Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Identificación de dos moléculas de Trypanosoma cruzi involucradas en la invasión de las células del huésped

Silber, Ariel M.

2000

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

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

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

Cita tipo APA:
Silber, Ariel M.. (2000). Identificación de dos moléculas de Trypanosoma cruzi involucradas en la invasión de las células del huésped. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3262_Silber.pdf

Cita tipo Chicago:
Silber, Ariel M.. "Identificación de dos moléculas de Trypanosoma cruzi involucradas en la invasión de las células del huésped". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3262_Silber.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Identificación de dos moléculas de *Trypanosoma cruzi* involucradas en la invasión de las células del huésped.

Tesis para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Autor: Lic. Ariel M. Silber

Director: Dr. Alberto J. Marcipar

Lugar de realización: Instituto de Tecnología Biológica - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral.

Año: 2000

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Identification of two molecules of *Trypanosoma cruzi* involved in host cell invasion.

Author: Lic. Ariel M. Silber

Director: Dr. Alberto J. Marcipar

Institution: Instituto de Tecnología Biológica - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral.

Year: 2000

A Sara Marcipar y a Víctor P. Silber.

A Karina.

A Iván, Marikena y Cintia, y en general a todos aquellos que con mucho esfuerzo andan detrás del sueño de conversar con la naturaleza.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este trabajo recibí ayuda de distintas personas. Para ser justo y referirme a todos ellos los agradecimientos deberían ocupar un volumen aparte. Sin embargo quiero mencionar a aquellas personas que tuvieron una relación más directa con este trabajo.

En primer lugar quiero expresar mi gratitud a Alberto Marcipar por permitirme llevar a cabo este trabajo en el INTEBIO, por la libertad de pensar y oponerme (a veces testarudamente) a sus opiniones.

Quiero agradecer al Dr. Mariano Levin (INGEBI) por la biblioteca de expresión de ADN copia de tripomastigotes utilizada en este trabajo.

A Patricia Cabeza Meckert y el grupo del Laboratorio de Patología del Instituto de Cirugía Cardiovascular de la Fundación Favaloro por su experiencia y ayuda con los experimentos de lectino-inmunohistoquímica, y por la simpatía y amistad con que me recibieron siempre.

Un agradecimiento muy especial a Raquel Chan y Daniel Gonzalez, porque en forma totalmente desinteresada me abrieron las puertas de su laboratorio para completar experimentos de biología molecular, me dieron reactivos cuando yo no podía comprarlos, me prestaron la computadora con que fue escrita parte de esta Tesis, discutieron resultados, revisaron menuscritos... la lista de cosas que me enseñaron y en las que me ayudaron es interminable, y me siento particularmente en deuda con ellos. Asimismo quiero extender mi agradecimiento a las integrantes del grupo Chan/Gonzalez que me ayudaron durante mi estadía en ese laboratorio: Silvina Felitti, Gabriela Gago, Claudia Palena y Mariana Tioni.

A Esteban Serra por la amistad, por la predisposición para discutir mis resultados, así como otros temas que no podría mencionar aquí, y por recibirme en su casa en Rosario todas las veces que fue necesario.

Estoy muy agradecido a Maria Julia Manso Alves y todo el grupo del Laboratorio de Parasitología del Instituto de Quimica de la Universidade de Sao Paulo por la ayuda con los experimentos de invasión a células, las discusiones, y los consejos. Quiero hacer extensivo este agradacimiento además a otra gente que durante mi estadía en la USP prestó atención a mis experimentos y mis resultados, dándome consejos útiles: Walter Colli, Alejandro Katzin, Tania Bijovsky e Igor Almeida.

A Juan y Joly por recibirme en su casa en Sao Paulo, con una gran hospitalidad, que incluyó asado y amigos.

Me siento también en deuda con Esteban Bontempi, Jacqueline Bua, Carlos Pravia, Lilian Joensen, Gabriela García, Susana Laucella, María Inés Antunez, Diana Hansen y Gustavo Allievi, y en general a la gente del Instituto Fatala Chabén que hicieron que mi paso por allí fuera una experiencia enriquecedora.

Quiero agradecer también a la gente del Departamento de Física de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL por haberme ayudado en todo momento a resolver los infinitos problemas informáticos con los que me tuve que enfrentar durante la escritura de este trabajo. Especialmente a María Belén Cassera, que me ayudó con la impresión de las figuras.

Finalmente, mi mayor reconocimiento es para las personas que estuvieron al lado mío. Fue un privilegio poder pensar, discutir, trabajar y reirme todo este tiempo junto a Iván Marcipar, Cintia Roodveldt, Marikena Risso y Elina Welchen. También quiero expresar mi agradecimiento a las personas que se sumaron al grupo de trabajo sobre el final de la Tesis, y cuya presencia en el laboratorio resultó muy estimulante por sus inquietudes, inteligencia y sentido del humor: Ariel Amadío, Laura Cabeza, María Belén Cassera (integrante del Departamento de Física), Gerardo Corradi, Andrés Dekanty y Maica Trevissi.

INDICE

ABREVIATURAS 1
RESUMEN 3
ABSTRACT 4
INTRODUCCION 5
I.El *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas 6
I.1 El *Trypanosoma cruzi* 6
I.1.i. Ubicación taxonómica 6
I.1.ii. Estructura celular 6
I.1.iii. Metabolismo energético: glucólisis 7
I.1.iv. Mitocondria y respiración 8
I.1.v. N-glicosilaciones 8
I.1.vi. Genoma 9
I.1.vii. Estadios evolutivos 10
I.1.viii. Diversidad biológica entre cepas, clones y aislados de *T. cruzi* 11
I.1.ix. Ciclo de vida 12
I.2. La enfermedad de Chagas 14
I.2.i. Formas de transmisión y control de la misma 14
I.2.ii. Patología de la infección 15
I.2.ii.a. Período agudo 15
I.2.ii.b. Período indeterminado 16
I.2.ii.c. Período crónico 16
I.2.iii. Respuesta inmunológica a la infección 17
I.2.iv. Tratamiento 20
I.2.v. Diagnóstico 21
I.2.v.a. Métodos directos 21
I.2.v.a.1. Visualización de parásitos 21
I.2.v.a.2. Detección de antígenos e inmunocomplejos 22

I.2.v.a.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)..... 23
I.2.v.b. Métodos indirectos..... 24
II. La invasión celular..... 27
II.1. La invasión de células fagocíticas y no fagocíticas por
amastigotes y tripomastigotes..... 27
II.1.i. La invasión de las células del huésped por formas amastigotes..... 27
II.1.i.a. Invasión de células fagocíticas..... 28
II.1.i.b. Invasión de células no fagocíticas..... 28
II.1.ii. La invasión de las células del huésped por formas tripomastigotes..... 28
II.1.ii.a. Invasión de células fagocíticas..... 28
II.1.ii.b. Invasión de células no fagocíticas..... 29
II.2. El proceso de interacción con las células
del huésped por formas tripomastigotes..... 30
II.2.i. Inducción de mecanismos de transducción de señales previo a la invasión.... 30
II.2.i.a. La movilización de Ca^{2+} en las células del huésped..... 30
II.2.i.b. La movilización de Ca^{2+} en el parásito..... 32
II.2.i.c. La fosforilación de proteínas en las células del huésped en la invasión..... 32
II.2.i.d. La fosforilación de proteínas del parásito en la invasión..... 33
II.2.i.e. Los receptores del TGF-β como vía para la transducción
de señales previo a la invasión..... 33
II.2.ii. La participación del citoesqueleto y los lisosomas..... 33
II.2.iii. El reconocimiento y la adhesión a las células..... 36
II.2.iii.a. Las moléculas parasitarias involucradas
en el reconocimiento y/o la adhesión previo a la invasión..... 37
II.2.iii.a.1. Glicoproteínas de superficie de los tripomastigotes metacíclicos..... 37
II.2.iii.a.2. Glicoproteínas de superficie de tripomastigotes de mamíferos..... 39
II.2.iii.a.3. Glicoproteínas de superficie de amastigotes..... 42

II.2.iii.b. Las moléculas de las células del huésped
involucradas en el reconocimiento y/o la adhesión..... 42
II.2.iv. Modificaciones de los componentes de superficie de las células
del huésped por componentes parasitarios relacionados con las etapas
tempranas de la invasión celular..... 45
II.2.iv.a. La transialidación..... 45
II.2.iv.b. La actividad pepditil-prolil cis-trans isomerasa..... 48
II.2.iv.c. La actividad cruzipaína..... 49
II.3. La internalización y la evasión de la vacuola parasitófora..... 49
OBJETIVOS..... 52
I. Objetivos generales..... 53
II. Objetivos particulares..... 53
MATERIALES Y METODOS..... 54
I. Soluciones y medios de cultivo..... 55
I.1. Soluciones..... 55
I.2. Medios de cultivo..... 56
II.1. Parásitos..... 57
II.1.i. Epimastigotes de la cepa Tulahuen stock 0 y de la cepa Y..... 57
II.1.ii. Tripomastigotes sanguíneos de ratón de la cepa Tulahuen stock 2..... 57
II.1.iii. Tripomastigotes de la cepa Y provenientes de cultivos de células..... 57
II.2. Células..... 58
II.3. Cepas de *Escherichia coli* y su preservación..... 58
II.4. Fagos y biblioteca de ADN copia..... 58
III. Homogenatos y fracciones celulares..... 59
III.1. Homogenato total (HT) de *T. cruzi*..... 59
III.2. Fracción fenólica de glicoproteínas de membranas de *T. cruzi* (PFMG)..... 59
III.3. Preparación de extractos de maní..... 60

IV. Purificaciones en columnas..... 60
IV.1. Tamiz molecular..... 60
IV.1.i. Calibración de la columna de tamiz molecular Sephadex G25..... 60
IV.1.ii. Tamizado molecular de la fracción fenólica de glicoproteínas
de membrana de *T. cruzi*..... 61
IV.2. Columna de afinidad sobre la base de membranas eritrocitarias..... 62
IV.2.i. Preparación de una columna de glóbulos rojos desialidados
capaz de exponer residuos galactosa terminales en la superficie..... 62
IV.2.ii. Condiciones de uso de la columna..... 62
V. Técnicas inmunoquímicas: preparación de sueros, y caracterización
de antígenos y anticuerpos..... 63
V.1. Dosaje de proteínas totales..... 63
V.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)..... 63
V.3. Obtención de sueros policlonales de conejo anti-PFMG y
anticuerpos purificados contra una proteína recombinante..... 64
V.3.i. Sueros policlonales de conejo anti-PFMG..... 64
V.3.ii. Purificación de anticuerpos específicos que reconocen
a la proteína recombinante..... 65
V.4. Caracterización de los sueros anti-PFMG y anticuerpos
purificados contra una proteína recombinante..... 66
V.4.i. Titulación..... 66
V.4.i.a. Titulación por Enzimo-Inmunoensayo (ELISA)..... 66
V.4.i.b. Titulación por dot blot..... 66
V.4.ii. Ensayo de Concanavalina A - peroxidasa..... 67
V.4.iii. Western blot..... 67
V.4.iv. Tratamiento deglicosilante..... 68
V.4.v. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)..... 68

VI. Ensayos de actividad y funcionalidad 68
VI.1. Reconocimiento de receptores en tejidos 68
VI.1.i. Procesamiento de las muestras para ensayos de
lectino inmunohistoquímica 69
VI.1.i.a. Muestras provenientes de biopsias humanas 69
VI.1.i.b. Muestras provenientes de biopsias murinas 69
VI.1.ii. Lectino inmunohistoquímica 69
VI.2. Actividad antigénica 70
VI.2.i. Panel de sueros humanos 70
VI.2.ii. ELISA con sueros humanos 70
VI.3. Ensayos de inhibición de la penetración 71
VI.3.i. Infección de células suceptibles 71
VI.3.ii. Recuento de amastigotes en células infectadas 72
VII. Búsqueda y caracterización molecular de antígenos
recombinantes relacionados con la PFMG 72
VII.1. Inmuno-rastreo de la biblioteca de expresión 72
VII.1.i. Adsorción de los sueros y pseudo-rastreo 72
VII.1.ii. Inmuno-rastreo de la biblioteca de expresión 73
VII.2. Purificación de los posibles fagos positivos para
el reconocimiento por el suero anti PFMG 74
VII.3. Amplificación del clon aislado y de fagos salvajes 74
VII.3.i. En medio sólido 74
VII.3.ii. En medio líquido 75
VII.4. Caracterización de la proteína recombinante 75
VII.4.i. Extracción y análisis de ADN 75
VII.4.i.a. Extracción de ADN de fagos 75
VII.4.i.b. Minipreparación de ADN plasmídico 76

VII.4.i.c. Extracción de ADN total de *T. cruzi* 76
VII.4.ii. Electroforesis en gel de agarosa 77
VII.5. Subclonado, transformación de bacterias y secuenciación de ADN 77
VII.5.i. Subclonado en el vector pUC119 77
VII.5.ii. Transformación de bacteria con ADN plasmídico 78
VII.5.iii. Secuenciación del fragmento de ADN clonado 79
VII.6. Análisis de las secuencias 79
RESULTADOS 80
I. Caracterización de la Fracción Fenólica de Glicoproteínas de Membranas (PFMG) búsqueda y caracterización de sus antígenos constituyentes en una biblioteca de expresión 81
II. Búsqueda de una proteína de *Trypanosoma cruzi* de unión a galactosa 104
DISCUSION 120
I. La fracción fenólica de glicoproteínas de membrana 122
II. La proteína flagelar ligante de Ca^{2+} 123
III. La glicoproteína símil lectina de 67 kDa (LLGP-67) 129
IV. Un modelo sobre el cual estudiar la interacción entre el parásito y las células del huésped humano desde el punto de vista del reconocimiento 132
V. Epílogo 134
CONCLUSIONES 136
REFERENCIAS 138

ABREVIATURAS

ADN: ácido deoxi-ribonucleico
ADNasa: deoxi-ribonucleasa
ADNc: ADN copia
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ARNasa: ribonucleasa
ATP: adenosina trifosfato
Ca^{2+}: ión calcio en estado divalente
cAMP: Adenosina monofosfato cíclico
Con A: concanavalina A
DAB: diamino benzidina
DTT: ditiotreitol
EDTA: etilen diamino tetra acetato de sodio
ELISA: enzimo-inmunoensayo
FFGM: fracción fenólica de glicoproteínas de membrana
Glc: glucosa
GlcNAc: N-acetil glucosamina
gli: glicina
GPI: glicofosfatidil inositol
GR: glóbulos rojos
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana
IFI: inmunofluorescencia indirecta
IFN-γ: interferón gamma
IgG: anticuerpos de tipo G
IL-10: interleuquina 10
IP3: inositol 1,4,5-trifosfato
IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
KAc: acetato de potasio
kDa: kilodalton
K-ADN: ADN del kinetoplasto
LB: medio Luria-Bertani
LIS: diiodo salicilato de litio
LLGP-67: glicoproteína símil lectina de 67 kDa del *Trypanosoma cruzi*
M: molar
Man: manosa
mg: miligramo
ml: mililitro
mM: milimolar
min.: minutos
NaAc: acetato de sodio
N° Acc.: número de acceso al banco de datos
NADH: nicotinamida adenina di nucleótido reducido
ng: nanogramo
nm: nanometros
pb: pares de bases
PBS: *buffer* fosfato salino
PBS-T: PBS adicionado con un 0,05 % de Tween 20
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PEG: polientilenglicol
PFMG: fracción fenólica de glicoproteínas de membrana del *Trypanosoma cruzi*
PHA: fitohemoaglutinina
PM: peso molecular

PMSF: fenilmetilsulfonilfluoruro

PNA: aglutinina de maní

RCA: aglutinina de *Ricinus communis*

SDS: dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

SM: solución de mantenimiento para fagos

TAE: *buffer* Tris-ácido acético-EDTA

TBE: *buffer* Tris-ácido bórico-EDTA

TBS: *buffer* Tris salino

TE: *buffer* Tris-EDTA

TEMED: N, N, N', N',-tetrametil etilen diamina

TGF-β: factor de crecimiento transformante β

TLCK: tosyl-L-lisina clorometilcetona

TMB: tetrametil benzidina

Tris: N-tris-(hidroximetil)aminometano

UFP: unidades formadoras de placas de lisis

UV: luz ultravioleta

v: volumen

V: voltios

WGA: aglutinina de germen de trigo

wt: salvaje

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-galactósido

μg: microgramo

Vi: volumen interno de columna

Vo: volumen de exclusión

Vt: volumen total

Vg: volumen ocupado por la matriz

RESUMEN:

El *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es un parásito con un complejo ciclo de vida que transcurre entre un insecto vector y mamíferos entre ellos el hombre. Durante este ciclo, el parásito alterna entre formas infectivas y no infectivas, y entre formas replicativas y no replicativas. Las únicas formas replicativas en el huésped mamífero son formas intracelulares, por lo tanto, para poder establecer la infección el parásito debe obligatoriamente internalizarse en las células del huésped y diferenciarse a formas replicativas. En el presente trabajo se caracterizaron parcialmente dos moléculas parasitarias y se demostró su participación en el proceso de internalización. Estas moléculas son una glicoproteína símil lectina de 67 kDa galactosa específica y una proteína flagelar ligante de calcio de la familia de las calflaginas. Se propone además un sistema que permite estudiar las interacciones entre receptores y antirreceptores que ocurren entre el parásito y las células humanas.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the aethiological agent for Chagas' disease, is a parasite with a complex life cycle between an insect vector and mammals (man among them). During this cycle, parasites alternate among infective and non-infective, and replicative and non-replicative forms. The only replicative forms in the mammalian host are the intracellular stages, so the parasite must internalize into the host cells in order to establish the infection. In the present work, two parasite molecules were partially characterized and a role for them in parasite internalization was demonstrated. These molecules consisted of a 67 kDa galactose specific lectin like glycoprotein and a flagellar calcium binding protein belonging to the calflagin family. Besides, a system to study receptors-couterreceptors interaction among parasites and human cells is proposed.

INTRODUCCION

I. El *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es un importante problema de salud pública en Latinoamérica, donde se estima que existen cerca de 25 millones de personas infectadas (Hayes R. y Schofield C. 1990), de los cuales se calcula que 3 millones se encuentran en Argentina (Curto de Casas S. I. 1985). La problemática de esta enfermedad endémica de los países latinoamericanos ha alcanzado incluso a los Estados Unidos y Canadá, donde se han reportado en los últimos años casos de transmisión de la infección a través de transfusiones de sangre (Grant I. et al. 1989, Kirchoff L. 1989, Nickerson P. et al. 1989).

I.1 El *Trypanosoma cruzi*

I.1.i. Ubicación taxonómica

El *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es un protozoo hemoflagelado, ubicado en la familia Trypanosomatideae, subgénero *Schizotrypanum* dentro del orden Kinetoplastida, clase Zoomastigophora, Phylum Sarcomastigophora. (Gonzalez Cappa S. M. e Isola E. L. D. 1994).

I.1.ii. Estructura celular

Los organismos del orden Kinetoplastida poseen como característica diferencial una única mitocondria en forma de tubos que recorre toda la célula, y una región de la misma separada del citoplasma por la doble membrana mitocondrial llamada kinetoplasto, que presenta un contenido particularmente alto de ADN (K-DNA). El K-DNA constituye entre un 20 y un 30% del ADN total de la célula y presenta una organización particular: el mismo está distribuido en 5000 a 10000 círculos menores o minicírculos y 25 a 50 círculos mayores o maxicírculos encadenados entre sí (Vickerman K. 1976). En una región próxima al kinetoplasto se encuentra el cuerpo basal, estructura cilíndrica constituida por nueve tripletes de microtúbulos conectados con el único flagelo. El mismo emerge de la célula a partir de una invaginación de la membrana citoplasmática llamada bolsillo flagelar y está separado del citoplasma por un tabique o

"septum". La estructura del flagelo está constituida por nueve pares de microtúbulos periféricos longitudinales y un par central (estructura 9 + 1) conectados con el cuerpo basal. Paralelos a los microtúbulos se encuentran filamentos longitudinales unidos entre sí por filamentos oblicuos que conforman una banda estriada delgada. Esta estructura está envuelta en una vaina que es una prolongación de la membrana citoplasmática. El conjunto conformado por el flagelo y el cuerpo basal constituye el aparato de locomoción del parásito (De Souza W. 1984). Otra característica estructural de estos parásitos es la ausencia de un verdadero citoesqueleto. En su lugar existe un tramado de microtúbulos subyacentes a la membrana citoplasmática (microtúbulos periplásticos) que actúan como refuerzo mecánico de la misma, y participan en la conformación de la morfología celular (Seebeck T. et al. 1990).

I.1.iii. Metabolismo energético: glucólisis

En los tripanosomátidos la glucólisis también presenta características únicas. En los estadíos sanguíneos en el huésped mamífero, la energía es tomada de la glucosa sérica. Los parásitos no presentan efecto Pasteur (regulación inhibitoria de la glucólisis por presencia de oxígeno). A diferencia de otros eucariotas, la maquinaria enzimática necesaria para la conversión de esta glucosa en energía en forma de ATP está compartimentalizada entre una organela llamada glicosoma, el citoplasma y la mitocondria. La alta concentración de las enzimas responsables de los pasos iniciales de la glucólisis en los glicosomas hace de éste un proceso altamente eficiente y rápido. En esta organela ocurre la vía glucolítica desde hexoquinasa hasta fosfoglicerato quinasa. El NADH generado durante este proceso es reoxidado por las enzimas glicosomales malato dehidrogenasa y α-glicerofosfato dehidrogenasa. La alimentación de este ciclo reconvirtiendo los productos enzimáticos nuevamente en sustratos se da en citoplasma (donde el ácido málico es procesado a fosfoenol piruvato, y luego en los glicosomas es convertido en oxalacetato, sustrato de la malato dehidrogenasa) y en la mitocondria parasitaria (donde el α-glicerofosfato es convertido en dihidroxiacetona fosfato y vuelve a entrar en los glicosomas como sustrato de la α-glicerofosfato dehidrogenasa). El malato generado en los glicosomas puede además ser procesado en la mitocondria, donde puede entrar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y terminar en la cadena

respiratoria (revisado por Boothroyd J. C. 1990, Cazzulo J. J. 1994, Gonzalez Cappa S. M. e Isola E. L. D. 1994).

I.1.iv. Mitocondria y respiración

Como se mencionó anteriormente, los tripanosomátidos poseen una única mitocondria. El rol principal de las mitocondrias en organismos eucariotas es el de generar ATP sobre la base del proceso de respiración oxidativa. En los tripanosomátidos, este proceso está regulado en el desarrollo. Por lo general, en las formas sanguíneas de los trypanosomas, no se han detectado citocromos ni generación de ATP asociado a la actividad mitocondrial. Morfológicamente, la mitocondria en este estadío consiste en un sistema de tubos largos y estrechos. La membrana interna presenta pocas o ninguna cresta. En los estadíos presentes en el insecto vector en cambio, las mitocondrias se vuelven más activas, aparecen las crestas de la membrana interna y se observa un incremento en la expresión de citocromos y enzimas necesarias para llevar a cabo la fosforilación oxidativa (revisado por Boothroyd J. C. 1990, Cazzulo J. J. 1994, Gonzalez Cappa S. M. e Isola E. L. D. 1994).

I.1.v. N-glicosilaciones

La síntesis de las N-glicoproteínas de la membrana del *T. cruzi* es otro de los procesos para los que estos parásitos presentan una serie de características únicas (Parodi A. J. 1993-a, Parodi A. J. 1993-b). En primer lugar, los poliprenoles que participan en la síntesis del dolicol fosfato precursor de la N-glicosilación son más pequeños que los caracterizados en mamíferos, plantas y hongos, estando constituídos por 10 a 13 unidades isoprenoides (Parodi A. J. y Quesada-Allué L. A. 1982, Quesada-Allué L. A. y Parodi A. J.1983). Sobre el dolicol fosfato se construye el precursor oligosacarídeo a ser transferido a los residuos asparagina de las glicoproteínas. Este precursor mantiene en la mayoría de las células estudiadas hasta ahora la composición $Glc_3Man_9GlcNAc_2$. Sin embargo, en el *T. cruzi* así como en otros tripanosomátidos esta composición varía. En el *T. cruzi* en particular se ha observado que los oligosacáridos transferidos a las glicoproteínas no contienen Glc, y la cantidad de manosas presentes

puede variar entre los distintos estadíos del parásito (Engel J. C. y Parodi A. J. 1985, Doyle P. et al. 1986). En este sentido, la oligosacaril transferasa de este parásito fue estudiada y mostró (a diferencia de otras provenientes de células de animales, plantas y hongos) una alta eficiencia en la transferencia de precursores glucosilados y no glucosilados a las proteínas durante la síntesis (Bosch M. et al. 1988). El procesamiento en el retículo endoplásmico consiste en la remoción secuencial de dos residuos manosas terminales, con la adición transitoria y remoción en cada paso de una glucosa terminal (Trombetta S. et al. 1989, Trombetta S. et al. 1991, Trombetta S. y Parodi A. J. 1992). En el aparato de Golgi, el procesamiento hacia formas de alta manosa ocurre de una forma similar a los eucariotas superiores, aunque en algunos casos el resultado final sean estructuras glucídicas raramente encontradas en estos, tales como glicosilaciones biantenarias $Man_7GlcNAc_2$ o $Man_6GlcNAc_2$ (Parodi A. J. et al. 1983). El procesamiento de las N-glicosilaciones hacia la forma compleja ocurre a través de diversas glucosil transferasas, que pueden transferir unidades de N-acetil glucosamina, manosa, galactosas ligadas en forma β(1-4)- y α(1-3)- y fucosa (Couto A. et al. 1987, Couto A. et al. 1990). La sialidación de las glicoproteínas de tipo complejo no ocurre en el aparato de Golgi. De hecho el *T. cruzi* no es capaz de sintetizar ácido siálico (Schauer R. et al. 1983). La sialidación ocurre a través de un mecanismo particular mediado por una enzima glicoproteica ubicada en la membrana citoplasmática. Esta enzima, denominada transialidasa, es una transglicosilasa que es capaz de transferir ácido siálico desde glicoconjugados exógenos a las glicoproteínas parasitarias (revisado por Colli W. 1993).

I.1.vi. Genoma

Los tripanosomátidos presentan un genoma esencialmente diploide cuyo tamaño total está en el orden de 10^7 pares de bases (Castro C. et al. 1981, Kooy F. R. et al. 1981). El genoma está organizado en cromosomas de diferente tamaño que no condensan durante la mitosis (probablemente debido a la ausencia de la histona H1) (Boothroyd J. C. 1990). La expresión de los genes nucleares presenta también aspectos diferenciales respecto de otros organismos eucariotas. Los transcriptos primarios son sintetizados como moléculas de ARN policistrónicas a partir de genes arreglados en tandem. Dentro de cada gen no se han encontrado intrones, aunque los transcriptos

primarios presentan secuencias espaciadoras no codificantes que son eliminadas mediante un proceso único: el trans-splicing. Durante este evento particular las distintas regiones codificantes del transcripto primario son separadas. Cada fragmento individual es unido al extremo 3' de una secuencia no codificante de 39 nucleótidos, que está en el extremo 5' de un transcripto de aproximadamente 140 bases. Esta secuencia que es agregada en forma universal a todos los ARN mensajeros, es rica en nucleótidos modificados cuya función sería análoga a la del "cap" en los mensajeros de otros eucariotas (Simpson L. y Show J. 1989).

I.1.vii. Estadíos evolutivos

Como consecuencia de su ciclo de vida, el *Trypanosoma cruzi* enfrenta hábitats tan diversos como el tubo digestivo del insecto vector, la sangre de los mamíferos o el medio intracelular en el cual ocurre el proceso replicativo en mamíferos. En virtud de esto el parásito adopta diferentes formas en cada hábitat. Las mismas son diferenciables tanto desde un punto de vista morfológico como bioquímico. Los estadíos del ciclo de vida del *T. cruzi* fueron caracterizados según el hábitat en el que se encuentran, y según caracteres morfológicos y estructurales (Gonzalez Cappa S. M. e Isola E. L. D. 1994):

Epimastigote: estadío en el que el parásito es capaz de replicar en forma extracelular. En el ciclo natural está presente sólo en el tubo digestivo del vector. Las células son fusiformes. El flagelo se origina por delante del núcleo y próximo a él, a un costado del cuerpo celular, y emerge formando una membrana ondulante corta. Dimensiones medias: 20 - 40 x 2 μm.

Tripomastigote: estadio no replicativo, infectivo en mamíferos. En el ciclo natural se lo encuentra presente en la ampolla rectal del insecto vector (tripomastigote metacíclico), y en la sangre del huésped mamífero infectado (tripomastigote sanguíneo). Las células son fusiformes. El kinetoplasto se sitúa por detrás del núcleo. El flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo del parásito, liberándose por el extremo anterior, formando una membrana ondulante larga. Dimensiones medias: 20 - 25 x 2 μm.

Amastigote: replicativo. En el ciclo natural se encuentra en el huésped mamífero, en el citoplasma de las células infectadas, y ocasionalmente en el medio extracelular (muchas veces asociado a la lisis prematura de las células parasitadas). Las células son esféricas u ovaladas y no presentan flagelo libre. Dimensiones medias: 2 – 4 μm.

Esferomastigote: forma replicativa. En el ciclo natural está presente en el estómago del insecto vector. Las células son esféricas con flagelo extracelular que bordea el cuerpo del parásito. Dimensiones medias: 2 - 4 μm.

I.1.viii. Diversidad biológica entre cepas, clones y aislados de *T. cruzi*

El *T. cruzi* presenta importantes variaciones a nivel intraespecífico. Los distintos aislamientos del parásito a partir de los cuales se ha trabajado se han realizado a partir de reservorios salvajes, huéspedes domésticos, insectos vectores y el hombre. Se han observado diferencias respecto de una variedad de propiedades biológicas en diferentes aislados. De hecho, ya en su primer trabajo Carlos Chagas describió un dimorfismo en los tripomastigotes sanguíneos (formas delgadas y formas gruesas) (Chagas C. 1909). Diferentes autores han observado posteriormente una relación entre la morfología de los tripomastigotes sanguíneos y sus propiedades biológicas: las formas definidas como "delgadas" penetran y replican en las células del huésped con más eficiencia que las formas gruesas. Otras propiedades biológicas sobre las cuales se han observados diferencias a nivel intraespecífico (además de la morfología de los tripomastigotes sanguíneos) son: la cinética de crecimiento, la virulencia, la capacidad de inducir lesiones, la susceptibilidad o resistencia a drogas quimioterapéuticas y la infectividad a células en cultivo (Brener Z. 1980). En relación con estas características se ha observado la existencia de cepas con comportamientos biológicos opuestos entre sí. En virtud de esto se las ha denominado cepas polares. Tal es el caso de las cepas Y y CL (Brener Z. 1977) o RA y CA1 (Gonzalez Cappa S. M. et al. 1980). Las cepas polares representarían una situación extrema de características opuestas entre las cuales podría ubicarse cualquier otra cepa, clon o aislado de *T. cruzi*.

Dado que algunas de las características mencionadas dependen fuertemente no sólo de la cepa del parásito en estudio sino también de las características del huésped o del entorno ambiental, se realizaron estudios en relación con las características bioquímicas y moleculares de diferentes clones, cepas y aislados del *Trypanosoma cruzi* en un intento por asociar a estas características las diferencias de comportamiento biológico. En relación con la expresión de proteínas se ha estudiado el perfil de isoenzimas, y a nivel molecular se ha estudiado el perfil de polimorfismos de fragmentos de restricción del K-DNA de distintas poblaciones. Esto permitió definir grupos que comparten un mismo perfil de isoenzimas llamados zimodemos (Miles M. A. et al. 1977), así como grupos que comparten un mismo perfil de longitud de algunos fragmentos de restricción del K-DNA llamados esquizodemos (Morel C. et al. 1980). Si bien la definición de estos grupos ha resultado de gran interés en epidemiología, taxonomía y genética de poblaciones de los tripanosomatideos, no se ha encontrado aún una correlación consistente entre estos grupos y las diferencias observadas en las propiedades biológicas de los parásitos tales como invasividad, virulencia, patogenia o tropismo (Macedo A. M. y Pena S. D. J. 1998).

I.1.ix. Ciclo de vida

El *T. cruzi* presenta un ciclo de vida complejo en mamíferos, entre ellos el hombre, y en el insecto vector hematófago de la familia *Triatominae*. Durante este ciclo, el *T. cruzi* pasa por los distintos estadíos evolutivos. Dos de estos transcurren en el insecto vector: tripomastigote metacíclico y epimastigote. Otros dos ocurren en el hospedador mamífero: tripomastigote y amastigote (Brener Z. 1973). El ciclo se inicia cuando el insecto vector se alimenta sobre un mamífero y elimina, en las cercanías de la lesión producida por la picadura, materia fecal conteniendo tripomastigotes metacíclicos, del parásito que es infectivo para el huésped mamífero. Estas formas eliminadas con las heces pueden penetrar a través de pequeñas lesiones o de las mucosas hasta llegar a la circulación sanguínea (De Souza W. 1984). Para poder introducirse en su hospedador el *T. cruzi* puede utilizar diferentes rutas de entrada, siendo una de las más comunes el pasaje de las formas infectivas a través de las barreras de la piel y de las mucosas de la conjuntiva ocular. Esta es una diferencia con otros protozoarios que son inoculados

directamente en la circulación de su huésped mamífero. En el sitio de la internalización a menudo se produce una inflamación local llamada chagoma de inoculación. Cuando esta inflamación se produce en un ojo conforma el signo de Romaña (Storino R. y Jorg M. 1994).

Una vez en el interior de su huésped, los tripomastigotes metacíclios deben replicarse para poder sobrevivir y establecer la infección y por esto invaden células del huésped mediante un proceso complejo que es en parte desconocido. El ciclo intracelular dura alrededor de 4 - 5 días y comienza dentro de las primeras 2 horas de la invasión, cuando los tripomastigotes escapan de la vacuola que los contiene hacia el citosol, probablemente mediante la acción de un factor hemolítico (Ley V. et al. 1990, Andrews N. W. et al. 1990), y se diferencian hacia la forma amastigote, único replicativo en el huésped mamífero. Luego de un período aproximado de 20 horas los amastigotes comienzan a dividirse por fisión binaria multiplicándose exponencialmente cada 12 horas; de este modo, cada parásito que es originariamente internalizado genera alrededor de 500 nuevas unidades infectantes (Dvorak J. 1975). Una vez completado el período replicativo, los parásitos se diferencian hacia la forma tripomastigote, y son liberados nuevamente al torrente sanguíneo por lisis de la célula huésped. Cuando los tripomastigotes llegan a la sangre pueden invadir células de otros tejidos del huésped o ser ingeridos por el insecto vector, en cuyo tracto intestinal se diferencian a epimastigotes, única forma replicativa en el insecto. Aproximadamente al quinto día de la ingesta, los epimastigotes se ubican en la porción terminal del tubo digestivo, donde se diferencian a la forma tripomastigotes metacíclicos. El ciclo se cierra cuando estos tripomastigotes encuentran un nuevo huésped susceptible e invaden células del huésped para poder replicarse (Brener Z. 1973).

