compromiso cardíaco es el más frecuente (27%), manifestado con arritmias, dilatación ventricular y/o hemibloqueo anterior izquierdo (Puigbó et al., 1977). El compromiso digestivo es el segundo en importancia (6%), y se caracteriza por hipertrofia y dilatación del tubo digestivo en la porción proximal y/o distal (WHO, 1997). La aparición de manifestaciones clínicas durante la fase crónica, en ausencia aparente de parásitos, ha llevado a sugerir un cierto componente autoinmune en el progreso de la enfermedad. Esta hipótesis continúa generando debate (para una revisión actualizada ver Masuda et al., 1998; Tarleton y Zhang, 1999; Kierszenbaum, 1999), máxime por las implicancias que tendría en cuanto a posibles estrategias terapéuticas.

Se ha descrito una prevalencia geográfica diferencial para los distintos cuadros patológicos de la fase crónica, así como de la gravedad de los mismos. Esto podría estar relacionado con la heterogeneidad entre las poblaciones humanas y/o con la gran variabilidad bioquímica y genética entre las cepas de parásitos presentes en las distintas regiones (Macedo y Pena, 1998). Esta diversidad refleja la estructura clonal dentro de la población de *T. cruzi*, con un mínimo o nulo intercambio genético entre los distintos linajes (Tibayrenc et al., 1986; Souto et al., 1996).

## **2- Biología de *T. cruzi***

### **2.1-Descripción general del parásito y sus diferentes estadios**

*T. cruzi* es un organismo del Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae, incluido en la sección estercoraria del género *Trypanosoma*. Se caracteriza por la presencia de un flagelo (que define su eje antero-posterior) y de una única mitocondria tubular conteniendo múltiples copias de ADN (kinetoplasto). El parásito presenta complejos cambios morfológicos y ultraestructurales que le permiten adaptarse a los distintos ambientes en los que alterna su ciclo de vida (figura 1). Así, pueden identificarse tres formas principales, llamadas estadios parasitarios (Brenner, 1973).

**Estadio epimastigote:** Presente en el tracto digestivo del insecto vector, replicativo y de morfología elongada (20-40  $\mu\text{m}$ ). No es infectivo para el hospedador mamífero. El kinetoplasto tiene localización posterior.

**Estadio amastigote:** De localización intracelular en el hospedador mamífero; mucho más chico que el epimastigote (2-4  $\mu\text{m}$ ), replicativo, esférico u ovalado y con flagelo inconspicuo.

**Estadio tripomastigote:** Presente en fluidos extracelulares del mamífero hospedador (llamado tripomastigote sanguíneo) y en la ampolla rectal del vector (llamado tripomastigote metacíclico). El tripomastigote es el único estadio no replicativo. Presenta morfología elongada y se caracteriza por un largo flagelo que emerge cercano al núcleo celular y permanece mayormente unido a la membrana plasmática.

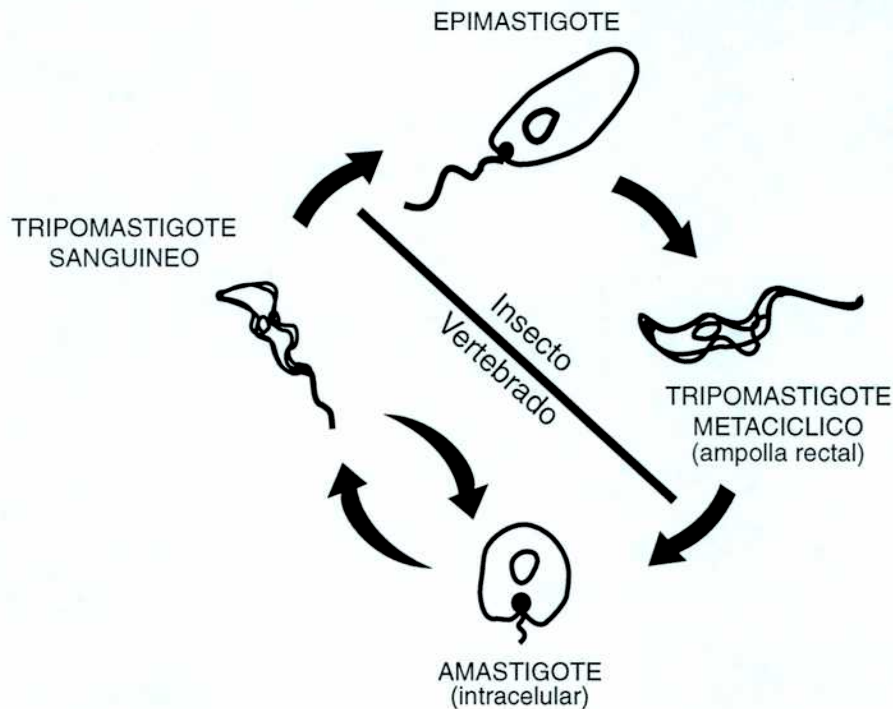


FIGURA 1: Ciclo de vida de *T. cruzi*.

## 2.2- Ciclo de vida de *T. cruzi*

La infección del hospedador mamífero ocurre por contaminación con la forma tripomastigote metacíclico (figura 1), que penetra a través de las mucosas y/o microescoriaciones de la piel. El parásito es transmitido en las deyecciones y en la orina del insecto hematófago después de la ingesta. Los tripomastigotes metacíclicos son capaces de invadir diferentes tipos de células nucleadas, incluyendo fibroblastos, células neuronales, miocitos, células epiteliales y endoteliales. También pueden invadir células fagocíticas, y de hecho los macrófagos residentes en tejido parecen ser unas de las primeras células infectadas *in vivo* (Burleigh y Andrews, 1995).

El mecanismo de invasión de células no fagocíticas es atípico, porque requiere del reclutamiento y fusión de lisosomas (formando una vacuola parasitófora) en el sitio de contacto del tripomastigote (Tardieux et al., 1992). La movilización de calcio intracelular parece ser indispensable para el rearrreglo lisosomal (Rodríguez et al., 1996; Villalta et al., 1998) y este reflujo sería disparado por un factor secretado por el propio tripomastigote (Burleigh y Andrews, 1995).

Una vez dentro de la célula, el parásito debe escapar de la vacuola parasitófora para poder multiplicarse en el citosol. La desestabilización y ruptura de esta organela estaría mediada por una proteína del tipo porina (Andrews et al., 1990; Hall, 1993), de acción semejante a las hemolisinas descritas en otros organismos patógenos como *Listeria monocytogenes* (Bielecki et al., 1990), *Shigella flexneri* (Sansonetti et al., 1986) y *Trichomonas vaginalis* (Fiori et al., 1996).

En el citoplasma celular, los tripomastigotes se diferencian a amastigotes (figura 1), los

cuales se multiplican por fisión binaria cada 12 horas (Brener, 1973). Luego de 4-5 días, algunos parásitos se diferencian nuevamente hacia la forma tripomastigote, los cuales son liberados a circulación, se diseminan e infectan nuevas células, reiniciando así el ciclo amastigote-tripomastigote (figura 1). También se describió una forma de propagación alternativa del parásito dentro del hospedador mamífero, mediada exclusivamente por el estadio amastigote (Mortara, 1991).

En el hematófago vector, la infección se produce por ingestión de tripomastigotes presentes en la sangre periférica de un vertebrado infectado. Los mismos pasan a lo largo del tracto digestivo del insecto, donde se diferencian a epimastigotes (figura 1), se multiplican y mantienen un estado permanente de infección. En la ampolla rectal, los epimastigotes se diferencian nuevamente a tripomastigotes metacíclicos (Brener, 1973).

### **3- *Trans*-sialidasa de *T. cruzi***

#### **3.1- Captación de ácido siálico en *T. cruzi***

El ácido *N*-acetil-neuramínico es el miembro más abundante de la familia de ácidos siálicos, azúcares carboxilados de nueve carbonos presentes mayormente en el extremo no reductor de los oligosacáridos sustituyentes en ciertas glicoproteínas y glicolípidos. El ácido siálico es un componente importante de la membrana de *T. cruzi*, sin embargo el parásito es incapaz de sintetizarlo a partir de precursores como *N*-acetil-[<sup>3</sup>H]-D-manosamina o [<sup>3</sup>H]-acetato (Schauer et al., 1983).

En 1985, se encontró que los epimastigotes en cultivo incorporaban ácido siálico en su superficie a partir de sialoglicoconjugados exógenos. Se propuso entonces un camino alternativo de incorporación de este azúcar en *T. cruzi*: una reacción de *trans*-glicosidación. Esta hipótesis implicaba la existencia de una actividad enzimática novedosa, catalizada por una *trans*-sialidasa (Previato et al., 1985). Esta actividad fue posteriormente confirmada en el estadio tripomastigote (Zingales et al., 1987) y descripta su expresión diferencial durante el ciclo de vida del parásito. Así, la actividad máxima se verifica en el estadio tripomastigote, es unas 7-15 veces menor en el estadio epimastigote y virtualmente nula en la forma amastigote (Cross y Takle, 1993).

Posteriormente, se clonaron genes codificantes para *trans*-sialidasa y se determinó la actividad enzimática en moléculas recombinantes (Uemura et al., 1992; Parodi et al., 1992). La actividad *trans*-sialidasa ha sido también descripta en los estadios de insecto de otros dos parásitos tripanosomátidos relacionados, *Trypanosoma brucei* (Pontes de Carvalho et al., 1993) y *Endotrypanum sp* (Medina-Acosta et al., 1994) y en el procariota patógeno *Corynebacterium diphtheriae* (Mattos-Guaraldi et al., 1998).

### 3.2- Propiedades enzimáticas

En ausencia de aceptores apropiados, la *trans*-sialidasa funciona como neuraminidasa/sialidasa, y de hecho fue originalmente descrita como tal (Pereira, 1983). Sin embargo, la *trans*-sialidasa difiere de las sialidasas/neuraminidasas conocidas debido a que es insensible a los inhibidores comunes de estas enzimas y a que transfiere el ácido siálico a un aceptor diferente del agua con gran eficiencia. En este sentido, su mecanismo catalítico recuerda más al de una sialil-transferasa de eucariotas superiores, aunque también se diferencia de ellas por su localización en superficie y en que no utiliza al CMP-siálico como dador (Paulson y Colley, 1989).

La diversidad de aceptores y dadores que pueden intervenir en la reacción de *trans*-sialidación, así como las propiedades cinéticas de la misma han sido claramente determinadas (Schenkman et al., 1991; Scudder et al., 1993; Ferrero-García et al., 1993).

### 3.3- Estructura génica

Una característica interesante y que podría estar reflejando la importancia de esta enzima en la supervivencia del parásito, es que la *trans*-sialidasa está codificada por una familia multigénica de alta complejidad (Campetella et al., 1992). Los genes que la integran, que en algunas cepas son más de 150, están dispersos en numerosos cromosomas y al menos una parte de ellos arreglados en tándem (Uemura et al., 1992; Egima et al., 1996; Cremona et al., 1999).

Esta superfamilia puede ser dividida en cuatro familias de acuerdo al análisis de sus secuencias aminoacídicas deducidas. El primer grupo es el único que codifica para proteínas con actividad enzimática demostrada, e involucra genes expresados tanto en los estadios epimastigote como tripomastigote. Las proteínas expresadas por estos últimos constan de dos regiones fácilmente identificables (Cazzulo y Frasch, 1992): una región C-terminal constituida en su mayor parte por bloques repetidos de aminoácidos, y una región N-terminal no repetitiva, responsable de la actividad catalítica (figura 2). El reciente modelado de la estructura de la *trans*-sialidasa ha permitido descomponer esta región N-terminal en dos dominios independientes, aunque estrechamente asociados (Buschiazzi et al., 2000). Un primer dominio responsable de la actividad catalítica en sí misma con alta similitud estructural y de secuencia a las sialidasas bacterianas, conectado por un segmento  $\alpha$ -hélice a un segundo dominio con características topológicas de una lectina vegetal (Buschiazzi et al., 2000). La secuencia aminoacídica deducida de esta región N-terminal predice la presencia de dos motivos consenso de unión a LDL ("Low Density Lipoprotein"), una secuencia característica de fibronectina (Fn3) y tres motivos aspártico homólogos a los encontrados en otras sialidasas (Pereira et al., 1991). Dentro de este grupo también se han identificado genes que codifican para moléculas inactivas (Cremona et al., 1995; Uemura et al., 1992).

La segunda familia involucra varios genes que codifican para proteínas de superficie llamadas genéricamente glicoproteínas de 85 kDa (GP85). Algunas de ellas tienen repeticiones de aminoácidos



en tándem en su extremo C-terminal, aunque distintas a las presentes en la anterior subfamilia (Schenkman et al., 1994a). La región N-terminal retiene dos motivos aspártico y el motivo Fn3. Todos estos genes codifican para productos inactivos que se definen por su inmunoreactividad con el anticuerpo monoclonal H1A10 (Abuin et al., 1989).

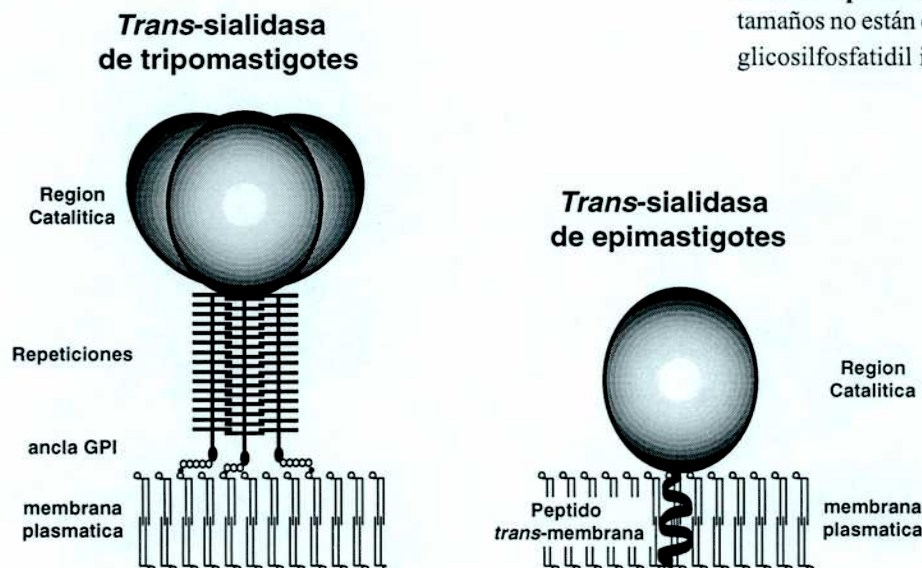
La tercer familia agrupa a los genes codificantes para las proteínas llamadas FL160, también presentes en superficie del parásito. Estas proteínas son inactivas como *trans*-sialidasa pero tienen la capacidad de unir componentes de la cascada del complemento (Norris et al., 1991). De manera interesante, anticuerpos dirigidos contra esta familia de moléculas muestran reacción cruzada con proteínas del sistema nervioso (Van Voorhis et al., 1993).

Los miembros del cuarto grupo también codifican para productos inactivos, que retienen el motivo Fn3 y se caracterizan por una región repetitiva en su extremo C-terminal idéntica a la del antígeno 13 (ver sección 4.4) (Campetella et al., 1992).

### 3.4- Estructura proteica y anclaje en superficie

#### 3.4.1- Trans-sialidasa de tripomastigotes

La *trans*-sialidasa de tripomastigotes fue purificada por cromatografía de afinidad usando anticuerpos inmovilizados dirigidos contra su porción repetitiva (Parodi et al., 1992; Uemura et al., 1992; Scudder et al., 1993). La proteína natural forma agregados multiméricos de una masa molecular relativa (Mr) de 400-600 kDa (Schenkman et al., 1992), mediados por interacciones no covalentes a nivel de su dominio repetitivo (figura 2) (Schenkman et al., 1994b). En SDS-PAGE corrido en



**FIGURA 2: Representación esquemática de las *trans*-sialidasas expresadas por los estadios epimastigote y tripomastigote. Los tamaños no están en escala. Abreviaturas: GPI, glicosilfosfatidil inositol.**

condiciones desnaturalizantes, la enzima migra como múltiples bandas que van desde los 100 hasta los 220 kDa. Estas bandas pueden variar en número y Mr, dependiendo de la cepa del parásito (Prioli et al., 1992). Sin embargo, todas las isoformas muestran la misma secuencia N-terminal madura (Pollevick et al., 1993), indicando que el polimorfismo se debe a diferentes modificaciones post-traduccionales (particularmente glicosilaciones) y/o a variaciones en el largo de su dominio repetitivo.

El clivaje del dominio repetitivo por acción controlada de proteasas inespecíficas monomeriza a la *trans*-sialidasa sin modificarle su actividad específica (Schenkman et al., 1994b). Más aún, la expresión en bacterias de un clon recombinante conteniendo solamente la región catalítica mostró una actividad específica similar a la de la *trans*-sialidasa natural (Campetella et al., 1994), confirmando que el dominio repetitivo no está involucrado en la catálisis.

La *trans*-sialidasa de tripomastigotes se encuentra unida a la superficie del parásito por medio de un anclaje de glicosilfosfatidil inositol (GPI; Agusti et al., 1997 y 1998) (figura 2). Este tipo de anclaje es recurrente en proteínas de superficie de tripanosomátidos (Ferguson, 1997). En *T. cruzi*, además de varios componentes de la superfamilia de *trans*-sialidasa (Schenkman et al., 1994a) otras moléculas como la Ssp-4 de amastigotes (Andrews et al., 1988), las glicoproteínas tipo mucina (Schenkman et al., 1993) y el lipopéptidofosfoglicano (de Lederkremer et al., 1991) se encuentran ancladas a superficie por esta vía. Todas ellas disponen de una secuencia de 15-30 aminoácidos altamente hidrofóbica en su extremo C-terminal que resulta delecionada durante la adición del ancla de GPI (Englund, 1993).

La acción de fosfolipasas-C de superficie, codificadas por el propio parásito, sobre moléculas ancladas por GPI parece ser una de las vías más importantes de secreción de componentes al medio extracelular en *T. cruzi* (Andrews et al., 1988). De hecho, varias de las proteínas mencionadas anteriormente pudieron ser detectadas en sangre de animales y/o pacientes infectados, circulando en forma libre o complejadas con anticuerpos (Andrews et al., 1988) y también en orina (Katzin et al., 1989; Umezawa et al., 1993). En el caso específico de la *trans*-sialidasa de tripomastigotes, ha podido ser detectada tanto en sobrenadante de cultivos como en citosol de células infectadas (Frevert et al., 1992) y en circulación de pacientes chagásicos (de Titto y Araujo, 1988).

Una vía alternativa de secreción de proteínas en *T. cruzi* es a través de vesículas que brotan de la superficie celular, más específicamente del bolsillo flagelar, por un mecanismo independiente de la acción de fosfolipasa-C (Gonçalves et al., 1991). Recientemente, se han caracterizado en detalle la cinética y los requerimientos para la liberación de estas vesículas por amastigotes de *T. cruzi* (Barros et al., 1996).

### 3.4.2- Trans-sialidasa de epimastigotes

La *trans*-sialidasa de epimastigotes también está presente en la superficie de *T. cruzi* (figura

2), pero no es liberada al medio extracelular espontáneamente, ni tampoco después del tratamiento del parásito con fosfolipasa-C exógena (Rosenberg et al., 1991; Chaves et al., 1993). A partir de su secuencia aminoacídica deducida, se ha propuesto que estaría anclada por un segmento *trans*-membrana (figura 2) (Briones et al., 1995). Otras diferencias notables con la *trans*-sialidasa de tripomastigotes es que la *trans*-sialidasa de epimastigotes es monomérica y no contiene el dominio repetitivo en su porción C-terminal (figura 2).

La homología de secuencia con la región no repetitiva de la *trans*-sialidasa de tripomastigotes asciende a un 82%. Coincidentemente, las propiedades catalíticas son muy semejantes a las de la enzima de tripomastigotes, e inclusive muestra inmunoreacción cruzada con ella a nivel de su región N-terminal (Chaves et al., 1993).

### 3.5- La *trans*-sialidasa en el hospedador mamífero.

Existen numerosas evidencias experimentales que sugieren fuertemente que la *trans*-sialidasa constituye un factor de virulencia de *T. cruzi* (para una revisión acerca de otros factores de virulencia en *T. cruzi* ver Hall y Joiner, 1993; Schenkman et al., 1994a). Sin embargo, la falta de inhibidores específicos y la presencia de múltiples genes codificantes han imposibilitado la demostración definitiva de este hecho.

Primeramente, la actividad es máxima en el estadio infectivo; si bien no pudo correlacionarse la virulencia de las distintas cepas con sus niveles de expresión de *trans*-sialidasa. Sin embargo, la reversión al fenotipo virulento de la cepa CL atenuada por pasajes seriados en cultivo coincide con la expresión aumentada de genes de la superfamilia de *trans*-sialidasa (Weston et al., 1999).

Por otro lado, los anticuerpos dirigidos contra epitopes sialilados presentes en la superficie del parásito (generados por acción de la *trans*-sialidasa) inhiben la invasión de células *in vitro* y previenen la infección en modelos animales (Yoshida et al., 1989; Schenkman et al., 1991; Ruiz et al., 1993; Franchin et al., 1997). Estos epitopes sialilados involucran a glicoproteínas ricas en residuos serina, treonina y prolina del tipo mucina (Schenkman et al., 1993), codificadas en familias multigénicas complejas (Di Noia et al., 1998). Coincidente con estos datos, la infección por *T. cruzi* es menos efectiva en líneas celulares deficientes en ácido siálico, y puede revertirse por la sialilación exógena de las mismas (Ming et al., 1993).

Otras evidencias sugieren que la *trans*-sialidasa podría funcionar como una molécula de interacción célula-célula, uniendo glicoconjugados de la superficie de la célula hospedadora (Schenkman et al., 1994a). Esta actividad de lectina ha sido demostrada para moléculas recombinantes, y resulta independiente de su actividad enzimática (Cremona et al., 1999). En este contexto, debe volver a mencionarse la conformación tridimensional predicha para la región globular de la *trans*-sialidasa, compatible con la existencia de un dominio tipo lectina (Buschiazzo et al., 2000).

Otras funciones importantes en las que podría estar implicada la superfamilia de moléculas de *trans*-sialidasa serían la resistencia a la lisis mediada por proteínas del complemento (Schenkman et al., 1994a), el escape del tripomastigote desde el fagolisosoma al citosol (Hall, 1993), la extravasación del parásito hacia los tejidos (Giordano et al., 1999) y la modulación del sistema inmune del hospedador (Leguizamón et al., 1999; Saavedra et al., 1999; Chuenkova y Pereira, 1995). Estos últimos autores, por ejemplo, demostraron que la virulencia de la infección se ve incrementada en animales preinoculados con *trans*-sialidasa purificada.

Por último, la inmunización de animales con distintas proteínas de la superfamilia de *trans*-sialidasa (o con el ADN codificante para algunos de estos genes) confiere protección frente al desafío con parásitos vivos (Santori et al., 1996; Wrightsman et al., 1994; Wizek et al., 1998a; Costa et al., 1998). La transferencia pasiva de anticuerpos y/o células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup> Tc1) dirigidas contra la región catalítica de distintos miembros de esta superfamilia también atenúa la parasitemia y la mortalidad en modelos animales de infección por *T. cruzi* (Villalta et al., 1996; Chuenkova y Pereira, 1995; Wizek et al., 1997; Millar et al., 1999).

El conjunto de estos resultados sugiere que la *trans*-sialidasa cumpliría un rol crucial en el establecimiento y/o mantenimiento de la infección.

### 3.6- Antigenicidad de la *trans*-sialidasa.

Durante la etapa aguda de la enfermedad, se verifica una fuerte respuesta humoral contra el dominio repetitivo C-terminal de la *trans*-sialidasa de tripomastigotes (llamado SAPA por Shed Acute Phase Antigen; Affranchino et al., 1989). Este dominio también es reconocido preferencialmente por sueros de conejos en la etapa aguda y ratones en cualquier momento de la infección (Affranchino et al., 1989; Leguizamón et al., 1991; Leguizamón et al., 1994a). Es por ello que se considera a SAPA como la porción inmunodominante de la molécula (Prioli et al., 1992; Cazzulo y Frasch, 1992). Sin embargo, los anticuerpos anti-SAPA no tienen efectos protectivos ni tampoco neutralizan la actividad *trans*-sialidasa sobre sustratos solubles (Parodi et al., 1992). Más aún, la transferencia pasiva de estos anticuerpos purificados o de sus fragmentos Fab' monovalentes produce un pequeño aumento en la parasitemia, en el número de nidos de parásitos en el bazo (Franchin et al., 1997) y en los índices de mortalidad del hospedador infectado (Chuenkova y Pereira, 1995).

En animales y humanos con infecciones crónicas, es posible encontrar anticuerpos dirigidos contra la región catalítica, capaces de neutralizar la actividad *trans*-sialidasa *in vitro* (Leguizamón et al., 1994a y b; Pereira-Chiocola et al., 1994). Estos anticuerpos sólo pueden detectarse por medio de un ensayo altamente específico (*Trans*-sialidase Inhibition Assay, TIA) en el cual se cuantifica la disminución de la actividad por la preincubación de la enzima con el suero de un individuo infectado (Leguizamón et al., 1994a y 1998). A diferencia de los anticuerpos dirigidos contra el dominio repetitivo, estos anticuerpos son capaces de inhibir la infección de células *in vitro*

(Chuenkova y Pereira, 1995) y de proteger a ratones *naïve* de la inoculación con una dosis letal de parásitos (Pereira-Chioccola et al., 1999). *In vivo*, la aparición de estos anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa se correlaciona con el control de la parasitemia por parte del hospedador (Leguizamón et al., 1994a).

En cuanto a la respuesta inmune celular, una gran proporción (78,6%) de muestras de células polimorfonucleadas obtenidas a partir de sangre periférica (PBMC) de pacientes chagásicos crónicos reconocen específicamente a la región catalítica de la *trans*-sialidasa (Ribeirão et al., 2000). Estas células fueron clasificadas mayoritariamente como CD4<sup>+</sup> Th1 y CD8<sup>+</sup> Tc1 (Ribeirão et al., 2000; Rodrigues et al., 1999) por su capacidad de secretar interferón  $\gamma$ . La importancia de estas células durante la infección es incierta, aunque debe mencionarse que *in vitro* son capaces de inhibir la replicación del parásito en cultivos de macrófagos y fibroblastos (Rodrigues et al., 1999) y que la liberación de interferón  $\gamma$  resulta crítica para la supervivencia del hospedador (Holscher et al., 1998). Otros miembros inactivos de la superfamilia de *trans*-sialidasa también fueron identificados como el blanco de acción de linfocitos citotóxicos durante la infección (Wizel et al., 1997 y 1998b; Low et al., 1998).

#### **4- Proteínas repetitivas**

##### **4.1- Características generales**

Las proteínas que contienen unidades repetitivas de aminoácidos tienen una distribución universal, aunque con mayor preponderancia en organismos eucariotas (Marcotte et al., 1999). La gran diversidad de dominios repetitivos y de proteínas que los contienen indica que estas estructuras sirven a una multiplicidad de propósitos. De hecho, algunas de estas repeticiones han sido involucradas en procesos tan dispares como la interacción proteína-proteína (Yan et al., 1998; Hu y Fearon, 1999), el incremento de la histéresis térmica (Graham et al., 1997) o la polimerización de los dominios no repetitivos asociados (Lindblom et al., 1999). En la mayoría de los casos, sin embargo, la naturaleza repetitiva de estos dominios no cumple una función estructural o físico-química evidente.

Los dominios repetitivos pueden ser divididos en dos grandes grupos de acuerdo a su secuencia primaria: los de “baja complejidad” que agrupan a corridas uniformes de uno o unos pocos aminoácidos estructuralmente relacionados y los de “alta complejidad”, cuya unidad repetitiva es en general más larga y más compleja. Los mecanismos moleculares de adquisición, mantenimiento y evolución genética de estas estructuras repetitivas han sido discutidos en detalle (para una revisión ver Colomer-Gould y Enea, 1990; Marcotte et al., 1999).

Aún teniendo en cuenta la amplísima diversidad mencionada anteriormente, los dominios repetitivos muestran algunas características comunes. En primer término, suele observarse un gran sesgo en su composición aminoacídica. En particular, los residuos hidrofóbicos y/o de grandes

grupos laterales (triptófano, fenilalanina, tirosina, leucina, cisteína, metionina, isoleucina) suelen estar poco representados mientras que los residuos pequeños y/o polares (prolina, glicina, serina, alanina, treonina, glutamato, glutamina, aspartato) son muy abundantes. Este sesgo en la estructura primaria se ve todavía más acentuado en los dominios repetitivos de “baja complejidad” (Marcotte et al., 1999; Schofield, 1991). Así, el análisis de un gran número de secuencias proteicas de *Plasmodium spp.* asentadas en el GenBank reveló una frecuencia significativamente menor de aminoácidos hidrofóbicos en los dominios repetitivos que en las porciones no repetitivas de esas mismas proteínas y/o de proteínas carentes de repeticiones (Verra y Hughes, 1999). Este sesgo en el uso de aminoácidos podría influenciar el grado de exposición de los dominios repetitivos en soluciones acuosas y su inmunogenicidad (Sercarz et al., 1993).

#### 4.2- Inmunogenicidad de los dominios repetitivos

La presencia de estructuras repetitivas en un antígeno correlaciona, en general, con un incremento en la inmunogenicidad del mismo. Esto ha sido demostrado originalmente para haptenos polimerizados artificialmente, poliacrilamida o carbohidratos bacterianos (Dintzis et al., 1976). Posteriormente, este concepto pudo ser ampliado para varios antígenos conteniendo tándems de repeticiones de aminoácidos u organizados en una conformación espacial rígida. Dentro de estos últimos, pueden incluirse ciertas proteínas virales, cuyo espaciamiento regular en la cápside les confiere el carácter “repetitivo” (Bachmann y Zinkernagel, 1997).