Diversos autores han demostrado la existencia además de un subciclo alternativo en el que los amastigotes juegan un rol fundamental manteniendo el ciclo replicativo del parásito en macrófagos (McCabe R. E. et al. 1984, Carvalho T. U. y De Souza W. 1986, Ley V. et al. 1988). Se observó que estas formas parasitarias ya sean como producto de una ruptura prematura de la célula huésped o de una diferenciación extracelular de los tripomastigotes son ingeridas por macrófagos y replican en su citoplasma (Ley V. et al.

1988). Este modo alternativo de propagación puede ser significativo para la supervivencia del parásito en presencia de una respuesta citotóxica del huésped en la cual la lisis de células infectadas podría liberar amastigotes. Recientemente se ha observado *in vitro* que formas tipo epimastigotes se desarrollarían a partir de formas amastigotes durante la replicación intracelular, para dar luego origen a las formas tripomastigotes invasivas. No hay evidencias aún sobre la capacidad infectiva de estas formas epimastigotes. A partir de esta información se propone que la diferenciación del *T. cruzi* en forma cíclica, de tripomastigote a epimastigote y de este último a amastigote se da en forma constante en el vector y en el huésped definitivo, constituyendo los esferomastigotes un estadío de diferenciación análogo al amastigote en el huésped mamífero (Almeida de Faria M. et al. 1999). Sin embargo, la ocurrencia de este fenómeno en la naturaleza aún debe ser demostrada.

I.2. La enfermedad de Chagas

I.2.i. Formas de transmisión y control de la misma

La transmisión natural del *T. cruzi* por el vector se lleva a cabo en el ciclo doméstico, en el que participan como fuente parasitaria el hombre y los mamíferos, y como vector el triatomino, que en nuestro país es principalmente el *Triatoma infestans* (Isola E. L. D. y Gonzalez Cappa S. M. 1994). Además de la transmisión vectorial se han descripto otras vías de transmisión interhumana de importancia epidemiológica (Maekelt G. A. 1983): por transfusión de sangre, por transmisión congénita o connatal (de la madre al niño) y por transplantes de órganos. Desde el punto de vista sanitario, las diferentes vías varían en importancia. La vectorial es la principal vía de transmisión, seguida por la transfusional y la congénita (mucho menos importante) (Pinto Dias J. C. 1979, Wendel S. et al. 1992).

Entre las medidas aplicadas con cierto éxito al control de la transmisión vectorial está el tratamiento de las viviendas con insecticidas (Storino R. y Barragan H. 1994). Para que esta medida demuestre efectividad en el tiempo, este tratamiento debe ser aplicado con continuidad y fundamentalmente, la propia comunidad o sus líderes deben

participar en la vigilancia de la transmisión. Para esto se han desarrollado sistemas de detección de triatomineos así como insecticidas de fácil utilización (Wisnivesky-Colli et al 1987, Wisnivesky-Colli et al 1988). La importante y continua presión de la reinfectación domiciliaria por triatominos, obliga a un permanente cuidado, para el cual tanto las organizaciones sanitarias como los pobladores deben actuar con continuidad y contigüidad geográfica. Un abandono de las acciones podría implicar un retorno de la zona a iguales condiciones epidemiológicas en las que se hallaba antes del tratamiento (Storino R. y Barragan H. 1994).

Una de las medidas de mayor importancia sanitaria en relación con la prevención de la transmisión de la enfermedad de Chagas es el control serológico de la sangre a transfundir, y el seguimiento de los pacientes en tratamiento (Schmunis G. 1992). El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* constituye uno de los elementos más importantes para el control de la transmisión interhumana.

I.2.ii. Patología de la infección

I.2.ii.a. Período agudo

La aparición de los síntomas en la enfermedad de Chagas tiene características particulares que dificultan su diagnóstico y tratamiento. La infección aguda es diagnosticada sólo en el 1-2% de los pacientes (WHO 1991). Durante esta etapa de la infección los tripomastigotes pueden encontrarse en sangre periférica y también en fluido cerebroespinal (Hoff R. et al. 1978).

La sintomatología, cuando se observa, es inespecífica. El signo más específico que puede desarrollarse es una lesión inflamatoria en el sitio de entrada del parásito, conocida como "chagoma de inoculación". El proceso inflamatorio se dispersa regionalmente, y puede evidenciarse una linfoadenopatía focal. Dentro de las células del sistema reticuloendotelial ocurren ciclos asincrónicos de multiplicación del parásito,

destrucción celular y reinfección. Otras manifestaciones observables en la fase aguda pueden incluir fiebre, hepatoesplenomegalia, náuseas, vómitos, diarrea y anorexia (Tanowitz H. et al. 1992).

Un número pequeño de los pacientes con enfermedad de Chagas aguda desarrolla miocarditis severa. Ésta puede ser clínicamente evidente y puede incluir taquicardia y falla cardíaca congestiva (Shikanai-Yasuda M. et al. 1990). La anemia, la trombocitopenia, la leucocitosis con predominancia de linfocitos, la función renal anormal, y los elevados niveles de enzima cardíaca, están entre las anomalías chagásicas más comúnmente reportadas por el laboratorio clínico (Tanowitz H. et al. 1992).

La mayoría de los pacientes con enfermedad aguda se recupera completamente dentro de los 3 o 4 meses y la mayor parte de ellos no es consciente de estar atravesando una enfermedad aguda. Un pequeño porcentaje muere debido a complicaciones asociadas a miocarditis o meningoencefalitis aguda. En estos casos, es fácilmente demostrable la presencia de amastigotes en células cardíacas, esqueléticas y de tejido blando, así como también en células gliales (Tanowitz H. et al. 1992).

I.2.ii.b. Período indeterminado

Pasados 2-3 meses a partir del momento de la infección el individuo ingresa en el período indeterminado sin sintomatología clínica aparente (Milei J. 1994). Aproximadamente un 60-65% de los individuos infectados no presentan síntomas evidentes, permaneciendo en esta fase de la infección durante el resto de su vida. Sólo un 30-40% de estos pacientes presentarán diferentes alteraciones clínicas después de 10 o 20 años de haberse infectado (WHO 1991).

I.2.ii.c. Período crónico

La enfermedad crónica puede manifestarse con cuadros clínicos diferentes, dependiendo de los órganos y/o tejidos afectados. La forma cardíaca de la enfermedad de Chagas, manifestada en aproximadamente el 27% de los infectados (WHO 1987),

consiste en una miocardiopatía congestiva con lesiones irreversibles miocárdicas y del sistema de conducción, pudiendo presentar arritmias u otros trastornos electrocardiográficos, dilatación ventricular, aneurisma de punta, tromboembolismo o falla cardíaca (Oliveira J. et al. 1983). Se estima que los pacientes mueren dentro de los 6 años después de diagnosticárseles cardiopatía chagásica severa (Carlomagno M. et al. 1989). También se ha reportado el infarto de miocardio (De Moraes C. et al. 1989), que se cree se debe a la embolización a partir de un aneurisma apical izquierdo. Asimismo se ha demostrado la existencia de arteriosclerosis y arteriolitis necrotizante (Okumara M. et al. 1962).

Los trastornos del aparato digestivo (megacolon/megaesófago) se originan por destrucción neuronal de los ganglios parasimpáticos intramurales del tubo digestivo (Rezende J. y Luquetti A. 1994). Los individuos con megavísceras pueden presentar diversos grados de lesiones cardíacas.

El compromiso del sistema nervioso periférico cursa en general sin manifestaciones clínicas, ya que la denervación es compensada por un proceso reinervatorio (Sica R. 1994).

I.2.iii. Respuesta inmunológica a la infección

La resistencia a la infección resulta de un equilibrio huésped-parásito en el que el huésped desarrolla mecanismos defensivos y el parásito mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica. Se alcanza una infección crónica cuando se induce una inmunidad de tipo concomitante al parásito, es decir que es capaz de resistir la reinfección pero no de impedir que persista la población de *T. cruzi* en el huésped infectado (Scott M. y Snary D. 1982). Tanto la inmunidad humoral como la celular tienen un papel en la resistencia a la infección por *T. cruzi* en el mamífero (Trischman T. 1983).

En la etapa aguda se induce una activación policlonal temprana de células B y T (con anticuerpos polireactivos de baja afinidad), en respuesta a la estimulación antigénica, que se extiende hasta el estadío crónico, seguida de una breve fase de inmunodepresión generalizada (Teixeira A. et al. 1978), debida principalmente a bajos niveles de expresión de interleuquina 2 (IL-2) (Harel-Bellan A. et al. 1983) y de sus receptores de membrana (Rottenberg M. et al. 1989). Esta desregulación de la respuesta inmunológica (activación policlonal e inmunosupresión específica e inespecífica) constituye uno de los mecanismos que emplea el parásito para evadir la respuesta inmune específica y/o provocar daño tisular. Sin embargo, no todos los pacientes presentan estos fenómenos y no existe relación clara con la patología.

El curso de la primoinfección con *T. cruzi* es, a primera vista, semejante a la de cualquier infección con microorganismos susceptibles de control inmune. En la mayoría de los casos, hay una fase aguda asociada a la parasitemia que, en general, es paulatinamente controlada cuando emerge la respuesta inmunológica. Luego se establece una infección crónica donde es difícil la detección de parásitos en circulación, aunque éstos nunca son eliminados totalmente del organismo. De acuerdo a los estudios que se han realizado en humanos, existiría una respuesta celular y humoral específica contra el parásito (Scott M. y Snary D. 1982).

Se ha demostrado que la presencia de los anticuerpos cumple un rol importante en la modulación de la infección. La transferencia pasiva de sueros inmunes o de linfocitos B a ratones infectados resultó en una mejora en la evolución de la infección por el *T. cruzi*, aunque con diferencias según las cepas de parásitos utilizadas. (revisado por Cardoni R. 1994). Por ejemplo la administración de anticuerpos contra *T. cruzi* a ratones infectados con la cepa CL no resulta en un cambio en el curso de la infección. Sin embargo, los anticuerpos contra la cepa CL han resultado protectivos para las infecciones por otras cepas parasitarias (Krettli A. U. y Brener Z. 1976).

Los anticuerpos contra el *T. cruzi* aparecen en el humano siempre a las pocas semanas de la infección, aún en individuos asintomáticos. Dichos anticuerpos se mantienen durante toda la vida, excepto en el caso de la cura parasitológica del paciente

con drogas tripanocidas durante la primoinfección temprana (Cerisola J. 1977). La producción de la mayoría de los anticuerpos específicos contra el parásito en ratones depende de linfocitos T con el marcador L3T4 (equivalente murino al CD4 humano) (Rottenberg M. et al. 1988-a).

La inmunidad mediada por células en respuesta al antígeno del parásito ha sido detectada en la mayoría de los individuos infectados y el porcentaje de positividad dependería de la sensibilidad y especificidad del método y de las características de los antígenos empleados (Tschudi E. et al. 1972, Lelchuk R. et al. 1974, De Titto E. et al. 1983). El papel relevante que juegan los linfocitos T en el control de la infección fue demostrado por la mayor suceptibilidad a la infección de ratones atímicos (Kierszenbaum F. y Pienkowski M. M. 1979, Trischmann T. M. 1983) o timectomizados (Schmunis G. A. et al. 1971). Tanto las poblaciones CD4+ como CD8+ están involucradas en la resistencia a la infección en la fase aguda y crónica de la misma (Rottenberg M. et al. 1988-b, Tarleton R. 1990). En particular se ha observado una inducción de la proliferación de linfocitos T colaboradores específicos contra el parásito (Burguess D. E. et al. 1981). Esto activaría los mecanismos efectores involucrados en la resistencia tanto por cooperación célula–célula como mediante la producción de citoquinas. Entre estos mecanismos estaría la activación de macrófagos (que se vuelven refractarios a la infección y destruyen al parásito luego de internalizarlo) y la inducción de la respuesta de anticuerpos (Rottenberg M. et al. 1988-b).

Las células CD8+ pueden ser supresoras, citotóxicas o secretoras de citoquinas. Su rol más relevante en relación a la infección está relacionado con la citotoxicidad dirigida a las células parasitadas (Tarleton R. 1994). Estas células también secretan interferón γ (IFN-γ) durante la infección (Nabors G. S. y Tarleton R. 1991, Cardillo F. et al. 1996).

Entre las citoquinas involucradas en la respuesta inmune a la infección por el *T. cruzi*, el IFN-γ es particularmente importante (Plata F. et al. 1987, Reed S. G. 1988, McCabe R. E. et al. 1991, Torrico F. et al. 1991). Es capaz de activar macrófagos *in vivo* e *in vitro* (Plata F. et al. 1984, Plata F. et al. 1987, Reed S. G. 1988) y de inhibir la

multiplicación parasitaria en células no fagocíticas (Osuna A. et al. 1986). Por otro lado, se ha observado que la interleuquina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante β (TGF-β) están implicadas en la suceptibilidad a la infección (Minoprio P. et al. 1991, Silva J. S. et al. 1991, Silva J. S. et al. 1992). Se ha reportado la producción de estas dos citoquinas durante la infección experimental (Silva J. S. et al. 1991, Silva J. S. et al. 1992).

La respuesta inmunológica juega un papel fundamental en la patología de la enfermedad de Chagas. Se ha demostrado que existen fenómenos inflamatorios inducidos por la lisis de células parasitadas y posiblemente mecanismos autoinmunes (Andrade Z. 1991), que provocarían daño tisular.

I.2.iv. Tratamiento

El tratamiento de la infección por *T. cruzi* es de difícil abordaje debido a que el protozoario no es susceptible a la mayoría de las drogas estudiadas, incluyendo aquellas que resultan efectivas contra los tripanosomas africanos y otros protozoarios (Marr J. y Docampo R. 1986). El nifurtimox (Lampit; Bayer 2502) y el benznidazol (Radamil; Roche7-1051), las dos drogas disponibles para el tratamiento del *T. cruzi*, reducen efectivamente la severidad de la enfermedad de Chagas aguda, pero su rol en la terapia de las infecciones crónicas aún está en discusión. Los tratamientos con ambas drogas deben ser llevados a cabo por períodos de tiempo prolongados. En muchos casos, estas terapias pueden causar efectos colaterales severos. Por otra parte, muchos pacientes que siguen un tratamiento completo no logran curarse parasitológicamente (Tanowitz H. et al. 1992).

Se han reportado estudios en los que se describen tratamientos con allopurinol a pacientes con enfermedad de Chagas crónica. El allopurinol, un inhibidor de la hipoxantina oxidasa, es activo contra el *T. cruzi* en cultivos de células de mamíferos y en ratones (Avila H. y Avila A. 1981). Según los autores resultó tan efectivo como el benznidazol y el nifurtimox en la supresión de las parasitemias, al ser medido por

xenodiagnóstico, y en provocar la negativización con los ensayos serológicos convencionales (Gallerano R. et al. 1990). La ventaja del allopurinol sería su relativa falta de efectos colaterales (Tanowitz H. et al. 1992).

Actualmente están llevando a cabo programas de investigación en algunos laboratorios para identificar y desarrollar nuevas drogas para el tratamiento de las infecciones por *T. cruzi*. Por ejemplo, se ha estudiado la actividad anti-*T. cruzi* de varios inhibidores de topoisomerasas bacterianas *in vivo* (Gonzalez Perdomo M. et al. 1990). Estos estudios mostraron una marcada inhibición de la proliferación y de la diferenciación del parásito causadas por varias drogas pertenecientes a esta clase, sugiriendo que el *T. cruzi* tiene una enzima similar a la topoisomerasa II bacteriana, y abriendo por lo tanto una nuevo camino en la búsqueda de un agente efectivo y no tóxico para el tratamiento de la infección por *T. cruzi* (Tanowitz H. et al. 1992).

I.2.v. Diagnóstico

Tanto los estudios de diagnóstico como los epidemiológicos en relación con la infección por *T. cruzi* presentan complicaciones particulares en áreas coendémicas con organismos filogenéticamente relacionados, tales como el *Trypanosoma rangeli* (Guhl F. et al. 1987). Estos parásitos presentan morfología y huéspedes vertebrados y no vertebrados similares, y presentan reacción cruzada para los ensayos serológicos (Greig S. et al. 1990). También pueden observarse en la serología reacciones cruzadas entre antígenos del *T. cruzi* y de microorganismos causantes de otras infecciones, tales como leishmaniasis, sífilis, o fiebre reumatoidea, afectando esto la confiabilidad en la interpretación de los resultados. Por lo tanto, la mejora en el diagnóstico de la infección chagásica es de una importancia decisiva debido a los aspectos epidemiológicos, sociales y clínicos de la enfermedad (Carvalho M. et al. 1993).

I.2.v.a. Métodos directos

I.2.v.a.1. Visualización de parásitos

La presencia de tripanosomas circulantes en sangre periférica es importante y prácticamente constante durante la fase aguda, y es casi nula en las fases indeterminada y crónica de la infección. Debido a esto, el diagnóstico por técnicas convencionales de visualización de parásitos circulantes se convierte en un sistema de elección para los pacientes que están cursando la fase aguda.

Los tripomastigotes frecuentemente pueden ser observados a través del análisis directo con microscopio de sangre fresca anticoagulada o luego de una centrifugación realizando la observación sobre muestras tomadas de la fracción en la que sedimentan los glóbulos blancos, en la interfase entre el coágulo y el suero, donde se concentran los tripomastigotes (Freilij H. et al. 1983). Los parásitos también pueden ser visualizados sobre frotis sanguíneos teñidos con Giemsa. En algunos casos es necesario aumentar la sensibilidad de estas técnicas mediante una amplificación por cultivo *in vivo*. El método más difundido consiste en el cultivo en el insecto vector mediante la alimentación del mismo sobre los pacientes sometidos al ensayo (xenodiagnóstico). En este caso, los triatomíneos susceptibles criados en laboratorio son alimentados sobre el paciente. Luego de 30 o 40 días, los contenidos intestinales de las vinchucas son examinados microscópicamente para la búsqueda de parásitos. Aunque este procedimiento es quizás el más sensible para el diagnóstico de infección aguda por *T. cruzi*, resulta usualmente positivo sólo para el 30-50% de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica (Chiari E. y Brener Z. 1966, revisado por Tanowitz H. et al. 1992). Asimismo, los especímenes sanguíneos o de plasma pueden ser cultivados en medio líquido (hemocultivo), y los parásitos pueden ser observados microscópicamente luego de varias semanas. Cuando se sospecha la infección chagásica aguda en un paciente inmunocomprometido y estos métodos fracasan se podría demostrar la presencia de *T. cruzi*, mediante el examen de especímenes de tejidos adicionales (Tanowitz H. et al. 1992).

I.2.v.a.2. Detección de antígenos e inmunocomplejos

La infección por *T. cruzi*, al igual que otras parasitosis, origina antígenos circulantes libres y en forma de inmunocomplejos en diferentes fluidos (sangre y orina). La presencia de estos antígenos fue originalmente descripta en el suero de ratones infectados (Araujo F. G. 1982). Esto concuerda con datos obtenidos por otros autores en este sentido, tanto en animales de experimentación (Gottlieb M. 1977, Bongertz E. et al. 1981) como en pacientes con enfermedad aguda y crónica (Gottlieb M. 1978, Marcipar A. et al. 1982, Alonso J. M. et al. 1986, Segura E. L. et al. 1986). Entre los antígenos circulantes que se caracterizaron se han descripto polisacáridos inmunogénicos de la superficie del parásito en el plasma de ratones (Gottlieb M. 1977, Martin U. O. et al. 1989) y en pacientes durante la fase aguda de la enfermedad (Andrews N. W. et al. 1987).

Un hecho interesante es la expresión de una glicoproteína de 70-84 kDa denominada Ssp4, el antígeno más importante del amastigote (Andrews N. W. et al. 1988), que se libera al medio circundante a medida que se transforma en tripomastigote. Los tripomastigotes también liberan al medio circundante un antígeno que fue llamado SAPA (shed acute phase antigen), que es reconocido por sueros de pacientes con enfermedad de Chagas aguda (Affranchino J. L. et al. 1989).

La presencia de antígenos de *T. cruzi* en la orina de los vertebrados fue originalmente descripta por Bongertz y colaboradores en animales experimentales durante la etapa aguda de la infección (Bongertz V. et al. 1981). En el hombre también se ha demostrado la excreción de antígenos del parásito analizando la orina de niños con enfermedad de Chagas aguda o congénita (Katzin A. M. et al. 1989). Mediante la captación de antígenos urinarios por micelas de nitrocelulosa y una posterior aglutinación, se amplió el diagnóstico parasitológico a pacientes crónicos (Freilij H. L. et al. 1987).

I.2.v.a.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de secuencias de ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede ser usada como un método altamente sensible para detectar ADN microbiano, y por lo tanto se ha convertido en una herramienta de enorme valor potencial en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, entre ellas las producidas por parásitos (Saiki R. K. et al. 1988). La posibilidad de detectar y amplificar por PCR cantidades de ADN del parásito equivalentes a menos de un genoma en una muestra sanguínea permitiría hacer un diagnóstico altamente específico y sensible de la infección por detección directa de componentes del parásito (secuencias de ADN específicas del mismo). Esto es muy importante, especialmente para pacientes cuya serología podría estar alterada debido a alguna situación de compromiso del sistema inmunológico: coinfectados con el virus HIV, inmunosuprimidos por drogas quimioterápicas, transplantados, neonatos o pacientes desnutridos. La aplicación de la técnica de PCR a estos pacientes sería de gran importancia, ya que podría llegar a sustituir la aplicación de otros métodos directos invasivos y de menor sensibilidad, tales como el xenodiagnóstico.

La aplicación de esta técnica, además, permitiría hacer un diagnóstico en etapas muy incipientes de la infección o de baja parasitemia. Esto sería especialmente importante en el caso de niños recién nacidos de madres chagásicas, ya que implicaría la posibilidad de aplicar tratamientos quimioterápicos en etapas tempranas del proceso infectivo. También sería de importancia para hacer un monitoreo permanente de la parasitemia en pacientes crónicos (Einsestein B. 1990, Avila H. et al. 1993).

La técnica de PCR también permitiría detectar y amplificar pequeñas cantidades de ADN del parásito en el intestino del insecto vector. Esto llevaría a acortar los tiempos de lectura de los xenodiagnósticos en el laboratorio, y a aumentar la sensibilidad de las lecturas, lo cual sería de gran importancia en los trabajos de campo para establecer dinámicas de infección por triatominos en estudios epidemiológicos para el control de la transmisión de la enfermedad de Chagas (Breniere S. et al. 1995, Silber A. M. et al. 1997).

Las parasitemias de *T. cruzi* pueden ser intermitentes en los individuos crónicamente infectados, lo cual podría limitar la sensibilidad de los ensayos. Más aún, los ensayos basados en PCR requieren el procesamiento de las muestras de sangre y de los procedimientos de ensayo que son considerablemente más complejos que aquellos requeridos para realizar pruebas serológicas. Este factor, además del problema potencial de las reacciones falso-positivas como resultado de la contaminación de las muestras con otros productos de amplificación, puede ser un obstáculo importante para la generalización del uso de la PCR para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, particularmente en los países en vías de desarrollo en los cuales la enfermedad de Chagas es endémica (Tanowitz H. et al. 1992).

I.2.v.b. Métodos indirectos

A diferencia del estadío agudo de la infección chagásica, durante las etapas indeterminada y crónica de la infección los parásitos son raramente detectados en sangre (Mendes et al. 1997). Por esta razón, los inmunoensayos basados en la detección de anticuerpos juegan un papel importante como herramientas de diagnóstico en el estadío crónico.

Las técnicas serológicas más utilizadas se basan en la detección de anticuerpos séricos específicos de alto título, que persisten durante toda la vida del individuo infectado. Estos ensayos altamente sensibles comprenden las pruebas de fijación de complemento (Machado-Guerreiro), hemoaglutinación, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia indirecta (IFI) y enzimo-inmunoensayo (ELISA) (Godsel L. et al. 1995-b). Estos y otros ensayos serológicos convencionales son ampliamente utilizados para el diagnóstico clínico individual, para el control en bancos de sangre y para llevar a cabo estudios epidemiológicos, entre otras posibles aplicaciones. La ocurrencia de reacciones falso-positivas ocasionales, sin embargo, ha sido un problema persistente para estos ensayos. Teniendo en cuenta la modalidad evolutiva de la enfermedad, el inmunodiagnóstico se transforma en una herramienta de laboratorio especialmente indicada para las etapas indeterminada y crónica de esta afectación (Freilij H. L. et al. 1994).

Dado que los procedimientos para realizar un diagnóstico parasitológico específico (xenodiagnóstico o cultivo de sangre) son poco sensibles, muy laboriosos y demandan varias semanas para completarse, una variedad de laboratorios de investigación han intentado desarrollar ensayos que tengan la sensibilidad de las pruebas convencionales y que sean altamente específicos, pero sencillos de realizar (Tanowitz H. et al. 1992).

El estudio del perfil de anticuerpos demuestra que el tipo M de inmunoglobulinas es el que aparece precozmente en el curso de la infección, disminuyendo a niveles casi no detectables en el crónico (Ross A. y Novoa-Montero D. 1993). Algunos ensayos que pueden detectar estos anticuerpos son la inmunofluorescencia anti-IgM, la aglutinación directa y los inmunoenzimáticos, fundamentalmente ELISA (Camargo M. y Noshino-Shimizu S. 1974, Kagan I. 1976). La aparición de inmunoglobulinas de tipo G se produce hacia la segunda y la tercera semana de la infección, perdurando en niveles detectables durante todo el curso de la misma por la mayoría de las técnicas (Freilij H. L. y Storino R. 1994).

Cabe aclarar que el resultado de estas técnicas sólo llevará a la confirmación de la infección y no a la de la enfermedad propiamente dicha (Ross A. y Novoa-Montero D. 1993). Para el propósito de un diagnóstico individual, los títulos de anticuerpos circulantes no guardan relación con la edad o sexo, con la gravedad de la enfermedad o con su evolución clínica (Cerisola J. et al. 1979, Kagan I. 1980).

Para el diagnóstico de laboratorio se ha establecido que deben utilizarse por lo menos dos reacciones serológicas. Si ambas son reactivas, convencionalmente se considera al individuo como infectado. En el caso de que haya disparidad entre ambas pruebas se realiza una tercera reacción para definir el estado de infectado o no infectado de dicha persona (Ross A. y Novoa-Montero D. 1993).

II. La invasión celular

La infección del huésped mamífero por *T. cruzi* queda establecida cuando el parásito invade a las células del mismo y establece un primer ciclo de replicación. Para esto, los tripomastigotes metacíclicos depositados por el insecto vector sobre el huésped deben atravesar la barrera de la piel. Esto implica que el contacto inicial entre el parásito y su huésped mamífero se da a través de los componentes de la matriz extracelular constituída fundamentalmente por un denso entramado de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. La composición de esta matriz podría ser un factor determinante del sitio de colonización inicial (Ortega-Barria E. y Pereira M. E. 1992). A partir de este evento, luego de un primer ciclo de replicación, el parásito puede dispersarse por el organismo e invadir otras células en otros tejidos, quedando alojado en ellos. En el huésped mamífero, el *T. cruzi* infecta a un amplio rango de células en distintos tejidos, tales como leucocitos, macrófagos, diferentes tipos de células epiteliales, fibroblastos, y neuronas (Zingales B. y Colli W. 1985).

II.1. La invasión de células fagocíticas y no fagocíticas por amastigotes y tripomastigotes

II.1.i. La invasión de las células del huésped por formas amastigotes

Durante mucho tiempo se consideró que los amastigotes eran formas replicativas no invasivas del *T. cruzi*, y que sólo eran viables en el citoplasma celular. Sin embargo, posteriormente se ha observado que los tripomastigotes pueden ser inducidos a transformarse en amastigotes en el medio extracelular (Andrews N. W. et al. 1987), y que estas formas amastigotes pueden ser invasivas tanto en células fagocíticas como no fagocíticas, aunque con diferente eficiencia (McCabe R. E. et al. 1984, Carvalho T. U. y De Souza W. 1986, Ley V. et al. 1988, Mortara R. A. 1991).

II.1.i.a. Invasión de células fagocíticas

Los amastigotes pueden ser internalizados pasivamente en macrófagos no activados y evadirse de la vacuola fagolisosomal para replicar de manera normal en el citoplasma celular, originando una progenie que es liberada de la célula por lisis (Ley V. et al. 1988). Se ha reportado recientemente que la adhesión de los amastigotes de *T. cruzi* a macrófagos sería facilitada por una lectina en la superficie de estos llamada receptor de manosa de macrófagos. Esta molécula sería una de las responsables de iniciar el proceso de internalización de los amastigotes a la vacuola fagocítica (Kahn S. et al. 1995). El mecanismo de internalización sería de tipo fagocítico.

II.1.i.b. Invasión de células no fagocíticas

Los amastigotes también han resultado infectivos en fagocitos no profesionales. Los amastigotes se posicionan al azar en la región dorsal de las células en cultivo, presumiblemente por simple sedimentación, durante las fases de reconocimiento y adhesión. La internalización de los amastigotes es significativamente disminuída por citocalacina D, lo que indicaría una participación del citoesqueleto celular en este proceso. Se observan agrupamientos de filamentos de actina en las inmediaciones del sitio de adhesión. Dado que este proceso resulta inhibido por staurospoina y genisteína, sería dependiente de la actividad proteína quinasa (Putney J. W. Jr. 1993). En este caso el mecanismo de internalización de los amastigotes también tiene características de fagocitosis, aún tratándose de células no fagocíticas (Burleigh B. y Andrews N. W. 1995-a).

II.1.ii. La invasión de las células del huésped por formas tripomastigotes

II.1.ii.a. Invasión de células fagocíticas

El evento de invasión intracelular fue estudiado inicialmente en células fagocíticas. Se ha demostrado que en estas células el estadío tripomastigote es eficientemente internalizado e incorporado a las vesículas fagolisosomales (Milder R. y

Kloetzer J. 1980, Meirelles M. N. L. y De Souza W. 1983, Carvalho T. U. y De Souza W. 1986) de las cuales son capaces de evadirse aproximadamente dos horas después de la internalización hacia el citoplasma para replicarse (Nogueira N. y Cohn Z. 1976, Milder R. y Kloetzer J. 1980). En la infección de las células fagocíticas pueden darse básicamente dos mecanismos: la internalización activa por parte de los tripomastigotes, y la fagocitosis pasiva (Nogueira N. y Cohn Z. 1976, Kipnis T. L. et al. 1979, Meirelles M. N. L. et al. 1982).

El mecanismo involucrado en la invasión de células fagocíticas macrofágicas ha estado sujeto a controversia. Mientras algunos investigadores reportaron que la entrada del parásito era bloqueada en presencia de inhibidores de la polimerización de actina tales como la citocalasina B (Meirelles M. N. L. et al. 1982, Meirelles M. N. L. et al. 1992), otros afirmaban lo contrario y proponían un mecanismo de entrada que no resultaba interferido por esta droga (citocalasina-independiente) (Kipnis T. L. et al. 1979). El descubrimiento posterior del mecanismo de entrada para tripomastigotes en células no fagocíticas permitió concluir que pueden ocurrir simultáneamente ambos mecanismos: una entrada que sería activa por parte del parásito, y una fagocitosis que sería pasiva por parte del mismo (Burleigh B. y Andrews N. A. 1995-a).

II.1.ii.b. Invasión de células no fagocíticas

El proceso de invasión a células no fagocíticas puede ser definido como inusual y difiere ampliamente del efectuado por otros organismos patógenos intracelulares que han sido estudiados hasta el momento (Falcow F. et al. 1992). El parásito es internalizado a través de regiones específicas de la membrana externa por una vesícula de tipo fagolisosomal (Tardieux I. et al. 1992). Aunque en este tipo de células los mecanismos fagocíticos ocurren, el mecanismo por el cual el parásito ingresa a las células es diferente. Se ha observado que la internalización no sólo no es inhibida, sino que puede ocurrir con mayor eficiencia en presencia de citocalasina D, un inhibidor de la polimerización de actina y por lo tanto de la fagocitosis (Schenkman S. et al. 1991-a). Por otra parte, no se

han observado alteraciones de la superficie celular típicas del proceso de "zippering" que ocurre durante la fagocitosis, tales como la formación de pseudopodios (Schenkman S. et al. 1988-a).

II.2. El proceso de interacción con las células del huésped por las formas tripomastigotes

II.2.i. Inducción de mecanismos de transducción de señales previo a la invasión

En los últimos años se ha demostrado un complejo sistema de señalización entre el *T. cruzi* y las células del huésped previo a la invasión. Posiblemente estos mecanismos constituyan uno de los aspectos clave de la regulación del proceso de invasión celular (Burleigh B. y Andrews N. W. 1998).

II.2.i.a. La movilización de Ca^{2+} en las células del huésped

El descubrimiento del mecanismo de invasión no fagocítico, en el cual ocurre un reclutamiento de los lisosomas de las células del huésped al sitio de internalización sugirió la existencia de una comunicación entre el parásito y la célula huésped. Se postuló la existencia de mecanismos de transducción de señales que permitirían el reclutamiento lisosomal necesario para la invasión (Tardieux I. et al. 1992). En este sentido se observó que en presencia del tripomastigote infectivo se producía un rápido y repetitivo aumento de la concentración de Ca^{2+} en células NRK (Tardieux I. et al. 1994). Por otra parte, la depleción de la concentración intracelular de Ca^{2+} resultó en una significativa inhibición de la entrada del parásito, sustentado la idea del rol del Ca^{2+} en el proceso de invasión (Mortara R. A. 1991, Araya J. E. et al. 1994, Tardieux I. et al. 1994, Wilkowsky S. et al. 1996).