Más allá de su composición aminoacídica favorable y de la mayor densidad (a nivel molar) de los epitopes repetitivos con respecto a otros epitopes del inmunógeno, las bases moleculares de su inmunodominancia parecen depender de su capacidad de cross-linking sobre las moléculas de reconocimiento antigénico en la superficie de los linfocitos reactivos. El cross-linking de las inmunoglobulinas de membrana, por ejemplo, produce una mayor activación, medida a varios niveles, de los correspondientes linfocitos B (Snapper et al., 1995). Esto explicaría en parte la rápida respuesta humoral que se observa contra los constituyentes de la cápside de distintos virus (Bachmann et al., 1993; Szolomanyi-Tsuda et al., 1998); y no contra esos mismos componentes pero presentados de manera menos organizada (por ejemplo en la membrana de una célula infectada). La influencia de la organización antigénica en la respuesta inmune humoral pudo ser demostrada incluso para epitopes heterólogos expresados en cápsides virales (Fehr et al., 1998).

De manera análoga, la presencia de epitopes repetitivos también podría influenciar la respuesta inmune celular. Recientemente, se demostró que la presentación de antígenos repetitivos deficientemente procesados lleva al agregado de moléculas de MHC clase II en superficie de células dendríticas y macrófagos. Como consecuencia, se verifica una superactivación de los linfocitos T reactivos mediada por el cross-linking de sus receptores T de membrana (Rötzsche et al., 1997). La formación de agregados de moléculas de MHC-antígeno y receptores T potencia la liberación de señales coestimuladoras en la célula presentadora y la proliferación de las células T en respuesta a

esas señales (Rötzsche et al., 1997).

La polimerización artificial de un antígeno puede llevar incluso a la pérdida de tolerancia inmunológica y consecuente generación de respuestas B y/o T autoreactivas (Fehr et al., 1997; Farris et al., 1999; Falk et al., 2000).

#### 4.3- Proteínas repetitivas en agentes patógenos

Numerosos agentes patógenos expresan proteínas conteniendo epitopes repetitivos que son preferencialmente reconocidos por la respuesta inmune del hospedador infectado. Entre ellas, pueden mencionarse la familia de lipoproteínas de superficie de *Mycoplasma spp.* (Razin et al., 1998; Sachse et al., 2000), la proteína  $\alpha$ C de *Streptococcus* (Madoff et al., 1991), el antígeno MB de *Ureaplasma urealyticum* (Zheng et al., 1995), la proteína de 39 kDa de cubierta del virus de la viruela aviar (Boulanger et al., 1998) y múltiples proteínas de parásitos protozoarios (Duncan et al., 1991; Colomer-Gould y Enea, 1990; McLaughlin et al., 1987; Kemp et al., 1987; McKean et al., 1997; Ibáñez et al., 1988).

Sin embargo, muchas de las respuestas inmunes dirigidas contra dominios repetitivos no resultan protectoras (Baughn et al., 1996; Kemp et al., 1987). Este hecho sugiere que la presentación de este tipo de estructuras podría constituir una estrategia de “inmunodistracción”, en favor de otras moléculas directamente implicadas en la virulencia del agente infeccioso (Kemp et al., 1987). Esta estrategia de inmunodistracción podría tener incluso un segundo nivel de complejidad. Las mínimas variaciones de secuencia que se observan normalmente entre las distintas unidades repetitivas de un mismo antígeno podría generar distintos epitopes de inmunoreactividad cruzada (Schofield, 1991). Esto podría interferir en la maduración de la afinidad de los anticuerpos y/o receptores T o inhibir la acción de células de memoria, de manera tal de disminuir la eficiencia de la respuesta inmune (Bertoletti et al., 1994). En este caso, el cuadro sería comparable a la expresión simultánea de múltiples proteínas levemente variables, tal cual lo demostrado para numerosos parásitos protozoarios (Plebansky et al., 1999; Millar et al., 1999), bacterias (Wise, 1993) y virus (Klenerman y Zinkernagel, 1998).

#### 4.4- Antígenos repetitivos de *T. cruzi*

En el caso de *T. cruzi* muchos de los antígenos inmunodominantes clonados hasta el momento contienen estructuras internas repetitivas. En nuestro laboratorio, por ejemplo, se han identificado diferentes antígenos repetitivos a través del rastreo de una biblioteca genómica de expresión de la cepa Miranda/76, construida en el bacteriófago  $\lambda$ gt11 (Ibáñez et al., 1987 y 1988). A cada clon se lo identificó originalmente con un número, excepto el clon N°7 al que más tarde se lo rebautizó SAPA (ver punto 3.6). La secuencia aminoacídica de estos tándems de repeticiones resultó ser casi idéntica en distintas cepas del parásito, sugiriendo una gran conservación evolutiva. Así, los antígenos 1/

FRA/JL7/H49 (Ibáñez et al., 1988; Lafaille et al., 1989; Levin et al., 1989; Cotrim et al., 1995); los antígenos 2/TCR39/B13 (Ibáñez et al., 1988; Hoft et al., 1989; Gruber y Zingales, 1993); los antígenos 13/TcD (Ibáñez et al., 1988; Burns et al., 1992); los antígenos 30/CRA/JL8/TCR 27 (Ibáñez et al., 1988; Lafaille et al., 1989; Levin et al., 1989; Hoft et al., 1989) y los antígenos 36/K1-7 (Ibáñez et al., 1988; Kerner et al., 1991); resultan altamente homólogos.

Estos antígenos resultan útiles para el diagnóstico de la enfermedad ya que son detectados en un alto porcentaje por sueros de pacientes chagásicos de diferentes regiones geográficas (Ibáñez et al., 1987). Algunos de ellos pueden incluso ser utilizados como marcadores serológicos de la etapa aguda (SAPA) o crónica (antígenos 1, 2 y 30) de la enfermedad (Ibáñez et al., 1988; Affranchino et al., 1989). Por todo esto, algunos de estos antígenos se utilizan en kits de diagnóstico (Vergara et al., 1991; Pastini et al., 1994) o acoplados a microplacas de ELISA para el rastreo masivo de bancos de sangre (Houghton et al., 2000).

A continuación, se detallan algunas características de los antígenos repetitivos empleados durante el presente trabajo de Tesis (ver también tabla 1).

### ***Antígeno 1***

Estudios de microscopía electrónica demostraron que este antígeno (que se encuentra naturalmente asociado a una proteína de 300 kDa) se localiza bajo la membrana, en la región de unión del flagelo con el cuerpo celular de todos los estadíos del parásito (Souto-Padrón et al., 1989; Cotrim et al., 1995). Si bien se desconoce su función, este antígeno presenta características estructurales descriptas en proteínas asociadas al citoesqueleto (Cotrim et al., 1995).

### ***Antígeno 2***

Se halla normalmente localizado en la superficie de tripomastigotes, unido a una proteína de alto peso molecular (Buschiazzi et al., 1992). No se secreta al medio extracelular. Su dominio repetitivo consta de 18 unidades dispuestas en tándem, de secuencia PSPFGQAAAGDK.

### ***Antígeno 13:***

Se encuentra naturalmente asociado a una proteína de 260 kDa expresada en todos los estadíos del parásito (Burns et al., 1992). Se localiza mayormente en la superficie de las formas amastigote y tripomastigote y parece ser secretado a la zona del bolsillo flagelar (Souto-Padrón et al., 1989). De hecho, estudios de microscopía electrónica realizados con anticuerpos policlonales dirigidos contra este antígeno revelaron inmunoreactividad en el sobrenadante. La secuencia (parcial) del dominio N-terminal de la proteína naturalmente asociada a este antígeno permitió ubicarla dentro de la superfamilia de moléculas de *trans*-sialidasa (ver punto 3.3).

### ***Antígeno 30:***

Estudios de microscopía electrónica y ensayos con anticuerpos unidos a partículas de oro



coloidal, revelaron una expresión y localización similar a la descrita para el antígeno 1, aunque la inmunoreactividad se extendió a ciertas zonas citoplasmáticas (Souto-Padrón et al., 1989; Lafaille et al., 1989). Este antígeno se encuentra normalmente asociado a una proteína de 220 kDa de función desconocida, y consta de 13 unidades repetitivas de secuencia EKQKAAEATKVAEA.

### **Antígeno 36:**

La proteína de 85 kDa que contiene al antígeno 36 tiene también localización intracelular pero, en este caso, sobre el cuerpo basal de los estadios tripomastigote y amastigote. Muestra cierta homología de secuencia con las repeticiones presentes en una proteína asociada a microtúbulos del tripanosoma africano *T. brucei* (Kerner et al., 1991). Recientemente, se ha reportado cierta homología a nivel de DNA entre el antígeno 36 y la ribonucleoproteína humana Ro/SSA de 52 kDa (Winkler et al., 1998). Esta homología resulta particularmente interesante si se tiene en cuenta que Ro/SSA es un autoantígeno en ciertas patologías autoinmunes (Dorner et al., 1996) y que los autoanticuerpos dirigidos contra ella inducen anomalías en el ritmo cardíaco (Miranda et al., 1998).

<b>antigeno</b>	<b>estadio</b>	<b>localizacion</b>	<b>secrecion</b>
1	A/E/T	IC	NO
2	T	SUP	NO
SAPA	T	SUP	SI
13	A/E/T	SUP	SI
30	A/E/T	IC	NO
36	A/T	IC	NO

**TABLA 1: Algunas propiedades de los antígenos repetitivos utilizados durante el presente trabajo de Tesis.** Se indica el estadio de expresión (A, amastigote; E, epimastigote; T, tripomastigote), su localización en el parásito (IC, intracelular; SUP, en superficie) y su secreción o no al medio extracelular.

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La diferenciación de *T. cruzi* desde el estadio epimastigote hacia el estadio tripomastigote involucra un cambio en el patrón de moléculas con actividad *trans*-sialidasa expresadas. Las moléculas expresadas en uno y otro caso son altamente homólogas, están localizadas en superficie, expuestas al medio extracelular y sólo difieren por la presencia en *cis* del dominio SAPA en la *trans*-sialidasa de tripomastigotes (Affranchino et al., 1989) (figura 2). Este dominio SAPA contiene un número variable de repeticiones en tándem seguidas por una secuencia de anclaje por GPI que posibilita una rápida secreción de la molécula con propósitos no determinados (Schenkman et al., 1994a).

Este cambio en el patrón de expresión no puede explicarse en términos mecanísticos, ya que ambos tipos de moléculas muestran las mismas características enzimáticas (Chaves et al., 1993; Campetella et al., 1994; Schenkman et al., 1994a).

Por otro lado, la presencia en una misma molécula de un factor de virulencia y un dominio extremadamente inmunogénico sugiere la existencia de un mecanismo de distracción inmunológica, similar a lo reportado para otras proteínas repetitivas (Kemp et al., 1987). Esta hipótesis resulta particularmente apropiada en el caso de la *trans*-sialidasa por una serie de evidencias indirectas: A) Tal como se mencionó, el dominio SAPA es efectivamente muy inmunogénico *in vivo* (Affranchino et al., 1989). B) En modelos animales de infección, los anticuerpos anti-SAPA tienen una cinética de inducción más rápida que los anticuerpos inhibitorios de la actividad *trans*-sialidasa (Leguizamón et al., 1994a). C) La inducción de estos anticuerpos inhibitorios coincide con el control de la parasitemia en modelos de infección en ratones (Leguizamón et al., 1994a, Pereira-Chiocola et al., 1994). D) Los anticuerpos anti-SAPA no afectan la reacción de *trans*-sialidación ni tienen mayor relevancia para el control del parásito *in vivo* (Parodi et al., 1992; Franchin et al., 1997). E) Este modelo de inmunodistracción ha sido verificado para una molécula inactiva perteneciente a la superfamilia de la *trans*-sialidasa (TSA-1), conteniendo un dominio repetitivo en *cis* no relacionado a SAPA (Wrightsman et al., 1994).

En este contexto teórico, se decidió emprender una línea de investigación que ayudara a comprender la funcionalidad del dominio SAPA en el hospedador mamífero. Más específicamente, los objetivos propuestos fueron los siguientes:

1-Estudiar la función del dominio SAPA en el curso de la respuesta inmune contra la *trans*-sialidasa y evaluar un posible efecto de distracción inmunológica.

2-Analizar la importancia del dominio SAPA en la *trans*-sialidasa secretada a sangre por el parásito.

3-Realizar un análisis comparativo del dominio SAPA con otros dominios repetitivos presentes en *T. cruzi*.

Parte de los resultados obtenidos durante el presente trabajo de Tesis fueron publicados en los siguientes artículos:

**The repetitive domain of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain.** Buscaglia C.A., Campetella O.E, Leguizamón M.S., and Frasch A.C.C. *The Journal of Infectious Diseases* 177, 431-6 (1998)

**Tandem amino acid repeats from *Trypanosoma cruzi* shed antigens increase the half-life of proteins in blood.** Buscaglia C.A., Alfonso J., Campetella O.E, and Frasch A.C.C. *Blood* 93, 2025-32 (1999)

Además, durante este período se publicaron los siguientes artículos no relacionados al tema de Tesis:

**A putative pyruvate dehydrogenase  $\alpha$  subunit gene from *Trypanosoma cruzi*.** Buscaglia C.A., Pollevick G.D., Lorca M., Veloso C., Frasch A.C.C., and Sánchez D.O. *Biochimica et Biophysica Acta* 1309, 53-7 (1996)

**Regulation of ovarian follicle differentiation in gonadotropin-stimulated rats.** Andreu C. V., Buscaglia C. A., Parborell F., Stein P., and Tesone M. *Endocrine* 6, 145-51 (1997)

***MATERIALES  
Y METODOS***

## MATERIALES Y METODOS

### 1- Parásitos

La cepa RA de *T. cruzi* fue originalmente aislada de un paciente en fase aguda de la enfermedad (González Cappa et al., 1981). Los tripomastigotes fueron obtenidos a partir de monocapas de células Vero de acuerdo a lo descrito (Zingales et al., 1985).

### 2- Bacterias

Se utilizaron bacterias *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac(F' proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15) o DH5 $\alpha$  F' Iq (supE44 Dlac U169 (Ø80 lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyr A96 thi-1 relA1 F' Iq) para la producción de ADN y proteínas recombinantes. Las bacterias se crecieron de rutina en medio LB (Sambrook et al., 1989). Para potenciar la recuperación de bacterias luego de la transformación se las recuperó por 45 minutos en medio SOC (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Mg(SO<sub>4</sub>), 20 mM glucosa).

### 3- Acidos nucleicos

#### 3.1- Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN fueron resueltos en geles de agarosa horizontales de distintos porcentajes (0,8% - 2%) de acuerdo a su tamaño. El buffer de electroforesis utilizado fue 90 mM Tris-borato, 90 mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA pH8.3 suplementado con bromuro de etidio (0.5 µg/ml final).

#### 3.2- Digestiones de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN se hicieron con endonucleasas de restricción comerciales, siguiendo las indicaciones del fabricante (New England Biolabs). En general, se utilizaron 5 unidades enzimáticas/µg de ADN durante 2 – 12 horas.

#### 3.3- Defosforilación de ADN

La remoción del grupo fosfato presente en el extremo 5' de la hebra de ADN se realizó por tratamiento con fosfatasa de intestino de ternero (BCIP, New England Biolabs) a una concentración final de 0.1 unidades enzimáticas/µg de ADN durante 2 horas a 37°C.

### 3.4- Plásmidos

Para clonado y amplificación de ADN se utilizaron distintos vectores comerciales: pUC18 y 19 (New England Biolabs), pBluescriptKSII (Stratagene) o pGEM-T easy (Promega). Los plásmidos de expresión utilizados fueron pTrcHis (Invitrogen), pGEX y pKK 223 (Pharmacia).

### 3.5- Aislamiento y purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se obtuvo por lisis alcalina y precipitación con alcohol y se lo purificó según técnicas tradicionales (Sambrook et al., 1989).

### 3.6- Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Luego de resolver por electroforesis los fragmentos de ADN, se escindió la banda de agarosa conteniendo el fragmento de interés y se lo purificó por el método de GENE CLEAN® (Bio 101 Inc.) o QUIAEX® (Qiagen) siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Ambos métodos se basan en la adsorción de ADN a vidrio en presencia de altas concentraciones salinas.

### 3.7- Ligación de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen final de 10 µl con cantidades variables de la enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs) de acuerdo al tipo de extremos de las moléculas de ADN a unir. Por lo general, las reacciones se incubaron O.N. a 16°C para extremos cohesivos y a 25°C para extremos romos.

### 3.8- Transformación de bacterias

Se usaron bacterias *E. coli* de las cepas mencionadas (punto 2), competentes para la captación de ADN por el método de Cl<sub>2</sub>Ca (Inoue et al., 1990). Alternativamente, se las electroporó en cubetas de 2 mm de diámetro bajo las condiciones usuales para *E. coli* (2,500 V, 25 µF y 200 Ohms) en un aparato GenePulser (Bio-Rad Laboratories).

### 3.9- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las amplificaciones de ADN por el método de PCR se realizaron en presencia de 0.20 mM de cada uno de los 4 deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 200 ng de cada oligonucleótido (Genset o Gibco BRL), 2 unidades enzimáticas de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL) y aproximadamente 1 ng de ADN molde previamente linealizado por restricción.

La secuencia nucleotídica (expresada desde el extremo 5´al 3´) de los oligonucleótidos mencionados en el presente trabajo de Tesis es:

1= CGC GGA TCC ATG CTG GCA CCC GGA TCG AGC CGA GTT GAG CTG

2= ACT GTG GGA TCC ACC ACA CG

3= GGG GCA GAA TCA ACG GTA TCG

4= CGG GAA TTC ACT CGT GTC GCT GCT GCT

5= CCG GAA TTC AAT CGG GCA AAA TCA AAA C

La presencia de algún sitio de restricción dentro de la secuencia del oligonucleótido se indica mediante el subrayado. Todos estos oligonucleótidos fueron diseñados con ayuda del programa OLIGO 4.0 (National Biosciences Inc.).

### 3.10- Secuenciación de ADN

Se siguió el método de terminación de cadena (Sanger et al., 1977) con el kit comercial Sequenase versión 2.0 (US Biochemical corp.). Alternativamente se utilizó el método de terminadores fluorescentes con el kit ABIPRISM (Perkin Elmer) y los fragmentos obtenidos se resolvieron en un secuenciador automático ABI377 (Perkin Elmer). Los datos de secuencia se analizaron con los programas DNASTrider, MacGene, y el paquete de análisis de secuencias LaserGene (DNASTAR Inc.).

## 4- **Proteínas**

### 4.1- Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las muestras de proteínas se calentaron a 100°C durante 3 minutos en presencia de 0.1% SDS y 1 mM DTT como agente reductor y se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida de distintos porcentajes (7,5 – 12,5%) de acuerdo al

rango de resolución deseado (Sambrook et al., 1989). Para visualizar las bandas proteicas de los geles, se realizó una tinción por Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma), nitrato de plata o Sypro Orange (Bio-Rad Laboratories) (Sambrook et al., 1989). La estimación de las Mr se realizó por referencia a un patrón corrido en paralelo.

#### 4.2 Purificación de *trans*-sialidasa natural

La *trans*-sialidasa natural se obtuvo a partir de sobrenadante de tripomastigotes en cultivo de la cepa RA. El sobrenadante se precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50% de saturación, se resuspendió en TBS y se filtró por una membrana de  $0.2\ \mu\text{m}$  (Nalgene). La muestra se purificó por cromatografía de afinidad en columnas de anticuerpo policlonal anti-SAPA inmovilizado, de acuerdo a lo descrito (Pollevick et al., 1993).

#### 4.3- Producción y purificación de *trans*-sialidasas recombinantes

Cultivos de 10 ml crecidos O.N. a  $37^\circ\text{C}$  con agitación (250 rpm) en LB + ampicilina  $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$  se usaron como inóculo diluyendo 1:50 en el mismo medio. Luego de 3 horas de crecimiento a  $37^\circ\text{C}$  con agitación ( $\text{Abs}_{600\text{nm}}=0.6-0.8$ ), se equilibró el cultivo a  $28^\circ\text{C}$  y se disparó la inducción por agregado de  $0.5\ \text{mM}$  isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG, Gibco BRL). El cultivo se continuó por tres horas más, las células se cosecharon por centrifugación a  $4^\circ\text{C}$  y los pellets se conservaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso. Los pellets de bacterias fueron resuspendidos en buffer de lisis:  $40\ \text{mM}$  Tris-HCl pH8,  $30\ \text{mM}$  NaCl,  $0.5\%$  (v/v) Tritón X-100,  $1\ \text{mM}$  fluoruro de fenilmetilsufonilo (PMSF, Sigma). Una vez resuspendido, se agregó lisozima de clara de huevo (Sigma)  $0.5\ \text{mg}/\text{ml}$  y se incubó durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Se adicionó deoxiribonucleasa I (DNAsa, Sigma)  $0.2\ \text{mg}/\text{ml}$  y se incubó hasta desaparición de viscosidad. Esta suspensión se centrifugó a  $10,000\ \text{g}$  por 45 minutos y se descartó el pellet. Luego de agregar NaCl hasta  $0.5\ \text{M}$  final y pasarla por un filtro de  $0.2\ \mu\text{m}$ , la muestra fue sometida a una cromatografía de afinidad (Porath y Olin, 1983) a través de una columna de ácido iminodiacético (IMAC, Pharmacia), previamente cargada con una solución  $0.3\ \text{M}$   $\text{Cl}_2\text{Ni}$  y equilibrada en buffer  $20\ \text{mM}$  Tris-HCl pH8,  $0.5\ \text{M}$  NaCl,  $5\ \text{mM}$  imidazol,  $1\ \text{mM}$  PMSF. Se mantuvo un flujo constante de corrida de  $2-4\ \text{ml}/\text{min}$ . Luego de lavar con el mismo buffer se eluyó aplicando un gradiente continuo de imidazol ( $0-500\ \text{mM}$ ) en el mismo buffer (Porath y Olin, 1983). El pico de proteína (monitoreado por  $\text{Abs}_{280\text{nm}}$ ) se concentró por centrifugación en vacío o por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50% de saturación. En ambos casos, las muestras fueron desaladas a través de columnas preempaquetadas de Sephadex G-50 (NAP-10, Pharmacia) equilibradas en TBS suplementado con  $5\ \text{mM}$  EDTA pH8 y guardadas a  $4^\circ\text{C}$ .



#### 4.4- Ensayo de actividad *trans*-sialidasa

La actividad de *trans*-sialidasa se midió usando 12  $\mu$ M [galactosa- $^{14}$ C]-lactosa (54 mCi/mmol; Amersham) como sustrato aceptor de ácido siálico, y 1 mM sialil-lactosa (*N*-acetil-neuramin lactosa, una mezcla de 72% y 28% de isómeros  $\alpha$ 2-3 y  $\alpha$ 2-6, respectivamente; Sigma), en un volumen final de 30  $\mu$ l. La reacción se efectuó en TBS a 20°C por 30 minutos y se detuvo por dilución, agregando 1 ml de agua destilada. Al producto de reacción se agregó una suspensión densa (0.1 ml) de resina de intercambio aniónico QAE-Sephadex en agua destilada. Luego de lavar exhaustivamente con agua, el producto se eluyó con 0.8 ml de una solución 0.5 M NaCl, se agregaron 5 ml de líquido centelleador Optiphase Hisafe 3 (Wallac) y se contó en un contador Beckman. Una unidad enzimática de *trans*-sialidasa se definió como la cantidad de enzima capaz de catalizar la transferencia de 10 nmoles de ácido siálico por minuto, en estas condiciones.

#### 4.5- Análisis de movilidad de *trans*-sialidasa en columnas de filtración molecular

2 columnas de tamizado molecular (Superosa 12-Superosa 6, Pharmacia), fueron conectadas en serie y equilibradas en TBS. La muestra de 500  $\mu$ l de proteína TS-SAPA (0.2 mg/ml en TBS) se inyectó y corrió a 0.5 ml/min. Las fracciones de elución recogidas fueron de 1.25 ml. De cada una de ellas se tomaron alícuotas de 5 y 200  $\mu$ l para determinación de la actividad *trans*-sialidasa e inmunoreactividad con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio SAPA, respectivamente (ver punto 6.6). Los estándares de Mr (Sigma), se corrieron antes y después de la muestra de TS-SAPA, obteniéndose en ambos casos perfiles de elución semejantes.

#### 4.6- Producción y purificación de glutatión S-transferasas (GST) quiméricas

Un cultivo (50 ml) crecido O.N. en LB + ampicilina (100  $\mu$ g/ml) de bacterias transformadas con el plásmido indicado se usó como inóculo, diluyéndolo 1:10 en el mismo medio. Luego de 90 minutos de crecimiento a 37°C con agitación ( $Abs_{600nm}=0.6-0.8$ ), se indujo la expresión de proteínas recombinantes por agregado de 0.5 mM IPTG. El cultivo se continuó por cuatro horas, las células se cosecharon por centrifugación a 4°C y los pellets se conservaron a -80°C hasta su uso. Estos pellets fueron resuspendidos en buffer de lisis: 40 mM Tris-HCl pH8, 30 mM NaCl, 1% (v/v) Tritón X-100, 1 mM PMSF. Una vez resuspendidos, se les agregó lisozima (0.5 mg/ml) y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Se adicionó DNasa I (0.2 mg/ml) y se incubó hasta desaparición de viscosidad. Esta suspensión se centrifugó a 10,000 g durante 45 minutos y se descartó el pellet. El sobrenadante se filtró por una membrana de 0.2  $\mu$ m y se sembró en una columna de 2 ml de glutatión-agarosa (Sigma) preequilibrada en PBS 1% (v/v) Tritón X-100. La proteína retenida se lavó exhaustivamente con PBS y se eluyó en 5 ml de PBS suplementado con 10 mM glutatión reducido (Sigma) (Smith y Johnson, 1988). El pico de proteína se desaló a través de columnas NAP-10

equilibradas en PBS y se guardó en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.7- Determinación de actividad glutatión S-transferasa

Diluciones seriadas (0.5 ng/ml-5  $\mu\text{g/ml}$ ) de las GST quiméricas purificadas se incubaron en 2 ml de buffer fosfato 0.1 M pH6.5 conteniendo 2.5 mM glutatión reducido y 0.5 mM 1-cloro-2,4 dinitrobenceno (Sigma) y se midió la cinética de Abs<sub>340nm</sub> en un espectrofotómetro de acuerdo a lo descrito (Habig et al., 1974). Las actividades obtenidas se expresaron en miliunidades de absorbancia x (pmol de proteína x minuto)<sup>-1</sup>.

#### 4.8- Preparación de hidróxido de aluminio (alúmina) y adsorción de proteínas

Se hidrató 1 gramo de sulfato de aluminio y potasio ( $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ ; Sigma) en 10 ml de agua destilada por 30 minutos y se descartó el sobrenadante. En agitación constante para evitar la formación de precipitados, se agregó al pellet 22.8 ml de una solución 0.25 N NaOH, se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos y se centrifugó a 500 g por 10 minutos. El pellet (aproximadamente 4-6 gramos de alúmina,  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) se lavó dos veces en 50 ml de agua destilada y se guardó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de usar en 1 ml de 150 mM Tris-HCl pH 7.6 como conservante.

Para la adsorción de proteínas, 100  $\mu\text{l}$  de esta suspensión se mezclaron con la proteína de interés (50–200  $\mu\text{g}$ ) diluída en TBS y se incubó a temperatura ambiente por 20-30 minutos con agitación ocasional (Rinella et al., 1996). Se centrifugó a 500 g por 10 minutos y se descartó el sobrenadante (o bien se le hizo una segunda ronda de adsorción). El pellet se lavó tres veces con 1 ml de TBS y se resuspendió en un volumen apropiado de PBS para su inyección en animales.

## 5- Experimentos con animales

### 5.1- Ratones

Se utilizaron ratones de 60-90 días de edad. Las cepas endocriadas C3H/HeN y CF1 fueron mantenidas en las instalaciones de nuestro Instituto. El trabajo con ratones de la cepa exocriada Rockland se realizó en el bioterio del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, UBA.

### 5.2- Vías de inoculación

Los ratones fueron inyectados en forma endovenosa (ev), a través del plexo venoso retro-ocular con proteínas diluídas en un máximo de 150  $\mu\text{l}$  de PBS, sin adyuvante. La inmunización de

proteínas emulsionadas en alúmina se realizó por vía intraperitoneal (ip) en un volumen de 0.2 ml. Los antisueros policlonales se generaron por inoculación subcutánea de conejos y/o ratones siguiendo esquemas de inmunización descriptos (Harlow y Lane, 1988) de tres dosis sucesivas del inmunógeno previamente emulsionado en adyuvante de Freund (Sigma). Las dosis utilizadas fueron de 200, 50 y 50 µg en el caso de los conejos y de 25, 10 y 10 µg en el caso de los ratones.

### 5.3- Colección de muestras de sangre y preparación de suero

Las muestras de sangre (20-40 µl) se obtuvieron a través de un corte en la punta de la cola de los ratones y fueron colectadas en capilares heparinizados para la posterior preparación de suero por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos. Para la exsanguinación total de los animales se utilizó tanto la punción cardíaca como el plexo venoso retro-ocular. En este caso, la sangre se incubó durante 30 minutos a 37°C para formación y retracción del coágulo y luego se centrifugó durante 30 minutos a 3000 rpm.

### 5.4- Ensayos farmacocinéticos

Para todos los ensayos farmacocinéticos se usaron ratones de 60-90 días de un peso aproximado a los 20 gramos, con disponibilidad de comida y agua *ad libitum*. El análisis empleado fue del tipo no compartimentalizado, desarrollado para el estudio de la cinética de desaparición de trazadores radiactivos en modelos animales (Griffiths, 1993). El mismo asume que el influjo del trazador se da en una única dosis y en un volumen despreciable con respecto al del compartimiento de inoculación (en este caso, el volumen de administración no sobrepasó los 150 µl, correspondiente a un 3.5-5% del volumen de sangre de un ratón del tamaño utilizado) Así mismo, se asumió que el influjo del trazador no alteró las propiedades de intercambio de moléculas del sistema (presión intraglomerular, permeabilidad vascular, etc). Teniendo en cuenta estas consideraciones, el coeficiente de extracción (E) del trazador se calculó según la fórmula (Griffiths, 1993)

$$E = (C_0 - C_t) \times (C_0)^{-1}$$

donde  $C_0$  y  $C_t$  refieren a la concentración del trazador en el momento inicial (30 minutos post-inyección) y en el momento de toma de la muestra, respectivamente. El valor de  $C_0$  no se calculó de acuerdo a la concentración del trazador en la muestra inyectada debido a las posibles pérdidas durante la inoculación y/o durante el rápido equilibrio inicial entre el espacio intra y extravascular (Zuckier et al., 1989; Kim et al., 1994a). Los datos obtenidos fueron transformados a persistencia porcentual del trazador de acuerdo a la fórmula

$$\text{Persistencia porcentual} = (1 - E) \times 100$$

### 5.5- Farmacocinética de *trans*-sialidasas recombinantes

Los animales fueron inyectados por vía ev con 75-100 pmoles de las distintas *trans*-sialidasas en PBS. A los tiempos post-inyección señalados, se determinó la actividad *trans*-sialidasa remanente en muestras de 5 µl de suero, tomando como C<sub>0</sub> la actividad medida para ese mismo animal a los 30 minutos post-inyección. En todos los casos, los valores fueron corregidos por sustracción de la media aritmética de los valores determinados para dos sueros de ratones *naïve* obtenidos y ensayados en paralelo. Para el cálculo de persistencia porcentual en sangre, cada valor de concentración fue transformado de acuerdo a lo descrito en el punto 5.4.

Todas las muestras se midieron inmediatamente después de su obtención, para evitar el ciclo de congelamiento/descongelamiento de las mismas. Por lo tanto, en paralelo a todas las mediciones se ensayó por duplicado una muestra de proteína TS purificada (0.5 ng/ml, capaz de rendir unas 3,000 cpm en las condiciones ensayadas) a partir de la cual se estandarizaron los valores obtenidos a los diferentes tiempos post-inyección.

### 5.6- Farmacocinética de las GST recombinantes

Los animales fueron inyectados por vía ev con 1 nmol de las distintas GST quiméricas en PBS. A los tiempos post-inyección señalados, se obtuvieron las muestras de sangre, se las procesó para obtener el suero y se guardaron a -20°C hasta su análisis en el ELISA de captura de GST explicado en el punto 6.7. En todos los casos, los valores de densidad óptica obtenidos fueron corregidos por sustracción de la media aritmética de los valores determinados para al menos tres sueros de ratones *naïve* ensayados en paralelo. En la misma placa de ELISA, se determinó la Abs<sub>405nm</sub> para curvas estándar de las distintas GST quiméricas diluidas en suero de ratón *naïve* (0.6-4,000 fmoles/pocillo). Los valores de Abs<sub>405nm</sub> obtenidos para las distintas muestras fueron transformados a concentración de proteína por interpolación en la parte lineal de la respectiva curva estándar y multiplicados por el factor de dilución correspondiente. Para el cálculo de persistencia porcentual en sangre, cada valor de concentración fue transformado de acuerdo a lo descrito en el punto 5.4.

## 6- Inmunoquímica

### 6.1- Purificación de anticuerpos policlonales

El suero se precipitó con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 50% de saturación y se resuspendió en un volumen adecuado de solución fisiológica (150 mM NaCl). Después de filtrarla por una membrana de 0.2 µm, la muestra se inyectó en una columna HiTrap de proteína A o G acoplada a agarosa, previamente equilibrada en solución fisiológica de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Pharmacia). Los anticuerpos se eluyeron en fracciones de 1 ml con glicina-HCl 100 mM pH3 y se neutralizaron inmediatamente por adición de 50 µl de 1 M Tris-HCl pH7.6 (Harlow y Lane, 1988). La muestra se

desaló rápidamente y, eventualmente, se concentró tal cual lo descrito. Alícuotas de los anticuerpos purificados se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El rendimiento fue calculado en 2-8 mg de anticuerpo/ml de sangre.

#### 6.2- Purificación de anticuerpos monoclonales

El hibridoma productor del anticuerpo monoclonal anti-SAPA N°1 (Leguizamón et al., 1991) fue mantenido en D-MEM (Gibco BRL) suplementado con 10% suero fetal bovino, 2 mM glutamina, estreptomycin (0.1 mg/ml) y penicilina (100 UI/ml). Después de centrifugar el cultivo a 1500 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50% de saturación y los anticuerpos se purificaron tal cual lo descrito en el punto 6.1. El rendimiento fue calculado en 10-20  $\mu\text{g}$  de anticuerpo monoclonal/ml de sobrenadante.

#### 6.3- Biotinilación de anticuerpos

Una solución (1 mg/ml) de anticuerpos policlonales anti-GST exhaustivamente dializada contra buffer borato 0.1 M pH8.8, se mezcló con 1  $\mu\text{l}$  de sulfo NHS-biotina (200 mg/ml en dimetil sulfóxido, Pierce). La reacción se realizó por 4 horas a temperatura ambiente con agitación ocasional y se removió el exceso de biotina sin acoplar por filtración en columnas NAP-10 (Harlow y Lane, 1988).

#### 6.4- Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa y reacción con antisueros (Western blot)

Las proteínas resueltas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a filtros de nitrocelulosa (Amersham) durante 2 horas a 80 mA limitante en una cuba de transferencia semi-seca Hoeffler. Los filtros se bloquearon durante 30 minutos con TBS 3% leche descremada (ld) y se procesaron por Western blot (Harlow y Lane, 1988).

#### 6.5- Screening inmunológico de colonias bacterianas

A partir de placas de LB agar + antibiótico crecidas O.N. a una densidad de 100-200 colonias/placa, se hizo una réplica en filtros de nitrocelulosa previamente embebidos en una solución de 10 mM IPTG. Con las colonias hacia arriba, se transfirieron estos filtros a nuevas placas de LB + antibiótico y se los dejó durante 5 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  para inducir la expresión de proteínas recombinantes. Se colocó los filtros en una cuba saturada en vapor de cloroformo durante 15 minutos, se los dejó secar y se los incubó O.N. a  $4^{\circ}\text{C}$  en una solución 50 mM Tris-HCl pH7.6, 150 mM NaCl, 5 mM

MgCl<sub>2</sub>, 3% Id, 1 µg/ml DNAsaI y 40 µg/ml lisozima. Se removió los restos de las colonias de los filtros y se los procesó según la técnica de Western blot.

#### 6.6- Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA)

Las placas de ELISA (Maxisorp, NUNC) se cubrieron con 100 µl de una solución 1 µg/ml de la proteína correspondiente en buffer PBS o carbonato 50 mM pH9.5 (Cantarero et al., 1980) y se incubaron durante 2-3 horas a 37°C y luego a 4°C hasta el momento de usar. Después de 3 lavados rápidos con TBS, las placas se bloquearon por 30 minutos con TBS 3% Id. Los sueros diluídos (1:100 a 1:10,000) en TBS 3% Id se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente, sin agitación. Después de varios lavados rápidos con TBS, se agregó una dilución apropiada del anticuerpo comercial acoplado al sistema de revelado por 60 minutos a temperatura ambiente. El sustrato de revelado usado fue 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico (ABTS; Sigma) suplementado con 1% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (para peroxidasa) o *para*-nitrofenilfosfato disódico (pNPP; Sigma) para fosfatasa alcalina (Harlow y Lane, 1988). En ambos casos, se dejó proceder la reacción colorimétrica por 30 minutos a temperatura ambiente y se midió la Abs<sub>405nm</sub> en un espectrofotómetro de microplacas (Bio-Rad) tomando como valor de referencia la Abs<sub>650nm</sub> de la misma muestra.

La titulación de sueros por ELISA se realizó por determinación de la densidad óptica obtenida a diluciones seriadas de los mismos. Se tomó como título la máxima dilución capaz de rendir un valor mayor a la media aritmética + 5 desvíos estándar (SD) del obtenido para los sueros de animales *naïve* ensayados en paralelo.

#### 6.7- ELISA de captura de GST quiméricas

Las placas de ELISA se cubrieron con 75 µl/pocillo de una solución de anticuerpo policlonal de conejo anti-GST purificado (8 µg/ml) en PBS. El bloqueo y las diluciones sucesivas de los sueros y los anticuerpos se realizaron en TBS 3% BSA dializada exhaustivamente contra PBS, para remover la biotina presente. Diluciones seriadas de las distintas muestras se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las proteínas retenidas se evidenciaron por la adición sucesiva de un anticuerpo policlonal anti-GST biotinilado (2.5 µg/ml), avidina conjugada a fosfatasa alcalina diluída según especificaciones del fabricante (Pierce) y, por último, el agente cromogénico pNPP.

#### 6.8- ELISA de anticuerpos dirigidos contra la región enzimática de la *trans*-sialidasa

Placas de ELISA recubiertas con el anticuerpo policlonal anti-SAPA (1 µg/pocillo) y bloqueadas de acuerdo a lo visto en el punto 6.6 fueron incubadas por 60 minutos con 1.5 µg/pocillo de proteína TS-SAPA purificada. Después de lavar con TBS, se adicionaron las muestras de

suero de los animales diluídas apropiadamente en TBS 3% Id y se revelaron los anticuerpos de ratón capturados de acuerdo a lo descripto.

#### 6.9- Generación de inmunocomplejos e inmunoprecipitación

Para la generación de inmunocomplejos, la proteína TS-SAPA (20 µg) se incubó durante 2 horas a 4°C con 0.1 ml de anticuerpos monoclonales anti-SAPA (mg/ml), con agitación ocasional. La correcta formación del inmunocomplejo se verificó por inmunoprecipitación de la actividad *trans*-sialidasa en presencia de proteína A-agarosa.

#### 6.10- Ensayo de inhibición de la *trans*-sialidasa (TIA)

Las muestras de suero (2 a 5 µl) se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente en presencia de 2 µl de la proteína TS (0.25 µg/ml, capaz de rendir 1,200 a 2,500 cpm en las condiciones del ensayo). Posteriormente, se diluyó con agua hasta 24 µl finales y se midió la actividad *trans*-sialidasa remanente de acuerdo a lo descripto. El porcentaje de inhibición se calculó por referencia a valores control, correspondientes a la incubación de la enzima con suero de ratones *naïve*.

En algunos lotes de ratones se observó una actividad inhibitoria basal (que en algunos casos llegó hasta un 25%) con respecto a la enzima incubada en PBS suplementado con BSA 1 mg/ml. Esta actividad inhibitoria, no caracterizada, puede ser atribuída a la presencia en suero de anticuerpos inespecíficos, a moléculas glicosiladas capaces de intervenir en la reacción como dadores/aceptores (Prioli et al., 1988). Esta inhibición no puede anularse por la adición de inhibidores de proteasas durante el ensayo ni por fraccionamiento del suero en columnas de proteína A-agarosa (datos no mostrados). El único tratamiento capaz de abolir parcialmente esta actividad inhibitoria fue el congelamiento/descongelamiento sucesivo de los sueros antes de ser ensayados.

### 7- Análisis estadísticos

La estabilidad en sangre de las distintas proteínas fue comparada con los valores reportados para las proteínas TS-SAPA (en el caso de todas las *trans*-sialidasas) o GST-SAPA (en el caso de todas las glutatión S-transferasas), usando el test T de Student (Forthofer y Lee, 1995). Valores de  $P < 0.05$  fueron considerados significativos.

***RESULTADO***

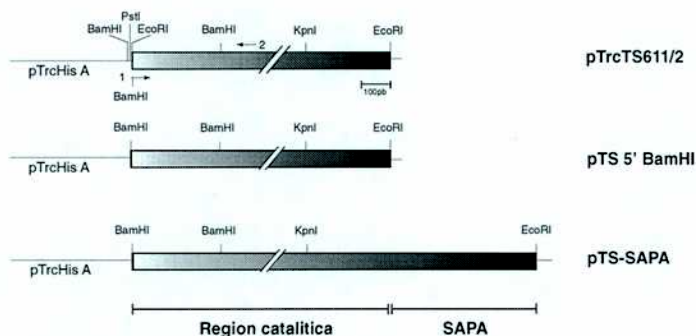


## RESULTADOS

**1- Construcción de un gen de *trans*-sialidasa conteniendo el dominio repetitivo.**

En nuestro laboratorio se había clonado un gen activo de *trans*-sialidasa de tripomastigotes de la cepa RA de *T. cruzi* en el vector de expresión bacteriano pKK223-3 (Campetella et al., 1994). Debido a la estrategia de clonado utilizada, este clon consta sólo de la región N-terminal, no repetitiva (figura 2), presente en la *trans*-sialidasa madura y comienza a partir de un residuo metionina introducido después del péptido señal (Pollevick et al., 1993). Experimentos realizados *in vitro* con esta proteína recombinante demostraron que la falta de las repeticiones no afectaba los parámetros cinéticos ni la especificidad de dadores/aceptores con respecto a la *trans*-sialidasa natural (Campetella et al., 1994).

Este gen fue posteriormente modificado a fin de removerle el sitio EcoRI interno y subclonado en fase de expresión en el sitio EcoRI del vector bacteriano pTrcHisA (Buschiazzi et al., 1997). Este nuevo clon, denominado pTrcTS611/2 expresa una *trans*-sialidasa activa de 678 aminoácidos denominada de aquí en más TS. La proteína TS contiene un péptido de fusión N-terminal de 48 aminoácidos codificado en el vector pTrcHisA, en el que está incluido un tándem de seis residuos histidina que facilita su purificación (Porath y Olin, 1983).



**FIGURA 3: Construcción de un gen de *trans*-sialidasa conteniendo el dominio repetitivo.** Se amplificó un fragmento del extremo 5' del clon pTrcTS611/2 por PCR, utilizando los oligonucleótidos 1 (que contiene un sitio BamHI propio) y 2, indicados con flechas. El producto amplificado y digerido por BamHI se usó para reemplazar el fragmento BamHI-BamHI del clon pTrcTS611/2 original y generar el clon pTS 5'BamHI. El fragmento KpnI-EcoRI de este clon fue reemplazado por el de un clon genómico de la cepa RA de *T. cruzi* conteniendo el extremo 3' de la *trans*-sialidasa de tripomastigote a fin de generar el clon pTS-SAPA. Por debajo de los clones se indican, en escala, las regiones de la *trans*-sialidasa.

A fin de generar un clon de *trans*-sialidasa conteniendo el dominio SAPA, primeramente se reemplazó el sitio EcoRI presente en el extremo 5' del clon pTrcTS611/2 mediante la técnica de PCR (figura 3). El clon obtenido (llamado pTS 5'BamHI) se seleccionó de acuerdo a la pérdida del sitio de restricción PstI presente en el sitio múltiple de clonado del vector (figura 3) y posteriormente se analizó por secuenciación de ADN. En una segunda etapa, se adicionó a este clon pTS 5'BamHI la región codificante para el dominio repetitivo SAPA por reemplazo del fragmento KpnI – EcoRI con un clon genómico de la cepa RA conteniendo el extremo 3' de la *trans*-sialidasa de tripomastigote (figura 3). El clon obtenido,

denominado pTS-SAPA (figura 3), fue analizado por secuenciación de ADN. La secuencia nucleotídica, así como la aminoacídica deducida, de su fragmento KpnI - EcoRI se indica en la figura 4A. Como puede observarse, el dominio SAPA presente en el clon pTS-SAPA consta de 13 unidades repetitivas de 12 aminoácidos cada una seguidas por una pseudo-repetición de 7 aminoácidos y un fragmento de 36 aminoácidos con características típicas de un motivo de anclaje por GPI. La secuencia aminoacídica consenso de la unidad repetitiva puede definirse como 1-DSSAHSTPSTPA-12, aunque se observa cierta variabilidad entre las distintas repeticiones. Particularmente a nivel del segundo y tercer aminoácido (2-SS-3 → 2-NG-3), reflejando una pequeña inversión de tres nucleótidos (gca → acg) (figura 4B). En menor frecuencia, también se observan variaciones de secuencia en las posiciones 1-D, 9-S, 10-T y 12-A (figura 4A).

**A**

```

      Kpn I
1741  AGG TAC CAC GTG GTT CTT ACG ATG GCG AAT AAA ATT GGC TCC GAG TAC ATT GAT GGA GAA CCT
581  R Y H V V L T M A N K I G S E Y I D G E P

CTG GAG GGT TCA GGG CAG ACC GTT GTG CCA GAC GAG AGG ACG CCT GAC ATC TCC CAC TTC TAC GTT GGC GGG
L E G S G Q T V V P D E R T P D I S H F Y V G G

TAT AAA AGG AGT GAT ATG CCA ACC ATA AGC CAC GTG ACG GTG AAT AAT GTT CTT CTT TAC AAC CGT CAG CTG AAT
Y K R S D M P T I S H V T V N N V L L Y N R Q L N

GCC GAG GAG ATC AGG ACC TTG TTC TTG AGC CAG GAC CTG ATT GGC ACG GAA GCA CAC ATG GGC AGC AGC AGC
A E E I R T L F L S Q D L I G T E A H M G S S S

GAC AAC GGT GCC CAC AGT ACG CCC TCA ACT CCC GCT GAC AAC GGT GCC CAC AGT ACG CCC TCG ACT CCC GGT
G S S A H S T P S T P A D N G A H S T P S T P G

GAC AAC GGT GCC CAC AGT ACG CCC TCA ACT CCC GCT GAC AAC GGT GCC CAC AGT ACG CCC TCG ACT CCC GGT
D N G A H S T P S T P A D S S A H S T P S T P A

GAC AGC AGT GCC CAC AGT ACG CCC TCA ACT CCC GCT GAC AAC GGT GCC CAC AGT ACG CCC TTG ACT CCC GGT
D S S A H S T P S T P A D N G A H S T P L T P G

GAC AAC GGT GCC CAC AGT ACG CCC TCA ACT CCC GCT GAC AAC GGT GCC CAC AGT ACG CCC TCG ACT CCC GGT
D N G A H S T P S T P A D N G A H S T P S T P G

GAC AAC GGT GCC CAC AGT ACG CCC TCA ACT CCC GCT GAC AAC GGT GCC CAC AGT ACG CCC TCG ACT CCC GGT
D N G A H S T P S T P A D S S A H S T P S T P A

GAC AGC AGT GCC CAC AGT ACG CCC TCG ACT CCC GCT GAC AGC AGT GCC CAC AGT ACG CCC TCA ATT CCC GCT
D S S A H S T P S T P A D S S A H S T P S I P A

GAC AGC AGT GCC CAC AGT ACG CCC TCA GCT CCC GCT GAC AAC GGC GCC AAT GGT ACG GTT TTG ATT TTG CAC
D S S A H S T P S A P A D N G A N G T V L I L H

GAT GGC GCT GCA TTT TCG GCC TTT TCG GGC GGA GGG CTT CTT TTG TGT GCG GGT GCT TTG CTG CTG CAC GTG
D G A A F S A F S G G G L L L C A G A L L L H V

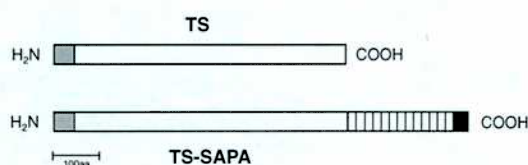
TTC GTT ATG GCA GTT TTT TTC TGA TGT AGT GAG AGA GTC TCC TAA CAA GCT TAT GAG GGC TGC AGG AAT TC
F V M A V F F *
      EcoRI
    
```

**FIGURA 4: Análisis de secuencia del clon pTS-SAPA. Panel A:** Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del fragmento KpnI – EcoRI presente en el clon pTS-SAPA. Cada una de las 13 repeticiones de aminoácidos está indicada por una flecha. La secuencia aminoacídica subrayada corresponde a una pseudo repetición. **Panel B:** Comparación a nivel nucleotídico y aminoacídico de las dos repeticiones más frecuentes presentes en el clon pTS-SAPA. Se remarcan los nucleótidos y aminoácidos diferentes.

**B**

	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>A</b>
GAC	<b>AAC</b>	<b>GGT</b>	GCC	CAC	AGT	ACG	CCC	TCG	ACT	CCC	GCT	
GAC	<b>AGC</b>	<b>AGT</b>	GCC	CAC	AGT	ACG	CCC	TCG	ACT	CCC	GCT	
	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>A</b>

La representación esquemática de las proteínas TS y TS-SAPA se indica en la figura 5. La expresión en fase del dominio SAPA predice un incremento de la Mr de la *trans*-sialidasa recombinante desde 75.6 a 94.6 kDa (incluyendo en ambos casos los 4 kDa correspondientes al péptido de fusión provisto por el vector (figura 5).

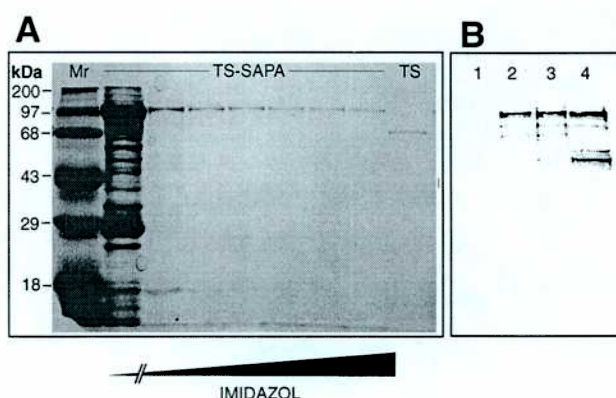


**FIGURA 5: Representación esquemática de las proteínas TS y TS-SAPA.** El péptido de fusión codificado por el vector pTrcHis se indica en gris; la región catalítica, responsable de la actividad *trans*-sialidasa se indica en blanco y las repeticiones de aminoácidos en rayado. La secuencia de anclaje por GPI presente en la proteína TS-SAPA se indica en negro. Abreviaturas: H<sub>2</sub>N, extremo amino terminal; COOH, extremo carboxilo terminal.

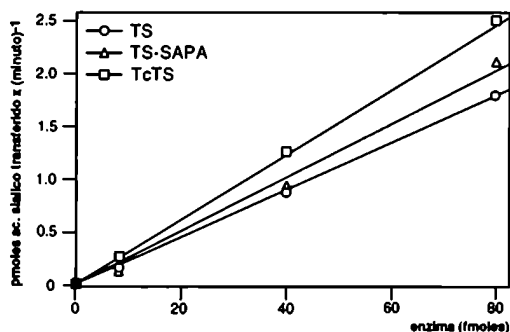
## 2- Purificación de la *trans*-sialidasa conteniendo el dominio repetitivo

Con el clon pTS-SAPA se transformaron bacterias *E. coli* y se indujo la expresión de la proteína recombinante. Luego de lisar las bacterias, la fracción soluble correspondiente al citoplasma se sometió a cromatografía de afinidad en una columna de ácido iminodiacético (IMAC) previamente cargada con níquel, y se eluyó en un gradiente continuo de imidazol. El perfil de elución parcial para la proteína TS-SAPA se muestra en la figura 6A. Allí puede observarse que las fracciones eluidas a mayor concentración de imidazol están considerablemente enriquecidas en una única proteína, de Mr estimada en 100 kDa, bastante aproximada a la Mr predicha para TS-SAPA. En ensayos de Western blot (figura 6B), esta proteína muestra inmunoreactividad con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el epítopo SAHSTP (Paula Alvarez y Oscar Campetella, comunicación personal) presente en algunas repeticiones del dominio SAPA (figuras 4A y 4B). La presencia de bandas inmunoreactivas adicionales (figura 6B) puede atribuirse a productos de degradación parcial generados dentro de la bacteria o durante el proceso de purificación (Cremona et al., 1995).

**FIGURA 6: Perfil de purificación e inmunoreactividad de la proteína TS-SAPA.** **Panel A:** Distintas fracciones eluidas de una columna IMAC en respuesta a un gradiente de imidazol (30–200 mM) se sometieron a SDS-PAGE revelado por Coomassie Brilliant Blue. Abreviaturas: TS, 100 ng de proteína TS purificada. Los patrones de Mr se indican, en kDa, a la izquierda. **Panel B:** Western blot revelado con un anticuerpo monoclonal anti-SAPA. Las proteínas corridas en cada calle son: TS (calle 1), dos fracciones de elución de TS-SAPA (calles 2 y 3) y lisado total de bacterias expresando TS-SAPA (calle 4).



La proteína TS-SAPA purificada fue cuantificada por SDS-PAGE contra una curva estándar de BSA y sometida a un análisis de actividad *trans*-sialidasa a diluciones crecientes (figura 7). El valor de actividad específica determinado para la proteína TS-SAPA (2.59 U/nmol) es muy semejante al determinado para la *trans*-sialidasa sin repeticiones (TS) purificada y ensayada en condiciones semejantes (2.27 U/nmol, figura 7). Estos resultados son coincidentes con datos previos, y confirman



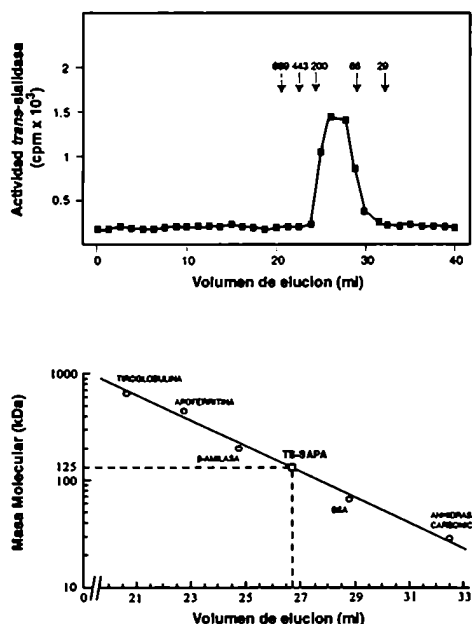
**FIGURA 7: Determinación de actividad específica de las distintas *trans*-sialidasas.** La reacción de *trans*-sialidasa se realizó por 5 minutos con las cantidades de enzima indicadas y los valores (en cpm) obtenidos en cada caso fueron transformados a pmoles de ácido siálico transferido x (minuto)<sup>-1</sup>. Los datos para cada proteína fueron ajustados a un modelo de regresión lineal simple por el método de los cuadrados mínimos (Forthoffer y Lee, 1995). TcTS, *trans*-sialidasa natural purificada de tripomastigotes de la cepa RA en cultivo (en este caso, la Mr promedio se estimó en 160 kDa de acuerdo a la movilidad electroforética de las distintas isoformas).

que la presencia del dominio repetitivo en *cis* no afecta significativamente el plegamiento ni la funcionalidad de la región catalítica (Schenkman et al., 1994a; Campetella et al., 1994). Más aún, la actividad específica de ambas proteínas es comparable a la de la *trans*-sialidasa natural (TcTS, 3.08 U/nmol), purificada a partir de sobrenadante de cultivo de tripomastigotes de la cepa RA (figura 7).

Los resultados cinéticos mostrados para cada enzima son representativos de todos los obtenidos, aunque debe tenerse en cuenta las pequeñas variaciones que pueden ocurrir de preparación en preparación (ver tabla 7).

Trabajos previos indicaban que la *trans*-sialidasa de tripomastigotes tiene una naturaleza multimérica (figura 2), mediada por interacciones no covalentes a nivel de su dominio repetitivo (Schenkman et al., 1992). Por lo tanto, quisimos averiguar si la proteína TS-SAPA sufría el mismo

proceso de multimerización durante su biosíntesis en bacterias. Para ello se sometió a la proteína TS-SAPA purificada a filtración en columnas de tamizado molecular. Como puede verse en la figura 8A, la actividad *trans*-sialidasa eluye en fracciones sucesivas entre los picos correspondientes a los estándares de β-amilasa (200 kDa) y BSA (66 kDa). El pico ancho de elución de esta proteína podría atribuirse a la coexistencia de múltiples especies activas con diferente grado de procesamiento



**FIGURA 8: Filtración molecular de la proteína TS-SAPA.** **Panel A:** Actividad *trans*-sialidasa determinada para 5 µl de las correspondientes fracciones de elución (1.25 ml/fracción) de la proteína TS-SAPA resuelta en dos columnas de filtración molecular (Superosa 12 y 6) conectadas en serie. Vol=0 ml corresponde al punto de inyección de la muestra. Con flechas se indica la posición del pico de elución de las distintas proteínas usadas como estándares de calibración (Tiroglobulina, 669 kDa; Apoferritina, 443 kDa; β-amilasa, 200 kDa; BSA, 66 kDa y anhidrasa carbónica, 29 kDa). **Panel B:** Los datos obtenidos para los estándares de Mr indicados en el panel A fueron transformados a escala semilogarítmica y ajustados a un modelo de regresión lineal simple por el método de los cuadrados mínimos. El volumen de elución (en ml) correspondiente al pico de actividad *trans*-sialidasa de la proteína TS-SAPA y su Mr deducida (en kDa) están indicados.

proteolítico a nivel de su extremo C-terminal (figura 6B). Las fracciones de elución conteniendo el pico de actividad *trans*-sialidasa muestran también un pico de inmunoreactividad con un anticuerpo monoclonal anti-SAPA (datos no mostrados).

La  $M_r$  estimada para la fracción correspondiente al pico de actividad *trans*-sialidasa es de 125 kDa (figura 8B), bastante aproximada a la estimada por SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes (figura 6). Estos resultados sugieren que la proteína TS-SAPA expresada en bacterias se encuentra mayormente como monómero. Una pequeña fracción de la misma podría corresponder, a lo sumo, a un dímero.