A los efectos de dilucidar el mecanismo de señalización involucrado en el aumento de Ca^{2+} intracelular se realizaron experimentos con tripomastigotes sanguíneos en los que se demostró que la actividad de señalización responsable del aumento del Ca^{2+} intracelular se encontraba en la fracción soluble del parásito (Burleigh B. y Andrews N.

1995-b) y que era inhibida por tratamiento con tripsina (Andrews N. W. et al. 1988, Tardieux I. et al. 1994). Esta actividad fue relacionada con una peptidasa alcalina de 120 kDa expresada en todos los estadíos parasitarios que ya había sido descripta (Ashall F. 1990, Ashall F. et al. 1990, Santana J. M. et al. 1992). Esta peptidasa fue bien caracterizada: se trata de una proteína citoplasmática homóloga a miembros de la familia de las prolil oligopeptidasas con actividad serin hidrolasa (Barr S. C. et al. 1996). Fue denominada oligopeptidasa B. La presencia de esta peptidasa sería un requisito para el procesamiento de un precursor presente solamente en el estadío tripomastigote infectivo (Burleigh B. et al. 1997, Caler E. V. et al. 1998), generando un factor parasitario (proteolytically generated trypomastigote factor, PGTF) con las mismas características de un factor de crecimiento hormonal de mamífero (Burleigh B. y Andrews N. W. 1995-b), capaz de provocar una elevación transitoria en la concentración de Ca^{2+} en células del huésped (Burleigh B. y Andrews N. W. 1995-b, Barr S. C. et al. 1996, Burleigh B. et al. 1997). Se demostró que este factor de señalización PGTF actúa sobre la fosfolipasa C de la célula huésped generando inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) por hidrólisis de fosfoinosítidos. El IP3 induce la apertura de los canales de Ca^{2+} intracelulares y esta elevación del Ca^{2+} produce un reordenamiento de los microfilamentos y una redistribución del esqueleto de F-actina faciliando la invasión del parásito a la célula del huésped (Rodriguez A. et al. 1995). El aumento transitorio de los niveles de Ca^{2+} intracelular llevaría al reclutamiento de los lisosomas hacia la membrana plasmática en donde se fusionarían con esta (Rodriguez A. et al. 1997). La exositosis de los lisosomas en un proceso Ca^{2+} dependiente estaría además modulada por las concentraciones de cAMP intracelular: un aumento en los niveles de cAMP resulta en un aumento de la exocitosis de los lisosomas en forma Ca^{2+} dependiente con el consiguiente aumento de la eficiencia de invasión (Rodriguez A. et al. 1999). Ha sido confirmado el rol determinante de la oligopeptidasa B de *T. cruzi* y del factor generado por esta en la invasión celular, mediante el gatillado de un proceso de transducción de señales, en el cual el Ca^{2+} es un actor fundamental, (Burleigh B. et al. 1997, Caler E. V. et al. 1998).

Otro grupo de moléculas cuya expresión ha sido recientemente vinculada con la señalización mediada por Ca^{2+} es el de la gp90, gp82 y gp35/50 de tripomastigotes metacíclicos. Estas moléculas fueron originalmente vinculadas con el proceso de

reconocimiento del parásito a las células del huésped (ver más abajo). En ensayos de adhesión de estas moléculas a células y evaluación de su actividad inductora de la movilización intracelular de Ca^{2+} se observó una correlación negativa entre adhesión y capacidad inductora de la señalización: si bien gp90 y gp35/50 se adhirieron más eficientemente a la superficie celular, gp82 disparó una respuesta de Ca^{2+} significativamente superior (Ruiz R. et al. 1998).

II.2.i.b. La movilización de Ca^{2+} en el parásito

En otros trabajos se observó que además de la elevación de los niveles de Ca^{2+} en células del huésped concomitantes con la invasión, ocurre un incremento de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático en los tripomastigotes (Moreno S. et al. 1994). El tratamiento de tripomastigotes con quelantes de Ca^{2+} intracelular resultó en una reducción de la asociación con mioblastos, sugiriendo para el Ca^{2+} un rol en el proceso de exocitosis de moléculas del parásito necesarias para la invasión o bien para la movilidad del parásito (Yacubu M. et al. 1994). Recientemente se ha demostrado que tripomastigotes de *T. cruzi* enfrentados a extractos de células HeLa muestran un aumento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular. En este proceso, también estaría involucrada la glicoproteína de superficie gp82 anteriormente mencionada (Ruiz R. et al. 1998).

II.2.i.c. La fosforilación de proteínas en las células del huésped en la invasión

Poco se sabe del rol que cumpliría la fosforilación de proteínas en el proceso de invasión a las células del huésped. Sin embargo, recientemente se ha reportado la desfosforilación de residuos tirosina en proteínas de 234, 205 y 50 kDa de peso molecular en células musculares L6E9 asociado al proceso de invasión por el *T. cruzi* (Zhong L. et al. 1998). Por otra parte, la invasión fue significativamente reducida por la presencia de fosfotirosina o inhibidores de la tirosina fosfatasa. En cambio no se vio afectada por fosfoserina o fosfotreonina (Zhong L. et al. 1998).

II.2.i.d. La fosforilación de proteínas del parásito en la invasión

En trabajos recientes, se ha descripto que el tratamiento de tripomastigotes metacíclicos con genisteina, un inhibidor de la actividad tirosina kinasa, disminuyó significativamente la capacidad invasiva de los parásitos a células HeLa. Por otra parte se *demostró* que extractos de estas células contienen un factor soluble capaz de aumentar los niveles de fosforilación de una proteína de tripomastigotes de 175 kDa (p175) (Favoretto S. Jr. et al. 1998).

II.2.i.e. Los receptores del TGF-β como vía para la transducción de señales previo a la invasión

Ming y colaboradores demostraron que los receptores celulares para TGF-β serían esenciales durante el proceso de invasión (Ming M. et al. 1995). Células deficientes en la expresión de estos receptores resultaron ser refractarias a la infección por el *T. cruzi*, fundamentalmente debido a la imposibilidad del parásito de inducir los mecanismos de transducción de señales. La transfección de células correspondientes a una línea de estas características con genes para el receptor de TGF-β y su expresión resultaron en un aumento de la capacidad de transducción de señales en las células y en un aumento de la capacidad invasiva (Ming M. et al. 1995).

II.2.ii. La participación del citoesqueleto y los lisosomas

Como se mencionó anteriormente, se ha observado que a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los patógenos intracelulares, la entrada del *T. cruzi* a células en algunos casos no resulta bloqueada sino, por el contrario, es facilitada por inhibidores de la polimerización de actina tales como la citocalasina D. De hecho se ha reportado un aumento de hasta diez veces de la capacidad invasiva de tripomastigotes de *T. cruzi* a células MDCK polarizadas en presencia de esta droga (Schenkman S. et al. 1991-a, Tardieux I. et al. 1992). Además, por microscopía electrónica de barrido se vió que los tripomastigotes pueden entrar sin la formación de pseudópodos u otra alteración de la membrana plasmática de la célula huésped típicas de los mecanismos fagocíticos en los

que participan los componentes del citoesqueleto (Schenkman S. et al. 1988-a). En estos casos, tampoco se observó acumulación de F-actina en el entorno de los parásitos recientemente internalizados. Esto indicaría que la entrada de los tripomastigotes no sólo puede ser independiente de la polimerización de actina, sino que incluso en algunos casos sería facilitada de alguna manera por la remoción del citoesqueleto de actina de la región cortical de la célula. De hecho se ha establecido que los tripomastigotes muestran una preferencia por los lamellipodios cercanos a los márgenes de las células (Schenkman S. et al. 1988-a) los cuales son muy dinámicos en relación con el armado y desarmado del esqueleto cortical de actina (Heath J. P. y Holifield B. F. 1991). Estas observaciones serían compatibles con el hecho de que el citoesqueleto de actina actuaría como barrera durante el proceso de migración de los lisosomas Ca^{2+} dependiente (Rodriguez A. et al. 1999).

A diferencia de las observaciones anteriormente mencionadas, en algunos casos, la participación del citoesqueleto parece ser esencial. En ensayos usando una línea de células de músculo cardiaco y formas metacíclicas del parásito en presencia de citocalacina B o D se observó una inhibición del 65% y 75% respectivamente en la capacidad invasiva. (Barbosa H. S. y Meirelles M. N. L. 1995). Carvalho y colaboradores observaron en un mismo cultivo que, durante la invasión por tripomastigotes, algunas células, pero no todas, acumulan filamentos de actina en el sitio de la invasión (Carvalho T. M. et al. 1999).

Estos datos confirmarían la existencia de diferentes mecanismos de invasión respecto de los requerimientos de la participación del citoesqueleto (Procopio D. O. et al. 1998).

Si bien el proceso de invasión se puede dar aún en condiciones de desacople de las funciones del citoesqueleto, se requiere del reclutamiento de los lisosomas en el sitio de contacto del parásito con la célula para que la misma ocurra (Heuser J. E. 1989, Montgomery R. et al. 1991, Tardieux I. et al. 1992). Algunas evidencias de una asociación inusual entre lisosomas del huésped con tripomastigotes fueron planteadas por investigadores que demostraron la existencia de un agrupamiento de lisosomas en las

proximidades de las regiones de la membrana plasmática del huésped en contacto con el parásito (Tardieux I. et al. 1992) y una fusión lisosomal para formar la membrana vacuolar que rodea al parásito durante un corto período de tiempo luego de la invasión celular (Meirelles M. N. L. 1986, Ley V. et al. 1990). En la mayoría de los tipos celulares en los que se ha estudiado el proceso de invasión por el *T. cruzi*, la fusión de los lisosomas a la membrana de las células para formar la vacuola fagocítica está regulada mediante la concentración de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, durante la invasión de macrófagos por tripomastigotes este proceso resultó Ca^{2+} independiente (Zimmerli S. et al. 1996).

Manipulaciones experimentales de la distribución celular y de la capacidad de fusión de lisosomas contribuyeron a demostrar la necesidad del reclutamiento de los lisosomas hacia el sitio de la invasión y su fusión con la membrana de la vacuola fagocítica: la acidificación del citoplasma celular, tratamiento que induce la migración de lisosomas a la periferia (Heuser J. E. 1989) facilitó la invasión del *T. cruzi* en células de riñón de ratas, mientras que la alcalinización para lograr el agrupamiento perinuclear de lisosomas tuvo el efecto opuesto (Tardieux I. et al. 1992). A través de la interferencia de la capacidad de fusión de los lisosomas mediante la sobrecarga de las células con sacarosa (descripto por Montgomery R. et al. 1991) se redujo la invasión a células de riñón de rata en un 50% (Tardieux I. et al. 1992). Resultados más recientes señalan que la migración lisosomal hacia la membrana plasmática es errática cuando estos están lejos del sitio de adhesión del parásito a la membrana celular. En cambio la migración está orientada hacia el sitio de adhesión del parásito cuando los lisosomas están a una distancia de 12 mm o menos del sitio de adhesión (Rodriguez A. et al. 1996). Posteriormente, Rodriguez y colaboradores han demostrado que la movilización de los lisosomas y su fusión a membranas plasmáticas también es un proceso regulado a través de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Rodriguez A. et al. 1997).

Estos datos en su conjunto llevaron a confirmar la existencia de un mecanismo de internalización a las células distinto de la fagocitosis, dependiente del intercambio de señales entre el parásito y la célula.

II.2.iii. El reconocimiento y la adhesión a las células

Uno de los eventos tempranos en la invasión consiste en el reconocimiento de la célula por parte del parásito y su adhesión a la misma. Ambos fenómenos puden estudiarse separadamente, ya que pueden ser desacoplados mediante la fijación de las células con aldehído o mediante una incubación inicial a baja temperatura (4°C), de forma tal de arrestar los procesos metabólicos normales. A través de estas estrategias, Schenkmam y colaboradores demostraron que el *T. cruzi* no se adhiere fuertemente a células a 4°C, probablemente debido a que las moléculas de adhesión presentes en la superficie parasitaria no son suficientes para establecer uniones fuertes con las moléculas de la superficie celular. Por otra parte, los mismos autores también han demostrado que en presencia de los inhibidores de la fosforilación oxidativa los parásitos no se adhirieron a las células (Schenkman S. et al. 1991-a). No está claro todavía porqué es necesaria la energía para una adhesión eficiente pero se propone que algunas moléculas involucradas son secretadas por el parásito durante el contacto con la célula o que el *T. cruzi* realiza un rearreglo dependiente de la energía de sus moléculas de superficie para generar ligandos activos que participen en el proceso de adhesión (Burleigh B. y Andrews N. W. 1995).

En general se asume que en los parásitos con un ciclo de vida intracelular el reconocimiento implica un ligamiento mediado por receptores y ligantes específicos tanto en la superficie del parásito como en la célula (revisado por Zingales B. y Colli W. 1985). En esta dirección se han realizado diversos trabajos orientados a la identificación de estos componentes tanto del parásito como de la célula huésped. Se observó que la remoción de las moléculas de superficie del parásito condujo a una drástica reducción de su capacidad invasiva (Andrews N. W. et al. 1984) y que anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas de superficie del parásito inhibieron el proceso de invasión (Alves M. J. M. et al. 1986, Araguth M. F. et al. 1988, Yoshida N. et al. 1989, Ramirez M. I. et al. 1993). Se observó también, que si se trataban los tripomastigotes con tripsina se eliminaban muchos de los componenetes de la superficie con pesos moleculares superiores a 80 kDa, provocando inhibición en la penetración del parásito a células cultivadas *in vitro*. Cuando estos componentes retornaban a sus niveles normales, los

parásitos recuperaban su capacidad de penetración (Andrews N. W. et al. 1984, Piras M. M. et al. 1985). Concomitantemente se observó que cuando células fibroblásticas eran tratadas con tripsina, la capacidad invasiva de los parásitos se veía disminuída (Alcantara A. y Brener Z. 1978, Piras R. et al. 1980, Henriquez D. et al. 1981, Nogueira N. y Cohn Z. 1986).

II.2.iii.a. Las moléculas parasitarias involucradas en el reconocimiento y/o la adhesión previo a la invasión

En los trabajos descriptos anteriormente quedó establecida la participación de las glicoproteínas de la superficie del parásito. Posteriormente surgieron las primeras evidencias experimentales en relación con la participación de los residuos glucídicos de estas glicoproteínas en el proceso de reconocimiento e interacción entre el *T. cruzi* y células de mamíferos. Se realizaron experiencias en las que se pudo observar una modificación en la infección seguida al tratamiento de los parásitos o de células del huésped con agentes oxidantes, glicosidasas, monosacáridos, lectinas de plantas e inhibidores de la glicosilación de proteínas (revisado por Zingales B. y Colli W. 1985). Un grupo importante de proteínas de superficie implicadas en la invasión son las de la superfamilia de la trans-sialidasa. Si bien es un grupo complejo de glicoproteínas de membranas que comparten características bioquímicas y moleculares semejantes, el rol de aquellas que tienen actividad enzimática en la invasión será discutido más adelante, describiendose aquí sólo aquellas que participan en el reconocimiento y/o la adhesión.

II.2.iii.a.1. Glicoproteínas de superficie de los tripomastigotes metacíclicos

Entre los componentes de membrana del estadío tripomastigote metacíclico que han sido descriptos uno de los primeros en ser caracterizados consistió en una glicoproteína de 90 kDa (gp90) (Yoshida N. et al. 1990) anclada a la membrana mediante una unión de tipo glicosilfofatidilinositol (GPI) (Schenkman S. et al. 1988). Anticuerpos monoclonales contra esta glicoproteína neutralizaron la infección en ratones

inoculados con las formas infectivas (Araguth M. F. et al. 1988) e inhibieron parcialmente la invasión en células de cultivo de mamífero (Schenkman S. et al. 1988-b), sugiriendo para esta proteína un rol en el proceso de invasión.

Otro componente de membrana que también estaría involucrado en este proceso es una glicoproteína de superficie de 82 kDa (gp82). Esta molécula está bien caracterizada, se sabe que está N-glicosilada, se expresa únicamente en el estadío tripomastigote metacíclico y según fue descripto, promueve la entrada del parásito a las células a través de un proceso de interacción de tipo ligando receptor (Ramirez M. I. et al. 1993). En ensayos de inhibición de la penetración de parásitos a células Vero la misma fue inhibida significativamente por anticuerpos monoclonales o fragmentos Fab específicos para la gp82. Además, la proteína purificada inhibió la invasión de tripomastigotes metacíclicos a células Vero demostrando el bloqueo de receptores celulares para el parásito (Ramirez M. I. et al. 1993). Por último, la gp82 recombinante expresada en la superficie de una cepa de bacterias *E. coli* incapaz de llevar a cabo el proceso de invasión celular, le confirió a éstas propiedades de invasividad (Pereira C. M. et al. 1999). Otros estudios demostraron que esta proteína además de presentar otras propiedades bioquímicas relacionadas con el proceso de transducción de señales previo a la invasión (ver más arriba), sería un antígeno inmunoprotector, ya que según se publicó es capáz de despertar una respuesta humoral y celular e inducir una respuesta inmune efectiva durante la infección aguda en ratones infectados (Santori F. et al. 1996). Estas gp90 y gp82 son ahora reconocidas como moléculas relacionas y pertenecientes a la superfamilia de las gp85/trans-sialidasa (Franco F. R. S. et al. 1993, Araya J. E. et al. 1994).

Otro grupo de moléculas de superficie de las formas metacíclicas está constituído por glicoproteínas pertenecientes a la familia de las proteínas tipo mucinas. Estas están caracterizadas como un grupo heterogéneo de glicoproteínas de entre 35 y 50 kDa (gp35/50) (Yoshida N. et al. 1989, Ruiz R. et al. 1993), altamente O-glicosiladas (Schenkman S. et al. 1993) ricas en treonina (Reyes M. B. et al. 1994), ancladas a la membrana mediante una unión a GPI (Schenkman S. et al. 1993), y que han sido identificadas como el principal aceptor de residuos exógenos de ácido siálico en

tripomastigotes metacíclicos (Colli W. 1993, Cross G. A. M. y Takle G. B. 1993, Schenkman S. et al. 1993, Schenkman S. et al. 1994). A estas moléculas tipo mucinas también se les atribuyó un rol en el proceso de invasión ya que anticuerpos monoclonales específicos inhibieron la invasión *in vitro* (Ruiz R. et al. 1993) y resultaron neutralizantes de la infección en ratones (Yoshida N. et al. 1989).

Una característica que contribuyó a asignarles a las glicoproteínas gp82 y gp35/50 un rol de importancia es su participación en el mecanismo de aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular en células en cultivo: ambas glicoproteínas inducen una elevación del Ca^{2+} citoplasmático al unirse a células Hela (Dorta M. L. et al. 1995). Como se mencionó anteriormente, este sería un proceso esencial en la invasión.

II.2.iii.a.2. Glicoproteínas de superficie de tripomastigotes de mamíferos

El estadío tripomastigote sanguíneo en mamíferos es similar a las formas metacíclicas en cuanto a su morfología y habilidad para invadir un amplio rango de células de mamífero *in vitro* según fue descripto (Lima M. F. y Kierszemabum F. 1982, Andrews N. W. et al. 1984, Zingales B. et al. 1985). En las formas tripomastigotes sanguíneos se agrega un componente de complejidad al problema: los tripomastigotes liberados por lisis celular remodelan los antígenos de superficie, incrementando significativamente su capacidad infectiva con el tiempo al ser incubados con medio de cultivo (Piras M. M. et al. 1982, Zingales B. y Colli W. 1985). El mismo fenómeno fue observado al incubarse los parásitos en medios conteniendo macromoléculas como la fetuína, ricas en ácido siálico (Piras M. M. et al. 1987, Schenkman S. et al 1991-b). Al estudiar la naturaleza de los componentes de la membrana involucrados en la invasión celular, cabe considerar que estos componentes van sufriendo modificaciones a lo largo del tiempo. Este proceso está relacionado fundamentalmente con la incorporación de ácido siálico a partir de glicoproteínas exógenas, presentes en el medio de cultivo, mediante la actividad trans-sialidasa según se discutirá más adelante.

Uno de los primeros grupos de moléculas en ser relacionadas con el proceso de invasión fue definida por el reconocimiento de un epitope con un anticuerpo monoclonal que resultó inhibitorio de la penetración del parásito a células de cultivo de mamífero en un 50-70% (Alves M. J. M. et al. 1986). Posteriormente las glicoproteínas de membrana conteniendo este epitope fueron caracterizadas como un grupo de glicoproteínas heterogéneas de superficie (Tc-85) (Abuin G. et al. 1989) Estas glicoproteínas están incluídas en la familia de glicoproteínas de 85 kDa dentro de la superfamilia de las trans-sialidasas (Peterson D. S. et al. 1986, Kahn S. et al. 1990, Giordano R. et al. 1994). Las proteínas de este grupo fueron aisladas con sueros contra tripomastigotes depletados de anticuerpos anti-epimastigotes (Zingales B. et al. 1982). Posteriormente fueron purificadas por afinidad por la lectina WGA (Katzin A. M. y Colli W 1983). Al ser purificadas a partir de parásitos crecidos en presencia de tunicamicina, mostraban un peso molecular de 75 kDa. Estas glicoproteínas están unidas a la membrana por un ancla de tipo GPI (Couto A. S. et al. 1993). Componentes acídicos de estas glicoproteínas presentan actividad de unión a las proteínas de la matriz extracelular tales como laminina lo cual sugiere un posible rol en el reconocimiento y/o adhesión a las células del huésped (Giordano R. et al. 1994).

Otras moléculas de superficie involucradas en la interiorización de los tripomastigotes a las células fueron definidas mediante el uso de tres anticuerpos monoclonales dirigidos contra epitopes estadío específicos: Ssp-1, Ssp-2 y Ssp-3 (Andrews N. W. et al. 1987). Los tripomastigotes liberados de sus células huésped expresaban el epitope Ssp-1 -contenido en glicoproteínas de aproximadamente 100, 120 y 150 kDa - y el epitope Ssp-2 correpondiente a una proteína de superficie de 70 kDa; pero durante la incubación extracelular de los parásitos estos marcadores fueron desapareciendo gradualmente mientras que Ssp-3 comenzó a hacerse detectable hacia las 48 hs de incubación (Andrews W. et al. 1987). La naturaleza de las moléculas que contienen el epitope Ssp-3 fue dilucidada tiempo después, cuando se estableció que dicho epitope es expuesto en la superficie en presencia de ácido siálico y que la molécula que lo contiene actuaría como aceptor de residuos de ácido siálico exógenos (Schenkman S. et al. 1991-b). En este sentido se observó que anticuerpos monoclonales que reconocían el epitope Ssp-3 conteniendo ácido siálico inhibían la adhesión de

tripomastigotes a células huésped (Schenkman S. et al. 1991-b, Schenkman S. et al. 1991-c). Finalmente, las moléculas conteniendo el epitope Ssp-3 de tripomastigotes sanguíneos fueron relacionadas con las glicoproteínas tipo mucinas de 35/50 kDa descriptas anteriormente y exclusivas de las formas metacíclicas (Acosta A. et al. 1994).

La penetrina es una proteína de 60 kDa que también ha sido involucrada en el proceso de internalización parasitaria. Es tripomastigote específica y presenta como característica la capacidad de unirse a heparina, heparán sulfato y colágeno (Ortega-Barria E. y Pereira M. E. 1992). Se ha observado que es capaz de unirse a células Vero en forma saturable y esta unión puede ser inhibida por heparina, heparán sulfato y colágeno. Por otra parte, la heparina y el heparán sulfato son moléculas que también resultan inhibitorias de la adhesión del *T. cruzi* a las células (Ortega-Barria E. y Pereira M. E. 1992). Ortega-Barria y Pereira demostraron que la expresión de esta molécula en una cepa de *Escherichia coli* que normalmente no invade las células de mamíferos, le confiere a estas bacterias la capacidad de unirse y penetrar en células Vero (Ortega-Barria E. y Pereira M. E. 1991).

Otra proteína involucrada en la internalización de los tripomastigotes a las células del huésped es la proteína de unión a fibronectina (Ortega-Barria E. y Pereira M. E. 1992). La intervención de la fibronectina del huésped mamífero en el proceso de invasión de las células de mamíferos por tripomastigotes ha sido puesta de manifiesto claramente. Se ha observado que la fibronectina se une a parásitos en forma saturable, y que anticuerpos antifibronectina inhiben la penetración del *T. cruzi* a células en cultivo mientras que la fibronectina humana solube la aumenta (Ouassi A. et al. 1984). Además, peptidos que imitan la conformación del dominio de unión de la fibronectina inhiben competitivamente la invasión celular (Ouassi A. et al. 1986-a). Estos datos sugirieron la posible participación de un receptor parasitario de unión a fibronectina en la invasión de las células del huésped. Esta proteína fue identificada mediante su purificación por cromatografía de afinidad al ligando (Ouassi A. et al. 1986-b). Se trata de una proteína de 85 kDa que también es capaz de unirse a colágeno (Velge P. et al. 1988) y ha sido identificada como uno de los antígenos mayores de excreción-secreción circulantes en la sangre de pacientes chagásicos (Ouassi A. et al. 1990).

II.2.iii.a.3. Glicoproteínas de superficie de amastigotes

En el proceso de transformación de los tripomastigotes al estadío amastigote, cambios significativos en la morfología del parásito son acompañados por la adquisición de nuevas moléculas de superficie de un peso molecular que está en el rango de lo 70-92 kDa. (Andrews N. W. et al. 1987, Pan A. A. y McMahon-Pratt D. 1989, Iida K. y Ley V. 1991, Schenkman S. et al. 1993). Entre los componentes de superficie de estas formas parasitarias se destacan una familia de proteínas denominadas amastinas, ligantes de Concanavalina A, contenidas en un glicoconjugado de alto peso molecular (Teixeira S. M. R. et al. 1994) y cuya función es aún desconocida. Un hecho interesante es la expresión de una glicoproteína de 70-84 kDa denominada Ssp-4, que es el antígeno más importante del amastigote (Andrews N. W. et al. 1989) y que se libera al medio circundante a medida que se transforma en tripomastigote. La Ssp-4 está asociada a la superficie del parásito por un anclaje de tipo GPI y se libera al medio por la acción de la fosfolipasa C (Andrews N. W. et al. 1988). El antígeno Ssp-4 es reconocido por sueros de pacientes con enfermedad de Chagas (Andrews N. W. et al. 1989, Pan A. A. y McMahon-Pratt D. 1989) constituyendo una herramienta para el diagnóstico diferencial de la enfermedad.

II.2.iii.b. Las moléculas de las células del huésped involucradas en el reconocimiento y/o la adhesión

El proceso de reconocimiento y la adhesión de los parásitos a las células requiere además de la presencia de proteínas parasitarias, de proteínas en la superficie de las células del huésped que actúen como receptores. El hecho de que el *T. cruzi* es capaz de invadir virtualmente toda célula nucleada sugiere la existencia de múltiples receptores específicos que pueden ser reconocidos por glicoproteínas específicas de la superficie parasitaria, o el reconocimiento de receptores ubicuos (Burleigh B. y Andrews N. W. 1995-a). La hipótesis de la invasión mediada por el reconocimiento de receptores celulares específicos está sustentada por el hecho de que los parásitos se unen a las células preferentemente por los márgenes cuando estos están expuestos (Schenkman S. et al. 1988-a). Además el tratamiento de las células con proteasas (Alcantara A. y Brener

Z. 1978, Henriquez D. et al. 1981) o glicosidasas resultó en una reducción significativa de la adhesión de los parásitos y su capacidad invasiva (Villalta F. y Kierszenbaum F. 1983, Villalta F. & Kierszenbaum F. 1984, De Titto E. H. y Araujo F. G. 1987). Hasta el momento no se han identificado una variedad importante de receptores celulares, lo cual sostiene la idea de que el parásito sería capaz de interactuar con una variedad restringida de moléculas que compartirían las mismas características bioquímicas (Burleigh B. y Andrews N. W. 1995).

Un grupo de moléculas que han sido identificadas como receptores en macrófagos es el de las β_1-integrinas. Anticuerpos específicos contra estas moléculas mostraron un efecto inhibitorio de la invasión celular. Sugerentemente, un anticuerpo monoclonal contra el sitio de unión de la fibronectina a las β_1-integrinas resultó inhibitorio de la unión del parásito a las células, mientras que otros dirigidos contra otras regiones de la molécula no afectaron la penetración. Estos resultados sugieren que la unión del *T. cruzi* a macrófagos podría estar mediada por las β_1-integrinas con la posible participación de la fibronectina (Fernandez M. A. et al. 1993). Es para destacar que las β_1-integrinas son una familia ubicua de proteínas integrales de membrana que unen la matriz extracelular con el citoesqueleto cortical, y que están involucradas en mecanismos de transducción de señales (Hynes R. O. 1992), todas características que la hacen una buena candidata como molécula receptora.

Una proteína de unión a residuos manosil presente en cardiomiocitos ha sido implicada también en el reconocimiento de las estructuras de la superficie parasitaria. Según los autores, la presencia de esta proteína estaría negativamente regulada en el proceso de infección, disminuyendo su presencia en la superficie celular luego de la invasión (Soeiro M. de N., 1999).

Otro tipo de estructuras cuya participación en la invasión celular ha sido demostrada son los carbohidratos de las glicoproteínas de membrana de las células. La remoción de azúcares como manosa (Villalta F. y Kierszenbaum F. 1983), galactosa (Villalta F. & Kierszenbaum F. 1984) o ácido siálico (De Titto E. H. y Araujo F. G. 1987) de la superficie de células en cultivo con glicosidasas específicas redujo la

capacidad de invasión parasitaria. Sin embargo, un tratamiento similar de los parásitos no presentó ningún efecto (De Titto E. H. y Araujo F. G. 1987) o incluso resultó en una invasión más eficiente (Villalta F. & Kierszenbaum F. 1983, Araujo-Jorge T. C. y De Souza W. 1984, Villalta F. & Kierszenbaum F. 1984). Por otra parte, se realizaron ensayos de bloqueo de distintas estructuras glucídicas de la superficie de celulas fibroblásticas y de cultivos primarios de embrión de pollo con diferentes lectinas. En presencia de lectinas de unión a manosa (Con A), N-acetilglucosamina y ácido siálico (WGA), galactosa (RCA) o N-acetil galactosamina (PHA) se observó que la invasión resultaba inhibida (Henriquez D. et al. 1981). En ensayos de invasión realizados en presencia de azúcares solubles algunos autores reportaron que de nueve azúcares evaluados sólo la N-acetil glucosamina resultó inhibitoria de la penetración en células no fagocíticas (Crane M. S. y Dvorak J. A. 1982). Por otra parte, se ha demostrado que la presencia del azúcar sintético β-D-galactofuranosa soluble también fue capaz de inhibir el ingreso del parásito a células epiteliales (de Arruda M. V. et al. 1989).

Más recientemente se ha comenzado a utilizar otro tipo de aproximaciones experimentales, consistentes en la realización de los ensayos de invasión celular usando líneas celulares con deficiencias en la síntesis normal de sus glicoconjugados de superficie. Con el uso de la línea celular Lec2, (células derivadas de la línea CHO deficientes en la síntesis de ácido siálico), se observó un 50% de inhibición de la invasión respecto de las células salvajes. Cuando el ensayo se hizo con Lec2 sialidadas usando la trans-sialidasa de *T. cruzi* purificada, los niveles de invasión observados fueron los normales (Ciavaglia M. et al. 1993, Ming M. et al. 1993, Schenkman R. P. S. et al. 1993). Estos ensayos sugirieron la participación del ácido siálico presente en los glicoconjugados de superficie de las células del huésped en el proceso de invasión. Experimentos similares utilizando células CHO mutantes incapaces de sintetizar proteoglicanos indican que la heparina y el heparán sulfato también estarían involucrados en este proceso (Herrera E. M. et al. 1994). Se observó además, que tanto la remoción de la heparina y el heparán sulfato de las células Lec2, como la desialidación de las células CHO mutantes resultaron en una eficiencia de internalización aún menor (Herrera

E. M. et al. 1994), sugiriendo la participación en el proceso de unión del parásito a las células de glicoconjugados de membranas conteniendo ácido siálico y glicosaminoglicanos en forma independiente.

II.2.iv. Modificaciones de los componentes de superficie de las células del huésped por componentes parasitarios relacionados con las etapas tempranas de la invasión celular:

Desde hace mucho tiempo se sabe que el *T. cruzi* modifica estructuras en la superficie de las células del huésped durante las etapas de reconocimiento y adhesión a las mismas. Algunas de estas modificaciones han sido extensivamente estudiadas y descriptas por diversos autores, y se ha demostrado que su ocurrencia son condición *sine qua non* para la ocurrencia de la invasión parasitaria.

II.2.iv.a. La transialidación

Como se mencionó anteriormente, hay una cantidad importante de evidencias acerca de que la presencia de ácido siálico tanto en la superficie de las células del huésped (De Titto E. H. y Araujo F. G. 1987, Ciaviglia M. et al. 1993, Ming M. et al. 1993, Schenkman R. P. S. et al. 1993) como en las formas infectivas del *T. cruzi* (Piras M. M. et al. 1987, Schenkman S. et al. 1991-b) participan en el proceso de invasión. Se ha observado que los parásitos son incapaces de sintetizar ácido siálico *de novo*, por lo que se estableció que los residuos de ácido siálico presentes en sus moléculas de superficie debían ser activamente transferidos por una trans-sialidasa a partir de sialoglicoconjugados exógenos (Previatto J. D. et al. 1985, Previato J. D. 1990).

El ácido siálico pertenece a una familia de azúcares carboxilados de 9 átomos de carbono encontrados como residuos terminales de oligosacáridos en células de mamífero (Colli W. 1993), fundamentalmente unido a galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y a otras moléculas de ácido siálico (Schauer R. 1985). El ácido siálico está involucrado en numerosos fenómenos biológicos, entre los que se cuenta: el mantenimiento de glóbulos rojos y glicoproteínas en circulación, las interacciones entre

células, adhesión de sustratos, resistencia al complemento, enmascaramiento biológico, desarrollo neuronal (Schauer R. 1985, Cross G. A. M. y Takle G. B. 1993), adhesión de virus como influenza (Nashimura H. et al. 1988), bacterias como *Mycoplasma sp.* a células huésped (Roberts, D. D. et al. 1989), e invasión de glóbulos rojos por merozoitos de *Plasmodium falciparum* (Hadley, L. H. et al. 1987). En el caso de *T. cruzi* se observó que el tratamiento de los parásitos con sialidasas disminuyó la aglutinación celular inducida por lectinas (Pereira M. E. et al. 1980), hizo a los tripomastigotes suceptibles al reconocimiento por la vía alterna del complemento (Kipnis T. L. et al. 1981), estimuló su captación por parte de macrófagos y redujo la carga negativa de la superficie de celular (Souto-Padrón T. y De Souza W. 1985). Por otro lado, epimastigotes tratados con sialidasas perdieron la capacidad de reaccionar con la lectina WGA -una lectina que une ácido siálico- y adquirieron la capacidad de unirse a una aglutinina de maní (PNA) que reconoce residuos galactosa. Una posterior incubación de estos parásitos con sialoglicoconjugados permitió que recuperaran los receptores de superficie para WGA. Concomitantemente, los receptores para PNA fueron bloqueados (Colli W. 1993).