### 3- Rol del dominio SAPA en la inmunogenicidad de la *trans*-sialidasa.

#### 3.1- La inducción de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa requiere de la inmunización con enzimas conformacionalmente nativas.

Distintos lotes de animales fueron inmunizados con 100 pmoles de la proteína TS o TS-SAPA emulsionadas en adyuvante de Freund. Estos animales fueron sangrados a distintos días post inmunización (dpi) a fin de analizar la cinética de inducción y la magnitud de las respuestas humorales dirigidas contra las diferentes regiones de la *trans*-sialidasa. Los anticuerpos anti-SAPA se evaluaron por ELISA y los anticuerpos neutralizantes de la actividad enzimática por medio de un ensayo de inhibición de la *trans*-sialidasa *in vitro* (TIA) (Leguizamón et al., 1994a).

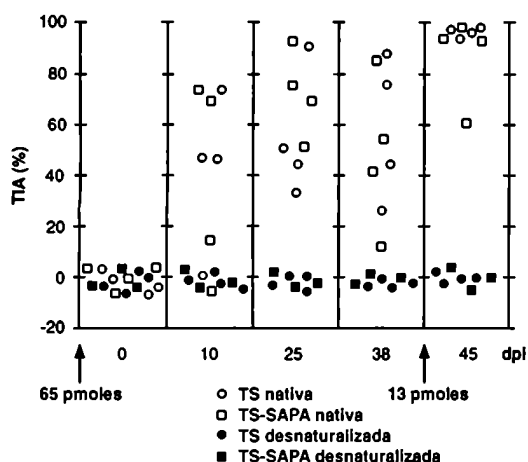
Todos los animales inmunizados con la proteína TS-SAPA generaron anticuerpos anti-SAPA; sin embargo, este modelo de inmunización no parece apropiado para la inducción de anticuerpos inhibitorios. Solamente uno de los ocho animales inmunizados (4 con TS y 4 con TS-SAPA) mostró un valor de inhibición en TIA del 32%. Resultados similares se obtuvieron al inmunizar conejos con la proteína TS (o mutantes de delección de la misma) emulsionada en este mismo adyuvante (Alejandro Buschiazzo, Oscar Campetella y Alberto C. C. Frasc, resultados sin publicar). Así, podía sugerirse que o bien la coinmunización con algún otro componente del parásito era necesaria para inducir la generación de anticuerpos inhibitorios de la *trans*-sialidasa o bien que la desnaturalización del inmunógeno causada por la agitación mecánica durante la emulsión y/o por distintos componentes del adyuvante interfería con la formación de este tipo de anticuerpos.

Para testear esta segunda hipótesis, decidimos utilizar algún adyuvante que nos permitiese presentar alternativamente enzimas nativas o desnaturalizadas al sistema inmune del animal inyectado. El adyuvante finalmente elegido fue el hidróxido de aluminio (alúmina), debido a las condiciones no desnaturalizantes en que puede realizarse la adsorción de proteínas (Rinella et al., 1996). De acuerdo al punto isoeléctrico (pI) predicho para las proteínas TS y TS-SAPA (ver tabla 7) las interacciones electrostáticas necesarias para su adsorción en alúmina podían establecerse dentro del rango de pH (7-8) óptimo para el funcionamiento de la *trans*-sialidasa (Schenkman et al., 1991; Scudder et al., 1993).

Alícuotas de los precipitados de alúmina adsorbidos con las proteínas TS o TS-SAPA y posteriormente lavados exhaustivamente con TBS fueron utilizadas en ensayos de actividad *trans*-sialidasa como fuente de enzima. En ambos casos la actividad retenida en el precipitado fue superior al 90% de la actividad enzimática original, mientras que la actividad remanente en el sobrenadante resultó prácticamente despreciable. Análisis de SDS-PAGE confirmaron la ausencia de proteínas en estas últimas fracciones (datos no mostrados). Por lo tanto, a los fines de la inmunización, se asumió que la totalidad de la enzima incubada en ambos casos quedó retenida en el adyuvante.

En paralelo, se acoplaron a alúmina proteínas TS y TS-SAPA previamente inactivadas irreversiblemente por calentamiento a 65°C durante 5 minutos (Schenkman et al., 1994b). En este caso, la adsorción se verificó exclusivamente por SDS-PAGE, obteniéndose eficiencias similares a

las reportadas para las moléculas nativas (>90%).

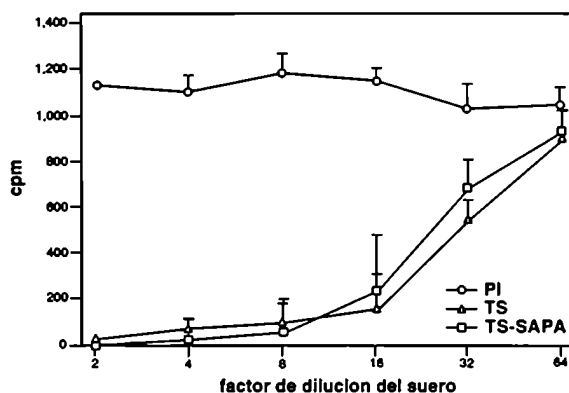


**FIGURA 9:** Porcentaje de inhibición de *trans*-sialidasa en suero de ratones inmunizados con diferentes enzimas en alúmina. Proteínas TS o TS-SAPA (nativas o desnaturalizadas) adsorbidas en alúmina se inyectaron en ratones por vía ip (en las dosis indicadas) en los días 0 y 39. A diferentes días post-inmunización (dpi) se obtuvieron muestras de suero y se determinó el porcentaje de inhibición de *trans*-sialidasa por TIA con respecto a sueros de ratones inmunizados con alúmina. Se muestra uno de dos experimentos con resultados similares.

antígeno (pmoles)	TIA+/n	Título anti-SAPA
TS (130)	6/6 (100%)	
TS (65)	5/7 (71%)	
TS (15)	ND	
TS (1.5)	1/8 (16%)	
TS-SAPA (130)	6/6 (100%)	>1/5,400
TS-SAPA (65)	7/10 (70%)	>1/900
TS-SAPA (15)	2/4 (50%)	>1/900
TS-SAPA (1.5)	0/3 (0%)	>1/100(*)
TS desnat (130)	0/3 (0%)	
TS desnat (65)	0/6 (0%)	
TS-SAPA desnat (130)	0/3 (0%)	>1/10,800
TS-SAPA desnat (65)	0/7 (0%)	>1/2,700

**TABLA 2:** Reactividad contra las diferentes regiones de la *trans*-sialidasa de los sueros de ratones inmunizados por vía ip. Los animales fueron inyectados con una única dosis de enzima emulsionada en alúmina y ensayados a los 25-30 dpi para anticuerpos anti-SAPA (por ELISA) e inhibitorios de *trans*-sialidasa (por TIA). Se indica el número de animales con valores de inhibición en TIA mayores al 50% (TIA+) sobre el total de ratones ensayados (n). ND, no determinado. (\*) correspondiente a uno de los tres animales ensayados.

Distintos lotes de ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal (ip) con cantidades equimolares de estas preparaciones. Un lote de ratones control fue inmunizado por la misma vía con alúmina. Como puede observarse en la figura 9, ambas proteínas (TS y TS-SAPA) presentadas en su conformación nativa son capaces de inducir la generación de una actividad inhibitoria de *trans*-sialidasa en el suero de los animales. Como se demuestra más adelante (sección 3.3, Resultados), esta actividad inhibitoria está debida a inmunoglobulinas circulantes. La inducción de estos anticuerpos inhibitorios es consistente de experimento en experimento, dosis-dependiente y puede verificarse con un mínimo de 15 pmoles de enzima/ratón (tabla 2). La titulación de los anticuerpos inhibitorios por dilución arrojó valores de 50% de inhibición similares, cercanos a 1/32 para los sueros de los animales inmunizados con TS o TS-SAPA (figura 10).



**FIGURA 10:** Titulación de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa en suero de ratones inmunizados. Diferentes diluciones de los sueros obtenidos de animales inmunizados por vía ip con 135 pmoles de la proteína indicada emulsionada en alúmina se analizaron por TIA. Se indica la media aritmética + SD de las cpm totales obtenidas para cada grupo de animales (TS, n=3; TS-SAPA, n=3; PI, n=2). PI, suero preinmune.

Por el contrario, los animales inyectados con las proteínas TS y TS-SAPA inactivadas previamente a su adsorción en alúmina son incapaces de generar anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa (figura 9 y tabla 2). Estos resultados sugieren un requerimiento conformacional del inmunógeno para inducir anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa.

Por último, los sueros de los animales inmunizados con TS-SAPA (nativa o desnaturalizada) se analizaron para la presencia de anticuerpos anti-SAPA (tabla 2). En ambos casos, los títulos obtenidos fueron elevados y dependientes de la dosis de antígeno administrado (tabla 2). Para dosis de antígeno mayores o iguales a los 15 pmoles, los anticuerpos anti-SAPA pudieron verificarse y en títulos superiores a 1/100 ya a los 7 dpi (datos no mostrados). Si bien los métodos de ELISA y TIA no son comparables, estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-SAPA son generados más tempranamente que los anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa que recién pueden detectarse entre los 10 y 25 dpi (figura 9).

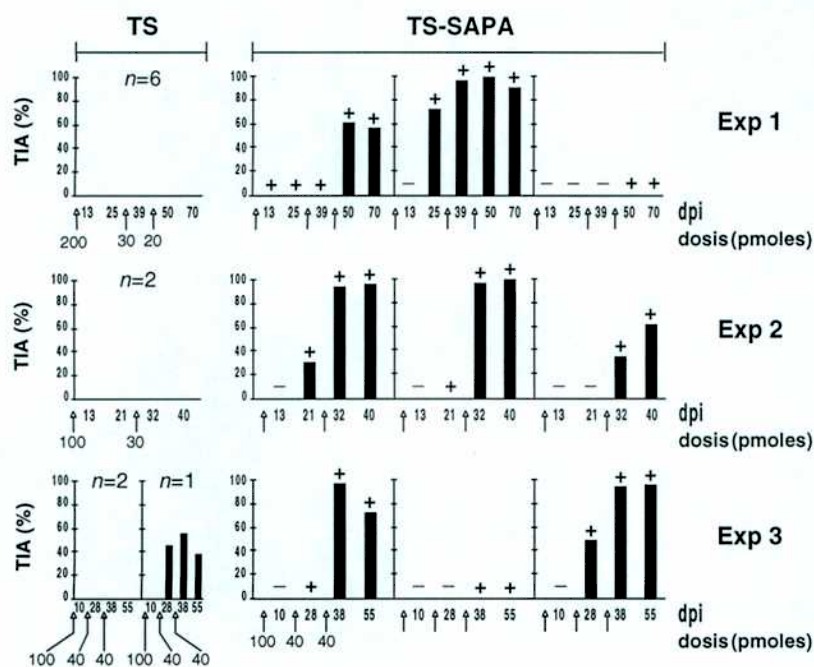
### 3.2- El dominio SAPA modula la inducción de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa.

Los resultados presentados en la sección anterior se ajustaban a los obtenidos en modelos de infección experimental de ratones con cepas no letales de *T. cruzi* (Leguizamón et al., 1994a). Sin embargo, el efecto que podía estar ejerciendo la presencia del adyuvante y/o la vía de presentación del inmunógeno era incierto. Por lo tanto, decidimos proseguir nuestros estudios en un modelo de inmunización por vía endovenosa (ev) con enzimas solubles; esto es, siguiendo el curso de presentación natural de la *trans*-sialidasa de tripomastigotes en las etapas tempranas de la infección.

Distintos lotes de ratones se inmunizaron a repetición por esta vía con cantidades equimolares de proteínas TS o TS-SAPA diluídas en PBS. La presencia de anticuerpos dirigidos contra las diferentes regiones de la *trans*-sialidasa se evaluó de acuerdo a lo visto en muestras de sangre obtenidas a distintos dpi. En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos en tres experimentos independientes, realizados con diferentes cepas de ratones. Como puede observarse, 7 de los 9 animales inmunizados con la proteína TS-SAPA generaron anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa mientras que éstos sólo fueron detectados en 1 de los 11 animales inmunizados con la proteína TS. A diferencia de los resultados obtenidos con proteínas emulsionadas en alúmina (figura 9 y tabla 2), la inducción de estos anticuerpos en los animales inmunizados con TS-SAPA por vía ev requirió por lo general de más de estímulo antigénico (figura 11).

La coinmunización con ambas regiones de la *trans*-sialidasa en *trans* (proteínas TS + GST-SAPA) por vía ev tampoco indujo la generación de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa en ratones *naïve* (tabla 3). Estos resultados sugieren que en el modelo de inmunización ev, la presencia del dominio repetitivo en la misma molécula que el dominio enzimático es necesaria para la inducción de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa.





**FIGURA 11: Porcentaje de inhibición de *trans*-sialidasa en suero de ratones inmunizados con diferentes enzimas por vía ev.** Ratones de las cepas Rockland (experimento 1) o C3H/HeN (experimentos 2 y 3) fueron inmunizados por vía ev con la proteína indicada. Los anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa en suero obtenidos a diferentes dpi se cuantificaron por TIA y los valores obtenidos transformados a % de inhibición con respecto a sueros de ratones *naïve*. + y - indican la inmunoreactividad anti-SAPA determinada por ELISA en esas mismas muestras (+ indica un título mayor a 1/100). Los animales fueron inmunizados en los siguientes días: experimento 1 (días 0, 32 y 42); experimento 2 (días 0 y 23); experimento 3 (días 0, 14 y 31). La cantidad de proteína inoculada en cada dosis se indica, en pmoles, debajo de cada experimento.

Por otro lado, la inmunización por vía ev con proteínas inactivadas tampoco derivó en la generación de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa pero sí en la de anticuerpos anti-SAPA (tabla 3). Los menores títulos de anticuerpos anti-SAPA obtenidos con respecto a los datos reportados en la tabla 2 pueden atribuirse al diferente modelo de inmunización. De todas formas, los resultados presentados en las tablas 2 y 3 son coincidentes en el sentido que la conformación del inmunógeno parece ser determinante en la inducción de anticuerpos inhibitorios pero no en la inducción de anticuerpos anti-SAPA.

antígeno	TIA+/n	Título anti-SAPA
TS	1/11 (9%)	-
TS-SAPA	7/9 (78%)	1/200 - 1/600
TS desnat	0/3 (0%)	-
TS-SAPA desnat	0/6 (0%)	1/600-1/2,400
TS + GST-SAPA	0/6 (0%)	ND

**TABLA 3: Reactividad contra las diferentes regiones de la *trans*-sialidasa de los sueros de ratones inmunizados por vía ev.** Los animales fueron inyectados con 2 o 3 dosis (ver figura 11) de la enzima correspondiente enzima y ensayados para anticuerpos anti-SAPA (por ELISA) e inhibitorios de *trans*-sialidasa (por TIA). Se indica el número de animales con valores de inhibición en TIA mayores al 50% (TIA +) sobre el total de ratones ensayados (n). ND, no determinado.

3.3- La inhibición de la actividad *trans*-sialidasa se debe a inmunoglobulinas circulantes.

La actividad inhibitoria de *trans*-sialidasa en el suero de los animales infectados crónicamente con *T. cruzi* se debe a inmunoglobulinas circulantes (Leguizamón et al., 1994a; Pereira-Chioccola et al., 1994). Con el propósito de caracterizar la actividad inhibitoria de *trans*-sialidasa presente en el suero de los animales inmunizados con *trans*-sialidasas recombinantes (figuras 9, 10 y 11), se extrajo la sangre total de cuatro de los animales positivos para el ensayo de TIA (2 inoculados con TS emulsionada en alúmina y 2 con TS-SAPA por vía ev). Distintas alícuotas de los sueros obtenidos se sometieron a diferentes tratamientos y posteriormente se los analizó por TIA.

La actividad inhibitoria no pudo ser abolida por el tratamiento con diferentes inhibidores de proteasas (tabla 4), indicando que el efecto observado no se debe a proteólisis de la enzima durante el ensayo. Alternativamente, distintas alícuotas de estos sueros fueron sometieron a cromatografía de afinidad por proteína A y se analizó por TIA a las fracciones retenidas y no retenidas en la columna. Como se indica en la tabla 4, las fracciones retenidas (mayormente inmunoglobulinas del tipo IgG; Harlow y Lane, 1988) inhibieron a la *trans*-sialidasa en un 94,95,100 y 99% respectivamente, mientras que las fracciones no retenidas inhibieron en un 25, 16, 8 y 36%, respectivamente. Esta inhibición remanente puede atribuirse a inmunoglobulinas no retenidas durante el fraccionamiento y/o a otros componentes plasmáticos (Prioli et al., 1988). En el caso de dos sueros no inhibitorios, obtenidos a partir de animales inmunizados por vía ev con la proteína TS (figura 11), tanto la fracciones retenidas como las no retenidas mostraron actividades inhibitorias de *trans*-sialidasa despreciables, similares a las de un ratón preinmune (tabla 4).

Por lo tanto, puede concluirse que, al igual que lo observado en sueros de animales infectados crónicamente con *T. cruzi*, la inhibición de la actividad *trans*-sialidasa presente en el suero de los animales inmunizados con enzimas recombinantes se debe mayoritariamente a inmunoglobulinas circulantes del tipo IgG.

antígeno (vía administr)	Ensayo de TIA (cpm)			
	Control	Inhib. prot.	Prot. A	
			No Ret.	Ret.
-	2509	2586	2316	2524
TS (ev)	2522	ND	2867	2600
TS (ev)	2613	2692	2810	1992
TS (ip)	436	370	1891	221
TS (ip)	110	89	2105	186
TS-SAPA (ev)	345	ND	2300	28
TS-SAPA (ev)	85	ND	1605	103

**TABLA 4: Identificación de la actividad inhibitoria de *trans*-sialidasa presente en suero de ratones inmunizados.** Alícuotas de los sueros de animales (5 µl) inmunizados con la proteína indicada fueron analizados por TIA en ausencia (control) o presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5 µM E64 y 0.5 mM TLCK). Esos mismos sueros fueron fraccionados en columnas de proteína A-agarosa y alícuotas de las fracciones retenidas (Ret.) y no retenidas (No Ret.) ensayadas por TIA. Se indica el valor de la media aritmética de dos ensayos independientes. ND, no determinado.

3.4- La respuesta inmune contra el dominio repetitivo acelera la inducción de anticuerpos inhibitorios de la actividad *trans*-sialidasa.

Una observación recurrente en el caso de los animales desafiados con *T. cruzi* o con la enzima TS-SAPA es que los anticuerpos dirigidos contra el dominio repetitivo parecen tener una cinética de inducción más rápida que la de los anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa (figura 11 y datos no mostrados; Leguizamón et al., 1994a). Resultaba interesante entonces estudiar el papel que la respuesta inmune anti-SAPA podía estar desempeñando en la inducción de los anticuerpos inhibitorios.

Para ello, se inmunizaron animales por vía ip con 35 pmoles de la proteína GST-SAPA emulsionada en alúmina. Esta proteína contiene exclusivamente el dominio repetitivo expresado como producto de fusión en el vector pGEX. El uso de esta proteína de fusión se debió a que la expresión en bacterias del dominio repetitivo no pudo lograrse en niveles suficientes en el vector pTrcHis ni en otros vectores ensayados (datos no mostrados).

Quince días más tarde, cuando los títulos de anticuerpos anti-SAPA obtenidos fueron mayores a 1/500 (datos no mostrados), los animales fueron desafiados con 100 pmoles de la proteína TS-SAPA por vía ev. Lotes control de animales *naïve* o sensibilizados con GST emulsionada en alúmina, fueron inmunizados con cantidades equivalentes de TS-SAPA. Alícuotas de suero colectadas a los 6, 15 y 21 días después del desafío fueron analizadas por TIA. Como puede verse en la tabla 5, 5 de los 6 animales sensibilizados con GST-SAPA resultaron positivos para el ensayo de TIA ya a los 15

antígeno de sensibilización (ip)	antígeno de desafío (ev)	TIA+/n		
		6	15	21 (dpi)
-	TS-SAPA	0/6	0/6	1/6
	TS	0/6	0/6	0/6
	TS-SAPA + Ab anti SAPA	0/6	1/6	1/6
	TS-SAPA + Ab normal	0/7	0/7	1/7
GST-SAPA	TS-SAPA	0/6	5/6	5/6
	TS	0/6	0/6	0/6
GST	TS-SAPA	0/4	0/4	1/4
	TS	0/4	0/4	0/4

**TABLA 5: Cinética de inducción de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa.** Ratones de la cepa C3H/HeN se sensibilizaron con 35 pmoles del antígeno indicado (emulsionado en alúmina) por vía ip. A los 15 dpi, los animales fueron desafiados por vía ev con 100 pmoles de las proteínas TS, TS-SAPA o TS-SAPA + el anticuerpo (Ab) indicado. Alícuotas de 5 µl de suero colectado a diferentes días después del desafío se analizaron por TIA. Se indica el número de animales con valores de inhibición en TIA mayores al 50% (TIA +) sobre el total de ratones ensayados (n).

días después del desafío con TS-SAPA, y sin necesidad de un segundo estímulo antigénico. Por el contrario, sólo 2 de los 10 animales control generaron anticuerpos inhibitorios en las mismas condiciones (tabla 5; ver también figura 11). Por otro lado, el desafío por vía ev con la proteína TS no aceleró la inducción de anticuerpos inhibitorios en animales *naïve* ni en animales sensibilizados con GST-SAPA (tabla 5; ver también figura 11).

Por lo tanto, puede concluirse que la respuesta inmune contra el dominio repetitivo acelera la inducción de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa.

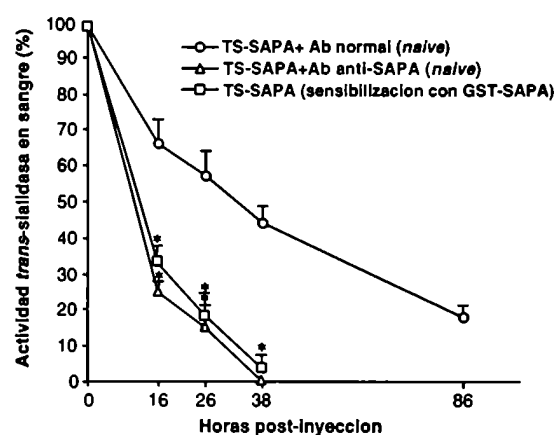
### 3.5- Experimentos con inmunocomplejos.

Los resultados presentados en el punto anterior podían implicar un rol del inmunocomplejo (TS-SAPA-anticuerpos anti-SAPA) en la inducción de la respuesta inhibitoria de *trans*-sialidasa.

Para evaluar esta hipótesis, se analizó la cinética de inducción de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa en animales inmunizados por vía ev con inmunocomplejos (TS-SAPA-anticuerpo monoclonal anti-SAPA) generados *in vitro*. Lotes de ratones control se inmunizaron con cantidades equivalentes de la proteína TS-SAPA preincubada con anticuerpos normales de ratón. Sin embargo, y tal como se indica en la tabla 5, la inducción de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa siguió la misma cinética en uno y otro caso, semejante a la observada en animales *naïve* inmunizados con cantidades equivalentes de TS-SAPA.

Por otro lado, se analizó la desaparición de actividad *trans*-sialidasa en sangre de los diferentes animales a tiempos cortos post-inyección. La figura 12 muestra que la vida media en circulación del inmunocomplejo (TS-SAPA-anticuerpo anti-SAPA) es significativamente menor ( $P < 0.01$ ) que la de la proteína TS-SAPA preincubada con anticuerpos normales de ratón. Más aún, esta cinética de desaparición muestra un perfil similar al de la proteína TS-SAPA inyectada en animales sensibilizados con GST-SAPA (figura 12). Estos resultados sugieren que en los animales sensibilizados con GST-SAPA los inmunocomplejos circulantes (TS-SAPA-anticuerpos anti-SAPA) podrían estar formando espontáneamente *in vivo*.

La menor vida media en circulación de los inmunocomplejos podría deberse a su captación específica en células presentadoras de antígenos (APC) expresando el receptor de Fc de inmunoglobulinas en superficie (Lanzavecchia, 1996). Sin embargo, los resultados presentados sugieren que otros mecanismos adicionales a esta captación facilitada por APC estarían involucrados en la inducción acelerada de anticuerpos inhibitorios en animales sensibilizados con GST-SAPA (tabla 5).



**FIGURA 12: Farmacocinética de inmunocomplejos.** Animales de la cepa C3H/HeN sensibilizados previamente o no con 35 pmoles de GST-SAPA fueron inyectados por vía ev con 100 pmoles de la/s proteína/s indicada/s. A diferentes tiempos post-inyección, se determinó la actividad *trans*-sialidasa remanente en 5  $\mu$ l de suero. Los valores obtenidos a los 30 minutos post-inyección fueron considerados como 100% actividad *trans*-sialidasa en las determinaciones sucesivas. Los datos se indican como la media + SD ( $n=3$  animales). Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) con respecto a los valores obtenidos para animales *naïve* inyectados con la proteína TS-SAPA + anticuerpos normales de ratón. Se muestra uno de dos experimentos con resultados similares. Ab, anticuerpos.

### 3.6- Titulación de los anticuerpos dirigidos contra la región enzimática por ELISA

El método de TIA es altamente específico para la evaluación de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa. Sin embargo, tiene las desventajas de ser operativamente dificultoso para el testeo de múltiples muestras en forma simultánea y de que sus resultados no pueden ser comparados con los sistemas convencionales de titulación de anticuerpos. Con el propósito de desarrollar un sistema de ELISA capaz de detectar los anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa, se unieron a la microplaca anticuerpos policlonales anti-SAPA (generados en conejo) purificados. Posteriormente, se incubó en estas placas una solución de la enzima TS-SAPA y se verificó la captura total de la misma por desaparición de la actividad enzimática en la fracción no retenida (datos no mostrados). Este sistema indirecto de inmovilización se utilizó para evitar la posible desnaturalización de la proteína durante el acople a la microplaca. Los datos mostrados en los puntos anteriores indicaban que los anticuerpos inhibitorios de la *trans*-sialidasa parecen estar dirigidos mayormente contra epitopes discontinuos en la molécula, absolutamente dependientes de la conformación del inmunógeno para su inducción (ver figuras 9 y 11 y tablas 2 y 3).

El reconocimiento de la *trans*-sialidasa por anticuerpos anti-SAPA, por otro lado, no modifica la integridad estructural del sitio catalítico (Parodi et al., 1992). Por lo tanto, estos anticuerpos pueden ser usados como un sustrato de inmovilización de la enzima en su conformación nativa. De hecho, pudimos detectar actividad *trans*-sialidasa haciendo la reacción directamente en la microplaca así tratada (datos no mostrados).

Diluciones seriadas de los sueros de animales inmunizados con la enzima TS (emulsionada en alúmina por vía ip o soluble por vía ev) se incubaron en estos pocillos y se determinó el título de anticuerpos totales dirigidos contra la región enzimática por medio de una reacción colorimétrica. Como puede verse en la tabla 6, todos los sueros de los animales inmunizados con la proteína TS por vía ev (negativos por TIA) también resultaron negativos por ELISA. Por otro lado, todos los animales inmunizados con TS por vía ip excepto uno mostraron inmunoreactividad significativa en el ELISA implementado, con títulos variables entre 1/15 a 1/60. Coincidentemente, el suero de este mismo animal mostró apenas un 27% de inhibición por TIA, significativamente menor al resto de los animales inmunizados por vía ip (tabla 6).

Si bien el ELISA desarrollado detecta en principio los anticuerpos totales dirigidos contra la región catalítica (inhibitorios de la actividad enzimática o no) la correlación observada entre ambos sistemas de evaluación resulta muy significativa. Por lo tanto, se sugiere su implementación como un primer método de búsqueda de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa en animales inmunizados con *trans*-sialidasas y, eventualmente, en animales y/o pacientes infectados con *T. cruzi* (aunque en este caso habría que cambiar la estrategia de anclaje de la enzima a la microplaca).

antígeno (via administr)	% inhib (TIA)	Titulo anti-TS
TS (ip) #1	100%	1/60
TS (ip) #2	95%	1/60
TS (ip) #3	92%	1/30
TS (ip) #4	97%	1/30
TS (ip) #5	76%	1/30
TS (ip) #6	88%	1/15
TS (ip) #7	84%	1/15
TS (ip) #8	27%	NS
TS (ev) (n=9)	0%	NS

**TABLA 6: Cuantificación de anticuerpos dirigidos contra la región enzimática de la *trans*-sialidasa por ELISA.** Diluciones apropiadas de las muestras de suero obtenidas de ratones inmunizados con la proteína TS por vía ev o ip se titularon por medio de un ELISA indirecto (ver Materiales y Métodos). Se indica, además, el porcentaje de inhibición de *trans*-sialidasa de esos mismos sueros determinado por TIA. NS, no se obtuvieron diferencias significativas con respecto a sueros de ratones *naive*. *n*, número de animales ensayados

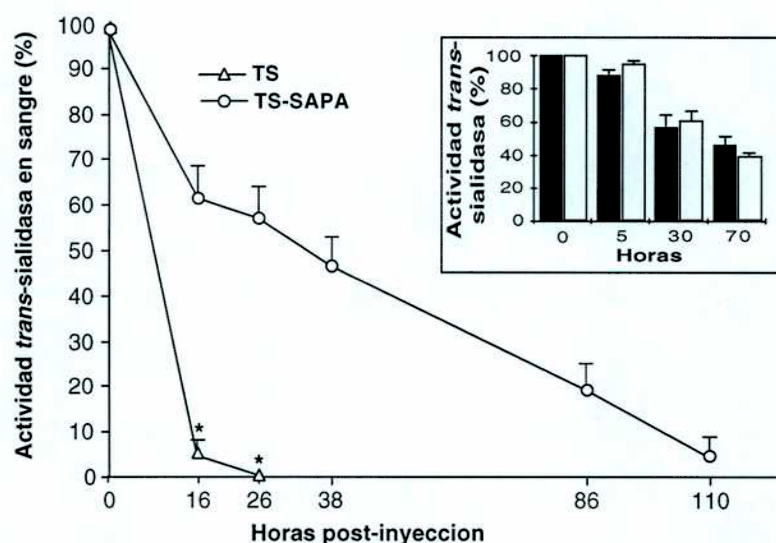
#### 4- Rol del dominio SAPA en la *trans*-sialidasa secretada a sangre

##### 4.1- Estabilidad en sangre de las *trans*-sialidasas recombinantes.

La liberación espontánea de *trans*-sialidasa a sangre del hospedador mamífero (de Titto y Araujo, 1988), sumada a los resultados obtenidos en el modelo de inmunización por vía ev (figura 11) nos indujeron a realizar un análisis farmacocinético de las distintas *trans*-sialidasas en sangre.