Pereira fue el primero en reconocer la importancia del ácido siálico en la biología del *T. cruzi* (Pereira M. E. 1983). Describió en el parásito una actividad sialidasa, capaz de exponer los residuos galactosa presentes en la superficie de glóbulos rojos de ratones infectados y de células endoteliales, miocardiocitos y glicoproteínas del suero *in vitro* (Pereira M. E. 1983, Libby P. et al. 1986). La caracterización molecular de esta sialidasa (neuraminidasa) reveló que es una molécula anclada a la membrana del parásito mediante una unión de tipo GPI (Rosenberg I. et al. 1991) y que pertenece a una familia de glicoproteínas cuyos pesos moleculares difieren entre cepas de *T. cruzi* y clones (Cavallesco R. y Pereira M. E. 1988, Prioli R. et al. 1990). Poco tiempo después, Previato y colaboradores sugirieron la posibilidad de que el *T. cruzi* adquiriera ácido siálico en sus glicoconjugados de membrana mediante una reacción de transialidación (Previato J. O. et al. 1985). La actividad trans-sialidasa fue luego confirmada en tripomastigotes (Zingales B. et al. 1987). Finalmente, Schenkman y colaboradores pudieron purificar y caracterizar esta enzima (Schenkman S. et al. 1991-b). La enzima resultó ser una trans-glicosilasa. Es una glicoproteína estadío específica ya que no está presente en amastigotes intracelulares (Ortega-Barria E y Pereira M. E. 1992, Frevert U.

et al. 1992), pero sí en tripomastigotes y en epimastigotes (Pereira M. E. 1983, Zingales B. et al. 1987). Su expresión aumenta en la fase estacionaria de crecimiento antes de la diferenciación a tripomastigotes metacíclicos en el insecto vector (Previato J. et al. 1985; Rosemberg I. et al. 1991, Frevert U. et al. 1992; Shenkman S. y Eichinger D. 1993). Su función es la transferencia de residuos de ácido siálico exógenos a receptores específicos de la superficie del parásito (Yoshida N. et al. 1989, Schenkman S. et al. 1991-b).

Las trans-sialidasas son un grupo heterogéneo de glicoproteínas enzimáticamente activas cuyos pesos moleculares varían entre 60 y 250 kDa (Prioli R. et al. 1990). La comparación de la secuencias de la trans-sialidasa con un antígeno de fase aguda liberado al medio circundante por el parásito llamado SAPA (Shed Acute Phase Antigen) (Pollevick G. D. et al. 1991) mostró una identidad del 80% (Pollevick G. D. et al. 1991, Pereira M. E. et al. 1991), sugiriendo que estas moléculas pertenecen a la misma familia de genes. Además, mediante el análisis de secuencias de genes codificantes para otras glicoproteínas de superficie, entre las cuales están las gp82 y gp90 de tripomastigotes metacíclicos, y el grupo de las Tc85 de tripomastigotes sanguíneos y de cultivo, se pudo demostrar que estas glicoproteínas estaban cercanamente relacionadas con las del grupo de la trans-sialidasa y el antígeno SAPA. De esta forma quedó definida una superfamilia de glicoproteínas de superficie algunas de las cuales conforman una subfamilia que presenta actividad trans-sialidasa (Burleigh B. y Andrews N. 1995-a).

La relevancia de esta enzima en la interacción entre el *T. cruzi* y las células del huésped fue evidenciada por la actividad inhibitoria de la penetración de anticuerpos monoclonales dirigidos contra aceptores de ácido siálico en el parásito (Yoshida N. 1989, Schenkman S. et al. 1991-b). Sin embargo, anticuerpos dirigidos contra el dominio catalítico, inhibitorios de la actividad enzimática, no siempre resultaron bloqueantes de la penetración (Schenkman S. et al. 1994). Esta idea fue sustentada además por la observación de que la actividad neuramidasa es alta en tripomastigotes –el estadío parasitario que infecta a células de mamífero- mínima en epimastigotes no infectivo y ausente en amastigotes intracelulares. Además, se observó que el grado de desialidación

de glóbulos rojos observados en ratones y en humanos infectados con *T. cruzi* se relaciona directamente con la magnitud de la parasitemia (Pereira M. E. 1983, Libby P. et al. 1986).

La transferencia de ácido siálico de glicoconjugados de las células del huésped hacia glicoconjugados parasitarios capaces de exhibir residuos galactosa terminales implica la modificación de las estructuras glucídicas tanto en las células del huésped como en el parásito (Schenkman S. y Eichinger D. 1993). Como ya se mencionó, esta modificación parecería ser de relevancia en el proceso de invasión. Se han identificado como las principales moléculas parasitarias aceptoras de ácido siálico a las mucinas, una familia de glicoproteínas de membrana ricas en el aminoácido treonina altamente O-glicosiladas (Schenkman S. et al. 1993). La presencia de ácido siálico en las mucinas promueve la invasión celular de tripomastigotes sanguíneos (Schenkman R. P. S. et al. 1993, Franchin G. et al. 1997). Sin embargo observaciones recientes indican que la remoción de ácido siálico de las mucinas podría estimular la invasión de tripomastigotes metacíclicos a células no fagocíticas (Yoshida N. et al. 1997). Es probable que, como en otros sistemas celulares estas moléculas puedan actuar en dos sentidos: como moléculas antiadherentes, y como moléculas adherentes, según el estadio parasitario y la célula blanco (Camargo M. M. et al. 1997-a, Camargo M. M. et al. 1997-b , de Diego J. et al. 1997, Kelm S. y Schauer S. 1997).

II.2.iv.b. La actividad pepditil-prolil cis-trans isomerasa

Moro y colaboradores describieron el producto de un gen del *T. cruzi* con alta homología a un grupo de proteínas eucariotas denominadas genéricamente "potenciadores de la infectividad en macrófagos" o MIP (por *macrophage infectivity potentiators*) (Moro A. et al. 1995). Se observó que el producto de estos genes correspondía a una proteína de secreción con actividad peptidil-prolil cis-trans isomerasa que fue denominada TcMIP. La inhibición de la actividad enzimática de esta proteína resultó en una disminución significativa de la infección de células LLC-MK2 por el *T. cruzi*. Por otra parte se demostró que cuando la TcMIP enzimáticamente activa era adicionada externamente a las células en cultivo la eficiencia de la infección aumentaba

significativamente de manera dosis dependiente. Estos datos en conjunto demostraron la participación en el proceso de invasión de una actividad isomerasa cis-trans en uniones peptidil-prolil ubicadas sobre la membrana de las células del huésped, (Moro A. et al. 1995).

II.2.iv.c. La actividad cruzipaína

Cruzipaína es el nombre genérico de un grupo de cisteín proteasas lisosomales del parásito (Cazzulo J. J. et al. 1990), que son bioquímica y genéticamente heterogéneas (Campetella O. et al. 1990, Bonaldo M. C. et al. 1991, Eakin A. E. et al. 1992). La cruzipaína está presente en forma mayoritaria en todos los estadios del ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* (Cazzulo J. J. y Frasch A. C. C. 1992). Hasta el momento se le han asignado múltiples roles, vinculándola a funciones relacionadas con la nutrición, desarrollo y diferenciación del parásito. Observaciones *in vitro* muestran que parásitos tratados con inhibidores de esta enzima pierden su capacidad de invadir células huésped y detienen el desarrollo intracelular (Meirelles M. N. L. et al. 1992). Se ha observado también que esta molécula está relacionada con la capacidad de infectar macrófagos por parte de tripomastigotes (Piras M. M. et al 1985, Souto-Padrón T. et al. 1990). Finalmente, Franke de Cazzulo y colaboradores confirmaron que la actividad cisteín proteasa es fundamental para la penetración y el desarrollo intracelular del parásito (Franke de Cazzulo, B. et al. 1994) probablemente induciendo el clivaje a nivel superficial de proteínas de membranas involucradas en la invasión.

II.3. La internalización y la evasión de la vacuola parasitófora

La internalización de *T. cruzi* en la vacuola parasitófora es un proceso sobre el cual se sabe muy poco. La vacuola se forma mediante el reclutamiento de los lisosomas al sitio de adhesión del parásito y fusión de los mismos a la membrana citoplasmática. Una de las funciones de los lisosomas sería la de proveer la cantidad de membrana requerida por el proceso de internalización del parásito (Andrews N. W. 1994). Las vacuolas conteniendo al *T. cruzi* recientemente internalizado se caracterizan por tener un pH luminal ácido, y por la presencia de marcadores lisosomales tales como la fosfatasa

ácida (Carvalho T. U. y De Souza W. 1989) y glicoproteínas de membrana lisosomales (Andrews N. W. et al. 1990, Hall B. F. et al. 1992). La fusión de los lisosomas a la membrana citoplasmática ocurre antes de que el parásito sea completamente internalizado. La membrana lisosomal sería desestabilizada por la actividad trans-sialidasa de membrana de los tripomastigotes (Hall B. F. et al. 1992). Andrews y colaboradores demostraron que mediante la presencia de una actividad formadora de poros de membrana, el *T. cruzi* es capaz de escapar de la vacuola fagolisosomal hacia el citoplasma. La proteína asociada a esta actividad fue denominada Tc-TOX y fue caracterizada: se estableció que estaba inmunológicamente relacionada con el componente C9 del complemento. Esta proteína mostró una actividad citolítica capaz de inducir un efecto de conductancia característico de los canales iónicos de trans membrana. Por estudios inmunocitoquímicos se determinó que está presente en el espacio luminal de la vacuola parasitófora desde poco tiempo después de la invasión (Andrews N. W. et al. 1990). La actividad de esta proteína estaría relacionada entonces con la formación de poros y la lisis de la vacuola fagolisosomal, liberando al parásito contenido al citoplasma celular, donde llevará a cabo el ciclo replicativo (Andrews N. W. 1994).

Como puede observarse, la invasión celular por parte del *T. cruzi* es un proceso complejo cuya comprensión aún no es completa. La diversidad de características que presentan las moléculas estudiadas sugiere que el *T. cruzi* utilizaría distintos antígenos durante los distintos procesos implicados en la invasión de la célula huésped, y probablemente haya involucrados más de un mecanismo en cada etapa.

La profundización del conocimiento de la naturaleza de las moléculas implicadas en la penetración, de los mecanismos por los cuales interactúan, así como de los eventos intracelulares y moleculares desencadenados a partir de esta interacción, sería de importancia para una mejor comprensión de los mecanismos de invasión intracelular por parte del *T. cruzi* y de las condiciones requeridas por el parásito para completar su ciclo de infección.

OBJETIVOS

I. Objetivos generales

I.1. Identificar nuevas moléculas del *Trypanosoma cruzi* implicadas en la interacción con las células del huésped y funcionalmente relacionadas con el proceso de invasión a las mismas.

I.2. Establecer un sistema que modele la interacción entre los componentes de la superficie del *Trypanosoma cruzi* y las células del huésped.

II. Objetivos particulares

II.1. Caracterizar una fracción fenólica de glicoproteínas de membranas y evaluar la presencia de componentes involucrados en el proceso de invasión de las células del huésped por el *Trypanosoma cruzi*.

II.2. Clonar, identificar y caracterizar componente/s de esta fracción involucrado/s en el proceso de invasión.

II.3. Identificar y caracterizar molécula/s involucrada/s en el proceso de reconocimiento de las células del huésped mediante la un sistema capaz de modelar las interacciones entre componentes del parásito y componentes de las células a ser invadidas.

MATERIALES Y METODOS

I. Soluciones y medios de cultivo

I.1. Soluciones

- PBS: NaCl 0,28 M, KCl 0,0027 M, Na_2HPO 0,01 M, KH_2PO_4 0,0018 M (pH 7,4)
- Glicina - HCl: Glicina -HCl 0,15 M (pH 2,8)
- TBS: Tris-HCl 50 mM (pH 8), NaCl 150 mM
- SM: NaCl 0,58%, $MgSO_4.7H_2O$ 0,2%, Tris-HCl 1M (pH 7,5), gelatina 2%
- TE: Tris-HCl 40 mM, EDTA 1 mM (pH 8)
- TAE 1x: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (pH 8)
- TBE 1x: Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM (pH 8,3)
- *Buffer* de muestra en SDS-PAGE: Tris-HCl 0,015 M (pH 6,8), glicerol 2,5%, SDS 0,625%, β- mercaptoetanol 1,25% y azul de bromofenol 1,25%
- Solución de deglicosilación: Na_3IO_4 10 mM en *buffer* NaAc 50 mM (pH 4,5)
- Gel de apilamiento en SDS-PAGE: Tris 0,0625 M (pH 6,8), SDS 0,05%, acril/bisacrilamida 2,4%, TEMED 0,05%, persulfato de amonio 10%
- Gel de separación en SDS-PAGE: Tris 0,375 M (pH 8,8), SDS 0,1%, acril/bisacrilamida 12%, glicerol 1%, TEMED 0,06%, persulfato de amonio 10%
- *Buffer* de corrida en SDS-PAGE: Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1% (pH 8,3)
- *Buffer* de transferencia en Western Blotting: Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, metanol 20% (pH 8,3)
- Solución de tinción de geles en SDS-PAGE: Azul de Coomassie G-250 0,5%, metanol 45%, ácido acético 10%
- Solución de elución de anticuerpos específicos: gli-HCl 0,1 M (pH 2,5)
- Solución de ajuste salino: Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), NaCl 5 M y EDTA 10 mM
- Solución I de transformación: MOPS 10 mM (pH 7), KCl 10 mM
- Solución II de transformación: MOPS 100 mM (pH 6,5), $CaCl_2$ 50 mM y KCl 10 mM
- Fenol-CHISAM: fenol/cloroformo/isoamilalcohol (25:24:1 vol.:vol.)

I.2. Medios de cultivo

- Caldo LB: peptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1% (pH 7,5)
- *Bottom-agar*: LB-agar 2%
- *Top-agar*: LB-agar 1%
- LB-glicerol: LB-glicerol 15% (v/v)
- Medio para crecimiento de *E. coli* Y1090: caldo LB suplementado con ampicilina 0,1 mg/ml, maltosa 0,02% y $MgSO_4$ 10 mM
- Medio Infusión de hígado - Triptosa (LIT): NaCl 0,4%, Bacto triptosa 0,5%, Infusión de hígado 0,5%, KCl 0,4%, Na_2HPO_4 0,8%, Dextrosa 0,2%. Este medio fue utilizado suplementado con 10% de suero fetal bovino y 2 mg/100 ml de hemina.
- Medio de Eagle modificado por Dulbeco (DMEM): Glucosa 0,45%, HEPES 15 mM, piruvato de sodio 10 mM, mercaptoetanol 0,05 mM. Este medio fue utilizado suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 μg/ml de streptomicina, 100 UI/ml de penicilina.

II.1. Parásitos

II.1.i. Epimastigotes de la cepa Tulahuen stock 0 y de la cepa Y

Los epimastigotes cepa Tulahuen stock 0 de *T. cruzi* aislada del vector *T. infestans* (Pizzi T. P. et al. 1952) y de la cepa Y (Silva L. H. P. y Nussenzweig V. 1953) fueron cultivados en medio axénico LIT hasta fase exponencial temprana (pasaje cada 72 horas) a 28°C (Camargo E. P. et al. 1964).

II.1.ii. Tripomastigotes sanguíneos de ratón de la cepa Tulahuen stock 2

Los tripomastigotes cepa Tulahuen stock 2: fueron obtenidos de sangre de ratones infectados según una técnica ya descripta (Krettli A. U. et al. 1979). Brevemente: se infectaron ratones BALB/c intraperitonealmente con $5x10^4$ parásitos por ratón. El día 11 correspondiente con el pico de la parasitemia se realizó una extracción de sangre en presencia de anticoagulante. La sangre obtenida fue desfibrinada y centrifugada a 100 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante conteniendo los epimastigotes fue separado y sometido a lavados con medio DMEM adicionado con 5% de suero fetal bovino.

II.1.iii. Tripomastigotes de la cepa Y provenientes de cultivos de células

Los tripomastigotes de la cepa Y fueron adicionados a una monocapa confluyente de células LLC-MK2 en medio DMEM suplementado con un 2% de suero fetal bovino. Botellas de cultivo de 36 cm^2 de superficie crecidas a confluencia fueron infectadas con 1 x 10^6 tripomastigotes. Los cultivos fueron mantenidos durante 5 días a 37°C con recambio de medio cada 48 horas. Los parásitos obtenidos fueron cosechados en medio DMEM 5 % de suero fetal bovino (Andrews N. W. y Colli W. 1982).

II.2. Células

Se utilizaron células de la línea LLC-MK2 mantenidas en cultivo en medio MEM con pasajes cada 48 horas.

II.3. Cepas de *Escherichia coli* y su preservación

Se utilizaron las cepas de *E. coli* Y1090 y DH5α. Para preservar las colonias bacterianas durante unas pocas semanas, se utilizó medio LB-agar 2% estéril, que se fundió y colocó en cajas de Petri esterilizadas, trabajando bajo flujo laminar. En el caso de la cepa Y1090, se agregó al medio de cultivo ampicilina 0,1 mg/ml esterilizada por filtración. Con un ansa estéril y a partir de cultivos líquidos de *E. coli* de las cepas Y1090 y DH5α, se cultivó en estría sobre las cajas de Petri, que fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Luego fueron selladas y guardadas en posición invertida a 4°C (Sanbrook J. et al. 1989).

Para conservar las cepas bacterianas durante largos períodos de tiempo, se inoculó un erlenmeyer conteniendo 5-10 ml de caldo LB a partir de una colonia aislada y se dejó crecer durante toda la noche a 37°C. Se transfirió un volumen del cultivo a un tubo eppendorf conteniendo un volumen de medio LB estéril suplementado con 30% de glicerol. Se mezcló con vórtex y se conservó a -20°C (Sambrook J. et al. 1989).

II.4. Fagos y biblioteca de ADN copia

Los fagos utilizados en este trabajo (incluyendo los que constituyen la biblioteca de ADN copia) son λgt11. La biblioteca utilizada para la realización del presente trabajo fue gentilmente cedida por el Dr. Mariano Levin (INGEBI, Bs. As.). La misma fue construida de la siguiente manera: se preparó ADN copia (ADNc) de tripomastigotes de la cepa CL Brener obtenidos a partir de sangre de ratón. Los fragmentos de ADNc simple cadena fueron adsorbidos parcialmente con ARN mensajero (ARNm) de los mismos tripomastigotes para obtener una población normalizada de moléculas de ADNc. Se colectó el ADNc no adsorbido, y mediante la actividad ADN polimerasa se lo

transformó en ADNc doble cadena. El mismo fue insertado en el sitio único de restricción *Eco*R I del fago λgt11.

Se estableció el título de la biblioteca en $3x10^8$ unidades formadoras de placas/ml (UFP/ml). Se determinó además el porcentaje de fagos recombinantes en la biblioteca utilizando en la etapa de inducción de la expresión con isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) un análogo de la galactosa, X-gal. El porcentaje de fagos salvajes (wt) (placas de lisis azules) resultó ser del 30% y el correspondiente a fagos recombinantes (placas de lisis incoloras), del 70% (Zingales B. 1994).

III. Homogenatos y fracciones celulares

III.1. Homogenato total (HT) de *T. cruzi*

A partir de cultivos de las distintas formas de *T. cruzi*, los parásitos fueron centrifugados a 3.500 x g durante 15 minutos y separados del medio. Dicha operación se repitió cuatro veces más, pero resuspendiendo el sedimento en PBS en cada instancia de lavado. A continuación, se agregaron 5 ml de H_2O por cada ml de sedimento y los inhibidores de proteasas TLCK y PMSF a una concentración final de 1 mM en cada caso. Para obtener una lisis total, la suspensión fue congelada y descongelada 4 veces, y posteriormente sometida a sonicación a 50 ciclos/minuto 4 veces, durante 1 minutos cada vez. Se comprobó con microscopio (45 x) que las estructuras estaban rotas. El lisado fue centrifugado a 3.500 x g durante 15 minutos y el sedimento fue descartado, utilizándose el sobrenadante clarificado así obtenido.

III.2. Fracción fenólica de glicoproteínas de membranas de *T. cruzi* (PFMG)

A partir de epimastigotes de cultivo de la cepa Tulahuen 0 en fase exponencial tardía, se obtuvo una fracción fenólica de glicoproteínas de membranas que fue denominada PFMG (por Phenolic Fraction Membrane Glycoproteins) (Marcipar A. J. et al. 1982). Brevemente: los parásitos fueron lavados por centrifugación a 5.000 x g durante 15 minutos 5 veces y resuspención en *buffer* PBS, y desintegrados por

ultrasonido. Luego de un congelamiento durante toda la noche a -20°C, el homogenato obtenido fue centrifugado a 12.000 x g a 4°C y el sobrenadante, descartado. A continuación, se agregaron fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) y tosyl-L-lisina clorometilcetona (TLCK) a una concentración final de 1 mM en cada caso, como inhibidores de proteasas. Los sedimentos fueron tratados con diiodo salicilato de litio (LIS) como agente caotrópico para solubilizar las glicoproteínas contenidas en la fracción sedimentada. Un volumen de esta fracción se suspendió en 40 volúmenes de LIS 0,2 M en *buffer* tris-acetato 0,15 M (pH 8) a 15°C y se agitó durante 1 hora. Luego de sonicar durante 5 minutos a 4°C se trató la fase soluble con un volumen de fenol saturado en H_2O a 4°C. Por último, se centrifugó el material obtenido a 5.000 x g y se descartó la fase insoluble. La fase fenólica obtenida fue sometida a una cromatografía en tamiz molecular como se describe más adelante.

III.3. Preparación de extractos de maní

Se llevó a cabo según una técnica ya descripta (Marcipar A. J. et al. 1982). Los granos crudos descascarados y molidos fueron tratados con hexano para extraer los componentes lipídicos. Luego de una filtración el residuo sólido fue secado al ambiente y se realizó una extracción de proteínas con PBS. Luego de filtrado, el material fue guardado a -20°C hasta el momento de su utilización.

IV. Purificaciones en columnas

IV.1. Tamiz molecular

IV.1.i. Calibración de la columna de tamiz molecular Sephadex G25

Se procedió a la calibración de una columna de tamiz molecular Sephadex G25. Se sembró una muestra consistente en una mezcla de albúmina sérica bovina 1 mg/ml y el colorante azul de bromofenol en una columna de 39 cm de altura y de 2,8 cm de diámetro. Se eluyó con H_2O a un flujo de 2 ml/minuto y se calculó el volumen interno Vi de la columna teniendo en cuenta que la albúmina es eluida con el volumen de exclusión

Vo, mientras que el colorante es eluido con el volumen total Vt. A partir de los datos obtenidos se calculó el Vi de la columna según la siguiente ecuación:

Vi = Vt - Vo (se consideró el volumen de la matriz de la columna Vg despreciable frente a Vi).

El Vi de la columna utilizada fue de 103 ml.

IV.1.ii. Tamizado molecular de la fracción fenólica de glicoproteínas de membrana de *T. cruzi*

Con el fin de eliminar el fenol y el LIS que estaban acompañando a las glicoproteínas, se sembró el sobrenadante en la columna Sephadex G25. La misma fue previamente equilibrada con H_2O, y luego de la siembra, eluida con H_2O.

Se obtuvieron 3 picos de elución, de los cuales se recuperó sólo el primero (Vo), correspondiente a las glicoproteínas (Marcipar A. J. et al. 1982). Este volumen eluido constituyó la fracción denominada Fracción Fenólica de Glicoproteínas de Membranas (PFMG).

Posteriormente, se concentraron los eluatos obtenidos hasta 1/10 del volumen inicial utilizando membranas de ultrafiltración con un límite de retención de 10 kDa hasta que se alcanzó una concentración de proteínas totales de 1,05 mg/ml. El material así obtenido se conservó a -20°C.

Se efectuó una determinación de proteínas totales en el sobrenadante obtenido, mediante la técnica de Bradford (descripta más adelante).

IV.2. Columna de afinidad sobre la base de membranas eritrocitarias

IV.2.i. Preparación de una columna de glóbulos rojos desialidados capaz de exponer residuos galactosa terminales en la superficie

Esta técnica se desarrolló según un protocolo ya descripto (Marcipar A. J. y col. 1982). Brevemente, se obtuvieron por centrifugación, glóbulos rojos a partir de sangre humana de grupo 0 proveniente de un banco de sangre hospitalario. Los eritrocitos fueron lavados 5 veces con PBS y lisados por shock hipotónico con agua destilada (1 vol. de GR :40 vol. agua) durante la noche a 4°C. El material así obtenido fue centrifugado a 20.000 x g durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante, obteniéndose un *pellet* enriquecido en membranas de GR. Las membranas fueron sometidas a lavados con PBS hasta la eliminación de los residuos de hemoglobina en los sobrenadantes de centrifugación (monitoreado por absorbancia a 280nm). El material así obtenido fue tratado con la enzima neuraminidasa durante toda la noche (2 UI/ml en buffer Tris acético 0,01 M pH 5,7). La enzima fue eliminada por sucesivos lavados en PBS. Las membranas desialidadas obtenidas se coreticularon con albúmina en presencia de glutaraldehído. El material obtenido se molió en un molino a cuchillos hasta obtenerse partículas de aproximadamente 1 mm de diámetro. El material fue incubado durante la noche con una solución de glicina 0,1 M en PBS para bloquear la posible formación de enlaces covalentes con los grupos aldehído libres residuales del tratamiento con glutaraldehído que podrían establecer enlaces covalentes con las proteínas durante la purificación. Finalmente se hicieron lavados con una solución de glicina-HCl 0,1 M pH 2,5 para eluir moléculas que pudieran haberse adherido en forma inespecífica. Un volúmen de 20 ml del material fue empacado en una columna para su evaluación y utilización.

IV.2.ii. Condiciones de uso de la columna

Los extractos de maní o la fracción HT fueron sembrados en la columna mediante una bomba peristáltica. El flujo utilizado para la siembra y la elución fue de 0,3 ml/minuto. La corrida fue monitoreada en todo momento por lectura de la absorbancia a

280 nm en un lector continuo. La elución fue registrada en un registrador. El volumen sembrado fue equivalente a dos volúmenes de columna, con una concentración de proteínas aproximada de 1 mg/ml medido por la técnica de Bradford. Los lavados fueron realizados con PBS hasta llevar la absorbancia a 280 nm a linea de base. La elución se llevó a cabo mediante competencia con los azúcares galactosa o lactosa 0,15 M en PBS. La columna fue regenerada mediante pasaje de una solución de glicina - HCl hasta equilibrar el pH a 2,5, y posterior tratamiento con PBS hasta reequilibrar el pH a 7,4.

El material obtenido de la elución de la columna fue concentrado por ultrafiltración tangencial hasta llevarlo a concentraciones adecuadas para ensayos posteriores. En el caso de la purificación de la proteína LLGP-67 para experimentos de lectino inmunohistoquímica (ver más adelante) el azúcar utilizado como agente de elución fue eliminado por pasos sucesivos de concentración por ultrafiltración y dilución en PBS hasta obtenerse una dilución del azúcar (estimada) de 10^8 veces.

V. Técnicas inmunoquímicas: preparación de sueros, y caracterización de antígenos y anticuerpos

V.1. Dosaje de proteínas totales

Se realizó la determinación de proteínas totales mediante la técnica de Bradford (Bradford M. M. 1976), utilizando microcubetas de policarbonato. La lectura se efectuó empleando un filtro de 590 nm. Se trabajó con un patrón de albúmina sérica bovina, con el que se trazó una curva de calibrado desde 0,01 mg/ml hasta 0,1 mg/ml, tomando valores de absorbancia por duplicado a los 5 minutos posteriores al agregado del reactivo de color.

V.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las electroforesis fueron llevadas a cabo en geles con un 12% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Laemmli U. K. 1970). Las muestras fueron tratadas con Tris-HCl 0,015 M (pH 6,8), glicerol 2,5%, SDS 0,625%, β- mercaptoetanol 1,25% y

azul de bromofenol 1,25%. Luego de incubar las muestras en un baño a en ebullición durante 5 minutos se sembraron aproximadamente 20 µl de cada una en el gel. Se aplicó una diferencia de potencial de 200 V.

Los marcadores de peso molecular que se utilizaron fueron los siguientes:

Proteína patrón	PM
- Fosforilasa b	97,4 kDa
- Albúmina sérica	66,6 kDa
- Ovoalbúmina	43,0 kDa
- Anhidrasa carbónica	31,0 kDa
- Inhibidor de tripsina	20,5 kDa
- Lisozima	14,4 kDa

La fijación y tinción de los geles se efectuó por inmersión en azul de Coomassie G-250 y posterior tratamiento con solución decolorante.

V.3. Obtención de sueros policlonales de conejo anti-PFMG y anticuerpos purificados contra una proteína recombinante

V.3.i. Sueros policlonales de conejo anti PFMG

Se utilizó una técnica ya descripta (Margni R. 1989). En cada caso los sueros fueron preparados en dos animales por duplicado. Previamente a la inoculación, se les extrajo sangre por punción de la vena marginal de la oreja a conejos hembra de raza neozelandesa de tres meses de vida, que fueron almacenados para su uso posterior como sueros control.

Se inoculó 0,6 ml de antígeno (PFMG o LLGP-67) 0,8 mg/ml (0,48 mg) en 0,6 ml de adyuvante completo de Freund a un conejo y 0,6 ml de PFMG 0,08 mg/ml (0,05 mg) en igual volumen de adyuvante completo de Freund al otro conejo. A los 15 días se

extrajo sangre de la vena marginal de la oreja, se separó el suero y se determinó el título por ELISA como se detalla más adelante.

Se aplicó un refuerzo en forma subcutánea a los 21 días de la primera inoculación de 0,6 ml de antígeno 0,75 mg/ml (0,45 mg) más 0,6 ml de adyuvante incompleto de Freund a ambos conejos. A los 10 días se extrajo sangre de la oreja, se separó el suero y se tituló. Los sueros policlonales así obtenidos fueron conservados a -20°C.

V.3.ii. Purificación de anticuerpos específicos que reconocen a la proteína recombinante

Se infectó una suspensión bacteriana (*E. coli* Y1090) con aproximadamente 10.000 UFP del clon positivo aislado, según se describe en VII.1.ii.. Posteriormente, se plaqueó la mezcla a confluencia sobre una placa de Petri con LB-agar 2% suplementado con ampicilina 0,1 mg/ml y se incubó a 37°C hasta el comienzo de la formación de un "césped". En ese momento se indujo la expresión proteica con una membrana de nitrocelulosa embebida en IPTG 10 mM, se incubó a 42°C para provocar la lisis bacteriana y se dejaron crecer las placas de lisis hasta confluencia.

Se incubó la membrana con suero de conejo anti-PFMG durante 2 hs. a temperatura ambiente. Luego de eliminar el suero y realizar 3 lavados de 15 minutos con PBS, se eluyeron los anticuerpos retenidos por inmunoafinidad con solución de gli-HCl 0,1 M (pH 2,5) durante 30 minutos y se neutralizó el pH con NaOH.

V.4. Caracterización de los sueros anti-PFMG y anticuerpos purificados contra una proteína recombinante

V.4.i. Titulación

V.4.i.a. Titulación por Enzimo-Inmunoensayo (ELISA)

Este ensayo se realizó por duplicado. Las microplacas de poliestireno fueron sensibilizadas con 1 μg de lisado total de epimastigotes (HT), obtenido según se detalló anteriormente. Se incubó durante la noche a 4°C y luego se bloqueó con leche descremada 5 % en *buffer* fosfato salino (pH 7,4) (PBS). Se incubó la muestra con distintas diluciones de los sueros de conejo en solución de PBS-leche descremada 1%. Se ensayaron diluciones seriadas hasta 1/800.000 para los sueros anti PFMG y 1/128.000 para los sueros anti LLGP-67. Luego se incubó con el segundo anticuerpo: anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa hecho en cabra diluido 1/1.000 en PBS-leche descremada 1%. El sustrato de la enzima que se utilizó fue H_2O_2 en presencia del cromógeno tetrametil benzidina (TMB). Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C durante 60 minutos. Entre una incubación y otra se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 0,01%. Las lecturas de absorbancia se efectuaron a 450 nm. El punto de corte para cada dilución fue calculado como la media de las absorbancias de los ensayos realizados con sueros negativos sumado a dos desvíos estándar.

V.4.i.b. Titulación por dot blot

Se sembraron distintas cantidades (100 ng, 10 ng, 1 ng y 0,1 ng) de lisado total de epimastigotes (HT) obtenido según se describió, sobre una membrana de nitrocelulosa. Se utilizó PBS-caseína 1% como solución bloqueante y como diluyente del suero y del conjugado. Las diluciones de sueros (preinmune o anti-PFMG) fueron realizadas en forma seriada al ½ cubriendo un rango desde 1/50 hasta 1/3.200. Como segundo anticuerpo, se usó suero anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa, diluido 1/1.000. Las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 60 minutos.

Entre una incubación y otra se realizaron 3 lavados de 15 minutos con PBS.

Para la visualización, se utilizó H_2O_2 como sustrato de la enzima peroxidasa en presencia de diamino benzidina (DAB) 0,05% como cromógeno, en PBS.

V.4.ii. Ensayo de Concanavalina A - peroxidasa

Se sensibilizaron placas de poliestireno incubándolas durante la noche a 4°C con 100 µl/pocillo de la glicoproteína purificada u homogenato de *T. cruzi*. Luego de un bloqueo de 1 hora con albúmina 5% en PBS se hicieron 3 lavados con PBS-T. Se incubaron las placas con una solución de 50 µg/ml de Concanavalina A durante 1 hora a 37°C. Luego de 3 lavados con PBS-T. Se incubaron las placas con una solución de 50 µg/ml de peroxidasa durante 1 hora a 37°C. La reacción fue revelada con buffer citrato 35% (0,14 M Ac. cítrico, 0,86 M Na2HPO4 2H2O), TMB-DMSO 0,1% y 0,01% de H_2O_2. Se hizo la lectura de absorbancia a 450 nm (Margni R. 1990). Los ensayos se llevaron a cabo por cuadruplicado.