Con este propósito, cantidades equimolares de las proteínas TS y TS-SAPA fueron dializadas exhaustivamente contra PBS y luego inyectadas por vía ev en ratones. A los 30 minutos post-inyección, se tomaron muestras de sangre de estos ratones y se determinó la actividad *trans*-sialidasa en suero. Los valores obtenidos una vez restados los blancos ( $5785 \pm 29$  cpm y  $6138 \pm 635$  cpm para animales inyectados con TS y TS-SAPA, respectivamente) fueron considerados como valores iniciales y se tomaron como 100% de actividad *trans*-sialidasa circulante en las sucesivas determinaciones.

El perfil de desaparición relativo de la actividad *trans*-sialidasa circulante se indica en la figura 13. Como puede observarse, esta desaparición es significativamente más rápida en los animales inyectados con la proteína TS que con TS-SAPA ( $P < 0.01$ ). Estos resultados pudieron ser reproducidos independientemente del sexo y del contexto genético de los ratones inyectados (cepas endocriadas C3H/HeN y CF1 y exocriadas Rockland).



**FIGURA 13: Farmacocinética e inactivación *in vitro* de las diferentes *trans*-sialidasas.** Ratones de la cepa C3H/HeN se inyectaron por vía ev con 100 pmoles de TS o TS-SAPA y se determinó la actividad *trans*-sialidasa remanente a distintos tiempos post-inyección en alícuotas (5  $\mu$ l) de suero. Los valores obtenidos a los 30 minutos post-inyección fueron considerados como 100% actividad *trans*-sialidasa en las determinaciones sucesivas. Los datos se indican como la media + SD ( $n=3$  animales). Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) con respecto a la proteína TS-SAPA. Se muestra uno de tres experimentos con resultados similares realizados en diferentes cepas de ratones. **Inserto:** Soluciones conteniendo TS o TS-SAPA (75 pmol/ml) incubadas a 37°C en PBS suplementado con BSA (100  $\mu$ g/ml) y azida sódica (0.02% m/v), fueron cuantificadas para actividad *trans*-sialidasa a los tiempos indicados. La actividad medida al tiempo 0 fue considerada como 100% en las determinaciones sucesivas. Los datos se indican como la media + SD de tres ensayos independientes.

Sin embargo, la cinética de inactivación térmica a 37°C de ambas enzimas *in vitro* es muy semejante (figura 13, inserto), similar a lo reportado para la *trans*-sialidasa natural, tratada o no con papaína (Schenkman et al., 1994b). Si se comparan los datos mostrados en ambas curvas, puede observarse que la cinética de desaparición relativa de ambas enzimas *in vitro* es semejante a la reportada *in vivo* para la proteína TS-SAPA. Por lo tanto puede sugerirse que la rápida desaparición de la actividad *trans*-sialidasa en animales inyectados con la proteína TS es un proceso activo, posiblemente mediado por mecanismos fisiológicos específicos.

El ensayo utilizado no permite discriminar si la desaparición de la actividad enzimática en circulación se debe a la inactivación de la molécula o a un proceso de catabolismo específico. A fin de evaluar estas posibilidades, se realizaron ensayos de Western blot sobre muestras de sangre con un anticuerpo comercial dirigido hacia el tag de residuos histidinas presente en el extremo N-terminal de ambas proteínas (figura 5). Lamentablemente, la sensibilidad de este anticuerpo no fue suficiente para detectar a la enzima circulante (datos no mostrados).

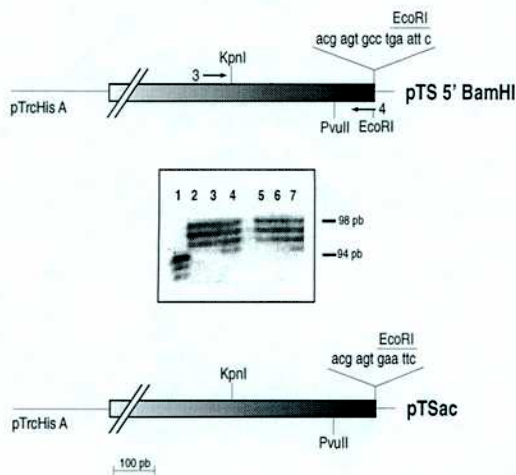
#### 4.2- Construcción de un gen de *trans*-sialidasa aceptor de antígenos repetitivos de *T. cruzi*.

La mayor estabilidad de la proteína TS-SAPA en circulación podía ser el reflejo de una simple alteración en las propiedades físico-químicas de la molécula causada por la adición del dominio SAPA en *cis*. Por lo tanto, quisimos estudiar el efecto de la adición en *cis* de dominios de características semejantes a SAPA en la farmacocinética de la *trans*-sialidasa.

Las moléculas elegidas fueron otros antígenos repetitivos presentes en diferentes proteínas de *T. cruzi*, que comparten con SAPA su secuencia de aminoácidos deficiente en residuos hidrofóbicos y su falta de estructuras conformacionales rígidas. Como se explicó en la introducción (punto 4.4), estos antígenos habían sido aislados originalmente en nuestro laboratorio a partir del rastreo de una genoteca de expresión del parásito (Ibáñez et al., 1987). Por lo tanto, todos ellos tenían la misma fase de expresión, dada por el sitio EcoRI de clonado en el bacteriófago  $\lambda$ gt11.

A fin de mecanizar el proceso de clonado de estos dominios repetitivos en *cis* con la *trans*-sialidasa, se construyó un clon "aceptor de repeticiones", que dispone de un único sitio EcoRI en su extremo 3', en la fase de expresión apropiada. Este clon aceptor se derivó del clon pTS 5' BamHI ya descrito (figura 3). La fase del sitio EcoRI de este clon se modificó por PCR, utilizando los oligonucleótidos 3 y 4 mostrados en la figura 14. El rastreo de los clones positivos se hizo por comparación del tamaño del fragmento PvuII - EcoRI de los productos de ligación. Como puede verse en el inserto de la figura 14, el clon 1 muestra un tamaño del fragmento PvuII - EcoRI 4 pb menor que el del clon original pTS 5' BamHI (clones 2-7) y por lo tanto fue seleccionado, amplificado y secuenciado a fin de verificar su modificación a nivel nucleotídico. A este clon se lo denominó pTSac (figura 14).





**FIGURA 14: Construcción de un gen de *trans*-sialidasa aceptor de dominios repetitivos.** El extremo 3' del clon pTS 5' BamHI fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos 3 y 4 (conteniendo un sitio EcoRI propio) indicados con flechas. El producto amplificado y digerido por KpnI + EcoRI se usó para reemplazar el fragmento KpnI-EcoRI del clon pTS 5' BamHI original y generar el clon pTSac. Se indica en ambos casos la fase de reemplazo del sitio EcoRI único. **Inserto:** Diferentes clones de ligación (1-7) fueron digeridos con EcoRI, rellenado su extremo 5' protruyente por acción de Klenow (0.5 Unidades enzimáticas) en presencia de dCTP, dGTP, dTTP y dATP-S<sup>35</sup> (cada uno 1.5 μM final) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de inactivar la Klenow por calentamiento a 75°C, los productos de reacción se digirieron por PvuII, se sembraron en geles desnaturalizantes de poliácridamida 5% y se expusieron autoradiográficamente durante 3 horas. El tamaño de fragmento para los distintos clones, en pb, se indica a la derecha.

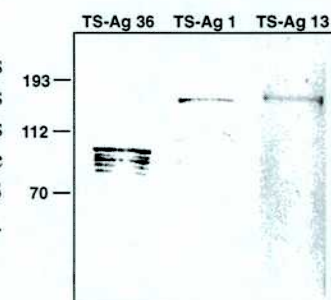
La actividad específica de la proteína purificada a partir de este clon (llamada TSac) fue comparada con la correspondiente a las proteínas obtenidas a partir de los clones pTrcTS611/2 original y pTS 5' BamHI, resultando todas ellas similares.

#### 4.3- Construcción de *trans*-sialidasas quiméricas conteniendo antígenos repetitivos de *T. cruzi*.

Tomando como base el clon pTSac descrito en el punto anterior, se procedió a la adición en su extremo 3' de los distintos antígenos repetitivos subclonados en el vector de expresión bacteriano pGEX-1 (Pastini et al., 1994). El protocolo para todas las construcciones fue básicamente el mismo: se liberó el fragmento de interés por digestión con EcoRI del correspondiente clon en pGEX y se lo ligó con el clon pTSac previamente digerido por EcoRI. Con los productos de ligación obtenidos, se transformaron bacterias *E. coli* y se seleccionó las colonias positivas por medio de un rastreo inmunológico (ver Materiales y Métodos) con el antisuero correspondiente. Los clones así obtenidos fueron secuenciados para confirmar la identidad y correcta orientación de su inserto. A partir de la adición de los antígenos 1, 13 y 36 (tabla 1) al clon pTSac, se obtuvieron los respectivos clones pTS-Ag 1, pTS-Ag 13 y pTS-Ag 36.

La correcta expresión de todas estas proteínas quiméricas se verificó en ensayos de Western blot, revelados con anticuerpos policlonales específicos generados contra cada uno de los dominios repetitivos (figura 15). Ninguno de los antisueros utilizados mostró inmunoreactividad con la proteína

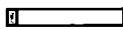
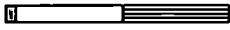
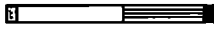
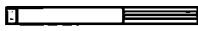
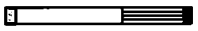
**FIGURA 15: Identificación de las *trans*-sialidasas quiméricas.** Las diferentes proteínas fueron sometidas a ensayos de Western blot revelados con antisueros policlonales contra los diferentes dominios repetitivos. La presencia de múltiples bandas inmunoreactivas en la calle correspondiente a la proteína TS-Ag 36 puede deberse a productos de degradación parcial. El incremento en la Mr de la TS-Ag 13 (ver tabla 7) se atribuye a migración anómala en SDS-PAGE (Burns et al., 1992). Los estándares de Mr se indican (en kDa) a la izquierda.



TSac carente de repeticiones (datos no mostrados).

#### 4.4- Análisis de las distintas *trans*-sialidasas quiméricas.

Las diferentes *trans*-sialidasas quiméricas fueron purificadas de acuerdo a lo descrito (punto 2). La tabla 7 muestra un esquema general de las diferentes proteínas y sus características. Como puede observarse, todas ellas muestran una actividad específica similar, sugiriendo que la presencia del dominio repetitivo en *cis* no altera mayormente el plegamiento ni la funcionalidad de la región catalítica, tal como se verifica en el caso del dominio SAPA (figura 7). El carácter altamente hidrofílico y la estructura secundaria laxa de los diferentes dominios repetitivos predicha por distintos algoritmos computacionales podría estar explicando en parte este fenómeno. Por otro lado, las propiedades físico-químicas de las diferentes *trans*-sialidasas quiméricas obtenidas (Mr, pI cercano a 6, carga neta a pH7) resultan comparables.

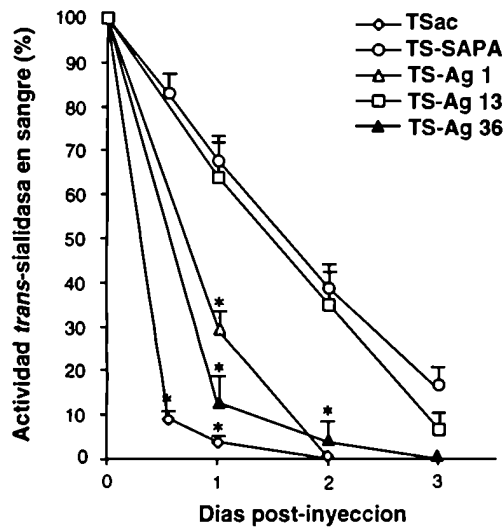
Nombre	Repr. Esquemática	Mr	pI	Carga	Act. Esp.	Unid. Repet.
TSac		75.4	6.58	-3.8	0.56	
TS-Ag 1		126.6	5.40	-25.7	0.48	6
TS-Ag 13		113.7	6.02	-13.4	0.77	56
TS-Ag 36		100.7	5.95	-18.8	ND	6
TS-SAPA		94.6	6.44	-9.4	1.09	13

**TABLA 7: Representación esquemática y propiedades moleculares de las *trans*-sialidasas quiméricas.** Los diferentes motivos presentes en las *trans*-sialidasas quiméricas se muestran con diferente patrón de sombreado. Desde el N- al C-terminal: el péptido de fusión provisto por el vector pTrcHis (gris), la región enzimática (blanco) y el dominio repetitivo variable (rayado). Las proteínas TS-SAPA y TS-Ag 13 contienen, además, un dominio adicional no repetitivo en su extremo C-terminal (indicado en negro). Las Mr están indicadas en kDa y la actividad específica (Act. Esp.), en Unidades enzimáticas/nmol. Se indica la carga neta predicha a pH7 para cada proteína. El guión indica la ausencia de unidades repetitivas en la proteína TSac. La secuencia aminoacídica consenso de las diferentes unidades repetitivas es: antígeno 1 (SMNAR AQELA REKKL ADRAF LDQKP EGVPL RELPL DDDSD FVAME QERRQ QLEKD PRRNA KEIAA LEE; 68 aminoácidos), antígeno 13 (EPKSA; 5 aminoácidos), antígeno 36 (ALPQE EQEDV GPRHV DPDHF RSTTQ DAYRP VDPSA YKR; 38 aminoácidos) y antígeno SAPA (DSSAH STPST PA; 12 aminoácidos) (Ibáñez et al., 1988).

#### 4.5- Estabilidad en sangre de las distintas *trans*-sialidasas quiméricas.

La farmacocinética de las diferentes *trans*-sialidasas quiméricas se determinó tal cual lo detallado en el punto 4.1. Lotes de ratones control, se inyectaron con cantidades equimolares de las proteínas TSac o TS-SAPA.

Como se observa en la figura 16, pueden distinguirse tres grupos de *trans*-sialidasas quiméricas de acuerdo a su estabilidad en sangre. El primero de ellos está integrado por las proteínas TS-SAPA y TS-Ag 13 con una vida media en sangre estimada en 32-34 horas. El segundo grupo lo



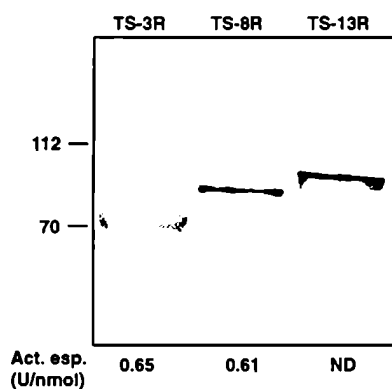
**FIGURA 16: Análisis farmacocinético de las *trans*-sialidasas quiméricas.** Ratones de la cepa C3H/HeN se inyectaron por vía ev con 100 pmoles de las diferentes proteínas, se sangraron a los tiempos indicados y se determinó la actividad *trans*-sialidasa remanente en 5 µl de suero. Los valores obtenidos a los 30 minutos post-inyección (día 0) fueron considerados como 100% actividad *trans*-sialidasa en las determinaciones sucesivas. Los datos se indican como la media + SD (n=3 animales). Los asteriscos indican diferencias significativas (P<0.05) con respecto a la proteína TS-SAPA. Se muestra uno de dos experimentos con resultados similares.

conforman las proteínas TS-Ag 1 y TS-Ag 36 con una vida media en sangre aproximada de 15-19 horas, significativamente menor al grupo anterior (P<0.05). Por último, la proteína TSac muestra una vida media en sangre muy corta, de alrededor de 7 horas (figura 16). La farmacocinética de esta proteína es prácticamente igual que la de la proteína TS (figura 13).

En definitiva, puede concluirse que los dominios repetitivos SAPA y 13 estabilizan de manera mucho más eficiente a la actividad *trans*-sialidasa circulante. Interesantemente, estos dominios SAPA y 13 son los únicos, entre todos los ensayados, que están presentes en proteínas de superficie del parásito, espontáneamente liberadas a sangre (tabla 1).

#### 4.6- Determinación de las secuencias del dominio SAPA involucradas en la estabilización en sangre de la actividad *trans*-sialidasa.

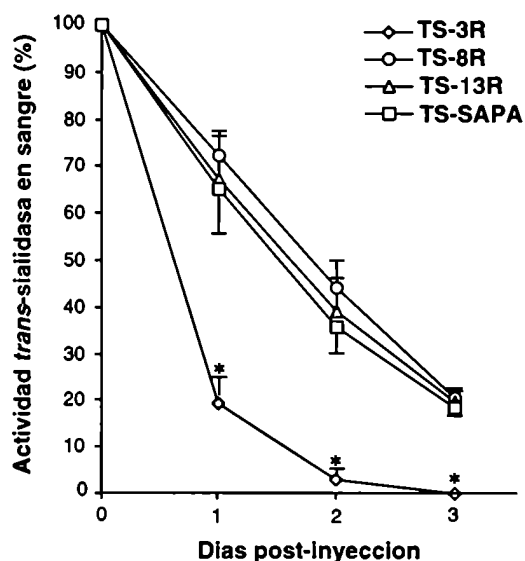
Dado que el dominio SAPA presente en la proteína TS-SAPA está compuesto por 13 repeticiones de aminoácidos seguidas por un motivo de anclaje por GPI (figura 4A), quisimos averiguar cuáles eran las secuencias mínimas involucradas en el fenómeno de estabilización descrito en los puntos anteriores. Para ello, se generaron por PCR diferentes clones parcialmente deletados a partir del clon pTS-SAPA, utilizando los oligonucleótidos 3 (figura 14) y 5 (ver Materiales y Métodos). Dado que el oligonucleótido 5 es complementario a una secuencia interna de la repetición de SAPA, la amplificación resultó en una mezcla de productos conteniendo diferente número de repeticiones. La mezcla de productos completa purificada de gel de agarosa fue digerida por KpnI + EcoRI (sitio provisto por el oligonucleótido 5) y usada para reemplazar el fragmento KpnI – EcoRI del clon pTSac (figura 14). Los clones obtenidos se digirieron por KpnI + EcoRI y se corrieron electroforéticamente en geles de agarosa 1,2%. Se seleccionaron 3 de diferente tamaño de inserto KpnI - EcoRI, a los cuales se les determinó el número de repeticiones por secuenciación de ADN. Estos tres clones, conteniendo respectivamente 3, 8 y 13 unidades repetitivas y nada del motivo de anclaje por GPI, fueron denominados pTS-3R, pTS-8R y pTS-13R. Las proteínas expresadas y purificadas a partir de estos clones mostraron inmunoreactividad con un anticuerpo monoclonal



**FIGURA 17:** Identificación de las *trans*-sialidasas conteniendo diferente número de repeticiones de SAPA. Las diferentes proteínas fueron sometidas a ensayos de Western blot revelados con un anticuerpo monoclonal anti-SAPA. Los estándares de Mr se indican (en kDa) a la izquierda. La actividad específica *trans*-sialidasa (Act. esp.) para cada proteína se indica debajo. ND, no determinado.

anti-SAPA (figura 17), y una actividad específica similar a la reportada para las diferentes *trans*-sialidasas quiméricas (comparar datos de figuras 17 y tabla 7).

La farmacocinética de estas proteínas se analizó de acuerdo a lo descrito, usando como referencia interna del ensayo un lote de animales inyectados con cantidades equimolares de la proteína TS-SAPA. Como se muestra en la figura 18, las proteínas TS-8R y TS-13R muestran una persistencia en sangre similar a la de TS-SAPA (vidas medias estimadas en ambos casos de 37-39 horas), indicando que el motivo de anclaje por GPI no estaría involucrado en la estabilización de la molécula circulante. Por el contrario, la proteína TS-3R muestra una vida media en sangre significativamente menor (12-13 horas,  $P < 0.01$ ) (figura 18). Estos resultados sugieren que existiría un número mínimo de repeticiones capaces de mediar este fenómeno.



**FIGURA 18:** Análisis farmacocinético de las *trans*-sialidasas conteniendo diferente número de repeticiones de SAPA. Ratones de la cepa C3H/HeN se inyectaron por vía ev con 100 pmoles de las diferentes proteínas, se sangraron a los tiempos indicados y se determinó la actividad *trans*-sialidasa remanente en 5  $\mu$ l de suero. Los valores obtenidos a los 30 minutos post-inyección (día 0) fueron considerados como 100% actividad *trans*-sialidasa en las determinaciones sucesivas. Los datos se indican como la media + SD ( $n=3$  animales). Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) con respecto a la proteína TS-SAPA. Se muestra uno de tres experimentos con resultados similares.

## 5- Utilización de las repeticiones presentes en antígenos de *T. cruzi* para estabilizar otra proteína en sangre

### 5.1- Expresión y purificación de proteínas GST quiméricas conteniendo diferentes dominios repetitivos de *T. cruzi*

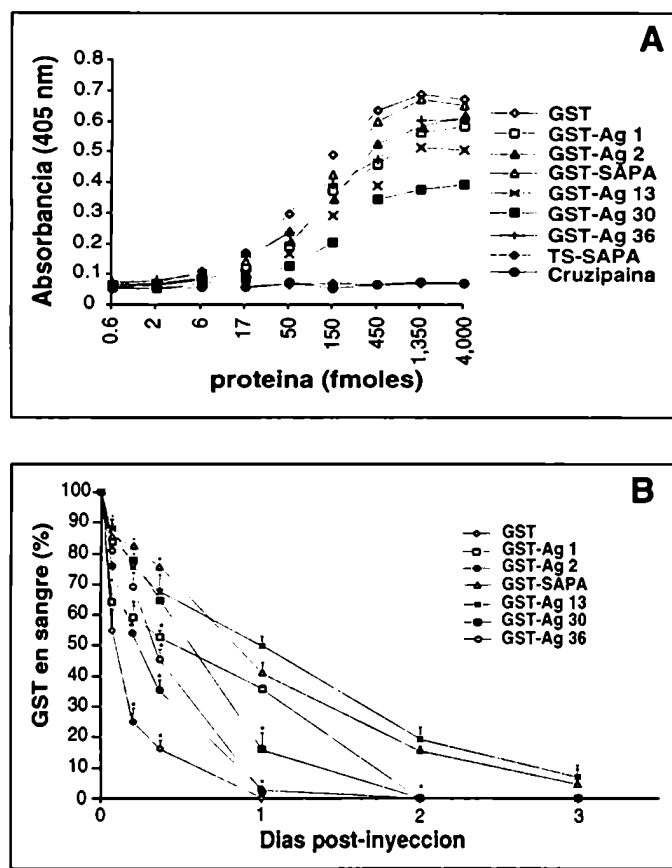
Teniendo en cuenta los resultados mostrados en el punto 4, quisimos estudiar si la estabilización en sangre mediada por los antígenos SAPA y 13 (figuras 16 y 18) podía validarse en otro modelo experimental en absoluto relacionado a la *trans*-sialidasa. Para ello se expresaron y purificaron los antígenos repetitivos de *T. cruzi* ya mencionados como productos de fusión con la glutatión S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*, codificada en el vector comercial pGEX-1 (Pastini et al., 1994). En paralelo, se expresaron en el mismo sistema otros dos antígenos repetitivos de *T. cruzi* (antígenos 2 y 30), no ensayados en el modelo *trans*-sialidasa (tabla 1). El número de repeticiones y la secuencia aminoacídica consenso de la unidad repetitiva de estos dos antígenos se detalla en la Introducción (sección 4.4)

### 5.2- Farmacocinética de las GST quiméricas

La farmacocinética de las quimeras de GST obtenidas se estudió en lotes de ratones inyectados por vía ev. Para la detección de las proteínas circulantes se desarrolló un método cuantitativo de captura del dominio GST en microplacas de ELISA (ver Materiales y Métodos). Como se muestra en la figura 19A, el rango de linealidad del ensayo de captura fue de 0.01 a 1.35 pmoles para todas las GST quiméricas, obteniéndose un valor correspondiente al 50% de reactividad muy similar para todas ellas (aproximadamente 0.15 pmoles). Esto sugiere que la presencia en *cis* de las diferentes repeticiones no modifica mayormente el reconocimiento de los anticuerpos dirigidos contra el dominio GST. Por otro lado, ni el antígeno SAPA presentado en otro contexto (TS-SAPA) ni una proteína no relacionada a GST (cruzipaína; Cazzulo, 1999) mostraron reactividad significativa en el sistema implementado (figura 19A), demostrando su alta especificidad.

Como se observa en la figura 19B, 3 grupos de proteínas pueden identificarse de acuerdo a su vida media en sangre. El primero incluye a las proteínas GST-SAPA y GST-Ag 13, con una vida media estimada en 22-24 horas. El segundo grupo de quimeras de GST se caracteriza por una vida media en sangre significativamente menor (alrededor de 6-13 horas,  $P < 0.05$ ) y está integrado por las proteínas GST-Ag 1, GST-Ag 2, GST-Ag 30 y GST-Ag 36. Por último, la proteína GST mostró una sobrevida en sangre estimada en 3 horas ( $P < 0.01$ ) y cayó a niveles indetectables ya a las 24 horas post-inyección (Figura 19B). Tal cual lo demostrado en el modelo de *trans*-sialidasa (figura 16), la adición en *cis* de cualquiera de los dominios repetitivos ensayados parece ejercer un efecto moderado sobre la vida media de las quimeras en sangre, pero este efecto resulta significativamente mayor cuando las quimeras contienen a los dominios repetitivos presentes en los antígenos 13 o SAPA. En este caso, y dado el sistema de captación de antígenos circulantes utilizado, sí puede establecerse una correlación directa entre el descenso en los niveles de densidad óptica y la remoción

de las moléculas de sangre.



**FIGURA 19: Análisis farmacocinético de las GST quiméricas. Panel A:** Estandarización del ensayo de captura de GST. Diluciones seriadas de las diferentes proteínas diluidas en suero de ratón *naive*, se ensayaron en el método de captura descrito. Los datos indican la media de la densidad óptica obtenida en tres determinaciones independientes (en ningún caso, las SD excedieron el 10% del valor de las medias). Las proteínas TS-SAPA y cruzipaina se usaron como controles negativos. **Panel B:** Ratones de la cepa C3H/HeN o CF1 se inyectaron por vía ev con 1 nmol de las diferentes proteínas, y se determinó la GST remanente por ELISA en diluciones seriadas de suero obtenido a diferentes tiempos post-inyección. Los valores obtenidos a los 30 minutos post-inyección (día 0) fueron considerados como 100% de GST circulante en las determinaciones sucesivas. Los datos se indican como la media + SD ( $n=4$  animales). Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ) con respecto a la proteína GST-SAPA. Se muestra uno de dos experimentos con resultados similares.

### 5.3- Análisis de las GST quiméricas circulantes.

Debido a la naturaleza policlonal del anticuerpo utilizado para la captura y revelado de las GST quiméricas circulantes, cabía la posibilidad que al menos una parte de la inmunoreactividad obtenida (figura 19B) se debiera al pegado de péptidos conteniendo uno o unos pocos epitopes resultantes de la acción de proteasas sanguíneas sobre las GST quiméricas inyectadas. Con el propósito de estudiar el perfil de las especies inmunoreactivas circulantes, muestras de suero obtenidas a diferentes tiempos post-inyección fueron sometidas a 1) análisis de actividad GST remanente y 2) Western blot.

1) Todas las GST quiméricas mostraron una actividad específica de glutatión transferasa similar, estimada en 10 miliunidades arbitrarias de absorbancia  $\times$  ( $\mu$ gramo de proteína  $\times$  minuto)<sup>-1</sup> (datos no mostrados). Por lo tanto, puede considerarse que a igualdad de pmoles inyectados, también se administra la misma cantidad de unidades enzimáticas. Distintos lotes de ratones fueron inyectados con 1 nmol de las distintas GST quiméricas y alícuotas de los sueros obtenidos a diferentes tiempos post-inyección fueron ensayadas para actividad glutatión transferasa. Los valores obtenidos fueron comparados con los valores de actividad reportados a los 30 minutos post-inyección (considerados como 100% de actividad circulante). Este sistema de evaluación, sin embargo, no resultó apropiado

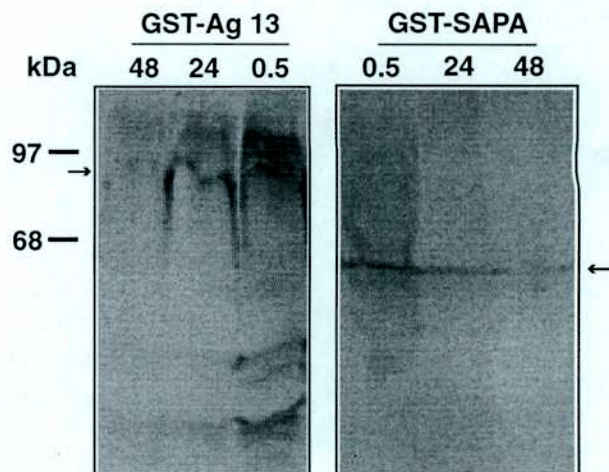
ya que sólo pudo detectarse actividad remanente a las 24 horas post-inyección en los animales inoculados con las proteínas GST-Ag 1, GST-Ag 13 y GST-SAPA (8, 25 y 21%, respectivamente).

2) En paralelo, alícuotas de estos mismos sueros fueron sometidos a SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes, transferidas a filtros de nitrocelulosa y analizadas en ensayos de Western blot. Las membranas fueron reveladas primeramente con 2 anticuerpos policlonales distintos anti-GST, generados en conejo. Sin embargo, debido a la baja sensibilidad de estos anticuerpos, debían sembrarse cantidades excesivas de suero, lo cual interfería con la corrida y la transferencia de las proteínas (datos no mostrados).

Por lo tanto, decidimos testear los filtros con sueros policlonales dirigidos contra los distintos dominios repetitivos. Si bien este procedimiento no permite una comparación cuantitativa entre los distintos filtros, sí permite analizar el perfil de las especies circulantes en cada caso. Como puede observarse en la figura 20, las proteínas GST-Ag 13 y GST-SAPA circulantes a las 24 y 48 horas post-inyección muestran una única especie circulante mayoritaria, correspondiente a la Mr de la proteína inyectada. En el caso de la proteína GST-Ag 13, las especies parcialmente degradadas presentes en la muestra de inyección parecen ser removidas más rápidamente que la especie intacta (figura 20).

Estos datos sugieren que o bien no hay proteólisis parcial de las proteínas circulantes o, en caso de haberlo, estos productos son removidos rápidamente de circulación y no participan de la inmunoreactividad reportada en la figura 19B.

En los animales inyectados tanto con GST-Ag 1, GST-Ag 2, GST-Ag 30 y GST-Ag 36, por otro lado, solamente pudo detectarse inmunoreactividad por Western blot a los 30 min post-inyección, pero no en los tiempos sucesivos (datos no mostrados). Si bien las bases moleculares y la sensibilidad de los ensayos de Western blot (figura 20), determinación de actividad enzimática y del ELISA de captura implementado (figura 19B) son diferentes, puede mencionarse cierta correlación entre los resultados obtenidos por los tres métodos.



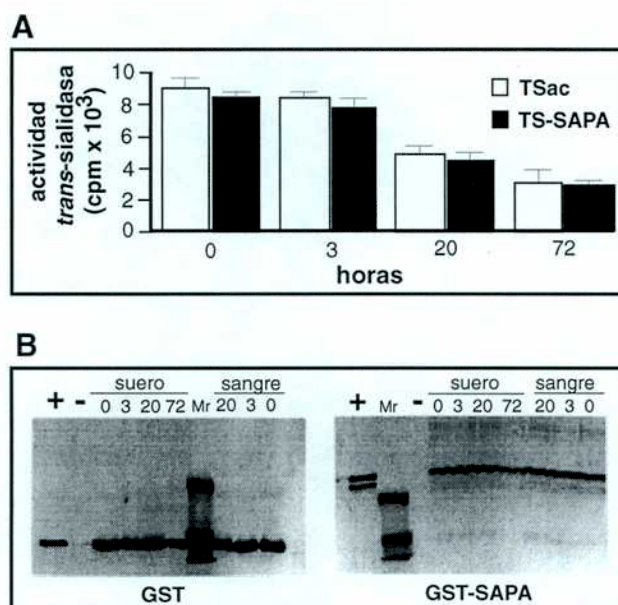
**FIGURA 20: Análisis de las especies circulantes en animales inyectados con GST quiméricas.** Muestras de suero (10  $\mu$ l) obtenidas a los tiempos indicados (en horas post-inyección) fueron sometidas a ensayos de Western blot revelados con anticuerpos policlonales dirigidos contra el dominio repetitivo correspondiente. Las Mr (en kDa) se indican a la izquierda. La posición de las proteínas intactas se indica mediante flechas.

## 6- Evaluación de los posibles mecanismos involucrados en la estabilización de proteínas quiméricas mediada por el antígeno SAPA.

### 6.1- Ensayos de protección frente a proteasas plasmáticas

Uno de los mecanismos posibles para explicar los resultados mostrados en las secciones 4 y 5 sería un rol protector de las repeticiones de los antígenos SAPA y 13 frente al ataque de proteasas sanguíneas. Por lo tanto, decidimos evaluar esta alternativa *in vitro*. Para ello se incubaron a 37°C cantidades equimolares de las proteínas TS o TS-SAPA y GST o GST-SAPA en presencia de suero o sangre entera de ratón. Se tomaron alícuotas de la mezcla de incubación a diferentes tiempos y se evaluó la degradación proteica (en el caso de las GST) y la actividad enzimática remanente (en el caso de las *trans*-sialidasas). En la figura 21, puede observarse que tanto la actividad enzimática (panel A) como la cantidad total de proteína (panel B) se ven disminuídas a lo largo del ensayo, pero que esta disminución es independiente de la presencia de las repeticiones. Por lo tanto, puede sugerirse que no existe una protección diferencial frente a la acción de proteasas séricas mediado por el dominio repetitivo SAPA.

Por otro lado, la tasa de degradación por proteasas de las proteínas TS y GST *in vitro* (figura 21A y B) es mucho menor a las reportadas *in vivo* (figuras 13 y 19B), sugiriendo la existencia de otro/s mecanismo/s involucrado/s.

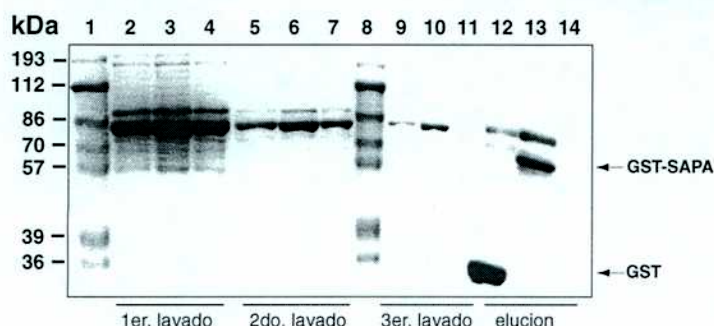


**FIGURA 21: Ensayos de sensibilidad de las proteínas quiméricas a proteasas sanguíneas. Panel A:** TSac y TS-SAPA (3 µg/ml) fueron incubadas en presencia de suero de ratón *naíve* y se determinó la actividad *trans*-sialidasa en alícuotas (2 µl) colectadas a diferentes tiempos. Los datos se indican como la media + SD de tres ensayos independientes. **Panel B:** Las proteínas GST o GST-SAPA (0.1 mg/ml) fueron incubadas en presencia de suero o sangre entera de ratón *naíve* colectada en 50% (v/v) de solución de Alsever (Harlow y Lane, 1988). A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de 10 µl y se las sometió a ensayos de Western blot revelados con un anticuerpo policlonal anti-GST. Los controles se indican como - (sangre de ratón *naíve*) y + (proteínas incubadas en PBS). Los estándares de Mr utilizados corresponden a 55 y 30 kDa.

### 6.2- Ensayos de interacción con componente/s plasmático/s

Por otro lado, se ensayó si las repeticiones del antígeno SAPA podrían estar mediando la unión a alguna molécula endógena que le sirviera como transportador en circulación. En este caso, la estrategia utilizada fue la de acoplar las distintas proteínas a una matriz de agarosa activada, incubadas en presencia de suero de ratón *naíve* y analizar el perfil de proteínas co-precipitantes en





**FIGURA 22: Ensayo de co-precipitación de proteínas séricas.** Proteínas GST (calles 2, 5, 9 y 12) y GST-SAPA (calles 3, 6, 10 y 13) acopladas a agarosa o agarosa sin acoplar (calles 4, 7, 11 y 14) se incubaron en presencia de suero de ratón *naïve* por 60 minutos a temperatura ambiente con agitación ocasional. Muestras de los sobrenadantes obtenidos luego del primer (calles 2-4), segundo (calles 5-7) y tercer lavado (calles 9-11) en TBS o muestras del pellet final de agarosa (calles 12-14) se sometieron a SDS-PAGE y se revelaron por tinción con Coomassie Brilliant Blue. Las calles 1 y 8 contienen los estándares de Mr, indicados en kDa a la izquierda de la figura. La posición de las proteínas GST y GST-SAPA se indica mediante flechas.

de TS-SAPA. La permanencia en sangre de la enzima TS-SAPA (medida como actividad *trans*-sialidasa remanente a distintos tiempos) no difirió significativamente en uno y otro caso (datos no mostrados), obteniéndose resultados muy similares a los ya reportados (figura 13).

Todos estos resultados, en conjunto, sugieren que la mayor estabilidad de proteínas en circulación mediada por las repeticiones de SAPA no puede atribuirse, en principio, a su interacción con algún componente del plasma normal de mamíferos.

uno y otro caso. Como puede verse en la figura 22, las proteínas que interaccionaron con las proteínas GST o GST-SAPA inmovilizadas luego de cada etapa de lavado fueron similares.

También se realizaron ensayos de competición de posibles receptores endógenos circulantes para el antígeno SAPA. Con este propósito, 15 minutos antes de la administración de la proteína TS-SAPA (20 pmoles) por vía ev, los animales fueron inyectados por la misma vía con una dosis 20 veces mayor de la proteína GST-SAPA. El lote de animales control, se inyectó únicamente con 20 pmoles





## DISCUSION

### Modelo experimental

El modelo experimental pensado para el análisis funcional del dominio SAPA se basaba en la comparación de moléculas de *trans*-sialidasa de tripomastigote idénticas, conteniendo o no al dominio repetitivo. Una alternativa para la generación de estas moléculas era la purificación de *trans*-sialidasa a partir del parásito en cultivo y su posterior tratamiento o no con papaína en condiciones controladas, tal cual lo descrito (Schenkman et al., 1994b). Este tratamiento parece remover exclusivamente al dominio SAPA, sin alterar la integridad de la región globular catalítica. Sin embargo, los alcances exactos de este procesamiento no han sido debidamente caracterizados e incluso pueden ser variables de acuerdo al lote de papaína utilizado o a la presencia de distintas proteínas co-purificadas de preparación en preparación.

Para trabajar en un modelo más definido, optamos por la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Para ello se generó un clon de *trans*-sialidasa de tripomastigotes conteniendo en *cis* al dominio repetitivo, a partir de un clon activo preexistente (figuras 3-6). Las proteínas TS y TS-SAPA generadas mostraron actividad específica similar, comparable también a la determinada para la *trans*-sialidasa natural (figura 7). Por lo tanto, puede asumirse que ambas moléculas están correctamente plegadas.

La única diferencia remarcable entre la proteína TS-SAPA generada y la *trans*-sialidasa natural se verificó a nivel de su grado de agregación. Mientras la *trans*-sialidasa expresada por el estadio tripomastigote forma espontáneamente complejos de 3 a 6 subunidades a través de uniones no covalentes (figura 2), el análisis de TS-SAPA por filtración molecular indica que esta proteína se encuentra mayormente en forma de monómero (figuras 8A y 8B). Esta discrepancia podría atribuirse al sistema de expresión utilizado, a la acción de una molécula adicional (ausente en *E. coli*) responsable de la agregación de la *trans*-sialidasa en el parásito o a su diferente procesamiento post-traducciona. Si bien no ha sido demostrado experimentalmente, la secuencia aminoacídica de las repeticiones de SAPA predice la presencia de múltiples sitios de *O*-glicosilación (Gupta et al., 1999) y fosforilación (Blom et al., 1999).

### Modulación de la inmunogenicidad de la *trans*-sialidasa mediada por SAPA.

Con el propósito de evaluar la existencia de un mecanismo de inmunodistracción mediado por el dominio SAPA, se inmunizaron animales con las distintas *trans*-sialidasas recombinantes y se analizó el curso de la respuesta inmune humoral contra las diferentes regiones de la enzima.

En los dos modelos de inmunización implementados (utilizando enzimas solubles por vía ev o enzimas adsorbidas en alúmina por vía ip), los anticuerpos parecen estar dirigidos primariamente

hacia la porción repetitiva de la *trans*-sialidasa. Como se indica en la figura 11, los anticuerpos anti-SAPA circulantes pueden ser detectados, por lo general, en forma más temprana que los anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa. En términos cuantitativos, también puede sugerirse que los anticuerpos anti-SAPA son mayoritarios, si bien los métodos de detección de inmunoglobulinas dirigidas contra uno y otro dominio no permite una comparación adecuada de sus niveles.

La titulación de los anticuerpos dirigidos contra la región enzimática por un sistema de ELISA indirecto, arrojó valores de 1/15 a 1/60, dependiendo del animal (tabla 6). Debe tenerse en cuenta que parte de la inmunoreactividad detectada por este sistema puede corresponder a anticuerpos dirigidos contra epítopes localizados en diferentes zonas de la región enzimática, no necesariamente inhibitorios (Campetella et al., manuscrito en preparación). Aún despreciando el efecto de éstos en el ensayo de ELISA implementado, los títulos obtenidos resultan significativamente menores que los de los anticuerpos dirigidos contra el dominio SAPA en animales inmunizados con cantidades equimolares o aún menores de la proteína TS-SAPA (tabla 2). En definitiva, puede asumirse que, en forma análoga a lo que ocurre *in vivo* durante la infección (Prioli et al., 1992), el dominio SAPA es inmunodominante en los modelos de inmunización con *trans*-sialidasas recombinantes. Esta inmunodominancia podría estar justificada por su mayor densidad molar de epítopes, por su mayor relajamiento estructural (Landry, 1997), por su carácter repetitivo (ver introducción, sección 4.2) y/o por otros factores relacionados al procesamiento de la *trans*-sialidasa en células presentadoras de antígenos (Sercarz et al., 1993; Agarwal et al., 1996 y 1998; Nayak et al., 1998).

Sin embargo, la inmunodominancia del dominio SAPA no parece retrasar y/o prevenir la inducción de anticuerpos inhibitorios en los animales inmunizados. En el modelo de administración de *trans*-sialidasas emulsionadas en alúmina por vía ip, por ejemplo, la cinética de aparición (figura 9) y el título de anticuerpos inhibitorios obtenidos (figura 10) no se ve afectada por la presencia del dominio repetitivo en el inmunógeno. Más aún, el porcentaje de animales positivos para el ensayo de TIA es muy semejante para todos los lotes de animales inmunizados con diferentes cantidades de proteínas TS o TS-SAPA nativas (tabla 2).

Aún más interesantes resultan los datos obtenidos por inmunización de enzimas solubles por vía ev, esto es, siguiendo la vía de presentación natural de la *trans*-sialidasa de tripomastigotes. Los mismos no sólo refutan la hipótesis de la inmunodistracción sino que, por el contrario, sugieren que la presencia del dominio SAPA en el inmunógeno favorecería la inducción de anticuerpos inhibitorios (figura 11). Este efecto no puede ser atribuido a una activación policlonal de linfocitos mediada por SAPA (y verificada para otros antígenos repetitivos de *T. cruzi*; Pestel et al., 1992) ya que sólo se observa en el caso de coadministración en *cis* de ambos dominios (tabla 3).

Una primera hipótesis para justificar estos resultados sería que la inducción de anticuerpos inhibitorios requiere de un tiempo mínimo de exposición de la *trans*-sialidasa en su conformación nativa al sistema inmune. De hecho, los resultados mostrados en la figura 9 y en las tablas 2 y 3 sugieren que los anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa parecen estar dirigidos exclusivamente contra epítopes conformacionales. En este contexto, la estabilización de la molécula en su

conformación nativa en sangre mediada por el dominio SAPA sería determinante (figura 13).

Alternativamente, puede sugerirse que las repeticiones de SAPA proveen de ciertos determinantes antigénicos adicionales que favorecen la inducción de anticuerpos inhibitorios. Los datos obtenidos de animales inmunizados con la proteína TS emulsionada en alúmina por vía ip indican que la región catalítica *per se* contiene todos los epitopes B y/o T necesarios para la inducción de esta respuesta (figura 9), aunque es difícil evaluar el rol del adyuvante en este modelo.

Por otro lado, debe considerarse el rol de la propia respuesta inmune contra el dominio repetitivo en la inducción de anticuerpos y/o células T dirigidas contra el dominio enzimático. Este fenómeno se conoce como difusión o spreading epitópico intramolecular, y ha sido muy bien descrito en otros sistemas (Mamula y Janeway Jr., 1993; Lehmann et al., 1992; Vijayakrishnan et al., 1994). Como consecuencia del bloqueo de ciertos epitopes mediado por inmunoglobulinas circulantes, la interacción con el antígeno de otras poblaciones de linfocitos B aún no activadas se vería favorecida (Vijayakrishnan et al., 1994). Alternativamente, los inmunocomplejos circulantes podrían ser captados e internalizados por células presentadoras de antígenos a través de sus receptores de Fc de membrana. La interacción estable con anticuerpos de alta afinidad modificaría el procesamiento del antígeno en el fagolisosoma y, por lo tanto, se vería favorecida la presentación en contexto MHC clase II de epitopes presentes en las zonas no protegidas de la molécula (Watts y Lanzavecchia, 1993; Salemi et al., 1995).

Aplicando este modelo a la *trans*-sialidasa de tripomastigotes, el bloqueo de los epitopes repetitivos mediado por anticuerpos favorecería, en un segundo momento, la inmunoreactividad hacia epitopes presentes en la región enzimática. De hecho, aquellos animales previamente sensibilizados con el dominio SAPA generan una más pronta respuesta inhibitoria de *trans*-sialidasa al ser desafiados con la proteína TS-SAPA (tabla 5). Más aún, los resultados mostrados en la figura 12 sugieren la formación espontánea del inmunocomplejo (TS-SAPA-anticuerpos anti-SAPA) en estos animales, lo cual favorecería su remoción de sangre, probablemente mediada por células presentadoras de antígenos.

La administración de estos inmunocomplejos en animales *naïve*, sin embargo, no acelera la inducción de anticuerpos inhibitorios de la *trans*-sialidasa (tabla 5). Por lo tanto, puede sugerirse que la presencia de otras poblaciones celulares activadas y/o de mediadores solubles presentes en animales sensibilizados con GST-SAPA son necesarias para la verificación del efecto descrito. Alternativamente, estas diferencias pueden ser atribuidas al isotipo monoespecífico del anticuerpo utilizado (IgG2a). La generación de distintos anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio SAPA (en curso en nuestro laboratorio) o el uso de anticuerpos policlonales anti-SAPA generados en ratón podría ayudar a esclarecer este punto.

El modelo de inducción de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa desarrollado es altamente reproducible de experimento en experimento y requiere de mínimas cantidades de enzima (tabla 2). Más aún, el título de anticuerpos inhibitorios obtenido (figura 10) es comparable a los

reportados *in vivo* en ratones infectados con cepas no letales de *T. cruzi* (Leguizamón et al., 1994a). De hecho, otros grupos de investigación en *T. cruzi* han adoptado este protocolo de rutina para la obtención de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa (Pereira-Chioccola et al., 2000). Durante el transcurso de la presente tesis se reportó un método alternativo de inducción de estos anticuerpos, a través de la inmunización intramuscular de animales con un ADN plasmídico conteniendo el gen de la *trans*-sialidasa (Costa et al., 1998 y 1999). Sin embargo, la posterior comparación de ambos métodos favoreció al modelo de inmunización con proteínas preadsorbidas en alúmina, ya que produce un mayor título de anticuerpos inhibitorios y un mayor efecto protector en modelos murinos de infección (Pereira-Chioccola et al., 1999).

### **Secuencias involucradas en la estabilización de proteínas en sangre**

El dominio repetitivo SAPA estabiliza a la actividad *trans*-sialidasa en circulación (figura 13). Esta estabilización es independiente del sexo y/o contexto genético de los animales, no implica una mayor estabilidad térmica (figura 13, inserto) y puede ser transferida a otra proteína en absoluto relacionada a la *trans*-sialidasa (figura 19B). La generación de diferentes proteínas quiméricas y el posterior análisis de su farmacocinética permitió identificar otra secuencia repetitiva de *T. cruzi* con capacidad similar a la del dominio SAPA. Como se observa en las figuras 16 y 19B, la adición en *cis* del antígeno 13 a la *trans*-sialidasa y a la GST reprodujo prácticamente los resultados obtenidos con las proteínas TS-SAPA y GST-SAPA, respectivamente. No existe, sin embargo, homología evidente a nivel de aminoácidos entre los antígenos 13 y SAPA.

Interesantemente, de todos los antígenos evaluados en el presente trabajo de Tesis, sólo estos dos son liberados espontáneamente al medio extracelular por el tripomastigote infectivo (tabla 1) (Souto-Padrón et al., 1989). Se podría proponer entonces que la estabilización de estos antígenos en circulación estaría funcionando *in vivo* como parte de una estrategia desarrollada por el parásito con propósitos definidos. Extendiendo este razonamiento, y debido a su localización intra o pericelular (tabla 1), sería razonable suponer que la función original *in vivo* de los antígenos 1, 2, 30 y 36 (si es que realmente cumplen alguna) no sea la de estabilizar a su proteína asociada en circulación (figuras 16 y 19B).

El análisis de distintas mutantes de delección de la proteína TS-SAPA a nivel de su dominio repetitivo permitió mapear las secuencias involucradas en la estabilización de actividad *trans*-sialidasa en sangre. Como se observa en la figura 18, las proteínas TS-8R y TS-13R, ambas deficientes en la secuencia de anclaje por GPI, muestran un perfil farmacocinético bastante similar al de la proteína TS-SAPA. Por lo tanto, puede concluirse que la capacidad estabilizadora descrita está asociada exclusivamente a la secuencia repetitiva del antígeno SAPA. Si bien no fue demostrado, puede sugerirse que, de manera análoga, el motivo hidrofóbico adicional presente en el extremo carboxilo del antígeno 13 (tabla 7) tampoco estaría involucrado en el fenómeno de estabilización descrito. Al igual que en el dominio SAPA, esta secuencia C-terminal presenta características

típicas de una señal de anclaje por GPI (Campetella et al., 1992).

El mapeo de la propiedad estabilizante en la propia secuencia repetitiva de SAPA resulta compatible con el procesamiento post-traducciona de la *trans*-sialidasa de tripomastigotes *in vivo*. Si bien no se ha determinado el residuo exacto involucrado en el anclaje por GPI, puede suponerse que gran parte de esta secuencia señal es delecionada durante la adición del ancla de GPI en retículo endoplásmico (Englund, 1993), y por lo tanto va a estar ausente en la proteína madura, secretada por el parásito.

Como se observa también en la figura 18, la proteína TS-3R (conteniendo apenas 3 unidades repetitivas) muestra una vida media en sangre significativamente menor que la proteína TS-SAPA. La falta de conocimiento acerca del mecanismo de estabilización no nos permite especular acerca de la relación entre el número de unidades repetitivas y la farmacocinética de la molécula. Sin embargo, estos resultados proveen una evidencia adicional para justificar el grado de polimerización del dominio SAPA. Hasta el momento, y más allá de un posible efecto sobre las moléculas de reconocimiento antigénico, una única hipótesis se había formulado para justificar el carácter repetitivo de SAPA. Según dicha hipótesis, la extensión de este dominio facilitaría el espaciamento de la región globular y catalítica de la *trans*-sialidasa por sobre el glicocálix de la superficie del parásito (Cross y Takle, 1993), en analogía a lo descrito para la proteína PARP/prociclina de superficie de *T. brucei* (para una revisión ver Borst y Fairlamb, 1998). De esta forma, la actividad *trans*-sialidasa podría interaccionar libremente con glicoconjugados séricos y/o de superficie de las células del hospedador y proveer de residuos de ácido siálico a las moléculas aceptoras en superficie (Pereira-Chiocola et al., 2000).

De acuerdo a lo visto en el presente trabajo de Tesis, la adquisición y/o el mantenimiento de un número mínimo de repeticiones en los genes de *trans*-sialidasa de tripomastigotes podría haberse seleccionado, además, por conferir un mayor tiempo de circulación a la molécula expresada (figura 18). En este contexto, debe mencionarse que todos los genes de *trans*-sialidasa de tripomastigotes de *T. cruzi* reportados en el GenBank hasta el momento tienen un número de repeticiones superior a este número crítico.

El análisis comparativo del dominio SAPA con otras secuencias presentes en el GenBank reveló una homología mayor al 40% con la lipoproteína Vsa CI del patógeno murino *Mycoplasma pulmonis* (Bhugra et al., 1995). Esta molécula consta de un segmento *trans*-membrana característico de lipoproteínas seguido por un tándem de 10 unidades repetitivas casi idénticas de 12 aminoácidos cada una (figura 23), expuestas hacia el medio extracelular. La función de esta lipoproteína *in vivo* es incierta, aunque puede sugerirse, en analogía a lo observado en otras lipoproteínas de *Mycoplasmas* de características similares, que podría actuar en la inmunodistracción de la respuesta

inmune y/o en el reconocimiento de las células del hospedador (Sachse et al., 2000). Tampoco se ha estudiado la posible secreción de esta molécula a circulación.

<i>Vsa CI</i>	D	A	N	T	S	Q	T	P	S	T	T	G
		:	:	:	:						:	:
<i>SAPA</i>	D	S	S	A	H	S	T	P	S	T	P	A

**FIGURA 23:** Comparación entre la unidad repetitiva de SAPA y de la proteína Vsa CI de *Mycoplasma pulmonis*. Las posiciones idénticas se indican con rayas y las conservadas mediante puntos.

### Mecanismo de estabilización de proteínas en sangre

La Mr predicha y estimada experimentalmente para las proteínas TS y TS-SAPA es de 75.6 y 94.6 kDa, respectivamente. Por lo tanto, su diferente vida media en sangre (figura 13) es difícilmente atribuible a una mayor filtración de la proteína TS en riñón. El diámetro del poro glomerular fue calculado en aproximadamente 40 Å, equivalente al tamaño efectivo de una proteína globular de 66 kDa como la albúmina sérica (Venkatachalam y Rennke, 1978). La ultrafiltración renal de moléculas superiores a este tamaño crítico es virtualmente nula, excepto en condiciones patológicas (Kanwar, 1984).

En el caso de las GST quiméricas, en cambio, este mecanismo sí podría estar involucrado en la rápida remoción de sangre de la proteína GST sin fusiones (Mr=26 kDa). El testeo de muestras de orina de los animales inyectados con las distintas GST quiméricas por el sistema de ELISA descrito no arrojó, sin embargo, diferencias significativas (datos no mostrados). Más aún, este mecanismo tampoco podría explicar la estabilidad diferencial de proteínas de tamaño casi idéntico (aproximadamente 60 kDa) como GST-SAPA, GST-Ag 30 y GST-Ag 36 (figura 19B).

Otro parámetro que condiciona el tiempo de residencia de proteínas, lípido-proteínas y hasta células en circulación es su nivel de glicosilación (Mattes, 1987; Pilatte et al., 1993; Burgon et al., 1996). Se han identificado numerosos receptores específicos para glicoproteínas en la superficie de distintos tipos celulares, entre ellos hepatocitos, macrófagos y células dendríticas (Lanzavecchia, 1996; Kolatkar et al., 1998) que remueven activamente moléculas de circulación. Sin embargo, y debido al sistema de expresión de proteínas utilizado, también puede descartarse cualquier efecto relacionado a la glicosilación diferencial de las moléculas comparadas (Makrides, 1996).

Entre los mecanismos ensayados experimentalmente, se estudió la posible interacción del dominio repetitivo SAPA con algún receptor endógeno. Se ha demostrado, por ejemplo, que ciertas proteínas de superficie de patógenos Gram<sup>+</sup> inhiben la acción del sistema inmune del hospedador actuando como receptores de proteínas circulantes endógenas, que eventualmente enmascaran la superficie de la bacteria. Entre éstas, se cuentan las proteínas MIG y MAG de *Streptococcus dysgalactiae* que reconocen a la  $\alpha$ -2 macroglobulina, la albúmina y la inmunoglobulina G (Jonsson



et al., 1995; Vasi et al., 1999) y las proteínas M1 y H de *Streptococcus pyogenes* que se unen al dominio Fc de inmunoglobulinas y a la albúmina, respectivamente (Akeson et al., 1994). En este sentido, resultaba particularmente interesante la presencia del motivo poliprolina II (Pxx)<sub>n</sub> en el dominio repetitivo SAPA. Esta estructura presenta una conformación rígida y extendida en solución, estabilizada por el espaciamiento entre sus residuos prolina y ha sido propuesta como motivo de unión entre proteínas (Williamson, 1994). Como se observa en la figura 4A, la secuencia PxxP está conservada en todas las unidades repetitivas de la proteína TS-SAPA.

Sin embargo, los experimentos de co-precipitación realizados resultaron infructuosos (figura 22). Más aún, la farmacocinética de la actividad *trans*-sialidasa en sangre de los animales inyectados con la proteína TS-SAPA ± una dosis 20 veces mayor de la proteína GST-SAPA mostró un perfil idéntico (datos no mostrados). Estos resultados no son compatibles con la idea de un receptor endógeno. De hecho, la inmunoglobulina G que es la única proteína cuya estabilidad en sangre está regulada por un sistema de captación y reexportación mediado por receptores específicos, es también la única que muestra una correlación directa entre su tasa de *clearance* y su concentración en sangre (Junghans y Anderson, 1996).

Por último, se demostró una sensibilidad a proteasas sanguíneas similar para moléculas conteniendo o no el dominio repetitivo (figuras 21A y B). Estos resultados son compatibles con la falta de interacción aparente entre los diferentes regiones de la molécula (tabla 7) y con el análisis de las especies circulantes en animales inyectados con GST-SAPA o GST-Ag 13 (figura 20).