V.4.iii. Western blot

Se realizó una corrida electroforética SDS-PAGE 12% de un lisado de epimastigotes o de una preparación de proteínas, que fue electrotransferida a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, la membrana fue teñida de manera reversible con el colorante rojo Ponceau, y cortada en tiras de manera de obtener en cada una la imagen correspondiente a la mitad longitudinal de cada calle corrida en el gel.

Las membranas fueron bloqueadas con PBS-leche descremada 1%. Luego se incubaron las tiras con los sueros de conejo o los anticuerpos purificados según cada ensayo, con sus correspondientes controles preinmunes. Se incubaron las tiras con suero anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa diluido 1/1.000 en PBS-albúmina 1%. Las incubaciones fueron realizadas a temperatura ambiente durante 60 minutos. Entre una incubación y otra se efectuaron 3 lavados de 15 minutos con PBS. La reacción de revelado fue llevada a cabo como se describe en el item anterior.

V.4.iv. Tratamiento deglicosilante

Para los ensayos de unión sobre antígenos inmobilizados, en caso de evaluarse la actividad de reconocimiento contra los antígenos deglicosilados, la reacción de deglicosilación se llevó a cabo de la siguiente manera: se incubaron los antígenos a ser tratados durante 1 hora con Na_3IO_4 10 mM en *buffer* NaAc 50 mM (pH 4,5) en oscuridad. Se lavó 3 veces con *buffer* NaAc 10 minutos cada vez. Luego de inubar 30 minutos con $NaBH_4$ 0,05 M se efectuaron 3 lavados de 15 minutos con PBS. El resto de las muestras fue mantenida en PBS.

V.4.v. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se realizaron improntas sobre portaobjetos con epimastigotes y una mezcla de tripomastigotes y amastigotes de cultivofijados con formol a una concentración final del 15%. Las diluciones elegidas para el primer anticuerpo fueron: 1/200 para el suero de conejo preinmune y anti-PFMG y no se hicieron diluciones para los anticuerpos que reconocen la proteína recombinante. Para el suero inmune anti LLGP-67 y el preinmune correspondiente se hicieron diluciones 1/50. Como revelador se utilizó un suero anti-IgG de conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína diluido 1/200. En el montaje de los preparados se usó glicerina tamponada con PBS y Azul de Evans 1/15.000 como colorante de contraste. Las muestras fueron observadas bajo un aumento de 400 X, utilizando un microscopio de epifluorescencia con luz UV.

VI. Ensayos de actividad y funcionalidad

VI.1. Reconocimiento de receptores en tejidos

Para la realización de estos ensayos se utilizó una preparación de la glicoproteína LLGP-67 libre de galactosa (ver III.2.ii.b.) para evitar que el azúcar inhibiera competitivamente la unión de la glicoproteína a los posibles receptores.

VI.1.i. Procesamiento de las muestras para ensayos de lectino inmunohistoquímica

VI.1.i.a. Muestras provenientes de biopsias humanas

Las muestras utilizadas en este trabajo consistieron en material de descarte de cirugías cardíacas realizadas en el Instituto de Cirugía Cardiovascular de la Fundación Favaloro. Se utilizaron muestras para biopsias de atrio derecho y arteria mamaria interna provenientes de pacientes sobre los cuales se realizó una cirugía a corazón abierto. Las muestras fueron congeladas en isopentano y seccionadas en un criostato en cortes de 4 μm de espesor.

Por otra parte, se utilizaron muestras de endomiocardio de ventrículo derecho provenientes de corazones normales de donantes recogidas en el momento del transplante. Estas muestras fueron fijadas en PBS con un 10% de formaldehído, embebidas en Histowax y seccionadas un micrótomo en cortes de 2 μm de espesor.

VI.1.i.b. Muestras provenientes de biopsias murinas

Muestras de riñón, ventrículo izquierdo y aorta de ratones adultos BALB/c fueron congeladas en isopentano y seccionadas en un criostato en cortes de 4 μm de espesor.

VI.1.ii. Lectino inmunohistoquímica

Las muestras de órganos embebidos en Histowax fueron desparafinadas, hidratadas y mantenidas en PBS para su uso posterior. Las muestras de tejidos cortados con el criostato fueron fijadas en acetona a 4°C y luego mantenidas en PBS para su uso posterior.

Las biopsias así tratadas fueron incubadas por una hora en presencia de una solución de LLGP-67 en PBS, libre de azúcar, a una concentración de 0,1 mg/ml durante la noche, o con PBS como control. Luego de lavados con PBS, las muestras fueron

enfrentadas a diluciones 1/5, 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80 de los sueros inmune y preinmune durante la noche a 4°C. Finalmente, luego de lavados, las muestras fueron enfrentadas a un conjugado anti conejo biotinilado por 20 minutos y tratadas con conjugado avidina peroxidasa o avidina fosfatasa alcalina por otros 20 minutos a temperatura ambiente.

Para la visualización, se utilizó H_2O_2 en presencia de diamino benzidina (DAB) 0,05% como cromógeno para el conjugado a la enzima peroxidasa o "Fast red" para la fosfatasa alcalina.

VI.2. Actividad antigénica

VI.2.i. Panel de sueros humanos

El panel utilizado está constituido por 100 sueros caracterizados por un sistema de ELISA y uno de hemoaglutinación indirecta comerciales (Gen-Cell, Argentina). Los sueros humanos fueron recogidos de donantes de bancos de sangre. Los sueros recibidos fueron reevaluados en un ensayo a doble ciego, y fueron caracterizados como positivos cuando ambas reacciones resultaron positivas y como negativos cuando ambas reacciones resultaron negativas. Los sueros que mostraron un resultado discordante en las dos pruebas serológicas fueron eliminados del panel.

VI.2.ii. ELISA con sueros humanos

Los ensayos se realizaron por duplicado. Las microplacas de poliestireno fueron sensibilizadas con 1 μg de lisado total de epimastigotes (HT) o de la molécula LLGP-67, obtenidas según se detalló anteriormente. Se incubó durante la noche a 4°C y luego se bloqueó con leche descremada 5% en *buffer* fosfato salino (pH 7,4) (PBS). Se incubó la muestra con una dilución 1/200 de los sueros en solución de PBS-leche descremada 1%. Luego se incubó con el segundo anticuerpo: anti-IgG humano conjugado a peroxidasa, diluido 1/1.000 en PBS-leche descremada 1%. El sustrato de la enzima que se utilizó fue H_2O_2 en presencia del cromógeno tetrametil benzidina (TMB). Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C durante 60 minutos. Entre una incubación y otra se realizaron 3

lavados con PBS-Tween 20 0,01%. Las lecturas de absorbancia se efectuaron a 450 nm. El punto de corte para cada dilución fue calculado como la media de las absorbancias de los ensayos realizados con sueros negativos sumado a dos desvíos estándar.

VI.3. Ensayos de inhibición de la penetración

Los ensayos de inhibición de la penetración de tripomastigotes a células en cultivo se realizaron según una técnica ya descripta (Andrews N. W. y Colli W. 1982) según se detalla a continuación.

VI.3.i. Infección de células suceptibles

Células de la línea LLC-MK2 fueron cultivadas en microplacas de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos, durante 48 horas. En recuentos de células se estimó una cantidad de $5x10^4$ células/cubreobjetos. Los sobrenadantes de estos cultivos fueron aspirados y lavados dos veces con PBS. Luego los cultivos fueron infectados con $1x10^6$ tripomastigotes de cultivo por pocillo, en presencia de los distintos sueros inmunes y preinmunes en un volumen total de 0,2 ml según se detalla a continuación:

Suero anti PFMG inmune y preinmune: dilución: 1/200
Suero anti LLGP-67 inmune y preinmune: dilución: 1/40
Anticuerpos purificados por inmunoafinidad sobre una proteína recombinante componente de la PFMG: sin diluir.

Los experimentos fueron realizados por triplicado. Luego de una hora de incubación los sobrenadantes fueron aspirados y los pocillos fueron lavados dos veces con PBS y adicionados con 0,5 ml de medio de cultivo/pocillo. Luego de una incubación durante la noche, los cultivos fueron fijados con paraformaldehído y teñidos con Giemsa para facilitar la observación y recuento de los amastigotes intracelulares. Los preparados así obtenidos fueron montados sobre portaobjetos en medio de montaje tamponado conteniendo glicerol.

VI.3.ii. Recuento de amastigotes en células infectadas

En primer lugar se realizó un recuento de amastigotes intracelulares para cada unidad experimental en los pocillos control (sin tratamiento) con el objeto de hacer una evaluación preliminar sobre la dispersión de los datos. Dado que la diferencia entre pocillos resultó no significativa, se realizó un recuento de un total de 150 células infectadas provenientes de distintos campos en distintos pocillos para cada ensayo, y los resultados fueron expresados como las medias de este recuento. Las barras de error representan los desvíos estandar para cada caso. En los casos en que fue posible se realizó un recuento balanceado de células en los triplicados.

VII. Búsqueda y caracterización molecular de antígenos recombinantes relacionados con la PFMG

VII.1. Inmuno-rastreo de la biblioteca de expresión

VII.1.i. Adsorción de los sueros y pseudo-rastreo

Para asegurar la ausencia de "ruido de fondo" o la posibilidad de falsos positivos en el inmuno-rastreo, se incubaron los sueros con recortes de membrana de nitrocelulosa previamente embebida en lisado total de *E. coli* Y1090 obtenido por sonicación.

Luego de incubar durante 20 minutos a 37°C 200 µl de cultivo de *E. coli* Y1090 con 100 µl de fago wt en solución de suspensión de fagos (solución SM), se plaqueó la mezcla con 2,5 ml de LB-agar 1% (*top agar*) en una caja de Petri conteniendo 25 ml de LB-agar 2% (*bottom agar*) suplementado con ampicilina 0,1 mg/ml. Las cajas de Petri fueron incubadas a 42°C hasta el comienzo de la formación de placas de lisis. En ese momento se indujo la expresión de proteínas colocando sobre el medio agarizado una membrana de nitrocelulosa embebida en IPTG 10 mM. Se continuó la incubación a 42°C durante 3 horas.

Luego de ser retirada de la caja de Petri, la membrana fue bloqueada con leche descremada 5% en solución de Tris-HCl 50 mM (pH 8), NaCl 150 mM (*buffer* TBS) durante 1 hora. Después de realizar 3 lavados de 15 minutos con TBS, se incubó el suero de conejo anti-PFMG con la membrana bloqueada durante 2 horas a 37°C.

Para comprobar que el suero de conejo anti-PFMG se encontraba libre de anticuerpos que reconocieran proteínas de la bacteria o del fago salvaje y que aún reconocía antígenos de *T. cruzi*, se realizó un ensayo de dot blot con membrana de nitrocelulosa. Se sembró 1 μg de antígeno bacteriano (sonicado total de *E. coli*) y 100 ng, 10 ng y 1 ng de lisado total de *T. cruzi*. Se utilizaron diluciones seriadas al ½ de suero en PBS-leche descremada 1% desde 1/1.000 hasta 1/16.000.

VII.1.ii. Inmuno-rastreo de la biblioteca de expresión

La técnica empleada fue la misma que la descripta para pseudo-rastreo (Sambrook J. et al. 1989), excepto que la población de fagos correspondió en este caso a la biblioteca de ADNc llevada a dilución de uso con solución SM. Se trabajó con 10.000 UFP por caja de Petri, aproximadamente.

Para la búsqueda y posible detección de los clones positivos, se bloqueó la membrana con TBS-leche descremada 5% y, luego de 3 lavados de 15 minutos con TBS, se incubó con una dilución 1/500 de los sueros en TBS-leche descremada 1%, PMSF 1mM, azida de sodio 0,02% y sonicado de *E. coli* 7,5%. Luego de 3 lavados de 15 minutos con TBS, se incubó la membrana con suero de conejo anti-IgG conjugado a peroxidasa diluido 1/1.000 en TBS-leche descremada 1%. Las incubaciones fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente durante 60 minutos. El sustrato de la enzima empleado fue H_2O_2 en presencia de DAB 0,05%, con $NiCl_2$.

Los posibles fagos positivos encontrados fueron localizados en la caja de Petri a partir de la impronta en la membrana, recuperados, suspendidos en 750 μl de SM estéril y 50 μl de cloroformo y conservados a 4°C.

VII.2. Purificación de los posibles fagos positivos para el reconocimiento por el suero anti PFMG

Los posibles fagos positivos fueron sometidos a nuevas rondas de plaqueo e inmunodetección para confirmar la reactividad de la proteína recombinante que estos fagos eran capaces de codificar con los anticuerpos anti-PFMG. El único fago que resultó confirmado fue sometido a sucesivas rondas de plaqueo y reconocimiento inmunoquímico por el suero anti PFMG en diluciones crecientes. De esta manera se consiguió aislar fagos provenientes de varias placas de lisis, codificantes para una proteína recombinante reactiva con el suero. Se consideró que estos fagos estaban clonados cuando el 100% de los fagos resultó reactivo en las condiciones de inducción de la proteína recombinante codificada. Como control de la especificidad de la reacción contra la proteína recombinante codificada, se llevó a cabo el mismo procedimiento con fagos salvajes (sin inserto de ADN parasitario).

VII.3. Amplificación del clon aislado y de fagos salvajes

VII.3.i. En medio sólido

Luego de incubar un cultivo de *E. coli* Y1090 en caldo LB suplementado con ampicilina 0,1 mg/ml, maltosa 0,02% y $MgSO_4$ 10 mM a 37°C durante toda la noche, se infectaron 200 µl de bacteria con 100 µl (10.000 UFP) de fago correspondiente al clon positivo o al fago wt. Después de incubar a 37°C en baño de agua durante 15 minutos, se agregaron 2 ml de LB-agar 1% y se plaquearon en cajas de Petri con LB-agar 2% suplementado con ampicilina 0,1 mg/ml. Para inducir la lisis bacteriana, se realizó una incubación a 42°C. Al momento de observarse el desarrollo de placas de lisis, se agregó a la superficie del agar 5 ml de solución SM y se incubó 12 hs. a 4°C. Luego de cosechar el sobrenadante, se agregaron 50 µl de cloroformo, se determinó la concentración de los fagos en suspensión por titulación y se conservó a 4°C.

VII.3.ii. En medio líquido

Se infectaron 50 ml de cultivo de *E. coli* cepa Y1090 en caldo LB suplementado con ampicilina 0,1 mg/ml, maltosa 0,02% y $MgSO_4$ 10 mM, con 200 ml de una suspensión de fagos de título superior a 10^8 UFP/ml. Los cultivos fueron incubados durante la noche a 42°C. A continuación, fueron centrifugados a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C. Luego de recuperar el sobrenadante, se agregaron 100 µl de cloroformo, se determinó la concentración de los fagos en suspensión por titulación y se conservó a 4°C.

VII.4. Caracterización de la proteína recombinante

VII.4.i. Extracción y análisis de ADN

VII.4.i.a. Extracción de ADN de fagos

La preparación de ADN del fago λgt11 se realizó de acuerdo al método descripto por Kaslow (Kaslow D. (1983). Los fagos suspendidos en SM fueron centrifugados a 9.000 x g con el fin de descartar restos de agar y bacterias lisadas. Al sobrenadante se le adicionó 0,6 g de NaCl y 0,7 g de PEG 6.000 por cada 10 ml con agitación continua hasta disolución total de las drogas sólidas. Luego de 2 horas de incubación a 4°C, se centrifugó 5 minutos a 12.000 x g y el precipitado fue resuspendido en 1 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), $MgSO_4$ 10 mM, NaCl 100 mM. A esta suspensión se le agregaron 100 µg de ADNasa y 100 µg de ARNasa por ml y se incubó durante 1 hora a 37°C. Luego se agregaron 100 µl de solución conteniendo Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), NaCl 5 M y EDTA 10 mM (solución de ajuste salino) y 125 µl de PEG 6.000 40% por ml y se incubó a 4°C para precipitar los fagos. Al cabo de 2 horas se centrifugó 10 minutos a 12.000 x g y el precipitado fue resuspendido en 1 ml de TE. Los fagos se lisaron por agregado de SDS a una concentración final de 1% y se eliminaron las proteínas con dos extracciones con fenol/cloroformo/isoamilalcohol (fenol-CHISAM) (25:24:1 vol.:vol.). Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ADN por agregado de 0,1 volumen de NaAc 3 M (pH 5,6) y dos volúmenes de etanol absoluto, e incubación a -20°C por 30 minutos.

Se centrifugó 15 minutos a 12.000 x g, se lavó el precipitado con etanol 80% y se resuspendió en *buffer* TE.

Se evaluó la cantidad y calidad del ADN obtenido por electroforesis de una alícuota en un gel de agarosa 0,7% y tinción con bromuro de etidio, según el método descripto más adelante (VII.4.2.).

VII.4.i.b. Minipreparación de ADN plasmídico

Para extraer ADN plasmídico bacteriano, se cultivó *E. coli* DH5α en medio LB (con o sin ampicilina, según el caso), hasta la fase estacionaria de la curva de crecimiento. Se sometió el cultivo a centrifugación a 3.500 x g durante 10 minutos, y el sedimento fue resuspendido en 0,3 ml de *buffer* conteniendo Tris/HCl 50 mM, EDTA 10 mM (pH 8,0) y 200 μg de RNAasa A/ml. Luego de adicionar 0,3 ml de solución de NaOH 200 mM con SDS 1%, se incubó la suspensión a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se agregó 0,3 ml de solución de KAc 2,55 M (pH 4,8), se efectuó una centrifugación a 14.000 x g a 4°C durante 30 minutos y se recuperó el sobrenadante. Finalmente, se precipitó el ADN con isopropanol y se centrifugó a 4°C durante 15 minutos. El ADN obtenido fue lavado dos veces con etanol 70%, secado y redisuelto en *buffer* TE.

Para controlar el estado del ADN plasmídico aislado se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa 1,5%.

VII.4.i.c. Extracción de ADN total de *T. cruzi*

Se realizó una extracción de ADN genómico a partir de epimastigotes de *T. cruzi*. Se adicionó un volumen de mezcla de fenol-CHISAM a un volumen de muestra. Luego de emulsionar suavemente y de centrifugar a 12.000 x g a temperatura ambiente, se separaron las fases y se colectó la fase acuosa. Luego de agregar 200 μl de *buffer* TE a los tubos emulsionados, se repitió la operación y la fase acuosa obtenida fue mezclada con la fracción colectada anteriormente. Se realizó una reextracción con un volumen de

fenol-CHISAM por cada volumen de fase acuosa. Luego de emulsionar agitando suavemente, se centrifugó y se recogió la fase acuosa. Se agregó 1/10 de volumen de NaAc 3 M (pH 5,2) y 2-2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se incubó durante toda la noche a 20°C. Se centrifugó a 4°C a 12.000 x g y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos operaciones de lavado con etanol 70% y se dejó secar el sedimento a temperatura ambiente para ser finalmente resuspendido en 30 µl de *buffer* TE.

VII.4.ii. Electroforesis en gel de agarosa

Para el análisis de los productos de amplificación o de extracción de ADN, se sembraron 5 µl de muestra (o 7,5 µl) y 1 µl de *buffer* de muestra 6X (o 1,5 µl) en geles de agarosa 0,7%, 1% o 1,5%, según el caso, mediante el sistema tipo submarino (Sambrook J. et al. 1989). Los geles fueron preparados en *buffer* TAE 1X, adicionándole bromuro de etidio hasta una concentración final de 0,3 µg/ml. Las corridas electroforéticas se realizaron en la misma solución amortiguadora, manteniendo un voltaje constante de 80 V. El tamaño del fragmento amplificado se estimó utilizando ADN de fago λ digerido con la enzima de restricción *Hin*d III como marcador de tamaño de fragmento. Las bandas de migración de ADN en el gel se visualizaron empleando un transiluminador de luz UV (λ=255 nm).

VII.5. Subclonado, transformación de bacterias y secuenciación de ADN

VII.5.i. Subclonado en el vector pUC119

El ADN fágico aislado fue sometido a una digestión con la endonucleasa de restricción *Eco*R I a una concentración final de 0.5 unidad/µl. La reacción se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C en un medio conteniendo Tris-acetato 25 mM (pH 7,8), KAc 100 mM, acetato de magnesio 10 mM y DTT 1 mM. El vector plasmídico pUC119 fue tratado de la misma manera. Una vez separado el inserto del genoma del fago mediante electroforesis en gel de agarosa 1% de bajo punto de fusión, se realizó una extracción fenólica y posterior precipitación del ADN con etanol absoluto y NaAc 3 M (pH 5,6). A continuación, los productos de digestión fueron sometidos a una reacción de ligación con

la enzima ligasa del fago T4 en presencia del vector. La mezcla de reacción contenía Tris-HCl (pH 7,8) 30 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 10 mM y ATP 1 mM. La reacción se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C en un volumen final de 10 µl. De esta forma, se obtuvieron construcciones aptas para la transformación de bacterias.

VII.5.ii. Transformación de bacteria con ADN plasmídico

Se realizó una transformación de *E. coli* DH5α con el plásmido pUC119 recombinante (pUC119/CaBP) obtenido según se describió anteriormente, por el método del $CaCl_2$ (Sambrook J. et al. 1989). Se cultivaron células de la cepa DH5α en caldo LB hasta saturación del cultivo. Se realizó una dilución 1/100 de este cultivo en medio LB fresco y se creció hasta el comienzo de la fase logarítmica. Una vez alcanzado este grado de crecimiento, las células se cosecharon por centriugación durante 5 minutos a 4.000 x g y se resuspendieron en 500 µl de solución I de transformación. Las células fueron centrifugadas 5 minutos a 4.000 x g y el sedimento fue resuspendido en 500 µl de solución II de transformación. Luego de incubarse en hielo por 15 minutos y centrifugarse 5 minutos a 4.000 x g, fueron resuspendidas en 100 µl de la misma solución. A estas células ya competentes, se les agregó el producto de la ligación, y la mezcla se incubó en baño de hielo durante 1 hora. Posteriormente, la mezcla fue sometida a un golpe térmico por incubación a 42°C durante 1 minuto, e inmediatamente después se le agregó 1 ml de LB y se incubó 1 hora a 37°C. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 4.000 x g durante 5 minutos, resuspendidas en 200 µl de LB y diseminadas en placas de Petri con medio LB-agar 2% con 100 µg/ml del antibiótico carbenicilina, X-gal 0,006% e IPTG 0,3 mM. Las placas de Petri fueron incubadas durante toda la noche a 37°C. Se identificaron y aislaron las colonias transformadas con el plásmido contendiendo fragmentos de ADN de *T. cruzi* por ser aquellas capaces de crecer en estas condiciones y, además, por ser blancas. Éstas fueron aisladas y cultivadas en medio LB con carbenicilina.

VII.5.iii. Secuenciación del fragmento de ADN clonado

Para determinar la secuencia del inserto, se utilizó la técnica de terminación aleatoria de la síntesis de cadena de ADN (Sanger F. et al. (1977). Para esto se utilizó un *kit* de secuenciación (Promega, EE.UU.). Los *primers* utilizados para la reacción consistieron en las secuencias universales directa y reversa compatibles con el vector, provistas junto con los demás reactivos para secuenciación. La detección de los productos de reacción se realizó a través de la emisión radioactiva (emisión β) por el isótopo P^{32} en la posición α de moléculas de ATP (Dupont, EE. UU.) incorporadas al azar durante el proceso de síntesis de las cadenas de ADN. Los fragmentos de ADN sintetizados en estas condiciones fueron resueltos en un gel de poliacrilamida 6% en presencia de urea 8 M en solución *buffer* TBE 1X. La mezcla para la preparación del gel fue filtrada y polimerizada mediante el agregado de 33 µl de TEMED y 166 µl de persulfato de amonio 10%. El gel fue corrido en *buffer* TBE ½ x a 2.000 V, luego de una precorrida de 1 hora en las mismas condiciones. Una vez finalizada la corrida, el gel fue colocado sobre papel Whatmann 3MM, cubierto con papel de nylon y secado al vacío. Finalmente, fue expuesto contra una película radiográfica con pantalla intensificadora a -70°C durante toda la noche.

VII.6. Análisis de las secuencias

Las secuencias de ADN obtenidas en el presente trabajo fueron analizadas con los programas de bioinformática del GenBank disponibles por Internet en la página WEB de la *National Library of Medicine* dependiente del *National Institutes of Health* (*WEB site: http://www.nih.ncbi.nlm.gov/*) y con el paquete informático DNAStar versión 3.8.

RESULTADOS:

I. Caracterización de la Fracción Fenólica de Glicoproteínas de Membranas (PFMG) búsqueda y caracterización de sus antígenos constituyentes en una biblioteca de expresión

En trabajos previos, Marcipar y col. describieron la obtención de un antígeno glicoproteico complejo de *T. cruzi* mediante el uso de un agente caotrópico (diiodo salicilato de litio) para desestabilizar las estructuras de membranas, y una extracción fenólica de las glicoproteínas (Marcipar A. J. et al. 1982). Dicho protocolo fue reproducido en nuestro laboratorio con algunas modificaciones con el objeto de estudiar la posible participación de los componentes de la fracción así obtenida en el proceso de invasión parasitaria a las células del huésped.

Se prepararon dos lotes de la PFMG para ser utilizados en el presente trabajo. Con el objeto de evaluar la composición del antígeno obtenido, se efectuó una electroforesis en gel de poliacrilamida 12 % en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol (SDS-PAGE) (figura 1). Para la visualización de las bandas, se sometió el gel a una tinción con azul de Coomassie. En los dos lotes analizados, se observaron cinco bandas mayoritarias de pesos moleculares correspondientes a 78, 61-65, 48, 33 and 26 kD. El antígeno predominante de esta fracción corrió como una banda particularmente difusa con un peso molecular aparente de 61-65 kDa.

Con el objeto de realizar estudios funcionales e identificar componentes de esta fracción, se prepararon sueros con 2 conejos inoculando la PFMG. Los sueros obtenidos fueron titulados por ELISA en microplacas. El máximo valor de título obtenido fue de 400.000 para ambos conejos, y para el caso del suero obtenido a partir de la 2da. extracción de sangre post inoculación.

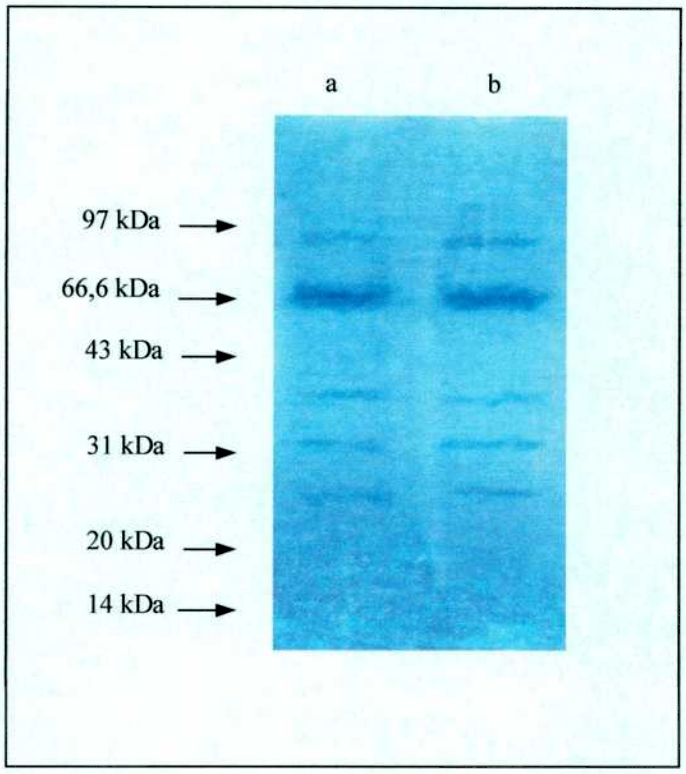


Fig.1: Electroforesis SDS-PAGE 12% del antígeno FGGM y tinción del gel con Azul de Coomassie. Calles **a** y **b:** dos preparaciones de FGGM obtenidas según Materiales y Métodos.

A partir de los sueros, se procedió a evaluar el patrón de reconocimiento de antígenos que estos presentaban sobre homogenatos totales (HT) de epimastigotes. Dado que esta fracción es rica en glicoproteínas de membrana del parásito, se evaluó además las eventuales diferencias en el patrón de reconocimiento de los antígenos correspondientes a la fracción glicoproteica nativa o sometida a un tratamiento deglicosilante. Se desarrollaron los experimentos de western blot sobre los antígenos parasitarios tratados o no químicamente para eliminar o conservar los residuos glucídicos. En ambos casos se observó un patrón de bandas similar: una banda dominante de 35-53 kDa, una muy tenue de 28-33 kDa y un complejo de bandas tenues y difusas de 61-65 kDa (figura 2).

Estos resultados indicarían que las regiones glucídicas de las glicoproteínas contenidas en esta fracción no contribuyen en forma significativa a la antigenicidad de la misma en los conejos. La comparación del patrón de bandas reveladas por el suero anti-PFMG muestra que si bien los valores de pesos moleculares no son concordantes en todos los casos con los observados para las corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida, el patrón correspondiente al antígeno mayoritario observado en los geles es coincidente con el reconocido por los sueros.

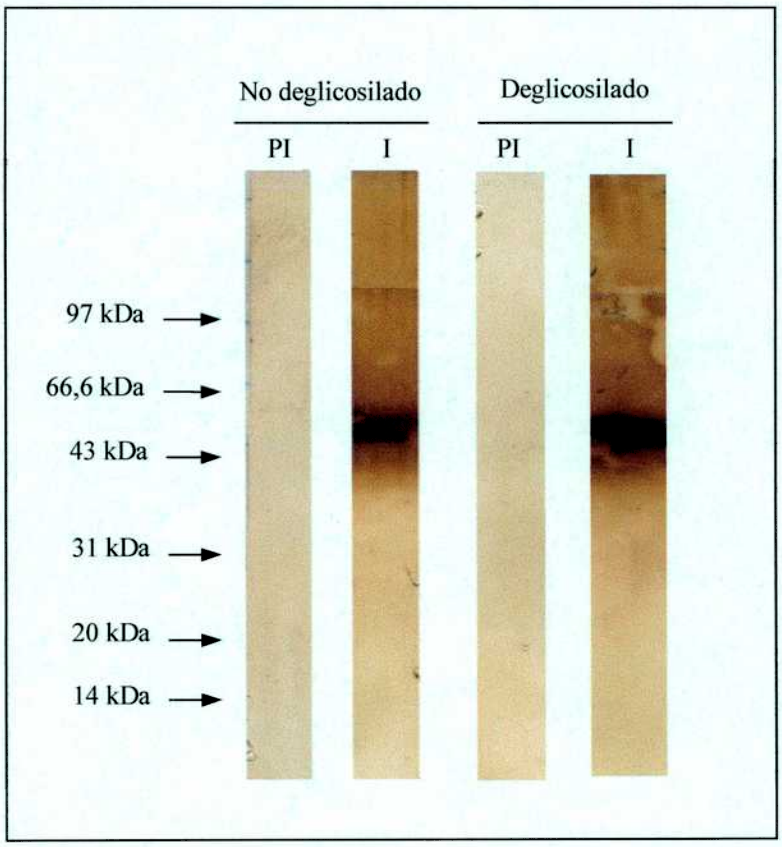


Fig. 2: Evaluación de los sueros obtenidos por western blot contra lisados de epimastigotes. Dos de las membranas fueron sometidas a una deglicosilación química (deglicosilado); mientras que en las otras dos se preservaron las estructuras glucídicas (no deglicosilado); **PI:** suero preinmune de conejo; **I:** Suero inmune de conejo.

En vistas a evaluar la posible participación de componentes de la PFMG en el proceso de infección celular en el huésped mamífero, resultó necesario estudiar el reconocimiento de antígenos por el suero en al menos un estadío infectivo del parásito. Se evaluó en el estadío tripomastigote. Para ello, se comparó por la técnica de western blot (proveniente de una corrida electroforética SDS-PAGE 12%) el patrón de bandas de los sueros frente a lisados de epimastigotes respecto de aquel para tripomastigotes de *T. cruzi*.

En este ensayo, los patrones de bandas para ambos estadíos del parásito fueron diferentes. En ambos casos, el suero reaccionó con un antígeno mayoritario, que se presentó como una banda difusa en el rango de 42 a 54 kDa de peso molecular. En el caso del HT de epimastigotes, se observó una banda adicional correspondiente a un antígeno de 30-37 kDa (figura 3).

Las diferencias observadas en las corridas de HT de epimastigotes respecto de los patrones descriptos en experimentos anteriores (figura 2) son atribuibles a las glicosilaciones, ya que conforman una zona heterogénea de la molécula y pueden ser una fuente de variabilidad en las corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Para confirmar la localización en la membrana de al menos algunos de los componentes de la PFMG, se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia indirecta. Se observó para todos los estadíos parasitarios evaluados una fuerte marcación de las estructuras de membrana tanto a nivel superficial como intracelular (figura 4). Las regiones marcadas abarcan prácticamente todo el cuerpo del parásito, incluyendo el flagelo. Esto indica que, al menos algunas de las glicoproteínas obtenidas, están dispersas en forma inespecífica sobre la superficie del parásito.

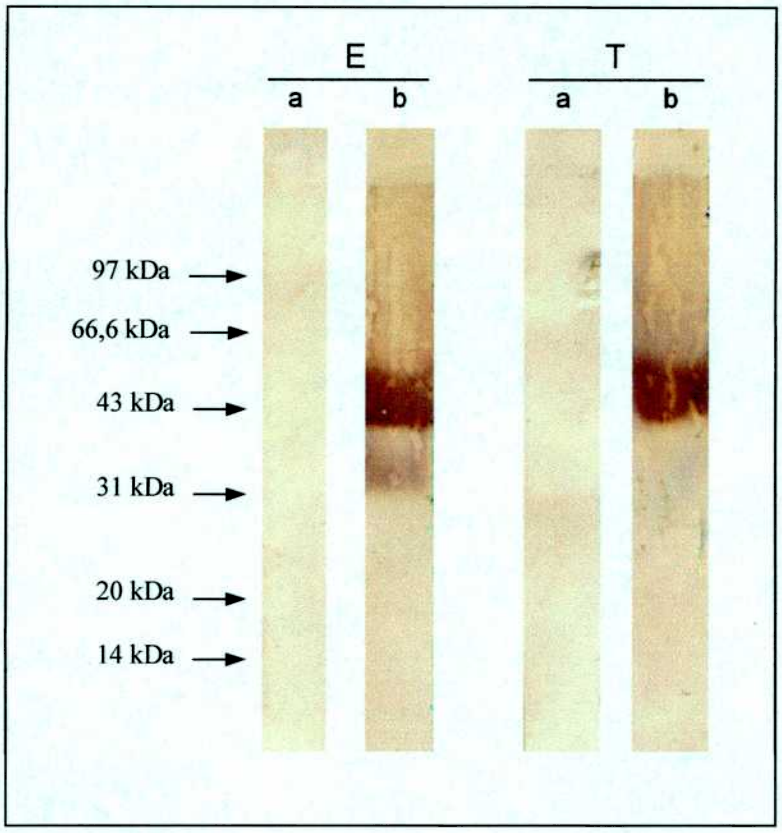
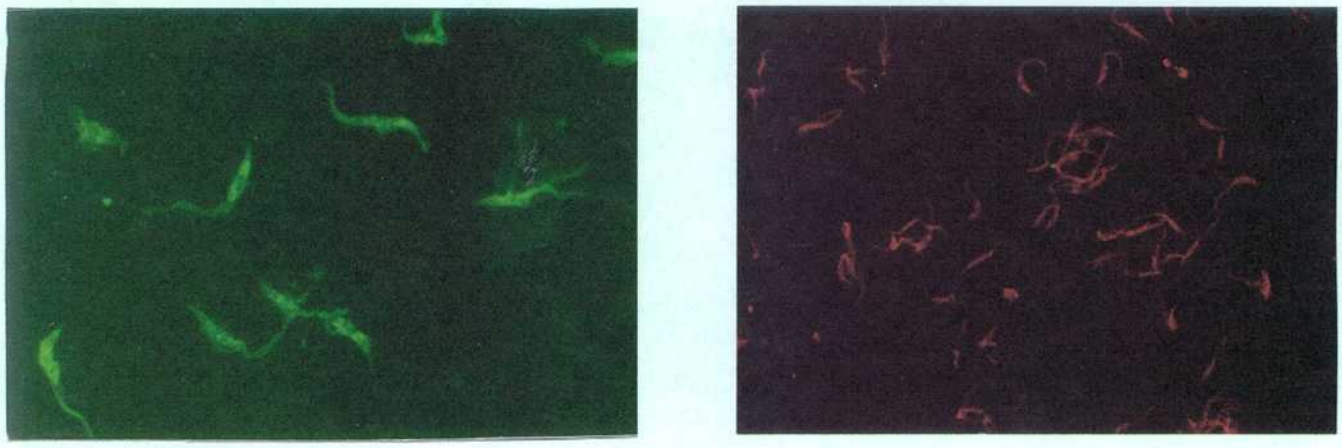


Fig. 3: Comparación por western blot del reconocimiento del suero anti-FGT de antígenos de epimastigotes **(E)** y tripomastigotes **(T)** utilizando: **a)** sueros preinmunes 1/4.000; **b)** sueros anti-FGT 1/4.000.

Para evaluar la posible participación de los componentes de la PFMG en el proceso de infección del huésped, se llevó a cabo un ensayo de inhibición de la penetración de *T. cruzi* a cultivo de células.

a)

I PI



b)

I PI

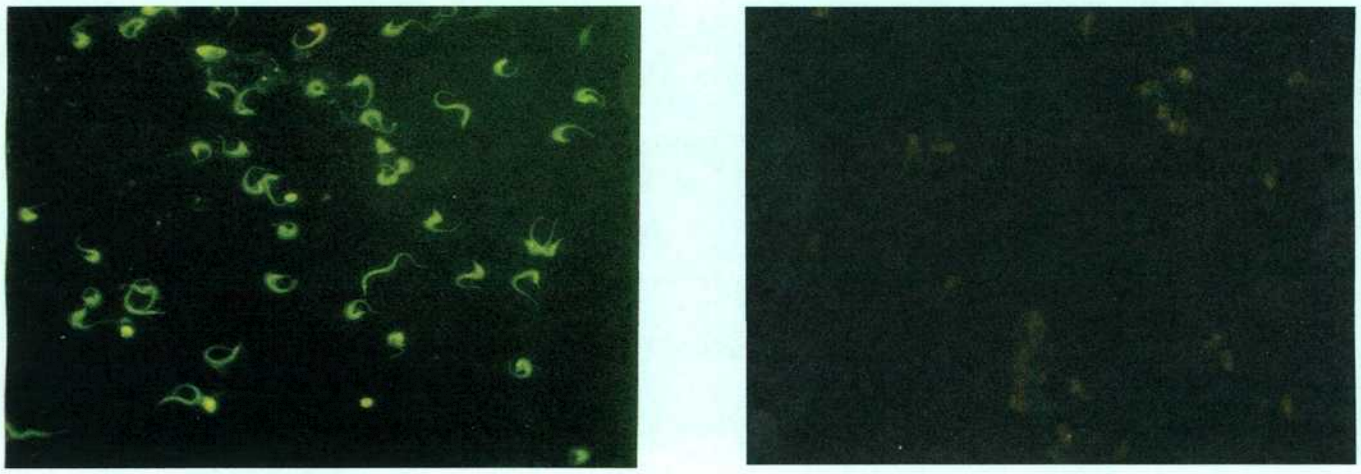


Fig. 4: Determinación por IFI de la localización subcelular de las proteínas constituyentes de la fracción fenólica de glicoproteínas de membrana (PFMG). Se utlizaron epimastigotes fijados **(a)** y una mezcla de tripomastigotes y amastigotes fijados **(b)**, los que fueron enfrentados a suero preinmune dilución 1/200 **(PI)** y suero anti-PFMG 1/200 **(I)**.

Las células de la línea LLC-MK2 fueron infectadas con tripomastigotes provenientes de cultivos celulares en presencia del suero inmune anti PFMG o del suero preinmune como control. Las condiciones del experimento fueron tales que se dejó evolucionar al sistema hasta que los tripomastigotes pudieran diferenciarse a amastigotes intracelulares pero no replicar. De esta forma pudo realizarse un recuento de amastigotes intracelulares, que fueron representativos de los tripomastigotes que pudieron ingresar. Se observó una inhibición del 73 % de la invasión celular de los parásitos tratados con el suero inmune respecto de los tratados con el suero preinmune (figura 5).

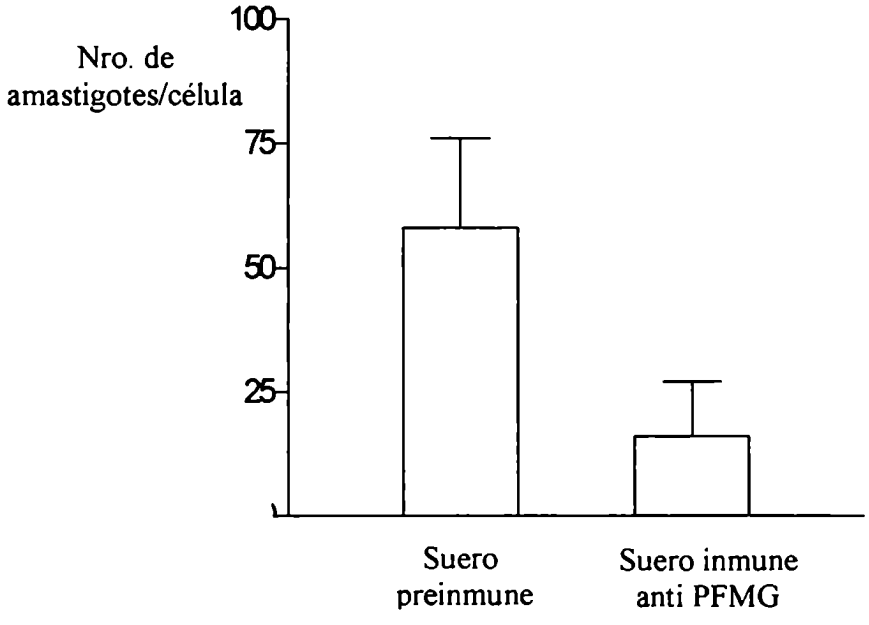


Fig. 5: Determinación del grado de inhibición de la penetración de tripomastigotes de *T. cruzi* a células LLC-MK2 en presencia de sueros de conejos inmunizados contra la PFMG o de sueros preinmunes.

Dado que la PFMG mostró contener componentes involucrados en la invasión celular en las fases de reconocimiento o internalización, se decidió realizar una búsqueda de

proteínas recombinantes en una biblioteca de ADN copia de tripomastigotes de *T. cruzi*. Como sonda se decidió utilizar una mezcla de los dos sueros preparados contra la PFMG, previa adsorción contra antígenos bacterianos y del fago, para minimizar la probabilidad de obtención de falsas señales.

Para realizar una búsqueda en una biblioteca de expresión construida en fago λ gt11, el ensayo a ser empleado debe presentar una alta sensibilidad (en términos de la cantidad límite de antígeno a ser detectado) en las condiciones de trabajo en que se llevará a cabo. La máxima cantidad de proteína recombinante que puede expresar este vector como fago realizando un ciclo lítico varía entre 10 y 100 ng por placa de lisis. Se tituló el suero trabajando sobre nitrocelulosa como matriz de inmovilización de antígenos, dado que sobre este material se realizarían los ensayos de inmuno-reconocimiento y utilizando homogenato total de *T. cruzi* como antígeno. Se evaluó en estas condiciones las cantidades límites de antígeno (no deglicosilado y deglicosilado) y suero que permitirían observar una señal positiva. Para ello, se realizó una titulación por dot blot utilizando antígeno nativo y antígeno sometido a tratamiento deglicosilante, en distintas cantidades. El título del suero determinado por esta técnica con 10 ng de antígeno sembrado, con y sin tratamiento deglicosilante, resultó ser 3.200.

Luego de sucesivos procesos de búsqueda en la biblioteca de expresión, se obtuvo una señal positiva sobre la impronta de una placa de lisis en una membrana de nitrocelulosa. Se ensayaron aproximadamente $5x10^5$ placas de lisis. Se identificó sobre la caja de Petri la placa de lisis productora de la proteína recombinante reconocida por el suero. El material de esta placa de lisis fue recuperado y replaqueado con el fin de confirmar la reacción y purificar el fago recombinante detectado. En cada evento de plaqueo, los fagos recuperados a partir de una placa de lisis aislada correspondiente a una señal positiva en la membrana, fueron utilizados para un nuevo ciclo de infección de bacterias, plaqueo, expresión de proteína recombinante y reacción inmunoquímica con el antisuero. Se efectuaron 6 ciclos hasta la obtención de un 100 % de placas de lisis positivas.

Para conocer algunas características de la proteína nativa correspondiente a la proteína clonada, se purificaron por inmunoafinidad a partir del suero anti-PFMG anticuerpos específicos contra la proteína recombinante. Con estos anticuerpos, mediante western blot proveniente de una corrida eletroforética SDS-PAGE 12% de un lisado total de epimastigotes y tripomastigotes, se determinó el peso molecular aparente del antígeno nativo que se correspondía con la proteína recombinante. Para ambos estadíos se observaron dos bandas de 29 y 31 kDa de peso molecular aparente (figura 6).

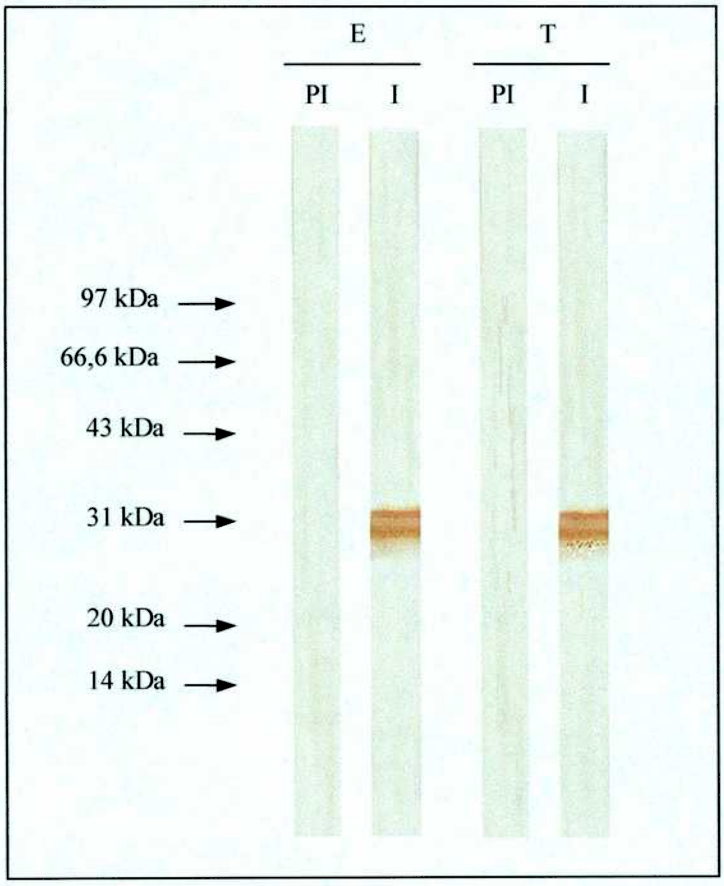
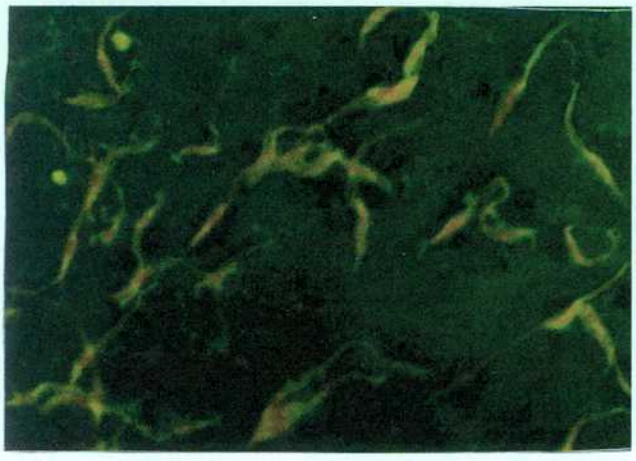


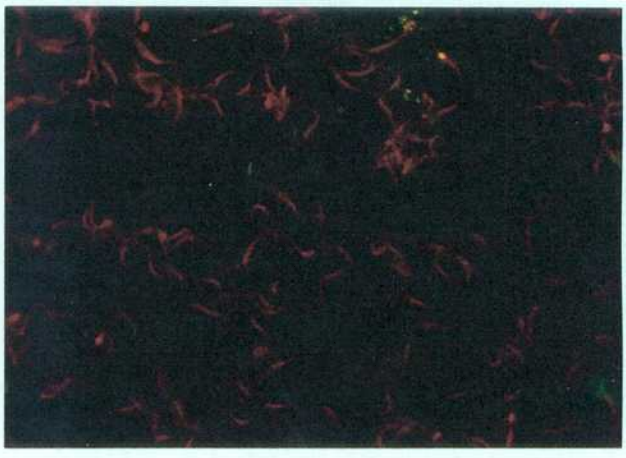
Fig. 6: Determinación del PM de la proteína nativa en epimastigotes de *T. cruzi* por western blot utilizando anticuerpos que reconocen a la proteína recombinante expresada por el clon obtenido. **PI:** anticuerpos purificados a partir de un suero preinmune que reconocen a la proteína recombinante. **I:** anticuerpos purificados a partir de un suero inmune que reconocen a la proteína recombinante. **E:** Epimastigotes. **T:** Tripomastigotes.

a)

I

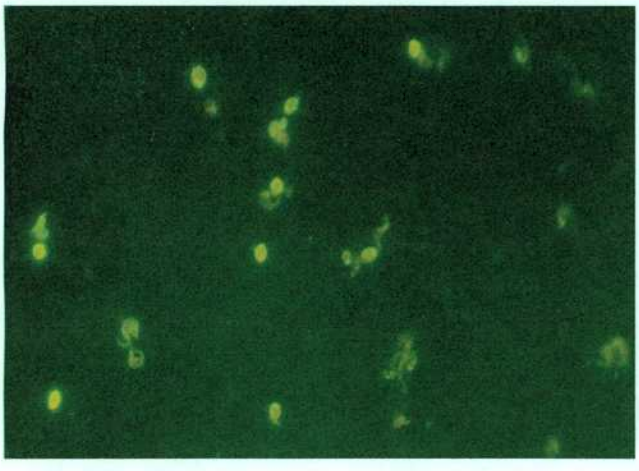


PI



b)

I



PI

Fig. 4: Determinación por IFI de la localización subcelular de la proteína del *T. cruzi* correspondiente a la proteína recombinante clonada. Se utlizaron epimastigotes fijados **(a)** y una mezcla de tripomastigotes y amastigotes fijados **(b)**, los que fueron enfrentados a anticuerpos purificados por inmunoafinidad sobre la proteína recombinante a partir de suero preinmune **(PI)** y suero anti-PFMG **(I)**.

Para determinar la localización subcelular de la proteína nativa correspondiente al antígeno recombinante obtenido en los estadíos epimastigote, tripomastigote y amastigote de cultivo del parásito, se realizó una inmunofluorescencia indirecta (IFI). Para ello, se fijaron parásitos permeabilizados, los que fueron posteriormente incubados con anticuerpos purificados sobre la proteína recombinante de *T. cruzi* a partir de suero anti-PFMG o suero preinmune de conejo.

Se observó que en el caso de los anticuerpos provenientes del suero preinmune sólo hubo una tenue tinción con el colorante usado como contraste, mientras que para las zonas reconocidas por los anticuerpos provenientes del suero anti-PFMG correspondieron fundamentalmente a estructuras del interior del cuerpo celular del parásito y al flagelo, aún en el estadío amastigote, en que éste ese presenta como una estructura pobremente desarrollada (figura 7).

Con el objeto de determinar si la proteína clonada correspondía a un componente de la PFMG involucrado en la invasión celular, se decidió evaluar la capacidad de anticuerpos específicos de bloquear la invasión parasitaria en cultivos celulares. Estos anticuerpos mostraron una capacidad inhibitoria de la penetración de los tripomastigotes de *T. cruzi* a células en cultivo de un 54%, lo cual resultó estadísticamente significativo (figura 8).

Para identificar a la proteína cuyo ADN había sido clonado, se decidió subclonar el inserto de fago λ en un vector plasmídico. Se procedió a su escición con la endonucleasa de restricción *Eco*R I. Esto permitió estudiar el tamaño del ADN codificante para la proteína recombinante. El producto de la digestión fue corrido electroforéticamente en un gel de agarosa 1%. El tamaño del fragmento estimado a partir del gel teñido con bromuro de etidio fue de aproximadamente 850 pb.

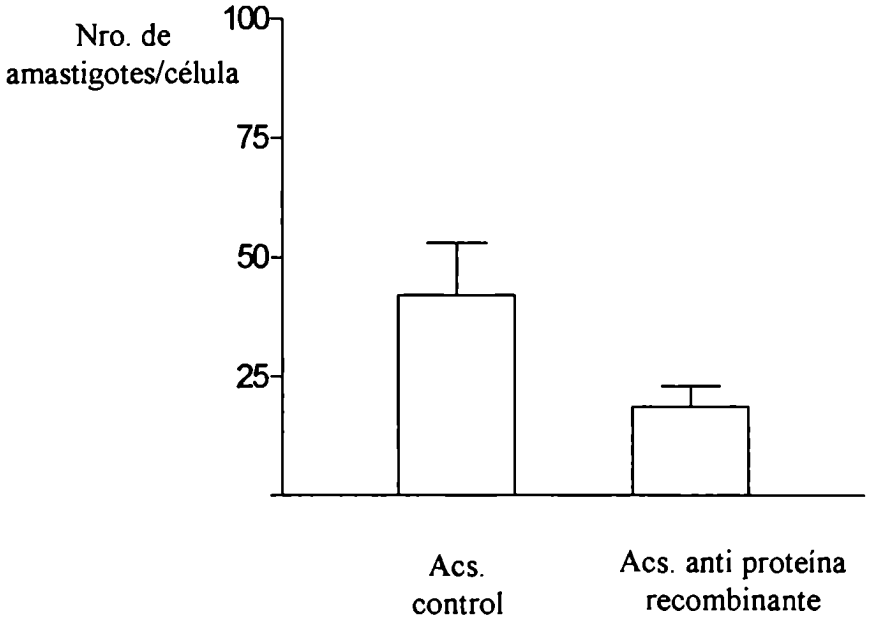


Fig. 8: Determinación del grado de inhibición de la penetración de tripomastigotes de *T. cruzi* a células LLC-MK2 en presencia de anticuerpos purificados por inmunoafinidad a partir de sueros de conejos inmunizados contra la PFMG (Acs. anti proteína recombinante) o de sueros preinmunes (Acs. control).

El inserto obtenido por digestión enzimática fue separado del resto del ADN genómico del fago mediante una corrida electroforética en gel de agarosa de bajo punto de fusión. Luego de ser recuperado del gel, fue insertado en el sitio de policlonado del plásmido pUC119. Luego de hacer una transformación bacteriana, una selección de las transformantes positivas para el inserto y un cultivo de las mismas, se hicieron minipreparaciones plasmídicas. Los plásmidos fueron digeridos con la enzima *Eco*R I y la presencia del ADN inserto fue confirmada por corrida electroforética en gel de agarosa 1,5% (figura 9).

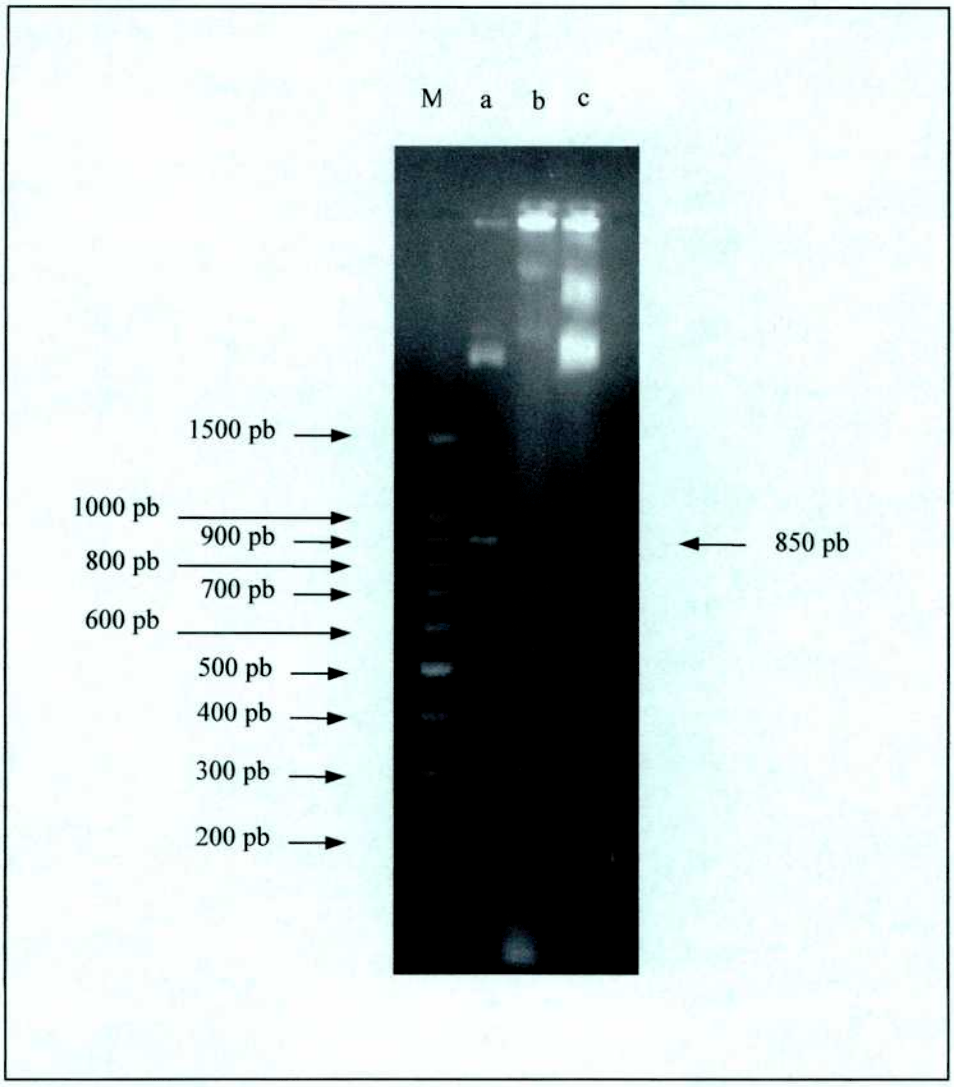


Fig. 9: Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Calles: **M:** marcadores de tamaño de fragmento; **a:** plásmido recombinante (pUC119/CaBP) digerido con *Eco*R I; **b:** plásmido recombinante (pUC119/CaBP); **c:** plásmido pUC119 sin inserto. A la derecha de la foto se marca la posición y el tamaño del fragmento escindido con *Eco*R I.

Se compararon las bandas de migración entre la calle sembrada con el plásmido ligado, y la calle sembrada con plásmido ligado y luego tratado con la enzima de restricción

*Eco*R I. En la primera calle se observó una única banda, correspondiente aproximadamente al tamaño del plásmido. En la segunda calle se visualizaron dos bandas: una de 3kpb y otra de 850 pb, aproximadamente. Ambas bandas corresponderían a los tamaños del ADN del plásmido y del fragmento de interés, respectivamente.

El fragmento de ADN subclonado en el vector pUC119 fue parcialmente secuenciado mediante la reacción de terminación aleatoria de la síntesis de cadena (método de Sanger) desde ambos extremos. Las lecturas obtenidas de los geles de secuencia fueron utilizadas para hacer una búsqueda de homologías en la base de datos (GenBank) del National Institute of Health (figura 10). De acuerdo a la información obtenida, el fragmento secuenciado desde el extremo 5' es altamente homólogo con la región 5´ de las secuencias reportadas para una familia de moléculas de localización preferentemente flagelar o de la membrana del bolsillo flagelar con capacidad de ligar calcio llamadas genéricamente calflaginas. El fragmento secuenciado presenta un 100 % de homología con el antígeno de 24 kDa de *T. cruzi* (24-kDa Ag) (N° Acc. S43664), la proteína ligante de calcio F29 (N° Acc. Z54793) y la proteína de unión a calcio de *T. cruzi* FCaBP-PBol (N° Acc. L26971). Se ha observado también una homología del 99% con los genes codificantes para la proteína 1F8 (CaBP 1F8) (N° Acc. X02838), la proteína flagelar de unión a calcio de 24 kDa (N° Acc. U70035) y la proteína de unión a calcio de *T. cruzi* de la cepa Y (N° Acc. D87512). Además de los porcentajes de homología obtenidos con las proteínas ligantes de calcio de *T. cruzi*, se encontró un considerable grado de coincidencia en la secuencia nucleotídica de la región 5' con una proteína funcional y estructuralmente relacionada de *Trypanosoma rangeli* (TrCBP) (N° Acc. Z54192), un protozoario filogenéticamente relacionado con *T. cruzi*.

Por otro lado, la secuencia determinada a partir del extremo 3' presenta alta homología con las secuencias reportadas para las regiones 3' no codificantes de los genes del antígeno 1F8 (CaBP 1F8) (X02838) (95% de homología), de la proteína flagelar de unión a calcio de 24 kDa (U70035) (94% de homología) y de la proteína de unión a calcio de *T. cruzi* FCaBP-PBol (L26971) (94% de homología).

```
                AAGGAGAGCAACGAGATGGGTGCTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGA
                         10        20        30        40        50
1F8.SEQ         AAGGAGAGCAACGAGATGGGTGCTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGA  50
24AG.SEQ        AAGGAGAGCAACGAGATGGGTGCTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGA  50
24FLAG.SEQ      AAGGAGAGCAACGAGATGGGTGCTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGA  50
CBPY.SEQ        AAGGAGAGCAACGAGATGGGTGGTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGA  50
CLONA.SEQ       AAGGAGAGCAACGAGATGGGTGCTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGA  50
F29.SEQ         AAGGAGAGCAACGAGATGGGTGCTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGA  50
PBOL.SEQ        AAGGAGAGCAACGAGATGGGTGCTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGA  50

                CAAGGGGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAACGCCAAGGACCGCAAGG
                         60        70        80        90       100
1F8.SEQ         CAAGGGGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAAGGCCAAGGACCGCAAGG  100
24AG.SEQ        CAAGGGGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAACGCCAAGGACCGCAAGG  100
24FLAG.SEQ      CAAGGGGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAACGCCAAGGACCGCAAGG  100
CBPY.SEQ        CAAGGGGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAACGCCAAGGACCGCAAGG  100
CLONA.SEQ       CAAGGGGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAACGCCAAGGACCGCAAGG  100
F29.SEQ         CAAGGGGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAACGCCAAGGACCGCAAGG  100
PBOL.SEQ        CAAGGGGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAACGCCAAGGACCGCAAGG  100

                AAGCGTGGGAGCGCATTCGCCAGGCGATTCCTCGTGAGAAGACCGCCGAG
                        110       120       130       140       150
1F8.SEQ         AAGCGTGGGAGCGCATTCGCCAGGCGATTCCTCGTGAGAAGACCGCCGAG  150
24AG.SEQ        AAGCGTGGGAGCGCATTCGCCAGGCGATTCCTCGTGAGAAGACCGCCGAG  150
24FLAG.SEQ      AAGCGTGGGAGCCCATTCGCCAGGCGATTCCTCGTGAGAAGACCGCCGAG  150
CBPY.SEQ        AAGCGTGGGAGCGCATTCGCCAGGCGATTCCTCGTGAGAAGACCGCCGAG  150
CLONA.SEQ       AAGCGTGGGAGCGCATTCGCCAGGCGATTCCTCGTGAGAAGACCGCCGAG  150
F29.SEQ         AAGCGTGGGAGCGCATTCGCCAGGCGATTCCTCGTGAGAAGACCGCCGAG  150
PBOL.SEQ        AAGCGTGGGAGCGCATTCGCCAGGCGATTCCTCGTGAGAAGACCGCCGAG  150

                GCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCTTCAAGA
                        160       170       180
1F8.SEQ         GCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCTTCAAGA  181
24AG.SEQ        GCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCTTCAAGA  181
24FLAG.SEQ      GCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCTTCAAGA  181
CBPY.SEQ        GCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCTTCAAGA  181
CLONA.SEQ       GCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCTTCAAGA  181
F29.SEQ         GCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCTTCAAGA  181
PBOL.SEQ        GCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCTTCAAGA  181
```

Fig. 10 a: Alineación de la secuencia nucleotídica de la cadena codificante del clon A para la región 5′ (181 bases). Se observa un 100% de homología para las secuencias correspondientes a las proteínas de *T. cruzi* 24-kDa Ag (24Ag), la proteína ligante de calcio F29 (F29) y FCaBP-PBol (PBol). También se encontró un 99% de homología con las proteínas de *T. cruzi* CaBP 1F8 (1F8), la proteína flagelar de unión a calcio de 24 kDa (24Flag) y la proteína de unión a calcio de *T. cruzi* de la cepa Y (CaBPY). Las bases señaladas en la posición 16-18 indican el codón de iniciación de la traducción.

```
                CGGCCGCAGAGTGACGTGCCCGCGCCGTTGCCAATGTAAA
                         10        20        30        40
1F8.SEQ         CGGCCGCAGAGTGACGTGCCCGCGCCGTTGCCAATGTAAA  40
24FLAG.SEQ      CGGCCGCAGAGTGACGTGCCCGCGCCGTCGCCAATGTAAA  40
CLONA.SEQ       CGGCCGCAGAGTGACGTTCCCGC-TCGTTGCCAATGTAAA  39
PBOL.SEQ        CGGCCGCAGAGTGACGTGCCCGCGCCGTCGCCAATGTAAA  40

                CACCGTGTCCGCATGCGGCGGGGCACTTGTTTTTGCTGGG
                         50        60        70        80
1F8.SEQ         CACCGTGTCCGCATGCGGCGAGGCACTTGTTTTTGCTGGG  80
24FLAG.SEQ      CACCGTGTCCGCATGCGGCGGGGCACCTGTTTTTGCTGGG  80
CLONA.SEQ       CACCGTGTCCGCATTCGGCGGGGCACTTGTTTTTGCTGGG  79
PBOL.SEQ        CACCGTGTCCGCATGCGGCGGGGCACCTGTTTTTGCTGGG  80

                CGGAGCACATTCTCCACTTTATGTAGTTGATGGT
                         90       100       110
1F8.SEQ         CGGAGCACATTCTCCACTTTATGTAGTTGATGGT        114
24FLAG.SEQ      CGGAGCACATTCTCCACTTTATGTAGTTGATGGT        114
CLONA.SEQ       CGGAGCACATTCTCCACTTTATGTAGTTGATGGT        113
PBOL.SEQ        CGGAGCACATTCTCCACTTTATGTAGTTGATGGT        114
```

Fig. 10 b: Secuencia nucleotídica determinada para la región 3' (118 bases) de la cadena codificante del fragmento clonado. Se encontró un 95% de homología con la proteína CaBP 1F8 (1F8), y 94% con la proteína flagelar de unión a calcio de 24 kDa (24Flag) y FCaBP-PBol (PBol) de *T. cruzi*.

Las regiones codificantes de las secuencias correspondientes a las calflaginas del *T. cruzi* (que presentaron un alto grado de homología con la secuencia 5' obtenida de la proteína clonada) fueron alineadas y comparadas entre sí. Las regiones codificantes resultaron altamente homólogas. A partir de esta información, se obtuvo una secuencia consenso (Fig. 11 a). La traducción de esta secuencia consenso a una secuencia aminoacídica permitió observar la presencia de cuatro motivos posibles de unión a Ca^{2+} de tipo "brazos EF" (Fig. 11 b). La mayor divergencia encontrada entre las secuencias completas codificantes para las calflaginas de *T. cruzi* fue del 1,7 %, observada para el caso de las proteínas F29 y CaBP 1F8 (Tabla I). Esto, así como el alto grado de homología de los extremos 5′ y 3′ del fragmento de ADN clonado en este estudio con todas las

secuencias evaluadas (más del 98 % en todos los casos), permite inferir que las estructuras de tipo "brazos EF" halladas para las calflaginas mediante el análisis de la secuencia primaria de aminoácidos estarían presentes en la proteína recombinante descripta en este estudio. En la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia nucleotídica consenso se resaltan las regiones correspondientes a los dominios de tipo "brazos EF". En la Fig. 11 b se muestra además de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia consenso de nucleótidos, la secuencia canónica correspondiente a estos dominios.