La existencia de un posible receptor no identificado hasta el momento y/o la captación diferencial de las proteínas ensayadas en algún tejido específico y/o otras alternativas deben evaluarse a fin de determinar las bases moleculares de la estabilización de proteínas en sangre mediada por los antígenos SAPA y 13. La dilucidación de este mecanismo podría incluso ser de utilidad para el estudio del *clearance* de las proteínas normalmente presentes en sangre de mamíferos.

### **Rol de la *trans*-sialidasa circulante**

La liberación de factores de virulencia durante la infección ha sido verificada para numerosos agentes patógenos (Alcami y Smith, 1992; Albrecht y Fleckenstein, 1992; Vaidya et al., 1997; Bentley-Hibbert et al., 1999). En el caso particular del *T. cruzi*, se demostró, por ejemplo, la secreción activa por tripomastigotes de un factor soluble, capaz de reproducir *in vitro* e *in vivo* el estado inmunosupresivo del hospedador durante la fase aguda de la enfermedad (Kierszenbaum et al., 1998). Algunas moléculas de naturaleza no proteicas, como la porción sacarídica de ciertos GPIs secretados por el parásito también podrían actuar como inmunomoduladores (Gomes et al., 1996).

La presencia de actividad neuraminidasa/*trans*-sialidasa en sangre de pacientes chagásicos en fase aguda había sido descrita hace más de 10 años (de Titto y Araujo, 1988). La estabilización de la *trans*-sialidasa en sangre mediada por su dominio repetitivo demostrada en el presente trabajo

de Tesis sugiere un rol activo para la molécula circulante. Esta estabilización podría constituir una estrategia novedosa para diseminar el efecto biológico de un factor de virulencia más allá del sitio preciso de infección, similar a lo reportado, por ejemplo, para el antígeno de 85 kDa de *Mycobacterium tuberculosis* (Bentley-Hibbert et al., 1999). En este sentido, resulta particularmente atractiva la idea de una interacción entre la *trans*-sialidasa soluble y distintos componentes del sistema inmune.

El papel del ácido siálico en la homeostasis de moléculas y células del sistema inmune ha sido bien establecido (Pilatte et al., 1993; Bagriaciğ y Miller, 1999). Por lo tanto, una molécula capaz de alterar el patrón de sialilación de los mismos podría ejercer, en principio, múltiples efectos. De hecho, se reportó recientemente la acción apoptótica de la *trans*-sialidasa soluble de *T. cruzi* sobre distintas poblaciones del sistema inmune *in vivo*. Estos efectos sólo pudieron verificarse administrando *trans*-sialidasas funcionales, sugiriendo que el mecanismo estaría mediado por la desialidación de moléculas de superficie (Leguizamón et al., 1999). Más aún, los efectos apoptóticos pudieron reproducirse por inyección de dosis mínimas de enzima, incluso menores a las encontradas en suero de ratones en el pico de la parasitemia (Leguizamón et al., 1994).

El efecto inmunosupresor mediado por *trans*-sialidasa pudo verificarse *in vitro* sobre poblaciones aisladas de linfocitos T (CD4<sup>+</sup>) (Gorelik et al., 1998). Sin embargo, otros autores utilizando un modelo similar, sugirieron diversos efectos inmunoestimulatorios mediados por la *trans*-sialidasa soluble (Todeschini et al., 1998), posiblemente mediados por su interacción directa con el receptor CD43. Las diferencias observadas pueden ser atribuídas al diferente sistema de evaluación utilizado y/o a las diferentes fuentes de enzima. Sin embargo, resulta claro que la *trans*-sialidasa soluble puede interaccionar *in vitro* e *in vivo* con diferentes poblaciones del sistema inmunológico y eventualmente modular su comportamiento. En este contexto, debe mencionarse que la apoptosis linfocitaria mediada por *T. cruzi* ha sido demostrada *in vivo* (Lopes et al., 1995) y parece ser determinante en la persistencia del parásito en macrófagos infectados (Freire-de-Lima et al., 2000).

El dominio SAPA también se encuentra presente en genes que codifican para *trans*-sialidasas inactivas, mutadas a nivel de uno o unos pocos aminoácidos (Cremona et al., 1995) pero que retienen la estructura conformacional de la molécula activa (Cremona et al., 1999). Si bien la expresión de estas proteínas en la superficie del tripomastigote no ha sido demostrada, su liberación al torrente sanguíneo podría aportar un grado más de complejidad al sistema. Por un lado podrían inducir la generación de anticuerpos inhibitorios en la misma forma que las moléculas activas (Cremona et al., 1999) pero, a la vez, podrían actuar titulando estos anticuerpos y previniendo la neutralización de la actividad *trans*-sialidasa en la superficie del parásito y/o en los fluidos extracelulares.

Más recientemente, se ha propuesto un rol directo del dominio SAPA sobre el sistema inmune, independiente de su actividad enzimática asociada (Saavedra et al., 1999). La adición de *trans*-sialidasa purificada de tripomastigotes y/o de péptidos sintéticos generados a partir de la secuencia de su tándem de repeticiones promueve la liberación de interleukina 6 en poblaciones de PBMC y

células del sistema microvascular de intestino humano. De manera interesante, estos efectos también son dependientes del grado de polimerización del dominio SAPA, verificándose sólo con moléculas conteniendo 4 o más unidades repetitivas en tándem (Saavedra et al., 1999). Estos resultados, sin embargo, resultan difíciles de interpretar a la luz del rol conflictivo que parece ejercer la interleukina 6 durante la infección con *T. cruzi* (Truyens et al., 1994) y, sobre todo, de la falta de protección frente al desafío con el parásito conferida por la transferencia pasiva de anticuerpos anti-SAPA en modelos animales (Franchin et al., 1997).

### Modelo integrador

Integrando los resultados presentados en el presente trabajo de Tesis con los datos obtenidos por otros autores en modelos de infección por *T. cruzi*, se sugiere el siguiente modelo de acción de la *trans*-sialidasa en el hospedador mamífero. Inmediatamente después de acceder al torrente sanguíneo del hospedador, el tripomastigote secreta activamente *trans*-sialidasa al medio extracelular. La misma permanece activa en circulación debido a la presencia de su dominio repetitivo, por un mecanismo incierto. La diseminación sistémica de esta molécula podría desencadenar distintos efectos sobre poblaciones del sistema inmune del hospedador, tendientes a favorecer el establecimiento y/o el progreso de la infección.

Debido a sus características estructurales, la respuesta inmune (humoral) estaría dirigida primariamente hacia el dominio repetitivo. Los anticuerpos anti-SAPA podrían inmunocomplejar espontáneamente a la *trans*-sialidasa, aunque sin inhibir su actividad enzimática. Eventualmente, los anticuerpos anti-SAPA podrían ser titulados por moléculas inactivas altamente homólogas. En un segundo momento, la respuesta inmune humoral se diversificaría hacia otros epitopes presentes en la región catalítica de la *trans*-sialidasa. A diferencia de las hipótesis más aceptadas, esta difusión de la respuesta inmune sería mediada por la presencia del dominio repetitivo en *cis*. La conformación nativa de la enzima circulante y/o la captación de los inmunocomplejos (*trans*-sialidasa-anticuerpos anti-SAPA) por medio de receptores específicos en superficie de células presentadoras de antígenos y/o otros mecanismos podrían estar implicados en la diversificación de la respuesta inmune. La consecuente aparición de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa y/o células T citotóxicas secretoras de interferón  $\gamma$  dirigidas hacia la región enzimática serían algunos de los factores involucrados en el control de los niveles de la infección por parte del hospedador y en el establecimiento de la fase indeterminada de la enfermedad.

Este mecanismo dual mediado por la presencia del dominio repetitivo en *cis* con la *trans*-sialidasa podría representar una estrategia novedosa, seleccionada en la interacción parásito-hospedador para el establecimiento de una infección de tipo crónica, que permita la supervivencia de ambas partes.

### Perspectivas futuras

La estabilización de moléculas bioactivas en sangre es un campo de intenso desarrollo en la farmacología actual. Sobre todo en el caso de péptidos y/o proteínas que requieren, para su acción terapéutica, del mantenimiento continuo en circulación dentro de un rango de concentraciones efectivo (Langer, 1998). En el caso de hormonas de aplicación endovenosa, la generación de análogos de vida media prolongada en sangre podría representar una alternativa a los esquemas de inyecciones recurrentes.

Hasta el momento, se han desarrollado distintas estrategias para mejorar la biodisponibilidad de los fármacos. Entre ellas, la mutagénesis racional de inmunoglobulinas (Ghetie et al., 1997), a partir del discernimiento de los residuos claves involucrados en su farmacocinética (Kim et al., 1994b; Zuckier et al., 1998). También puede mencionarse la generación de proteínas quiméricas, fusionadas genéticamente a dominios de proteínas endógenas (Breton et al., 1995; Makrides et al., 1996) y el encapsulamiento de moléculas bioactivas en superficie de estructuras del tipo liposomas (Maruyama et al., 1991). La composición glico y sulfolípidica específica de estas estructuras reducen su captación por células del sistema retículoendotelial y aumentan en consecuencia su estabilidad en circulación.

La estrategia más avanzada y promisoría, sin embargo, parece ser la derivatización de moléculas con polímeros anfifílicos inertes del tipo polietilenglicol (PEG). Esta técnica se basa en el acople de grupos PEG a residuos lisina y, en menor medida, cisteína o carbohidratos accesibles al solvente (Abuchowski et al., 1977). Las moléculas así modificadas ven reducida su inmunogenicidad a la vez que disminuyen su tasa de filtración glomerular por el aumento de su tamaño efectivo (Lundblad y Bradshaw, 1997). En este sentido, el efecto estérico de la derivatización con PEG sería análogo al de la polimerización artificial de proteínas descripto, por ejemplo, para la eritropoyetina (Sytkowski et al., 1998). Hasta el momento, 2 enzimas sustituidas con PEG han sido aprobadas para su uso clínico: la PEG-adenosina deaminasa para el tratamiento de síndromes severos de inmunodeficiencia (Chaffee et al., 1992) y la PEG-L-asparaginasa, de relativo éxito en el tratamiento de leucemias linfoblásticas agudas (Ettinger et al., 1995). Numerosas enzimas y hormonas proteicas derivatizadas con PEG se encuentran en etapa experimental (Farese et al., 1996; Clark et al., 1996; Tsutsumi et al., 1997; Chapman et al., 1999). Este dispositivo tiene, no obstante, una serie de desventajas como ser el costo adicional de la modificación, la toxicidad, la posibilidad de generar respuestas autoinmunes y, sobre todo, la falta de especificidad durante la modificación química. Como resultado, se obtienen mezclas heterogéneas de actividad específica disminuída (Tsutsumi et al., 1997; Clark et al., 1996) y variables de preparación en preparación (Chapman et al., 1999; DeSantis y Jones, 1999).

Sería de gran utilidad, entonces, contar con estrategias alternativas que aumenten la permanencia en circulación de proteínas funcionalmente activas. Como quedó demostrado, tanto el

antígeno SAPA como el antígeno 13 de *T. cruzi* son capaces de incrementar en un 500% la vida media en sangre de dos proteínas en absoluto relacionadas (figuras 13 y 19B). Si bien las bases moleculares de esta estabilización no han podido ser elucidadas hasta el momento, estos dos antígenos cumplen, en principio, con los requisitos mínimos exigidos: su capacidad estabilizadora es independiente de la proteína carrier y no modifican mayormente su plegamiento ni su funcionalidad (figura 19A y tabla 7). Este segundo punto es crítico para la probable estabilización de moléculas con actividad enzimática y/o que deban interactuar con un receptor para desencadenar su efecto biológico. En este sentido ya hemos comenzado la generación de quimeras de trombopoyetina humana (Kaushansky, 1999) conteniendo al dominio SAPA, con el propósito de evaluar su funcionalidad y estabilidad en circulación.

Un segundo paso, también en curso en nuestro laboratorio, es la disminución de la antigenicidad de los dominios repetitivos SAPA y 13. Para ello, hemos comenzado el mapeo de sus epitopes (Paula Alvarez y Oscar Campetella, resultados sin publicar). Una vez identificados los residuos críticos, éstos podrían ser reemplazados por mutagénesis y evaluarse las moléculas resultantes en cuanto a su antigenicidad y su permanencia en sangre.

Así mismo, una vez determinado el mecanismo de estabilización a nivel molecular, podría implementarse una estrategia racional de búsqueda de este tipo de secuencias en moléculas secretadas por *T. cruzi* y tal vez por otros parásitos relacionados.

## CONCLUSIONES

\* Se describió por primera vez un esquema de inmunización para la inducción de anticuerpos inhibitorios de la actividad *trans*-sialidasa. Hasta el momento, estos anticuerpos sólo habían podido ser obtenidos de manera consistente a partir de sangre de pacientes chagásicos crónicos o animales infectados. La obtención en grandes cantidades de estos anticuerpos o incluso la generación de anticuerpos monoclonales inhibitorios de *trans*-sialidasa puede constituir una herramienta valiosa para el estudio de la infección por *Trypanosoma cruzi*.

\* Se describió un requerimiento estructural del inmunógeno para la inducción de anticuerpos inhibitorios de *trans*-sialidasa, lo cual sugiere que el/los epítipo/s involucrado/s está/n compuesto/s por residuos discontinuos en la secuencia primaria de la proteína. El reciente modelado de la estructura tridimensional de la región enzimática de la *trans*-sialidasa (Buschiazzo et al., 2000) podría ayudar a mapear estos epítopes.

\* Se demostró que la presencia del antígeno SAPA en la *trans*-sialidasa es necesaria para la inducción de anticuerpos inhibitorios *in vivo*. Estos resultados contradicen las teorías actuales acerca del rol inmunodistractor de los antígenos repetitivos y podría constituir una estrategia seleccionada en la interacción parásito-hospedador para limitar los niveles de la infección.

\* Se describió un esquema rápido de cuantificación de anticuerpos dirigidos contra la región enzimática de la *trans*-sialidasa por ELISA. La correlación entre este sistema y el método de TIA resulta significativa. Por lo tanto, una leve modificación al método implementado (esto es, cambiando el *tag* de anclaje de la *trans*-sialidasa a la microplaca) podría utilizarse como un primer método de rastreo rápido en la búsqueda de anticuerpos inhibitorios en animales infectados experimentalmente y/o en pacientes chagásicos.

\* Se determinó la importancia del antígeno repetitivo SAPA naturalmente asociado a la *trans*-sialidasa en la persistencia en circulación de la molécula. Así mismo, se identificó otro antígeno repetitivo de *Trypanosoma cruzi* (antígeno 13), también secretado espontáneamente por la forma infectiva del parásito, con propiedades semejantes.

\* La adición en *cis* de cualquiera de estos dos dominios repetitivos a una proteína no relacionada a la *trans*-sialidasa resultó en un incremento significativo de su vida media en sangre. Por lo tanto, se sugiere una posible aplicación biotecnológica para los antígenos SAPA y 13.







## ***BIBLIO***

---

**BIBLIOGRAFIA**

- Abuchowski, A., McCoy, J. R., Palczuk, N. C., van Es, T., and Davis, F. F. (1977). Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J Biol Chem* 252, 3582-6.
- Abuin, G., Colli, W., de Souza, W., and Alves, M. J. (1989). A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. *Mol Biochem Parasitol* 35, 229-37.
- Affranchino, J. L., Ibáñez, C. F., Luquetti, A. O., Rassi, A., Reyes, M. B., Macina, R. A., Aslund, L., Pettersson, U., and Frasc, A. C. (1989). Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 34, 221-8.
- Agarwal, A., Nayak, B. P., and Rao, K. V. (1998). B cell responses to a peptide epitope. VII. Antigen-dependent modulation of the germinal center reaction. *J Immunol* 161, 5832-41.
- Agarwal, A., Sarkar, S., Nazabal, C., Balasundaram, G., and Rao, K. V. (1996). B cell responses to a peptide epitope. I. The cellular basis for restricted recognition. *J Immunol* 157, 2779-88.
- Agusti, R., Couto, A. S., Campetella, O., Frasc, A. C., and de Lederkremer, R. M. (1998). Structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchor of the *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote forms. *Mol Biochem Parasitol* 97, 123-31.
- Agusti, R., Couto, A. S., Campetella, O. E., Frasc, A. C., and de Lederkremer, R. M. (1997). The *trans*-sialidase of *Trypanosoma cruzi* is anchored by two different lipids. *Glycobiology* 7, 731-5.
- Akeson, P., Schmidt, K., Cooney, J., and Björck, L. (1994). M1 protein and protein H: IgGFc- and albumin-binding streptococcal surface proteins encoded by adjacent genes. *Biochem J* 300, 877-86.
- Albrecht, J. C., and Fleckenstein, B. (1992). New member of the multigene family of complement control proteins in herpesvirus saimiri. *J Virol* 66, 3937-40.
- Alcami, A., and Smith, G. L. (1992). A soluble receptor for interleukin-1  $\beta$  encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 71, 153-67.
- Andrews, N. W., Abrams, C. K., Slatin, S. L., and Griffiths, G. (1990). A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* 61, 1277-87.
- Andrews, N. W., Robbins, E. S., Ley, V., Hong, K. S., and Nussenzweig, V. (1988). Developmentally regulated, phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 167, 300-14.
- Bachmann, M. F., Hoffman Rohrer, U., Kündig, T. M., Bürki, K., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1993). The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 262, 1448-51.
- Bachmann, M. F., and Zinkernagel, R. M. (1997). Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu Rev Immunol* 15, 235-70.
- Bagriacik, E. Ü., and Miller, K. S. (1999). Cell surface sialic acid and the regulation of immune cell interactions: the

neuraminidase effect reconsidered. *Glycobiol* 9, 267-75.

Barros, H. C., Da Silva, S., Verbisck, N. V., Araguth, M. F., Tedesco, R. C., Procopio, D. O., and Mortara, R. A. (1996). Release of membrane-bound trails by *Trypanosoma cruzi* amastigotes onto modified surfaces and mammalian cells. *J Eukaryot Microbiol* 43, 275-85.

Baughn, R. E., Jiang, A., Abraham, R., Ottmers, V., and Musher, D. M. (1996). Molecular mimicry between an immunodominant amino acid motif on the 47- kDa lipoprotein of *Treponema pallidum* (Tpp47) and multiple repeats of analogous sequences in fibronectin. *J Immunol* 157, 720-31.

Bentley-Hibbert, S. I., Quan, X., Newman, T., Huygen, K., and Godfrey, H. P. (1999). Pathophysiology of antigen 85 in patients with active tuberculosis: antigen 85 circulates as complexes with fibronectin and immunoglobulin G. *Infect Immun* 67, 581-8.

Bertoletti, A., Sette, A., Chisari, F. V., Penna, A., Levrero, M., De Carli, M., Fiaccadori, F., and Ferrari, C. (1994). Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* 369, 407-10.

Bhugra, B., Voelker, L. L., Zou, N., Yu, H., and Dybvig, K (1995). Mechanism of antigenic variation in *Mycoplasma pulmonis*: interwoven, site-specific DNA inversions. *Mol Microbiol* 18, 703-14.

Bielecki, J., Youngman, P., Connelly, P., and Portnoy, D. A. (1990). *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 345, 175-6.

Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294, 1351-62.

Borst, P., and Fairlamb, A. H. (1998). Surface receptors and transporters of *Trypanosoma brucei*. *Annu Rev Microbiol* 52, 745-78.

Boulanger, D., Green, P., Smith, T., Czerny, C.-P., and Skinner, M. A. (1998). The 131-amino-acid repeat region of the essential 39-kDa core protein of Fowlpox virus FP9, equivalent to Vaccinia virus A4L protein, is nonessential and highly immunogenic. *J Virol* 72, 170-9.

Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol* 27, 347-83.

Breton, J., Pezzi, N., Molinari, A., Bonomini, L., Lansen, J., Gonzalez de Buitrago, G., and Prieto, I. (1995). Prolonged half-life in the circulation of a chemical conjugate between a pro-urokinase derivative and human serum albumin. *Eur J Biochem* 231, 563-9.

Briones, M. R., Egima, C. M., and Schenkman, S. (1995). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase gene lacking C-terminal repeats and expressed in epimastigote forms. *Mol Biochem Parasitol* 70, 9-17.

Burgon, P. G., Stanton, P. G., and Robertson, D. M. (1996). *In vivo* bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms. *Endocrinology* 137, 4827-36.

Burleigh, B. A., and Andrews, N. W. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol* 49, 175-200.

- Burns, J. M., Jr., Shreffler, W. G., Rosman, D. E., Sleath, P. R., March, C. J., and Reed, S. G. (1992). Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 1239-43.
- Buschiazzo, A., Campetella, O., and Frasch, A. C. (1997). *Trypanosoma rangeli* sialidase: cloning, expression and similarity to *T. cruzi trans-sialidase*. *Glycobiology* 7, 1167-73.
- Buschiazzo, A., Campetella, O. E., Macina, R. A., Salceda, S., Frasch, A. C. C., and Sánchez, D. O. (1992). Sequence of the gene for a *Trypanosoma cruzi* protein antigenic during the chronic phase of human Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 54, 125-8.
- Buschiazzo, A., Tavares, G. A., Campetella, O., Spinelli, S., Cremona, M. L., París, G., Amaya, M. F., Frasch, A. C., and Alzari, P. M. (2000). Structural basis of sialyltransferase activity in trypanosomal sialidases. *EMBO J* 19, 16-24.
- Campetella, O., Sánchez, D., Cazzulo, J. J., and Frasch, A. C. C. (1992). A superfamily of *Trypanosoma cruzi* surface antigens. *Parasitol Today* 8, 378-81.
- Campetella, O. E., Uttaro, A. D., Parodi, A. J., and Frasch, A. C. (1994). A recombinant *Trypanosoma cruzi trans-sialidase* lacking the amino acid repeats retains the enzymatic activity. *Mol Biochem Parasitol* 64, 337-40.
- Cantarero, L. A., Butler, J. E., and Osborne, J. W. (1980). The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. *Anal Biochem* 105, 375-82.
- Cazzulo, J. J. (1999). Cruzipain, major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: sequence and genomic organization of the codifying genes. *Medicina (B Aires)* 59, 7-10.
- Cazzulo, J. J., and Frasch, A. C. C. (1992). SAPA/*trans-sialidase* and cruzipain: two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. *FASEB J* 6, 3259-64.
- Chaffee, S., Mary, A., Stiehm, E. R., Girault, D., Fischer, A., and Hershfield, M. S. (1992). IgG antibody response to polyethylene glycol-modified adenosine deaminase in patients with adenosine deaminase deficiency. *J Clin Invest* 89, 1643-51.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.g., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida no homem. *Mem Inst Osw Cruz* 1, 159-218.
- Chapman, A. P., Antoniw, P., Spitali, M., West, S., Stephens, S., and King, D. J. (1999). Therapeutic antibody fragments with prolonged *in vivo* half-lives. *Nat Biotechnol* 17, 780-3.
- Chaves, L. B., Briones, M. R., and Schenkman, S. (1993). *Trans-sialidase* from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 61, 97-106.
- Chuenkova, M., and Pereira, M. E. (1995). *Trypanosoma cruzi trans-sialidase*: enhancement of virulence in a murine model of Chagas' disease. *J Exp Med* 181, 1693-703.
- Clark, R., Olson, K., Fuh, G., Marian, M., Mortensen, D., G., T., Chang, S., Chu, H., Mukku, V., Canova-Davis, E., Somers, T., Cronin, M., Winkler, M., and Wells, J. A. (1996). Long-acting growth hormones produced by conjugation with polyethylene glycol. *J Biol Chem* 271, 21969-77.

- Colomer-Gould, V., and Enea, V. (1990). *Plasmodium yoelii* circumsporozoite gene structure and its implications for the evolution of the repeat regions. *Mol Biochem Parasitol* 43, 51-8.
- Costa, F., Franchin, G., Pereira-Chioccola, V. L., Ribeiro, M., Schenkman, S., and Rodrigues, M. M. (1998). Immunization with a plasmid DNA containing the gene of *trans*-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine* 16, 768-74.
- Costa, F., Pereira-Chioccola, V. L., Ribeiro, M., Schenkman, S., and Rodrigues, M. M. (1999). *Trans*-sialidase delivered as a naked DNA vaccine elicits an immunological response similar to a *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res* 32, 235-9.
- Cotrim, P. C., Paranhos-Baccala, G., Santos, M. R., Mortensen, C., Cano, M. I., Jolivet, M., Camargo, M. E., Mortara, R. A., and Da Silveira, J. F. (1995). Organization and expression of the gene encoding an immunodominant repetitive antigen associated to the cytoskeleton of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 71, 89-98.
- Cremona, M. L., Campetella, O., Sánchez, D. O., and Frasch, A. C. C. (1999). Enzymically inactive members of the *trans*-sialidase family from *Trypanosoma cruzi* display  $\beta$ -galactose binding activity. *Glycobiology* 9, 581-7.
- Cremona, M. L., Sánchez, D. O., Frasch, A. C., and Campetella, O. (1995). A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi trans*-sialidases. *Gene* 160, 123-8.
- Cross, G. A. M., and Takle, G. B. (1993). The surface *trans*-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol* 47, 385-411.
- de Lederkremer, R. M., Lima, C., Ramírez, M. I., Ferguson, M. A., Homans, S. W., and Thomas-Oates, J. (1991). Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Biol Chem* 266, 23670-5.
- de Titto, E. H., and Araujo, F. G. (1988). Serum neuraminidase activity and hematological alterations in acute human Chagas' disease. *Clin Immunol Immunopathol* 46, 157-61.
- DeSantis, G., and Jones, J. B. (1999). Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr Op Biotechnol* 10, 324-30.
- Di Noia, J. M., D'Orso, I., Aslund, L., Sánchez, D. O., and Frasch, A. C. (1998). The *Trypanosoma cruzi* mucin family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions. *J Biol Chem* 273, 10843-50.
- Dintzis, H. M., Dintzis, R. Z., and Vogelstein, B. (1976). Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3671-5.
- Dorner, T., Feist, E., Held, C., Conrad, K., Burmester, G. R., and Hiepe, F. (1996). Differential recognition of the 52-kDa Ro(SS-A) antigen by sera from patients with primary biliary cirrhosis and primary Sjogren's syndrome. *Hepatology* 24, 1404-7.
- Duncan, L. R., Gay, L. S., and Donelson, J. E. (1991). African trypanosomes express an immunogenic protein with a repeating epitope of 24 amino acids. *Mol Biochem Parasitol* 48, 11-6.

- Egima, C. M., Briones, M. R., Freitas Junior, L. H., Schenkman, R. P., Uemura, H., and Schenkman, S. (1996). Organization of *trans*-sialidase genes in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 77, 115-25.
- Englund, P. T. (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu Rev Biochem* 62, 121-38.
- Ettinger, L. J., Kurtzberg, J., Voute, P. A., Jurgens, H., and Halpern, S. L. (1995). An open-label, multicenter study of polyethylene glycol-L-asparaginase for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 75, 1176-81.
- Falk, K., Röttschke, O., Santambrogio, L., Dorf, M. E., Brosnan, C., and Strominger, J. L. (2000). Induction and suppression of an autoimmune disease by oligomerized T cell epitopes. Enhanced in vivo potency of encephalitogenic peptides. *J Exp Med* 191, 717-730.
- Farese, A. M., Hunt, P., Grab, L. B., and MacVittie, T. J. (1996). Combined administration of recombinant human megakaryocyte growth and development factor and granulocyte colony-stimulating factor enhances multilineage hematopoietic reconstitution in nonhuman primates after radiation-induced marrow aplasia. *J Clin Invest* 97, 2145-51.
- Farris, A. D., Brown, L., Reynolds, P., Harley, J. B., James, J. A., Scofield, R. H., McCluskey, J., and Gordon, T. P. (1999). Induction of autoimmunity by multivalent immunodominant and subdominant T cell determinants of La (SS-B). *J Immunol* 162, 3079-87.
- Fehr, T., Bachmann, M. F., Bucher, E., Kalinke, U., Di Padova, F. E., Lang, A. B., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1997). Role of repetitive antigen patterns for induction of antibodies against antibodies. *J Exp Med* 185, 1785-92.
- Fehr, T., Skrastina, D., Pumpens, P., and Zinkernagel, R. M. (1998). T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9477-81.
- Ferguson, M. A. (1997). The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352, 1295-302.
- Ferrero-García, M. A., Trombetta, S. E., Sánchez, D. O., Reglero, A., Frasch, A. C. C., and Parodi, A. J. (1993). The action of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase on glycolipids and glycoproteins. *Eur J Biochem* 213, 765-71.
- Fiori, P. L., Rappelli, P., Addis, M. F., Sechi, A., and Cappuccinelli, P. (1996). *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. *Microb Pathog* 20, 109-18.
- Forthofer, R. N., and Lee, E. S. (1995). *Introduction to Biostatistics* (San Diego, CA: Academic Press).
- Franchin, G., Pereira-Chiocola, V. L., Schenkman, S., and Rodrigues, M. M. (1997). Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice. *Infect Immun* 65, 2548-54.
- Freire-de-Lima, C. G., Nascimento, D. O., Soares, M. B., Bozza, P. T., Castro-Faria-Neto, H. C., de Mello, F. G., DosReis, G. A., and Lopes, M. F. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403, 199-203.
- Frevert, U., Schenkman, S., and Nussenzweig, V. (1992). Stage-specific expression and intracellular shedding of the

cell surface *trans*-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 60, 2349-60.

Ghetie, V., Popov, S., Borvak, J., Radu, C., Matesoi, D., Medesan, C., Ober, R. J., and Ward, E. S. (1997). Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat Biotechnol* 15, 637-40.

Giordano, R., Fouts, D. L., Tewari, D., Colli, W., Manning, J. E., and Alves, M. J. (1999). Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J Biol Chem* 274, 3461-8.