Finalmente, para evaluar la factibilidad de que esta proteína sea sometida a modificaciones postraduccionales como glicosilaciones, se construyó sobre la base de la secuencia consenso un gráfico del perfil de hidropaticidad (figura 11 c). Como se puede observar, la proteína codificada por estos genes es esencialmente hidrofílica, mostrando preferentemente cuatro dominios separados por pequeñas regiones hidrofóbicas. Las secuencias aminoacídicas blanco para potenciales N- glicosilaciones son blancos potenciales para las glicosil transferasas, ya que se encuentran en zonas potencialmente expuestas de la molécula.

```
                ATGGGTGCTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGACAAGG
                         10        20        30        40
1F8.SEQ         ATGGGTGCTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGACAAGG  40
24AG.SEQ        ATGGGTGCTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGACAAGG  40
24FLAG.SEQ      ATGGGTGCTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGACAAGG  40
CBPY.SEQ        ATGGGTGGTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGACAAGG  40
F29.SEQ         ATGGGTGCTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGACAAGG  40
PBOL.SEQ        ATGGGTGCTTGTGGGTCGAAGGGCTCGACGAGCGACAAGG  40

                GGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAACGCCAAGGACCG
                         50        60        70        80
1F8.SEQ         GGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAAGGCCAAGGACCG  80
24AG.SEQ        GGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAACGCCAAGGACCG  80
24FLAG.SEQ      GGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAACGCCAAGGACCG  80
CBPY.SEQ        GGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAACGCCAAGGACCG  80
F29.SEQ         GGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAACGCCAAGGACCG  80
PBOL.SEQ        GGTTGGCGAGCGATAAGGACGGCAAGAACGCCAAGGACCG  80

                CAAGGAAGCGTGGGAGCGCATTCGCCAGGCGATTCCTCGT
                         90       100       110       120
1F8.SEQ         CAAGGAAGCGTGGGAGCGCATTCGCCAGGCGATTCCTCGT  120
24AG.SEQ        CAAGGAAGCGTGGGAGCGCATTCGCCAGGCGATTCCTCGT  120
24FLAG.SEQ      CAAGGAAGCGTGGGAGCCCATTCGCCAGGCGATTCCTCGT  120
CBPY.SEQ        CAAGGAAGCGTGGGAGCGCATTCGCCAGGCGATTCCTCGT  120
F29.SEQ         CAAGGAAGCGTGGGAGCGCATTCGCCAGGCGATTCCTCGT  120
PBOL.SEQ        CAAGGAAGCGTGGGAGCGCATTCGCCAGGCGATTCCTCGT  120

                GAGAAGACCGCCGAGGCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCT
                        130       140       150       160
1F8.SEQ         GAGAAGACCGCCGAGGCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCT  160
24AG.SEQ        GAGAAGACCGCCGAGGCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCT  160
24FLAG.SEQ      GAGAAGACCGCCGAGGCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCT  160
CBPY.SEQ        GAGAAGACCGCCGAGGCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCT  160
F29.SEQ         GAGAAGACCGCCGAGGCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCT  160
PBOL.SEQ        GAGAAGACCGCCGAGGCAAAACAGCGCCGCATCGAGCTCT  160
```

Fig. 11: a) Obtención de una secuencia consenso a partir de las secuencias de las regiones codificantes de los genes de *T. cruzi* que muestran homología con la proteína recombinante descripta en este trabajo.

```
                TCAAGAAGTTCGACAAGAACGAGACCGGGAAGCTGTGCTA
                           170       180       190       200
1F8.SEQ         TCAAGAAGTTCGACAAGAACGAGACTGGGAAGCTGTGCTA  200
24AG.SEQ        TCAAGAAGTTCGACAAGAACGAGACTGGGAAGCTGTGCTA  200
24FLAG.SEQ      TCAAGAAGTTCGACAAGAACGAGACCGGGAAGCTGTGCTA  200
CBPY.SEQ        TCAAGAAGTTCGACAAGAACGAGACCGGGAAGCTGTGCTA  200
F29.SEQ         TCAAGAAGTTCGACAAGAACGAGACCGGGAAGCTGTGCTA  200
PBOL.SEQ        TCAAGAAGTTCGACAAGAACGAGACCGGGAAGCTGTGCTA  200

                CGATGAGGTGTACAGCGGCTGCCTCGAGGTGCTGAAGTTG
                           210       220       230       240
1F8.SEQ         CGATGAGGTGCACAGCGGCTGCCTCGAGGTGCTGAAGTTG  240
24AG.SEQ        CGATGAGGTGCACAGCGGCTGCCTCGAGGTGCTGAAGTTG  240
24FLAG.SEQ      CGATGAGGTGTACAGCGGCTGCCTCGAGGTGCTGAGGTTG  240
CBPY.SEQ        CGATGAGGTGCACAGCGGCTGCCTCGAGGTGCTGAAGTTG  240
F29.SEQ         CGATGAGGTGTACAGCGGCTGCCTCGAGGTGCTGAAGTTG  240
PBOL.SEQ        CGATGAGGTGTACAGCGGCTGCCTCGAGGTGCTGAAGTTG  240

                GACGAGTTCACGCCGCGAGTGCGCGACATCACGAAGCGTG
                           250       260       270       280
1F8.SEQ         GACGAGTTCACGCCGCGAGTGCGCGACATCACGAAGCGTG  280
24AG.SEQ        GACGAGTTCACGCCGCGAGTGCGCGACATCACGAAGCGTG  280
24FLAG.SEQ      GACGAGTTCACGTCGGGAGTGCGCGACATCACGAAGCGTG  280
CBPY.SEQ        GACGAGTTCACGCCGCGAGTGCGCGACATCACGAAGCGTG  280
F29.SEQ         GACGAGTTCACGCCGCGAGTGCGCGACATCACGAAGCGTG  280
PBOL.SEQ        GACGAGTTCACGTCGCGAGTGCGCGACATCACGAAGCGTG  280

                CATTCGACAAGGCGAGGGCCCTGGGCAGCAAGCTGGAGAA
                           290       300       310       320
1F8.SEQ         CGTTTGACAAGGCGAGGGCCCTGGGCAGCAAGCTGGAGAA  320
24AG.SEQ        CGTTCGACAAGGCGAGGGCCCTGGGCAGCAAGCTGGAGAA  320
24FLAG.SEQ      CATTCGACAAGGCGAGGGCCCTGGGCAGCAAGCTGGAGAA  320
CBPY.SEQ        CATTCGACAAGGCGAGGGCCCTGGGCAGCAAGCTGGAGAA  320
F29.SEQ         CATTCGACAAGGCGAGGGTTCTGGGCAGCAAGCTGGAGAA  320
PBOL.SEQ        CATTCGACAAGTCGAGGACCCTGGGCAGCAAGCTGGAGAA  320
```

Fig. 11: a) Obtención de una secuencia consenso a partir de las secuencias de las regiones codificantes de los genes de *T. cruzi* que muestran homología con la proteína recombinante descripta en este trabajo (continuación).

```
                CAAGGGCTCCGAGGACTTTGTTGAATTTCTGGAGTTCCGT
                         330       340       350       360
1F8.SEQ         CAAGGGCTCCGAGGACTTTGTTGAATTTCTGGAGTTCCGT  360
24AG.SEQ        CAAGGGCTCCGAGGACTTTGTTGAATTTCTGGAGTTCCGT  360
24FLAG.SEQ      CAAGGGCTCCGAGGACTTTGTTGAATTTCTGGAGTTCCGT  360
CBPY.SEQ        CAAGGGCTCCGAGGACTTTGTTGAATTTCTGGAGTTCCGT  360
F29.SEQ         CAAGGGCTCCGAGGACTTTGTTGAATTTCTGGAGTTCCGT  360
PBOL.SEQ        CAAGGGCTCCGAGGACTTTGTTGAATTTCTGGAGTTCCGT  360

                CTGATGCTGTGCTACATCTACGACTTCTTCGAGCTGACGG
                         370       380       390       400
1F8.SEQ         CTGATGCTGTGCTACATCTACGACTTCTTCGAGCTGACGG  400
24AG.SEQ        CTGATGCTGTGCTACATCTACGACTTCTTCGAGCTGACGG  400
24FLAG.SEQ      CTGATGCTGTGCTACATCTACGACTTCTTCGAGCTGACGG  400
CBPY.SEQ        CTGATGCTGTGCTACATCTACGACTTCTTCGAGCTGACGG  400
F29.SEQ         CTGATGCTGTGCTACATCTACGACTTCTTCGAGCTGACGG  400
PBOL.SEQ        CTGATGCTGTGCTACATCTACGACTTCTTCGAGCTGACGG  400

                TGATGTTCGACGAGATTGACGCCTCCGGCAACATGCTGGT
                         410       420       430       440
1F8.SEQ         TGATGTTCGACGAGATTGACGCCTCCGGCAACATGCTGGT  440
24AG.SEQ        TGATGTTCGACGAGATTGACGCCTCCGGCAACATGCTGGT  440
24FLAG.SEQ      TGATGTTCGACGAGATTGACGCCTCCGGCAACATGCTGGT  440
CBPY.SEQ        TGATGTTCGACGAGATTGACGCCTCCGGCAACATGCTGGT  440
F29.SEQ         TGATGTTCGACGAGATTGACGCCTCCGGCAACATGCTGGT  440
PBOL.SEQ        TGATGTTCGACGAGATTGACGCCTCCGGCAACATGCTGGT  440

                CGACGAGGAGGAGTTCAAGCGCGCCGTGCCCAAGCTTGAG
                         450       460       470       480
1F8.SEQ         CGACGAGGAGGAGCTCAAGCGCGCCGTGCCCAAGCTTGAG  480
24AG.SEQ        CGACGAGGAGGAGCTCAAGCGCGCCGTGCCCAAGCTTGAG  480
24FLAG.SEQ      CGACGAGGAGGAGTTCAAGCGCGCCGTGCCCAAGCTTGAG  480
CBPY.SEQ        CGACGAGGAGGAGTTCAAGCGCGCCGTGCCCAAGCTTGAG  480
F29.SEQ         CGACGAGGAGGAGTTCAAGCGCGCCGTGCCCAAGCTTGAG  480
PBOL.SEQ        CGACGAGGAGGAGTTCAAGCGCGCCGTGCCCAAGCTTGAG  480
```

Fig. 11: a) Obtención de una secuencia consenso a partir de las secuencias de las regiones codificantes de los genes de *T. cruzi* que muestran homología con la proteína recombinante descripta en este trabajo (continuación).

```
                GCGTGGGGCGCCAAGGTCGAGGATCCCGCGGCGCTGTTCA
                         490       500       510       520
1F8.SEQ         GCGTGGGGCGCCAAGGTCGAGGATCCCGCGGCGCTGTTCA  520
24AG.SEQ        GCGTGGGGCGCCAAGGTCGAGGATCCCGCGGCGCTGTTCA  520
24FLAG.SEQ      GCGTGGGGCGCCAAGGTCGAGGATCCCGCGGCGCTGTTCA  520
CBPY.SEQ        GCGTGGGGCGCCAAGGTCGAGGATCCCGCGGCGCTGTTCA  520
F29.SEQ         GCGTGGGGCGCCAAGGTCGAGGATCCCGCGGCGCTGTTCA  520
PBOL.SEQ        GCGTGGGGCGCCAAGGTCGAGGATCCCGCGGCGCTGTTCA  520

                AGGAGCTCGATAAGAACGGCACTGGGTCCGTGACGTTCGA
                         530       540       550       560
1F8.SEQ         AGGAGCTCGATAAGAACGGCACTGGGTCCGTGACGTTCGA  560
24AG.SEQ        AGGAGCTCGATAAGAACGGCACTGGGTCCGTGACGTTCGA  560
24FLAG.SEQ      AGGAGCTCGATAAGAACGGCACTGGGTCCGTGACGTTCGA  560
CBPY.SEQ        AGGAGCTCGATAAGAACGGCACTGGGTCCGTGACGTTCGA  560
F29.SEQ         AGGAGCTCGATAAGAACGGCACTGGGTCCGTGACGTTCGA  560
PBOL.SEQ        AGGAGCTCGATAAGAACGGCACTGGGTCCGTGACGTTCGA  560

                CGAGTTTGCTGCGTGGGCTTCTGCAGTCAAACTGGACGCC
                         570       580       590       600
1F8.SEQ         CGAGTTTGCTGCGTGGGCTTCTGCAGTCAAACTGGACGCC  600
24AG.SEQ        CGAGTTTGCTGCGTGGGCTTCTGCAGTCAAACTGGACGCC  600
24FLAG.SEQ      CGAGTTTGCTGCGTGGGCTTCTGCAGTCAAACTGGACGCC  600
CBPY.SEQ        CGAGTTTGCTGCGTGGGCTTCTGCAGTCAAACTGGACGCC  600
F29.SEQ         CGAGTTTGCTGCGTGGGCTTCTGCAGTCAAACTGGACGCC  600
PBOL.SEQ        CGAGTTTGCTGCGTGGGCTTCTGCAGTCAAACTGGACGCC  600

                GACGGCGACCCGGACAACGTGCCGGAGAGCGCGTGA
                         610       620       630
1F8.SEQ         GACGGCGACCCGGACAACGTGCCGGAGAGCGCGTGA      636
24AG.SEQ        GACGGCGACCCGGACAACGTGCCGGAGAGCGCGTGA      636
24FLAG.SEQ      GACGGCGACCCGGACAACGTGCCGGAGAGCGCGTGA      636
CBPY.SEQ        GACGGCGACCCGGATAACGTGCCGGAGAGCGCGTGA      636
F29.SEQ         GACGGCGACCCGGACAACGTGCCGGAGAAGGCTTGA      636
PBOL.SEQ        GACGGCGACCCGGACAACGTGCCGGAGAGCGCGTGA      636
```

Fig. 11: a) Obtención de una secuencia consenso a partir de las secuencias de las regiones codificantes de los genes de *T. cruzi* que muestran homología con la proteína recombinante descripta en este trabajo (continuación).

Tabla 1: análisis de los porcentajes de homología entre las distintas secuencias codificantes para las calflaginas de *T. cruzi*. Los valores por encima de la diagonal representan los porcentajes de homología. Los valores por debajo de la diagonal representan los porcentajes de divergencia.

% de Similitud

% de Divergencia

	1F8	24Ag	24FAg	CBPY	F29	CBP_{PBOL}
1F8		**99,7**	**98,4**	**98,9**	**98,3**	**98,6**
24Ag	**0,3**		**98,7**	**99,2**	**98,6**	**98,9**
24FAg	**1,6**	**1,3**		**98,9**	**98,6**	**99,2**
CBPY	**1,1**	**0,8**	**1,1**		**98,7**	**99,2**
F29	**1,7**	**1,4**	**1,4**	**1,3**		**98,7**
CBP_{PBOL}	**1,4**	**1,1**	**0,8**	**0,9**	**1,3**	

Vuelta

Hélice E — Hélice F

E n * * n n * * n X * Y * Z G -Y I -X * * -Z n * * n n * * n

MGACGSKGST SDKGLASDKD GKNAKDRKEA WERIRQAIPR EKTAEAKQRR IELFKKFDKN ETGKLCYDEV YSGCLEVLKL DEFTPRVRDI TKRAFDKARA LGSKLENKGS EDFVEFLEFR LMLCYIYDFF ELTVMFDEID ASGNMLVDEE EFKRAVPKLE AWGAKVEDPA ALFKELDKNG TGSVTFDEFA AWASAVKLDA DGDPDNVPES A

Fig. 11 **b**: Arriba: secuencia canónica para los motivos de tipo "brazos EF". Los símbolos corresponden a: n: cualquier aminoácido hidrofóbico, *: cualquier aminoácido, X, Y, Z, -X, -Y, -Z: cualquier aminoácido coordinante de Ca^{2+}, los cuales presentan un oxígeno en sus cadenas laterales. Abajo: secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos consenso de las regiones codificantes para las calflaginas de *T. cruzi*. En letras verdes se resaltan las regiones que conformarían los dominios de tipo "brazos EF". Subrayados, los sitios potenciales de N- glicosilaciones.

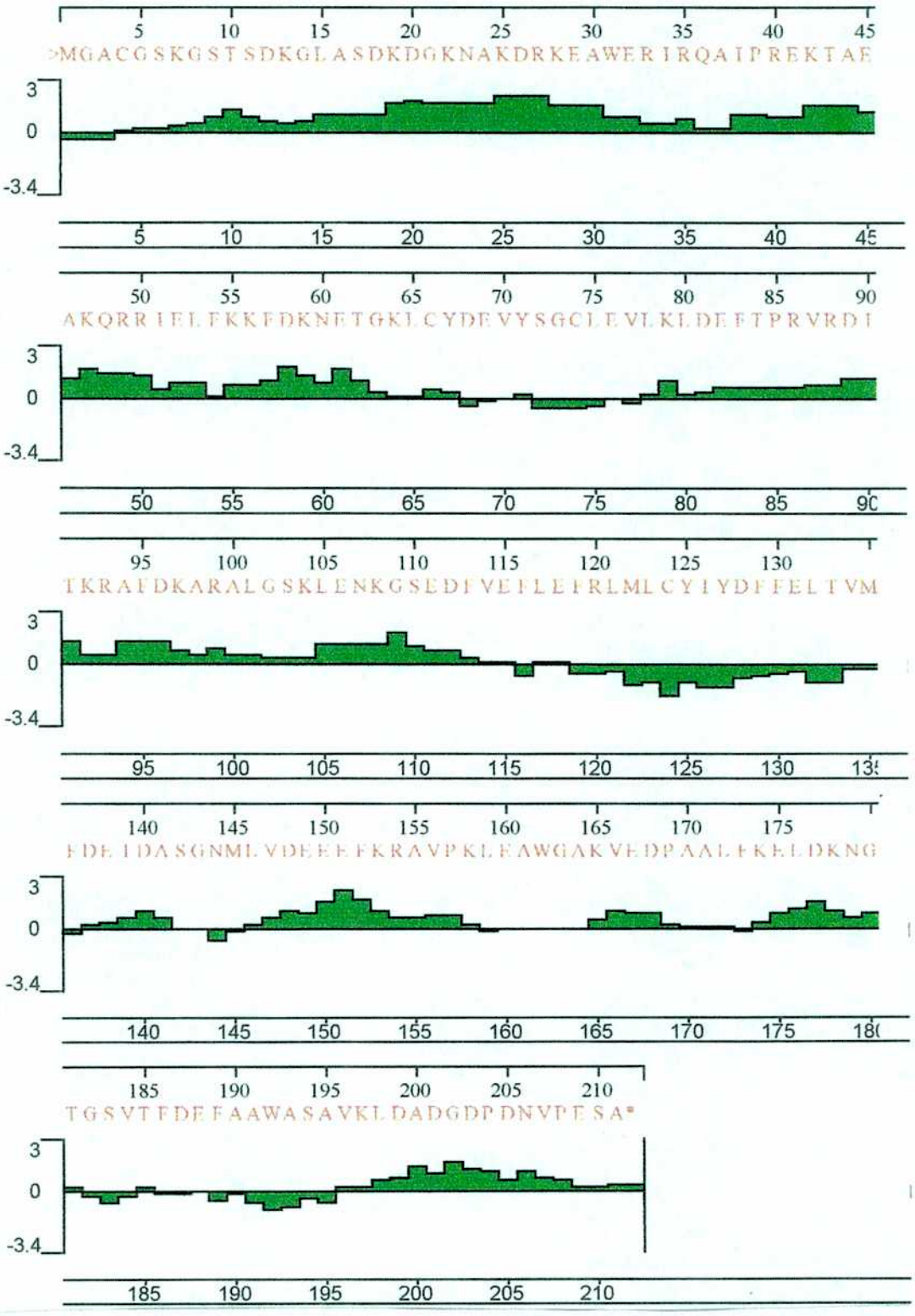


Fig. 11 c) Gráfico representando el perfil de hidropaticidad de una secuencia aminoacídica deducida a partir de la secuencia consenso obtenida anteriormente.

II. Búsqueda de una proteína de *Trypanosoma cruzi* de unión a galactosa

Con el fin de establecer un sistema que permita representar la interacción entre moléculas de superficie del parásito y de la membrana del huésped humano, se puso a punto un sistema descripto previamente (Marcipar A. J. et al. 1982) que permitiera obtener membranas celulares humanas estabilizadas. El modelo de membrana celular humana utilizado fue la membrana eritrocitaria dado que estas membranas al ser tratadas con neuraminidasa, exponen los residuos glucídicos subyacentes. Sobre esta base, se construyó una matriz que permitió la purificación de moléculas parasitarias mediante la interacción directa con componentes de superficie de las células del huésped humano.

La naturaleza de los residuos expuestos luego de este tratamiento está estrechamente relacionada con la naturaleza de los glicoconjugados que recubren a las membranas, mayoritariamente glicoproteínas de tipo híbrido o complejo, y glicolípidos. Entre estos últimos, son cuantitativamente importantes los antígenos determinantes de grupo sanguíneo presente en la superficie de estas células. En el caso de eritrocitos humanos de grupo "0", se ha observado la presencia de residuos galactosidados expuestos en la superficie de los mismos luego del proceso de desialidación. Esto se debe a que la desialidación de la de las glicoproteínas de tipo híbrido o complejo expone a los azúcares internos de las antenas, que son mayoritariamente tipo galactosa (galactosas o N-Acetil galactosaminas). Originariamente, la posibilidad de exponer galactosas terminales en las membranas eritrocitarias se utilizó para la identificación y purificación de lectinas con esta especificidad. Una de las mejor caracterizada es la aglutinina de maní (PNA) capaz de unir a los residuos D-Galactosa y D-galactosa β (1-3) D-N-Ac-galactosamina en posición terminal.

En nuestro laboratorio se preparó una columna de membranas de eritrocitos humanos de grupo "0" desialidados con el objetivo de ser utilizada para la identificación y purificación de moléculas parasitarias de unión a los residuos descriptos.

Para estudiar la presencia de residuos tipo galactosa en la columna preparada en nuestro laboratorio, se evaluó la capacidad de unión de la lectina galactosa específica PNA. La columna fue cargada con extractos de maní y eluida por competencia con galactosa (figura 12). Se obtuvo un único pico de elución en condiciones de elución específica, indicando que esta columna es una herramienta apta para la búsqueda de proteínas símil lectinas galactosa específicas. Se puede observar además que mediante una elución en condiciones caotrópicas (en presencia de buffer glicina-HCl 0,15 M pH 2,8) se obtuvo un pico adicional probablemente debido a otro tipo de mecanismos de interacción diferentes de aquellos mediados por galactosa.

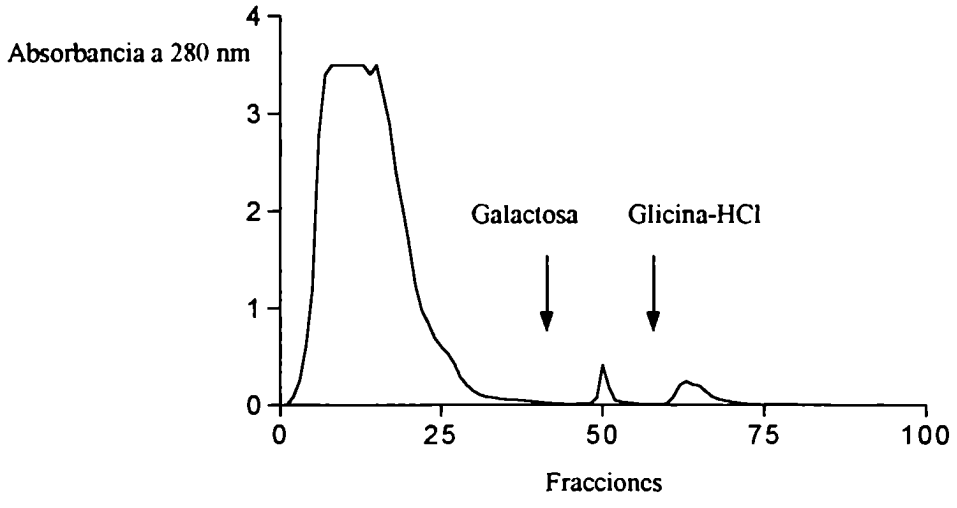


Fig. 12: Cromatograma obtenido durante la purificación de las proteínas del extracto de maní unidas a los sitios de reconocimiento de la columna. Las flechas indicadas con las leyendas "Galactosa" y "Glicina-HCl" indican el momento de adición a la columna de cada uno de estos eluyentes. Los dos picos de elución correspondieron a las fracciones 48-55 y 61-70.

El material obtenido en las fracciones correspondientes al pico de elución con galactosa fue posteriormente concentrado y evaluado por electroforesis en geles de poliacrilamida (figura 13). Se obtuvo una única banda de aproximadamente 32 kDa. Este

peso molecular fue coincidente con el de la PNA comercial (figura 13). Además, como se puede observar, la purificación resultó altamente específica, ya que permitió la purificación de esta proteína aparentemente a homogeneidad en un único paso. Esto estaría indicando que es posible purificar una molécula con actividad de unión a galactosas libres terminales mediante el uso de la columna de eritrocitos aquí presentada, y separarla de una mezcla compleja de otras proteínas presentes en un extracto.

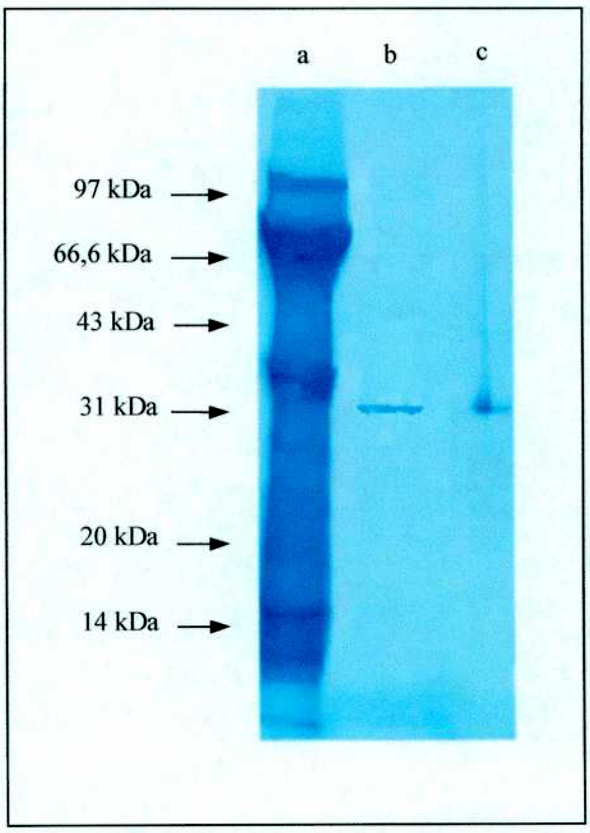


Fig. 13: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las muestras. Calles: **a:** extracto total de maní. **b:** PNA purificada **c:** PNA comercial.

Para determinar la presencia de proteínas tipo lectinas galactosa específicas en el *T. cruzi* se sembró la columna con 10 mg de extracto de epimastigotes. Las moléculas retenidas fueron eluidas luego de lavados con PBS por competencia con galactosa en las

mismas condiciones utilizadas para la elución de la PNA. Durante la elución con galactosa se obtuvo un pico de absorbancia a 280 nm correspondiente a la elución de una proteína del extracto parasitario. Esto evidenció la presencia entre las proteínas de *T. cruzi* de al menos una molécula capaz de unirse específicamente a residuos glucídicos expuestos en la columna que contienen componentes galactosidados (figura 14). También en este caso se observó la elución en condiciones caotrópicas de un pico de proteínas. Se propone que serían proteínas parasitarias capaces de interactuar en forma específica con los componentes de la membrana eritrocitaria por mecanismos distintos del reconocimiento de los residuos galactosa.

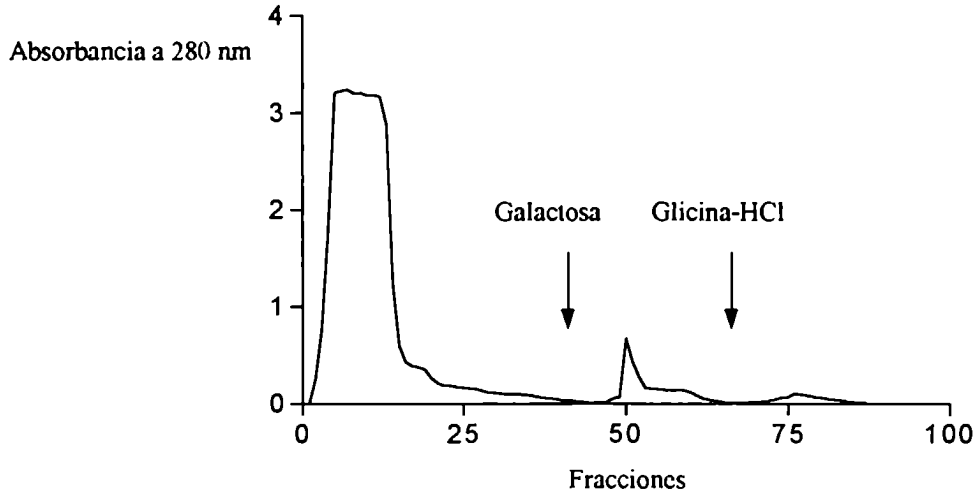


Fig. 14: Cromatograma obtenido durante la purificación de las proteínas parasitarias unidas a los sitios de reconocimiento de la columna. Las flechas indicadas con las leyendas "Galactosa" y "Glicina-HCl" indican el momento de adición a la columna de cada uno de estos eluyentes. Los picos de elución correspondieron a las fracciones 49-60 y 71-79.

El material obetnido en las fracciones correspondiente al pico de elución fue concentrado y posteriormente analizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Se observó una única banda de aproximadamente 67 kDa de peso molecular aparente (figura 15). Esto confirma la presencia en el *Trypanosoma cruzi* de una molécula

única de unión a resíduos tipo galactosa terminal, de naturaleza monomérica u homopolimérica, que puede ser purificada aparentemente a homogeneidad por un procedimiento que implica una interacción directa con membranas del huésped.

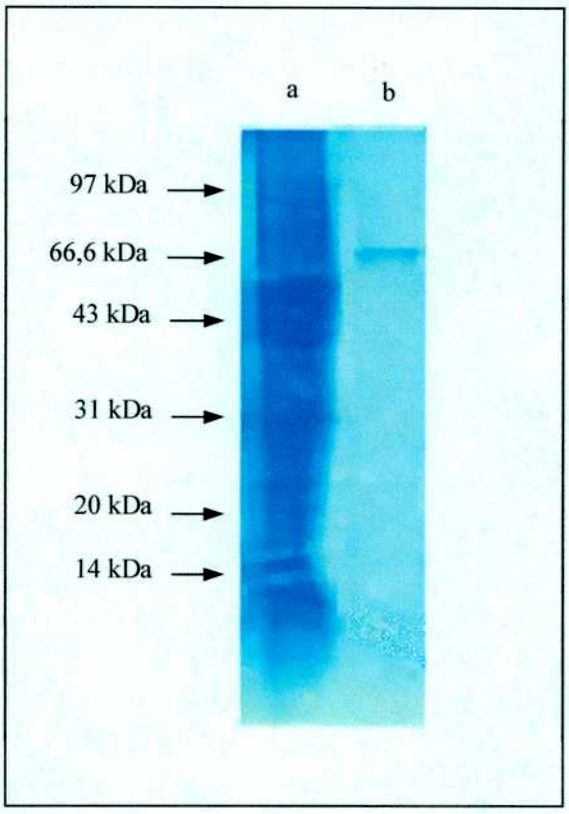


Fig. 15: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las muestras. Calles: **a:** HT de *T. cruzi*.. **b:** Proteína purificada de *T. cruzi*

Para saber si esta proteína presentaba residuos N-glucídicos se realizó un ensayo que permitió evaluar la presencia de sitios de unión a la lectina concanavalina A (ensayo de Con A-peroxidasa). Como control positivo se utilizó un homogenato de antígenos de *T. cruzi*. Por otra parte para evaluar la posible interacción de la peroxidasa (usada para revelar este ensayo) con la proteína purificada se realizó un control de reactividad no mediada por la Con A. Finalmente se evaluó la reactividad de la proteína químicamente deglicosilada

con la Con A. Los resultados obtenidos indicaron que la proteína purificada presenta al menos un resíduo N-glicosídico (Fig. 16). Dado que la proteína motivo de este estudio está asociada a la actividad de unión a resíduos tipo galactosa en los glicoconjugados de membrana, y que es una glicoproteína, fue denominada LLGP-67 por *lectin like glicoprotein* o "glicoproteína tipo lectina".