Gomes, N. A., Previato, J. O., Zingales, B., Mendonça-Previato, L., and DosReis, G. (1996). Down-regulation of T lymphocyte activation *in vitro* and *in vivo* induced by glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 156, 628-35.

Gonçalves, M. F., Umezawa, E. S., Katzin, A. M., de Souza, W., Alves, M. J. M., Zingales, B., and Colli, W. (1991). *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp Parasitol* 72, 43-53.

González Cappa, S. M., Bijovsky, A. T., Freilij, H., Muller, L., and Katzin, A. M. (1981). Isolation of a *Trypanosoma cruzi* strain of predominantly slender form in Argentina. *Medicina (B. Aires)* 41, 119-20.

Gorelik, G., Cremaschi, G., Borda, E., and Sterin-Borda, L. (1998). *Trypanosoma cruzi* antigens down-regulate T lymphocyte proliferation by muscarinic cholinergic receptor-dependent release of PGE<sub>2</sub>. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 48, 115-23.

Graham, L. A., Liou, Y.-C., Walker, V. K., and Davies, P. L. (1997). Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature* 388, 727-8.

Griffiths, R. (1993). *In vivo* labelling. R. J. Slater, ed. (New York: Oxford University Press).

Gruber, A., and Zingales, B. (1993). *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp Parasitol* 76, 1-12.

Gupta, R., Birch, H., Rapacki, K., Brunak, S., and Hansen, J. E. (1999). O-GLYCBASE version 4.0: a revised database of O-glycosylated proteins. *Nucleic Acids Res* 27, 370-2.

Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249, 7130-9.

Hall, B. F. (1993). *Trypanosoma cruzi*: mechanisms for entry into host cells. *Semin Cell Biol* 4, 323-33.

Hall, B. F., and Joiner, K. A. (1993). Developmentally-regulated virulence factors of *Trypanosoma cruzi* and their relationship to evasion of host defences. *J Euk Microbiol* 40, 207-13.

Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory.

Hoft, D. F., Kim, K. S., Otsu, K., Moser, D. R., Yost, W. J., Blumin, J. H., Donelson, J. E., and Kirchhoff, L. V. (1989). *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect Immun* 57, 1959-67.

Holscher, C., Kohler, G., Muller, U., Mossmann, H., Schaub, G. A., and Brombacher, F. (1998). Defective nitric oxide



- effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in  $\gamma$  interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun* 66, 1208-15.
- Houghton, R. L., Benson, D. R., Reynolds, L., McNeill, P., Sleath, P., Lodes, M., Skeiky, Y. A. W., Badaro, R., Krettli, A., and Reed, S. G. (2000). Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated or untreated Chagas' disease. *J Infect Dis* 181, 325-30.
- Hu, G., and Fearon, E. R. (1999). Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins. *Mol Cell Biol* 19, 724-32.
- Ibáñez, C. F., Affranchino, J. L., and Frasch, A. C. C. (1987). Antigenic determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA. *Mol Biochem Parasitol* 25, 175-84.
- Ibáñez, C. F., Affranchino, J. L., Macina, R. A., Reyes, M. B., Leguizamón, S., Camargo, M. E., Aslund, L., Pettersson, U., and Frasch, A. C. (1988). Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol Biochem Parasitol* 30, 27-33.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-8.
- Jonsson, H., Burstoff-Asp, C., and Guss, B. (1995). Streptococcal protein MAG - a protein with broad albumin binding specificity. *Biochim Biophys Acta* 1249, 65-71.
- Junghans, R. P., and Anderson, C. L. (1996). The protection receptor for IgG catabolism is the  $\beta$ 2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5512-6.
- Kanwar, Y. S. (1984). Biology of disease: Biophysiology of glomerular filtration and proteinuria. *Lab Invest* 51, 7-21.
- Katzin, A., Alves, M. J., Abuin, G., and Colli, W. (1989). Antigenuria in chronic chagasic patients detected by a monoclonal antibody raised against *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83, 341-3.
- Kaushansky, K. (1999). The enigmatic megakaryocyte gradually reveals its secrets. *Bioessays* 21, 353-60.
- Kemp, D. J., Coppel, R. L., and Anders, R. F. (1987). Repetitive proteins and genes of malaria. *Annu Rev Microbiol* 41, 181-208.
- Kerner, N., Liegeard, P., Levin, M. J., and Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1991). *Trypanosoma cruzi*: antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton. *Exp Parasitol* 73, 451-9.
- Kierszenbaum, F. (1999). Chagas' disease and the autoimmune hypothesis. *Clin Microbiol Rev* 12, 210-23.
- Kierszenbaum, F., Majumder, S., Paredes, P., Tanner, M. K., and Sztein, M. B. (1998). The *Trypanosoma cruzi* immunosuppressive factor (TIF) targets a lymphocyte activation event subsequent to increased intracellular calcium ion concentration and translocation of protein kinase C but previous to cyclin D2 and cdk4 mRNA accumulation. *Mol Biochem Parasitol* 92, 133-45.
- Kim, J. K., Tsen, M. F., Ghetie, V., and Ward, E. S. (1994b). Identifying amino acid residues that influence plasma clearance of murine IgG1 fragments by site-directed mutagenesis. *Eur J Immunol* 24, 542-8.

- Kim, J. K., Tsen, M. F., Ghetie, V., and Ward, E. S. (1994a). Localization of the site of the murine IgG1 molecule that is involved in binding to the murine intestinal Fc receptor. *Eur J Immunol* 24, 2429-34.
- Klenerman, P., and Zinkernagel, R. M. (1998). Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. *Nature* 394, 482-5.
- Kolatkar, A. R., Leung, A. K., Isecke, R., Brossmer, R., Drickamer, K., and Weis, W. I. (1998). Mechanism of *N*-acetylgalactosamine binding to a C-type animal lectin carbohydrate-recognition domain. *J Biol Chem* 273, 19502-8.
- Lafaille, J. J., Linss, J., Krieger, M. A., Souto-Padrón, T., de Souza, W., and Goldenberg, S. (1989). Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Mol Biochem Parasitol* 35, 127-36.
- Landry, S. (1997). Local protein instability predictive of helper T-cell epitopes. *Immunol Today* 18, 527-32.
- Langer, R. (1998). Drug delivery and targeting. *Nature* 392, 5-10.
- Lanzavecchia, A. (1996). Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Op Immunol* 8, 348-54.
- Leguizamón, M. S., Campetella, O., Russomando, G., Almirón, M., Guillén, I., González Cappa, S. M., and Frasch, A. C. (1994b). Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase activity in sera from human infections. *J Infect Dis* 170, 1570-4.
- Leguizamón, M. S., Campetella, O. E., González Cappa, S. M., and Frasch, A. C. (1994a). Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of *trans*-sialidase that inhibit its activity. *Infect Immun* 62, 3441-6.
- Leguizamón, M. S., Campetella, O. E., Reyes, M. B., Ibáñez, C. F., Basombrío, M. A., Rincón, J., Orn, A., and Frasch, A. C. (1991). Bloodstream *Trypanosoma cruzi* parasites from mice simultaneously express antigens that are markers of acute and chronic human Chagas disease. *Parasitology* 102, 379-85.
- Leguizamón, M. S., Mocetti, E., Garcia Rivello, H., Argibay, P., and Campetella, O. (1999). *Trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system *in vivo*. *J Infect Dis* 180, 1398-402.
- Leguizamón, M. S., Russomando, G., Rojas de Arias, A., Samudio, M., Cabral, M., González Cappa, S. M., Frasch, A. C., and Campetella, O. (1998). Use of *trans*-sialidase inhibition assay in a population serologically negative for *Trypanosoma cruzi* but at a high risk of infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 5, 254-5.
- Lehmann, P., Forsthuber, T., Miller, A., and Sercarz, E. E. (1992). Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 358, 155-7.
- 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., and et al. (1989). Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg* 41, 530-8.
- Lindblom, A., Quadt, N., Marsh, T., Aeschlimann, D., Morgelin, M., Mann, K., Maurer, P., and Paulsson, M. (1999). The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is assembled into trimers via a coiled-coil  $\alpha$ -helix. *J Biol Chem* 274,

6374-80.

Lopes, M. F., da Veiga, V. F., Santos, A. R., Fonseca, M. E., and DosReis, G. A. (1995). Activation-induced CD4<sup>+</sup> T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immunol* *154*, 744-52.

Low, H. P., Santos, M. A., Wizel, B., and Tarleton, R. L. (1998). Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8<sup>+</sup> CTL. *J Immunol* *160*, 1817-23.

Lundblad, R. L., and Bradshaw, R. A. (1997). Application of site-specific chemical modification in the manufacture of biopharmaceuticals: I. an overview. *Biotechnol Appl Biochem* *26*, 143-51.

Macedo, A. M., and Pena, S. D. J. (1998). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas' disease. *Parasitol Today* *14*, 119-24.

Madoff, L. C., Michel, J. L., and Kasper, D. L. (1991). A monoclonal antibody identifies a protective C-protein  $\alpha$ -antigen epitope in group B *Streptococci*. *Infect Immun* *59*, 204-10.

Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* *60*, 512-38.

Makrides, S. C., Nygren, P. A., Andrews, B., Ford, P. J., Evans, K. S., Hayman, E. G., Adari, H., Uhlen, M., and Toth, C. A. (1996). Extended *in vivo* half-life of human soluble complement receptor type 1 fused to a serum albumin-binding receptor. *J Pharmacol Exp Ther* *277*, 534-42.

Mamula, M. J., and Janeway Jr., C. A. (1993). Do B cells drive the diversification of immune responses? *Immunol Today* *14*, 151-2.

Marcotte, E. M., Pellegrini, M., Yeates, T. O., and Eisenberg, D. (1999). A census of protein repeats. *J Mol Biol* *293*, 151-60.

Maruyama, K., Mori, A., Bhadra, S., Subbiah, M. T. R., and Huang, L. (1991). Proteins and peptides bound to long-circulating liposomes. *Biochim Biophys Acta* *1070*, 246-52.

Masuda, M. O., Levin, M., De Oliveira, S. F., Dos Santos Costa, P. C., Bergami, P. L., Dos Santos Almeida, N. A., Pedrosa, R. C., Ferrari, I., Hoebeke, J., and Campos de Carvalho, A. C. (1998). Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. *FASEB J* *12*, 1551-8.

Mattes, M. J. (1987). Biodistribution of antibodies after intraperitoneal or intravenous injection and effect of carbohydrate modifications. *J Natl Cancer Inst* *79*, 855-63.

Mattos-Guaraldi, A. L., Formiga, L. C. D., and Andrade, A. F. B. (1998). *trans*-sialidase activity for sialic acid incorporation on *Corynebacterium diphtheriae*. *FEMS Microbiol Lett* *168*, 167-72.

McKean, P. G., Trenholme, K. R., Rangarajan, D., Keen, J. K., and Smith, D. F. (1997). Diversity in repeat-containing surface proteins of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* *86*, 225-35.

McLaughlin, G. L., Benedik, M. J., and Campbell, G. H. (1987). Repeated immunogenic amino acid sequences of *Plasmodium* species share sequence homologies with proteins from humans and human viruses. *Am J Trop Med Hyg*

37, 258-62.

Medina-Acosta, E., Paul, S., Tomlinson, S., and Pontes de Carvalho, L. C. (1994). Combined occurrence of trypanosomal sialidase/*trans*-sialidase activities and leishmanial metalloproteinase gene homologues in *Endotrypanum* sp. *Mol Biochem Parasitol* 64, 273-82.

Millar, A. E., Wleklinski-Lee, M., and Kahn, S. J. (1999). The surface protein superfamily of *Trypanosoma cruzi* stimulates a polarized Th1 response that becomes anergic. *J Immunol* 162, 6092-9.

Ming, M., Chuenkova, M., Ortega-Barria, E., and Pereira, M. E. (1993). Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and *trans*-sialidase on the trypanosome. *Mol Biochem Parasitol* 59, 243-52.

Miranda, M. E., Tseng, C. E., Rashbaum, W., Ochoras, R. L., Casiano, C. A., Di Donato, F., Chan, E. K., and Buyon, J. P. (1998). Accessibility of SSA/Ro and SSB/La antigens to maternal autoantibodies in apoptotic human fetal cardiac myocytes. *J Immunol* 161, 5061-9.

Mortara, R. A. (1991). *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp Parasitol* 73, 1-14.

Nayak, B. P., Tuteja, R., Manivel, V., Roy, R. P., Vishwakarma, R. A., and Rao, K. V. (1998). B cell responses to a peptide epitope. V. Kinetic regulation of repertoire discrimination and antibody optimization for epitope. *J Immunol* 161, 3510-9.

Norris, K. A., Bradt, B., Cooper, N. R., and So, M. (1991). Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J Immunol* 147, 2240-7.

Parodi, A. J., Pollevick, G. D., Mautner, M., Buschiazzo, A., Sánchez, D. O., and Frasch, A. C. C. (1992). Identification of the gene(s) coding for the *trans*-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J* 11, 1705-10.

Pastini, A. C., Iglesias, S. R., Carricarte, V. C., Guerin, M. E., Sánchez, D. O., and Frasch, A. C. C. (1994). Immunoassay with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens potentially useful for screening donated blood and diagnosing Chagas' disease. *Clin Chem* 40, 1893-7.

Paulson, J. C., and Colley, K. J. (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type- specific glycosylation. *J Biol Chem* 264, 17615-8.

Pereira, M. E. (1983). A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Science* 219, 1444-6.

Pereira, M. E., Mejia, J. S., Ortega-Barria, E., Matzilevich, D., and Prioli, R. P. (1991). The *Trypanosoma cruzi* neuraminidase contains sequences similar to bacterial neuraminidases, YWTD repeats of the low density lipoprotein receptor, and type III modules of fibronectin. *J Exp Med* 174, 179-91.

Pereira-Chioccola, V. L., Acosta-Serrano, A., Almeida, I. C., Ferguson, M. A. J., Souto-Padrón, T., Rodrigues, M. M., Travassos, L. R., and Schenkman, S. (2000). Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies. *J Cell Sci* 113, 1299-307

- Pereira-Chioccola, V. L., Costa, F., Ribeiro, M., Soares, I. S., Arena, F., Schenkman, S., and Rodrigues, M. M. (1999). 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, 103-10.
- Pereira-Chioccola, V. L., Schenkman, S., and Kloetzel, J. K. (1994). Sera from chronic Chagasic patients and rodents infected with *Trypanosoma cruzi* inhibit *trans*-sialidase by recognizing its amino-terminal and catalytic domain. *Infect Immun* 62, 2973-8.
- Pestel, J., Defoort, J.-P., Gras-Masse, H., Afchain, D., Capron, A., Tartar, A., and Ouaiissi, A. (1992). Polyclonal cell activity of a repeat peptide derived from the sequence of an 85-kDa surface protein of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Infect Immun* 60, 715-9.
- Pilatte, Y., Bignon, J., and Lambre, C. R. (1993). Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. *Glycobiology* 3, 201-18.
- Plebansky, M., Lee, E. A. M., Hannan, C. M., Flanagan, K. L., Gilbert, S. C., Gravenor, M. B., and Hill, A. V. S. (1999). Altered peptide ligands narrow the repertoire of cellular immune responses by interfering with T-cell priming. *Nat Med* 5, 565-71.
- Pollevick, G. D., Sánchez, D. O., Campetella, O., Trombetta, S., Sousa, M., Henriksson, J., Hellman, U., Pettersson, U., Cazzulo, J. J., and Frasch, A. C. (1993). Members of the SAPA/*trans*-sialidase protein family have identical N-terminal sequences and a putative signal peptide. *Mol Biochem Parasitol* 59, 171-4.
- Pontes de Carvalho, L. C., Tomlinson, S., Vandekerckhove, F., Bienen, E. J., Clarkson, A. B., Jiang, M. S., Hart, G. W., and Nussenzweig, V. (1993). Characterization of a novel *trans*-sialidase of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes and identification of procyclin as the main sialic acid acceptor. *J Exp Med* 177, 465-74.
- Porath, J., and Olin, B. (1983). Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry* 22, 1621-30.
- Previato, J. O., Andrade, A. F. B., Pessolani, M. C. V., and Mendonca-Previato, L. (1985). Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Mol Biochem Parasitol* 16, 85-96.
- Prioli, R. P., Ortega-Barria, E., Mejia, J. S., and Pereira, M. E. (1992). Mapping of a B-cell epitope present in the neuraminidase of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 52, 85-96.
- Prioli, R. P., Rosenberg, I., Shivakumar, S., and Pereira, M. E. (1988). Specific binding of human plasma high density lipoprotein (cruzin) to *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 28, 257-63.
- Puigbó, J. J., Valecillos, R., Hirschhaut, E., Giordano, H., Boccalandro, I., Suarez, C., and Aparicio, J. M. (1977). Diagnosis of Chagas' cardiomyopathy. Non-invasive techniques. *Postgrad Med J* 53, 527-32.
- Razin, S., Yogeve, D., and Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1094-156.
- Ribeiro, M., Pereira-Chioccola, V. L., Rénia, L., Fragata Filho, A. A., Schenkman, S., and Rodrigues, M. M. (2000). Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase. *Parasite Immunol* 22, 49-

- Rinella, J. V., Jr., White, J. L., and Hem, S. L. (1996). Treatment of aluminium hydroxide adjuvant to optimize the adsorption of basic proteins. *Vaccine* *14*, 298-300.
- Rodrigues, M. M., Ribeiro, M., Pereira-Chiocola, V. L., Rénia, L., and Costa, F. (1999). Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect Immun* *67*, 3855-63.
- Rodríguez, A., Samoff, E., Rioult, M. G., Chung, A., and Andrews, N. (1996). Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J Cell Biol* *134*, 349-62.
- Rosenberg, I., Prioli, R. P., Ortega-Barria, E., and Pereira, M. E. (1991). Stage-specific phospholipase C-mediated release of *Trypanosoma cruzi* neuraminidase. *Mol Biochem Parasitol* *46*, 303-5.
- Rötzsche, O., Falk, K., and Strominger, J. L. (1997). Superactivation of an immune response triggered by oligomerized T cell epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA* *94*, 14642-7.
- Ruiz, R. d. C., Rigoni, V. L., Gonzalez, J., and Yoshida, N. (1993). The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. *Parasite Immunol* *15*, 121-5.
- Saavedra, E., Herrera, M., Gao, W., Uemura, H., and Pereira, M. A. (1999). The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, through its COOH-terminal tandem repeat, upregulates interleukin 6 secretion in normal human intestinal microvascular endothelial cells and peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* *190*, 1825-36.
- Sachse, K., Helbig, J. H., Lysnyansky, I., Grajetzki, C., Muller, W., Jacobs, E., and Yogev, D. (2000). Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. *Infect Immun* *68*, 680-7.
- Salemi, S., Caporossi, A. P., Boffa, L., Longobardi, M. G., and Barnaba, V. (1995). HIVgp120 activates autoreactive CD4-specific T cell responses by unveiling of hidden CD4 peptides during processing. *J Exp Med* *181*, 2253-7.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* *74*, 5463-7.
- Sansonetti, P. J., Ryter, A., Clerc, P., Maurelli, A. T., and Mounier, J. (1986). Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect Immun* *51*, 461-9.
- Santori, F. R., Paranhos-Bacalla, G. S., Da Silveira, J. F., Yamauchi, L. M., Araya, J. E., and Yoshida, N. (1996). A recombinant protein based on the *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote 82-kDa antigen that induces and effective immune response to acute infection. *Infect Immun* *64*, 1093-9.
- Schauer, R., Reuter, G., Muhlfordt, H., Andrade, A. F., and Pereira, M. E. (1983). The occurrence of *N*-acetyl- and *N*-glycoloylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* *364*, 1053-7.

- Schenkman, S., Chaves, L. B., Pontes de Carvalho, L. C., and Eichinger, D. (1994b). A proteolytic fragment of *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase lacking the carboxyl-terminal domain is active, monomeric, and generates antibodies that inhibit enzymatic activity. *J Biol Chem* 269, 7970-5.
- Schenkman, S., Eichinger, D., Pereira, M. E., and Nussenzweig, V. (1994a). Structural and functional properties of *Trypanosoma trans*-sialidase. *Annu Rev Microbiol* 48, 499-523.
- Schenkman, S., Ferguson, M. A., Heise, N., de Almeida, M. L., Mortara, R. A., and Yoshida, N. (1993). Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by *trans*-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 59, 293-303.
- Schenkman, S., Jiang, M. S., Hart, G. W., and Nussenzweig, V. (1991). A novel cell surface *trans*-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* 65, 1117-25.
- Schenkman, S., Pontes de Carvalho, L., and Nussenzweig, V. (1992). *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *J Exp Med* 175, 567-75.
- Schofield, L. (1991). On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasites. *Parasitol Today* 7, 99-105.
- Scudder, P., Doom, J. P., Chuenkova, M., Manger, I. D., and Pereira, M. E. (1993). Enzymatic characterization of  $\beta$ -D-galactoside  $\alpha$  2,3-*trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 268, 9886-91.
- Sercarz, E. E., Lehmann, P. V., Ametani, A., Benichou, G., Miller, A., and Moudgil, K. (1993). Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol* 11, 729-66.
- Sgambatti de Andrade, A. L., Zicker, F., de Oliveira, R. M., Almeida e Silva, S., Luquetti, A., Travassos, L. R., Almeida, I. C., de Andrade, S. S., Guimaraes de Andrade, J., and Martelli, C. M. T. (1996). Randomised trial of efficacy of benzimidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 348, 1407-13.
- Smith, D. B., and Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Snapper, C. M., Kehry, M. R., Castle, B. E., and Mond, J. J. (1995). Multivalent, but not divalent, antigen receptor cross-linkers synergize with CD40 ligand for induction of Ig synthesis and class switching in normal murine B cells. *J Immunol* 154, 1177-87.
- Souto, R. P., Fernandes, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A., and Zingales, B. (1996). DNA markers define two phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83, 141-52.
- Souto-Padrón, T., Reyes, M. B., Leguizamón, M. S., Campetella, O. E., Frasch, A. C. C., and de Souza, W. (1989). *Trypanosoma cruzi* proteins which are antigenic during human infections are located in defined regions of the parasite. *Eur J Cell Biol* 50, 272-8.
- Sytkowski, A. J., Dotimas Lunn, E., Davis, K. L., Feldman, L., and Siekman, S. (1998). Human erythropoietin dimers with markedly enhanced *in vivo* activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 1184-8.
- Szolomanyi-Tsuda, E., Le, Q. P., Garcea, R. L., and Welsh, R. M. (1998). T-cell-independent immunoglobulin G

- responses *in vivo* are elicited by live-virus infection but not by immunization with viral proteins or virus-like particles. *J Virol* 72, 6665-70.
- Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J. A., Heuser, J. E., and Andrews, N. W. (1992). Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* 71, 1117-30.
- Tarleton, R. L., and Zhang, L. (1999). Chagas' disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 15, 94-9.
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., and Ayala, F. J. (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 115-9.
- Todeschini, A. R., Nunes, M. P., Lopes, M. F., Pires, R. S., Correa, M., Borges, V. M., Frasc, A. C. C., Previato, J. O., Mendonça-Previato, L., and DosReis, G. (1998). Immunostimulation of host T-lymphocyte function by *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Osw Cruz* 93, 253.
- Truyens, C., Angelo-Barrios, A., Torrico, F., Van Damme, J., Heremans, H., and Carlier, Y. (1994). Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. *Infect Immun* 62, 692-6.
- Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Kamada, H., Kihira, T., Kaneda, Y., Ohorasugi, Y., and Mayumi, T. (1997). PEGylation of interleukin-6 effectively increases its thrombopoietic potency. *Thromb Haemost* 77, 168-73.
- Uemura, H., Schenkman, S., Nussenzweig, V., and Eichinger, D. (1992). Only some members of a gene family in *Trypanosoma cruzi* encode proteins that express both *trans*-sialidase and neuraminidase activities. *EMBO J* 11, 3837-44.
- Umezawa, E. S., Shikanai-Yasuda, M. A., da Silveira, J. F., Cotrim, P. C., Paranhos, G., and Katzin, A. M. (1993). *Trypanosoma cruzi*: detection of a circulating antigen in urine of chagasic patients sharing common epitopes with an immunodominant repetitive antigen. *Exp Parasitol* 76, 352-7.
- Urbina, J. A., Payares, G., Molina, J., Sanoja, C., Liendo, A., Lazard, K., Piras, M. M., Piras, R., Perez, N., Wincker, P., and Ryley, J. F. (1996). Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science* 273, 969-71.
- Usinger, R. L., Wygodzinsky, P., and Ryckman, R. E. (1966). The biosystematics of Triatominae. *Annu Rev Entomol* 11, 309-30.
- Vaidya, T., Bakhiet, M., Hill, K. L., Olsson, T., Kristensson, K., and Donelson, J. E. (1997). The gene for a T lymphocyte triggering factor from African trypanosomes. *J Exp Med* 186, 433-8.
- Van Voorhis, W. C., Barrett, L., Koelling, R., and Farr, A. G. (1993). FL-160 proteins of *Trypanosoma cruzi* are expressed from a multigene family and contain two distinct epitopes that mimic nervous tissues. *J Exp Med* 178, 681-94.
- Vasi, J., Svensson, J., Frick, I.-M., and Müller, H.-P. (1999). Five homologous repeats of the protein G-related protein MIG cooperate in binding to goat immunoglobulin G. *Infect Immun* 67, 413-6.



- Venkatachalam, M. A., and Rennke, H. G. (1978). The structural and molecular basis of glomerular filtration. *Circ Res* 43, 337-47.
- Vergara, U., Lorca, M., Veloso, C., González, A., Engstrom, A., Aslund, L., Petterson, U., and Frasc, A. C. C. (1991). Assay for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. *J Clin Microbiol* 29, 2034-7.
- Verra, F., and Hughes, A. L. (1999). Biased amino acid composition in repeat regions of *Plasmodium* antigens. *Mol Biol Evol* 16, 627-33.
- Vijayakrishnan, L., Kumar, V., Agrewala, J. N., Chandra Mishra, G., and Rao, K. V. S. (1994). Antigen-specific early primary humoral responses modulate immunodominance of B cell epitopes. *J Immunol* 153, 1613-25.
- Villalta, F., Smith, C. M., Burns, J. M., Chaudhuri, G., and Lima, M. F. (1996). Fab' fragments of a mAb to a member of family 2 of *trans*-sialidases of *Trypanosoma cruzi* block trypanosome invasion of host cells and neutralize infection by passive immunization. *Ann N Y Acad Sci* 797, 242-5.
- Villalta, F., Zhang, Y., Bibb, K. E., Burns, J. M., Jr., and Lima, M. F. (1998). Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through the MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 247-52.
- Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H., and Segura, E. (1994). Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 127, 151-62.
- Watts, C., and Lanzavecchia, A. (1993). Suppressive effect of antibody on processing of T cell epitopes. *J Exp Med* 178, 1459-63.
- Weston, D., Patel, B., and Van Voorhis, W. C. (1999). Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of a distinct family of sialidase superfamily genes. *Mol Biochem Parasitol* 98, 105-16.
- WHO. (1997). World Health Organization. Tropical Disease Research, progress 1995-96, W. H. O. Publications, ed. (Geneva).
- Williamson, M. P. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J* 297, 249-60.
- Winkler, M. A., Rivera, D. M., Pan, A. A., and Nowlan, S. F. (1998). Homology of *Trypanosoma cruzi* clone 36 repetitive DNA sequence to sequence encoding human Ro/SSA 52 kDa autoantigen. *Parasite* 5, 94-5.
- Wise, K. S. (1993). Adaptive surface variation in mycoplasmas. *Trends Microbiol* 1, 59-63.
- Wizel, B., Garg, N., and Tarleton, R. L. (1998a). Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 66, 5073-81.
- Wizel, B., Nunes, M., and Tarleton, R. L. (1997). Identification of *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase family members as targets of protective CD8<sup>+</sup> TC1 responses. *J Immunol* 159, 6120-30.
- Wizel, B., Palmieri, M., Mendoza, C., Arana, B., Sidney, J., Sette, A., and Tarleton, R. (1998b). Human infection with *Trypanosoma cruzi* induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J Clin Invest* 102, 1062-71.

- Wrightsmann, R. A., Dawson, B. D., Fouts, D. L., and Manning, J. E. (1994). Identification of immunodominant epitopes in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface antigen-1 protein that mask protective epitopes. *J Immunol* 153, 3148-54.
- Yan, B. S., Tam, M. H., and Syu, W. J. (1998). Self-association of the C-terminal domain of the hepatitis-C virus core protein. *Eur J Biochem* 258, 100-6.
- Yoshida, N., Mortara, R. A., Araguth, M. F., González, J. C., and Russo, M. (1989). Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-Kda surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 57, 1663-7.
- Zheng, X., Teng, L.-J., Watson, H. L., Glass, J. I., Blanchard, A., and Cassell, G. H. (1995). Small repeating units within the *Ureaplasma urealyticum* MB antigen gene encode serovar specificity and are associated with antigen size variation. *Infect Immun* 63, 891-8.
- Zingales, B., Carniol, C., de Lederkremer, R. M., and Colli, W. (1987). Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 26, 135-44.
- Zingales, B., Katzin, A. M., Arruda, M. V., and Colli, W. (1985). Correlation of tunicamycin-sensitive surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* with parasite interiorization into mammalian cells. *Mol Biochem Parasitol* 16, 21-34.
- Zuckier, L. S., Chang, C. J., Scharff, M. D., and Morrison, S. L. (1998). Chimeric human-mouse IgG antibodies with shuffled constant region exons demonstrate that multiple domains contribute to *in vivo* half-life. *Cancer Res* 58, 3905-8.
- Zuckier, L. S., Rodríguez, L. D., and Scharff, M. D. (1989). Immunologic and pharmacologic concepts of monoclonal antibodies. *Semin Nucl Med* 19, 166-86.