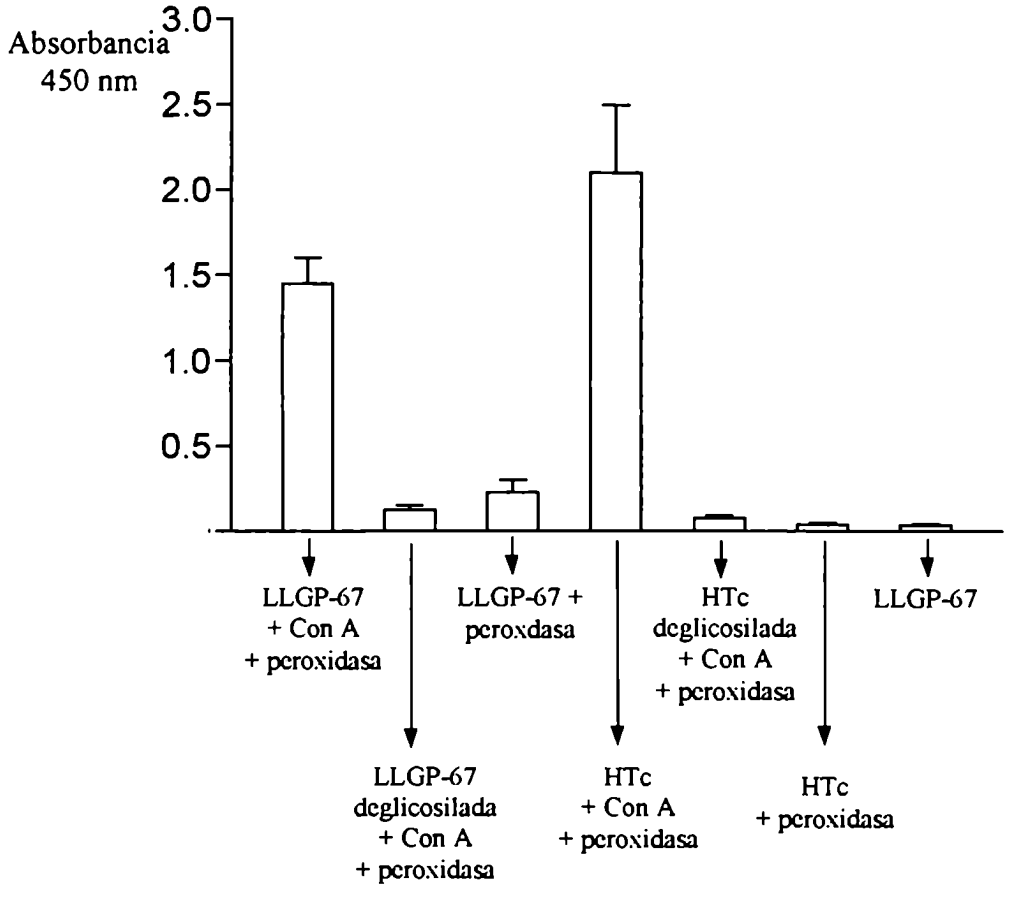


Figura 16: Ensayo de reactividad a Con A - peroxidasa. La LLGP-67 proveniente de la purificación químicamente deglicosilada o no, fue sometida a un ensayo de reconocimiento por la Con A y revelado con peroxidasa. Las leyendas correspondientes a cada barra indican las condiciones del ensayo en cada caso.

Con el fin de obtener sueros contra esta glicoproteína se procedió a la inoculación de conejos con la molécula purificada. El suero obtenido fue titulado por ELISA. El título máximo obtenido fue de 4000. También se realizó una prueba de dot blot para evaluar la mínima cantidad de antígeno capaz de ser detectada por este suero. Esta fue de 1 μg.

En un ensayo de western blot contra antígenos del estadío epimastigote, los sueros obtenidos reconocieron en forma específica una proteína de 67 kDa de peso molecular al ser enfrentados contra lisados totales de epimastigotes de *T. cruzi* corridos electroforéticamente en un gel de poliacrilamida con SDS y electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa. Dado que una condición necesaria para asignarle a una proteína de *T. cruzi* un rol en la invasión celular es su presencia en un estadío infectivo, se enfrentó el suero además contra un lisado total de tripomastigotes corridos electroforéticamente en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y electrotransferidos a nitrocelulosa.

Nuevamente el suero reveló una única banda de 67 kDa de peso molecular. Estos datos muestran que la proteína está presente en el estadío epimastigote y tripomastigote del parásito. Dado que el suero presenta un patrón de reconocimiento similar para ambas formas es probable que no esté regulada en el desarrollo, al menos para los estadíos epimastigote y tripomastigote (figura 17).

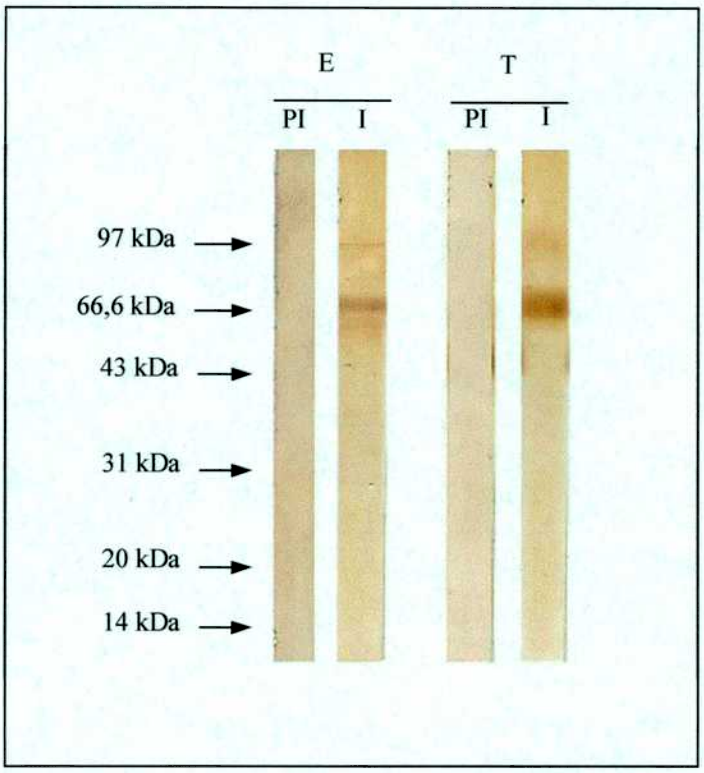


Fig. 17: Western blot : una preparación de HT de *T. cruzi* fue corrida electroforéticamente en gel de poliacrilamida con SDS, electrotransferida a una membrana de nitrocelulosa y enfrentada a un suero de un conejo inmunizado contra la LLGP67 (**I**) o contra un suero preinmune (**PI**). **E**: epimastigotes. **T:** tripomastigotes.

Sobre la base de estos resultados, se decidió confirmar la presencia de la LLGP-67 en el huésped humano infectado, evaluando la relevancia antigénica de esta proteína en el mismo. Para detectar presencia de la LLGP-67, se procedió a realizar un estudio de reactividad antigénica de la proteína obtenida con un panel de sueros de pacientes (Tabla 2). Los índices de sensibilidad (98%) y especificidad (98,11%) demuestran que esta molécula es reconocida por un alto porcentaje de las personas infectadas, lo cual la hace antigénicamente relevante.

Tabla 2: Evaluación de la relevancia antigénica de la LLGP-67 en el huésped humano. Se utilizó un panel de sueros cuya reactividad serológica fue definida sobre la base de una reacción de hemoaglutinación indirecta y un ELISA basado en un homogenato total de epimastigotes de *T. cruzi*. Se estudió la reactividad serológica de sueros de este panel contra la LLGP-67 en ensayos de ELISA.

		PANEL:		TOTAL
		SUEROS (+)	SUEROS (-)	
Reactividad de los sueros contra la LLGP-67	(+)	49	1	50
	(-)	1	52	53
TOTAL		50	53	103

Para confirmar que estas reacciones de ELISA revelaron específicamente la reactividad de los sueros contra la LLGP-67 y no contra posibles proteínas contaminantes (indetectables en gel de poliacrilamida en presencia de SDS revelado por tinción con azul de Coomasie) se hicieron ensayos de western blot. La LLGP-67 purificada (el mismo lote de LLGP-67 que fue utilizado para llevar a cabo las reacciones de ELISA) fue corrida electroforéticamente y electrotransferida a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron enfrentadas a mezclas de los sueros humanos crónicos utilizados en el ensayo anterior. Las mezclas de sueros mostraron reconocer en todos los casos una única banda de 67 kDa de peso molecular (figura 18), confirmando que los valores de sensibilidad y especificidad reportados anteriormente se deben al reconocimiento específico de la LLGP-67. Estos datos en forma conjunta, permite confirmar que la LLGP-67 estaría expresada también en al menos uno de los estadios que están presentes en el huésped infectado: tripomastigote y/o amastigote.

Por otro lado, se quiso establecer la presencia de la LLGP-67 en la fracción de glicoproteínas estudiada previamente FFGM. Para ello se llevaron a cabo ensayos de ELISA con la fracción FFGM y la LLGP-67. Para evaluar el reconocimiento cruzado por los sueros anti-FFGM y anti-LLGP-67, se sensibilizaron pocillos con ambos materiales, y cada uno de ellos fue enfrentado a ambos sueros. La alta reactividad cruzada, en ambos casos respecto de los controles, demuestra que la LLGP-67 es un constituyente de la FFGM (figura 19).

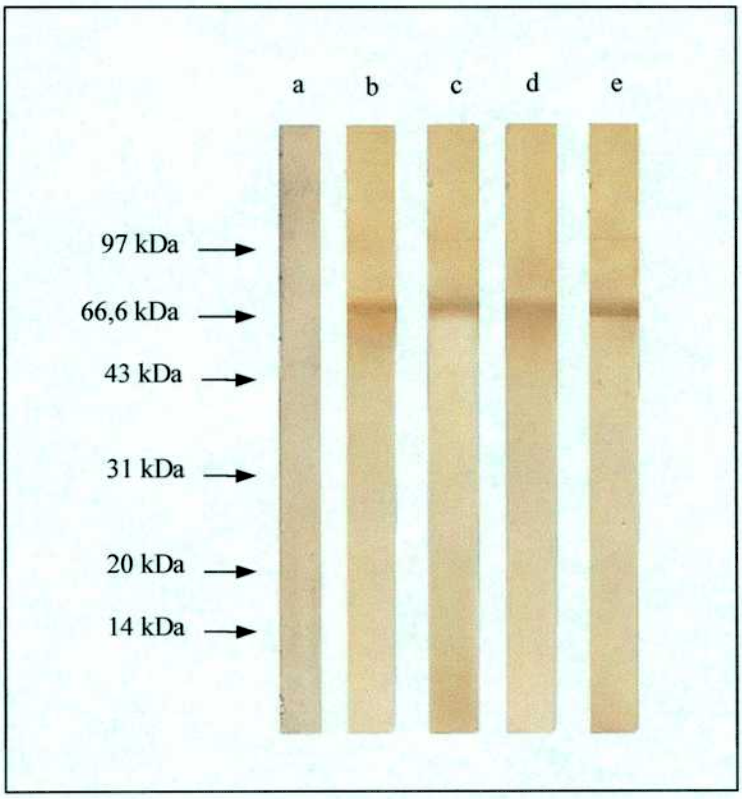


Fig. 18: Western blot: la proteína purificada fue corrida en un gel de poliacrilamida con SDS y electrotransferida a nitrocelulosa. Las membranas fueron enfrentadas a una mezcla de sueros humanos negativos (a) y mezclas de sueros humanos positivos para la infección por el *T. cruzi* correspondientes al panel descripto anteriormente (b, c, d y e).

El hecho de que la LLGP-67 es un constituyente de una fracción de glicoproteínas de membranas del *T. cruzi*, junto con el hecho de que es una proteína glicosilada nos permite inferir que la LLGP-67 podría tener una localización superficial en el parásito. Para obtener información sobre la presencia en las membranas de esta glicoproteína con actividad lectina, se realizaron inmunofluorescencias de epimastigotes y una mezcla de tripomastigotes y amastigotes de cultivo de *T. cruzi* (Fig. 20). Se observó una intensa marcación tanto en la región superficial (a nivel de las membranas parasitarias) como en el interior del cuerpo celular del parásito en todos los estadíos.

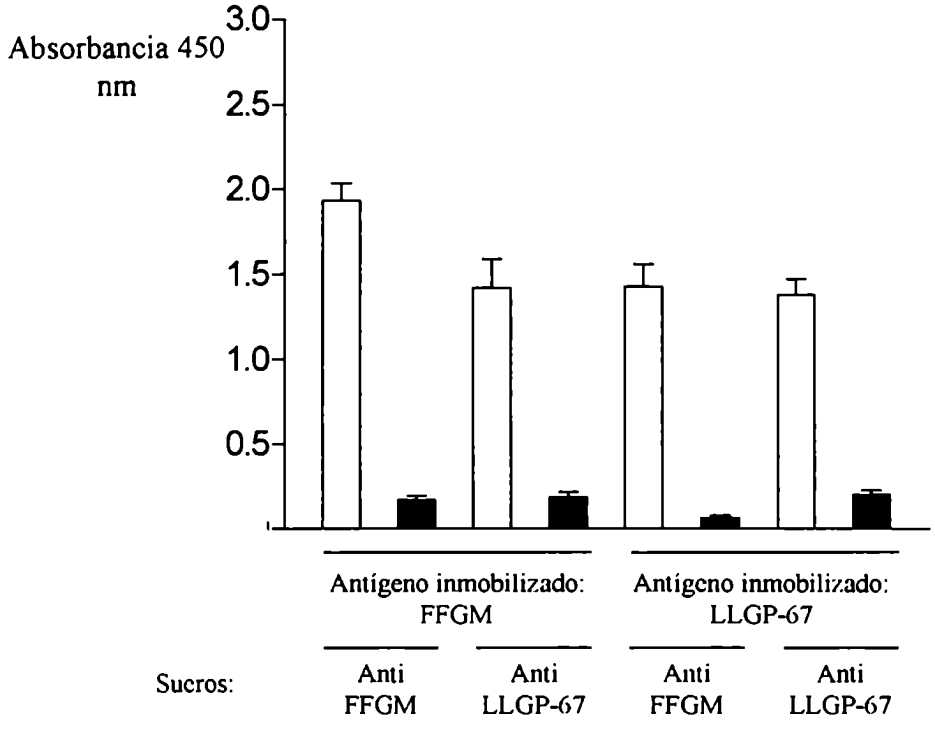
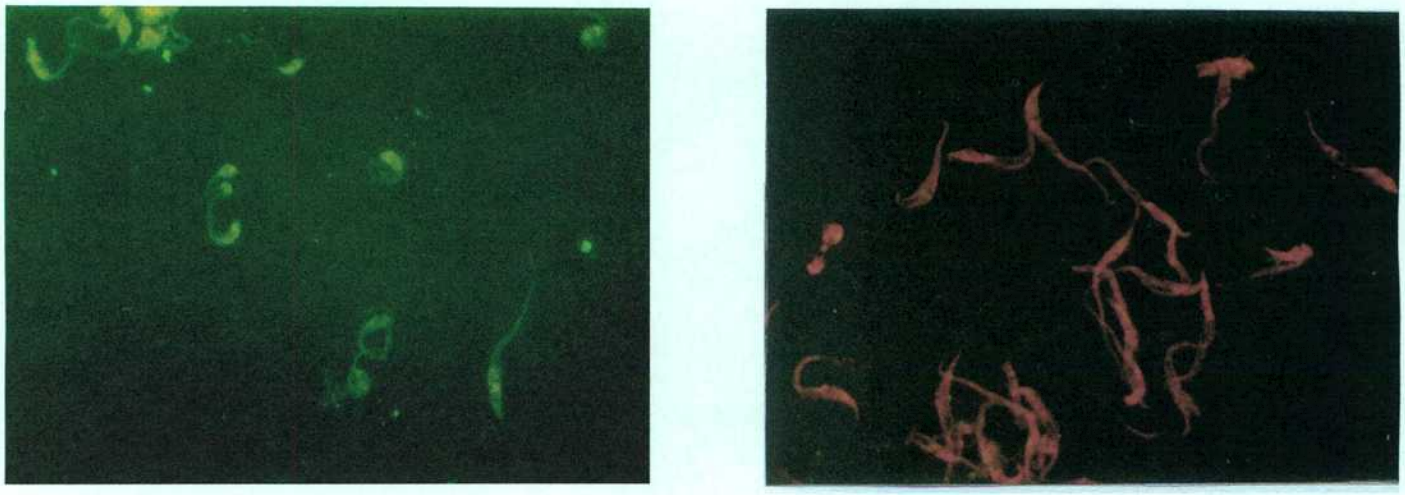


Fig. 19: Ensayos de ELISA con los sueros anti-FFGM y anti-LLGP-67 usando FFGM y LLGP-67 como antígeno (según se indica en el gráfico). Las barras blancas indican la reactividad de los sueros inmunes. Las barras negras indican la reactividad de los sueros control (en cada caso el control fue realizado con el suero preinmune proveniente del mismo animal que el suero inmune). Como puede observarse ambos sueros presentan reactividad cruzada.

a)

I PI



b)

I PI

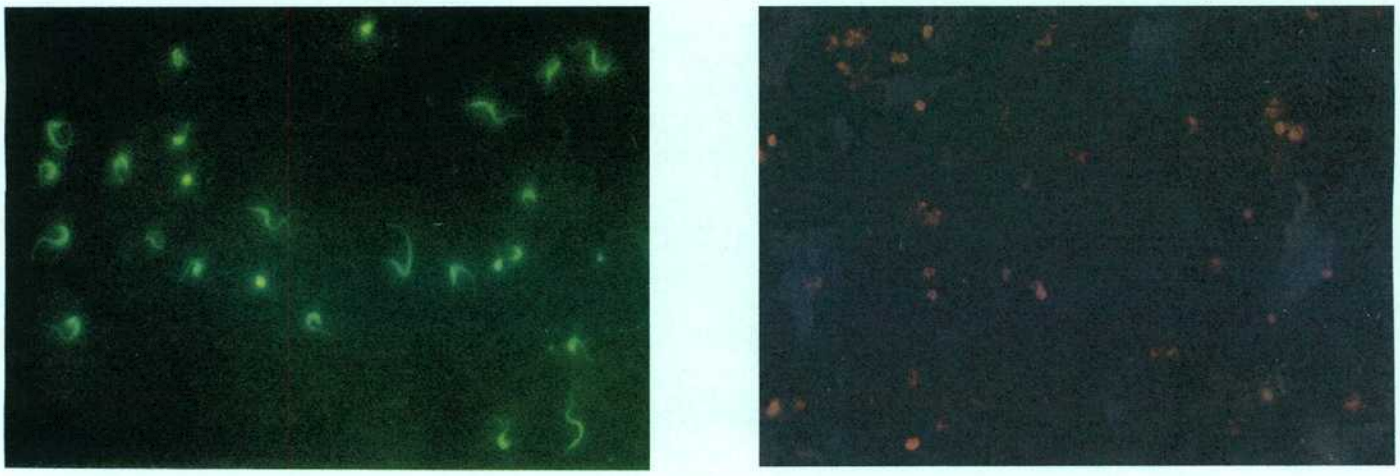


Fig. 20: Determinación de la localización subcelular de la LLGP-67 por IFI. Se utilizaron epimastigotes fijados **(a)** y una mezcla de tripomastigotes y amastigotes fijados **(b)** los que fueron enfrentados a suero preinmune dilución 1/50 **(PI)** y suero anti LLGP-67 dilución 1/50 **(I)**.

Dado que se estableció que esta molécula interactúa en forma específica con componentes de las membranas eritrocitarias humanas, reconociendo glicoconjugados presentes en las mismas, es posible que la LLGP-67 esté involucradas en el reconocimiento de las células del huésped previo a la invasión. Se resolvió evaluar la posible actividad de reconocimiento y ligación de esta molécula sobre receptores de la superficie celular en distintos tejidos. Para ello se realizaron ensayos de lectino inmunohistoquímica, en los que se incubaron cortes de tejidos murinos y humanos con una preparación de la LLGP-67 libre de galactosa. La reactividad de la proteína parasitaria contra los componentes de las membranas de los tejidos ensayados fue revelada mediante el uso de los sueros específicos contra la lectina.

En los tejidos de ratón se observó una marcada reactividad a nivel del endotelio aórtico, del endotelio de los vasos sanguíneos cardíacos y en las membranas basales de los tubos y el mesangio glomerular renal. Se puede observar la marcación de estructuras de la superficie celular en los preparados de los tejidos evaluados. La LLGP-67 reconoce receptores en ambos tipos de tejido muscular que son blanco de la invasión por *T. cruzi*. En los tejidos humanos ensayados se observó una intensa reactividad en las células endoteliales de la arteria mamaria, el atrio y el ventrículo derecho. La presencia de LLGP-67 sobre dichos tejidos fue evidenciada mediante el uso de sueros inmunes específicos. En todos los casos, las incubaciones con el suero preinmune o el suero inmune pero sin el tratamiento con la LLGP-67 fueron negativos (Fig. 21).

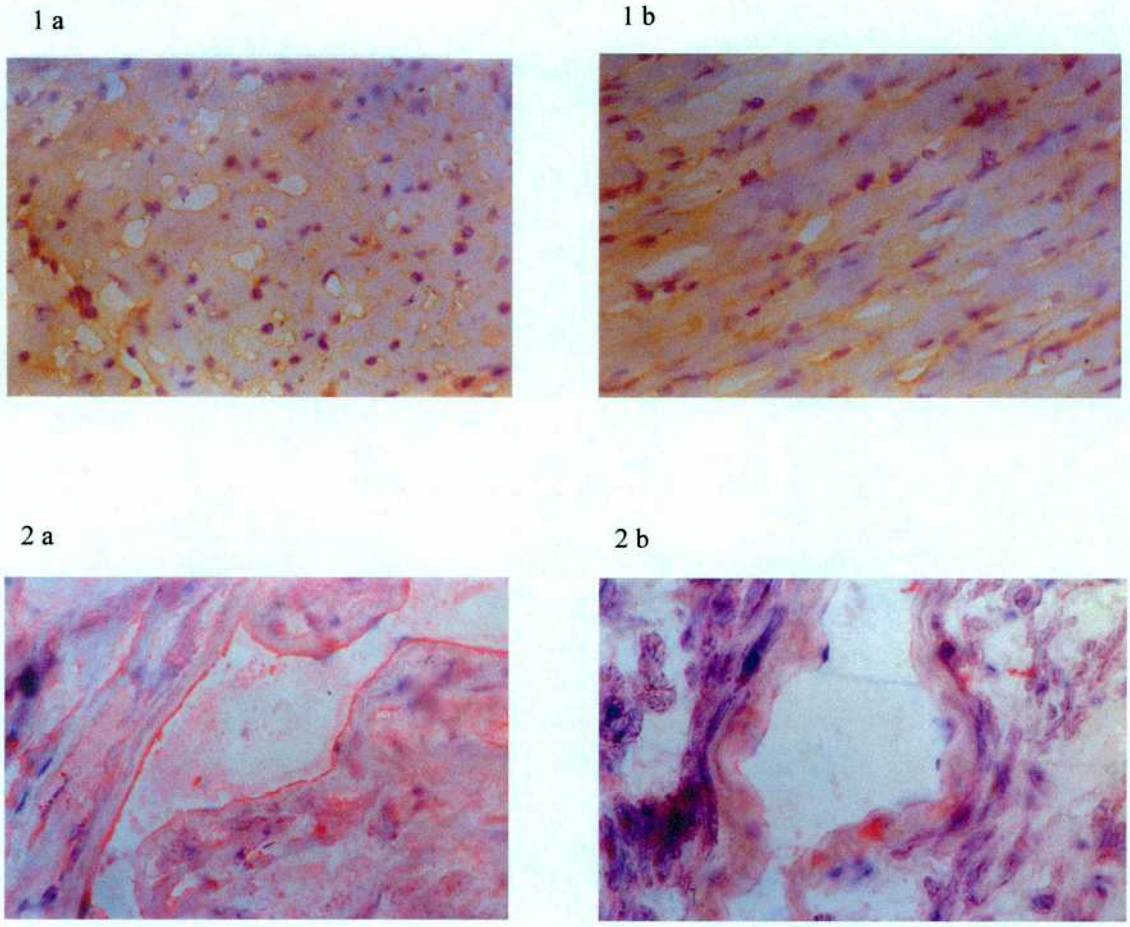
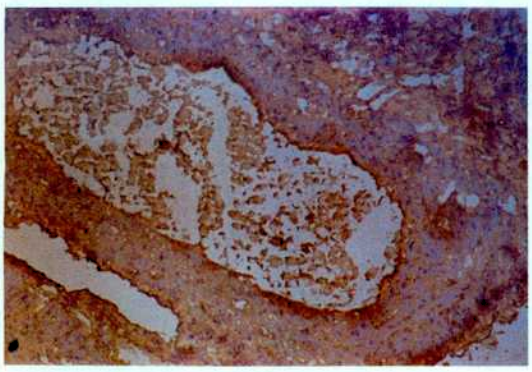
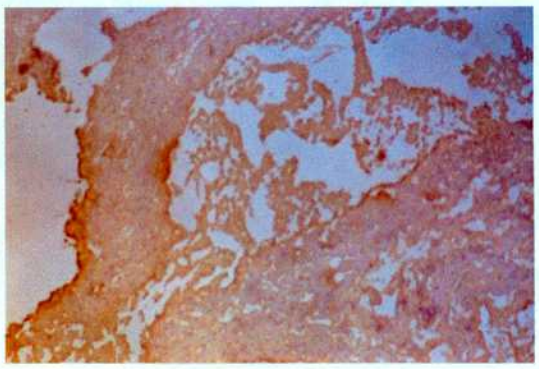


Fig. 21: Lectino inmunohistoquímica sobre preparados de tejidos murinos y humanos. Se puede observar la marcación con DAB (coloración marrón) en las regiones de los cortes en que hubo reconocimiento específico por parte de la LLGP-67 sobre el tejido cardíaco murino, y la marcación con Fast Red (coloración roja) en las regiones de los cortes en que hubo reconocimiento específico por parte de la LLGP-67 sobre el tejido cardíaco humano. Fotos: **1:** tejido cardíaco de ratón. **a:** incubado con LLGP-67, reconocida por el suero inmune específico anti LLGP-67 (aumento: 400 X). **b:** incubado con suero inmune (sin LLGP-67) (aumento: 400 X). **2:** aurícula humana. **a:** incubado con LLGP-67, reconocida por el suero inmune específico anti LLGP-67 (aumento: 200 X). **b:** incubado con suero inmune (sin LLGP-67) (aumento: 200 X).

3 a



3 b



3 c

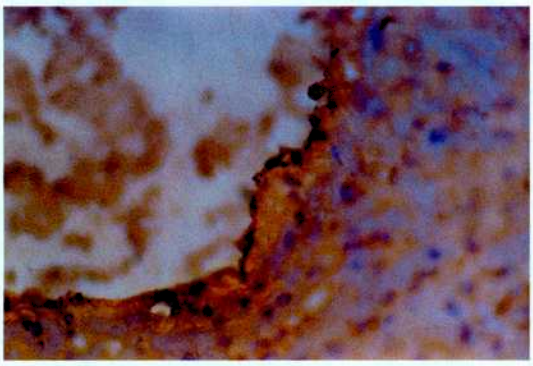


Fig. 21 (cont.): Lectino inmunohistoquímica sobre preparados de tejidos humanos. Se puede observar la marcación con DAB (coloración marrón) en las regiones de los cortes en que hubo reconocimiento específico por parte de la LLGP-67 sobre la arteria mamaria humana. Fotos: **3:** arteria mamaria humana. **a:** incubado con LLGP-67, reconocida por el suero inmune específico anti LLGP-67 (aumento: 100 X). **b:** idem, aumento: 400 X **c:** incubado con suero inmune (sin LLGP-67) (aumento: 100 X).

Demostrado el reconocimiento de estructuras de la superficie celular que actuarían como receptores durante las etapas iniciales del proceso de invasión parasitaria, queda por evaluar la participación directa de la LLGP-67 en el reconocimiento durante la invasión celular. Para esto se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la penetración con los sueros específicos contra la LLGP-67. Se observó que la invasión parasitaria es bloqueada en un 63 % en presencia de los sueros inmunes, respecto del suero del mismo animal pero preinmune (figura 22). Estos resultados permiten confirmar que esta molécula cumple un papel relevante en las etapas tempranas de la invasión celular.

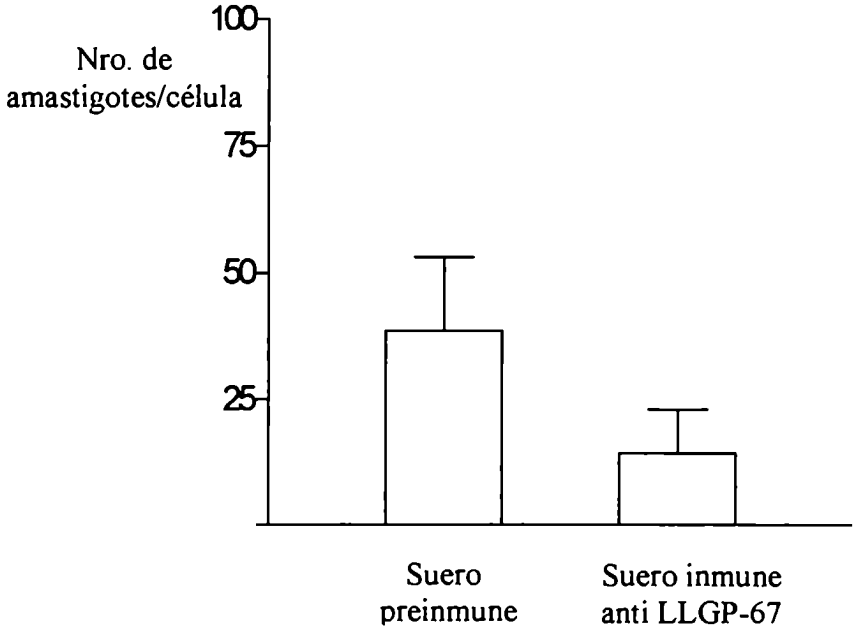


Figura 22: Determinación del grado de inhibición de la penetración de tripomastigotes de *T. cruzi* a células LLC-MK2 en presencia de sueros de conejos inmunizados contra la LLGP-67 o de sueros preinmunes.

DISCUSION

En el presente trabajo se ha evaluado la presencia de moléculas involucradas en la penetración del *T. cruzi* a las células del huésped en una fracción rica en glicoproteínas parasitarias, producto de una extracción fenólica de los componentes de la membrana citoplasmática. Se han identificado dos componentes de esta fracción, que han sido parcialmente caracterizados, y se ha demostrado su relación con la capacidad del *T. cruzi* de invadir a las células del huésped.

En trabajos previos, Marcipar y colaboradores han estudiado desde el punto de vista del diagnóstico una fracción de glicoproteínas de membranas obtenida a partir de los epimastigotes de *T. cruzi* mediante una extracción utilizando LIS como agente caotrópico y subsecuentemente una extracción con fenol (Marcipar A. J. et al. 1982). La fracción de glicoproteínas de membranas descripta por Marcipar y colaboradores fue definida para la cepa Tehuantepec, y resultó rica en componentes de 40 y 60 kDa de peso molecular. Estas glicoproteínas han sido estudiadas como marcadores relevantes para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad de Chagas. Esta fracción ha mostrado contener antígenos relevantes en la respuesta inmune humoral durante la infección en el huésped humano (Marcipar A. J. et al. 1982). Un grupo de glicoproteínas, componentes mayoritarios de esta fracción, fueron estudiadas. Se observó que los extractos fenólicos de glicoproteínas de *T. cruzi* resultaron ricos en glicoproteínas con glicosilaciones de tipo híbridas o complejas con poco o ningún contenido de moléculas de ácido siálico terminal ya que mostraban afinidad por la lectina PNA y por lo tanto eran capaces de exponer galactosa o N-acetil galactosamina en los extremos de las antenas. Esta subfracción obtenida por cromatografía de afinidad a aglutinina de maní fue denominada MCA (por Major Cathodic Antigen) (Marcipar A. J. et al. 1982). Estas fracciones obtenidas por partición en un sistema fenol:agua serían ricas en glicoconjugados de la membrana parasitaria de medio o bajo grado de glicosilación, ya que los glicoconjugados con un alto grado de glicosilación (fundamentalmente las mucinas) particionan en la fase acuosa durante el proceso de extraccion fenol agua (Schenkman S. et al. 1993).

Hasta este momento se ha demostrado la participación de una importante cantidad de antígenos del *T. cruzi* en las distintas etapas del proceso de invasión celular, entre los cuales los más extensamente caracterizados son aquellos que pertenecen a la

superfamilia de la trans-sialidasa, con o sin actividad enzimática, y las glicoproteínas de superficie de la familia de las mucinas (revisado por Burleigh B. y Andrews N. W. 1995-a). Sin embargo, hay consenso entre distintos autores acerca de que aún no ha sido determinado el repertorio completo de antígenos de *T. cruzi* involucrados en la invasión a las células del huésped. En el presente trabajo se propuso la obtención y análisis de una fracción de glicoproteínas de membranas de *T. cruzi*, no evaluada previamente para la presencia de componentes involucrados en las internalización de parásitos a células. Esto ha sido realizado bajo la hipótesis de que dicha fracción, diferente en composición de otras evaluadas, permitiría identificar moléculas involucradas en este proceso diferentes de aquellas ya estudiadas.

I. La fracción fenólica de glicoproteínas de membrana

En el presente trabajo se ha obtenido la fracción glicoproteica a partir de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen 0, la cual mostró un perfil electroforético diferente a aquel descripto originalmente. Un análisis de la composición de las proteínas por SDS-PAGE reveló la presencia de cinco bandas definidas de 78, 48, 33 y 26 kDa y una banda difusa cuantitativamente mayoritaria de 61-65 kDa. Las imágenes de inmunofluorescencia indicaron que al menos algunos de estos componentes resultaron estar presentes tanto en la superficie como en el interior de las células parasitarias. Se observó por *western blot* la presencia de moléculas antigénicamente relacionadas tanto en el estadío no infectivo (epimastigote) como en el infectivo (tripomastigote). Sin embargo, diferencias observadas entre los patrones de western blot de los epimastigotes y los tripomastigotes permiten inferir que algunas de las proteínas analizadas estarían reguladas en el desarrollo, ya que se observó para ambos estadíos el reconocimiento de una banda difusa de entre 42 y 54 kDa, pero en epimastigotes se observó además el reconocimiento de una banda adicional de 30 a 37 kDa. Finalmente, los experimentos de inhibición de la penetración de parásitos a células de mamíferos LLC-MK2 demostraron claramente (72 % de inhibición de la penetración en ensayos realizados en presencia de un suero anti-FFGM respecto del mismo ensayo realizado con el suero preinmune) la presencia de moléculas cuya actividad estaría relacionada con la invasión celular.

Los resultados obtenidos demuestran que la FFGM es una fuente diferente de las evaluadas hasta ahora en la cual sería posible la identificación de nuevas moléculas involucradas en la invasión celular. Para ello se llevó a cabo una búsqueda de antígenos recombinantes, en una biblioteca de expresión, reconocidos por sueros anti-FFGM.

II. La proteína flagelar ligante de Ca^{2+}

La búsqueda de fragmentos de ADNc de tripomastigotes en una biblioteca de expresión llevó al reconocimiento y aislamiento de un fago conteniendo un fragmento de ADN heterólogo codificante para un antígeno presente tanto en el estadío tripomastigote como epimastigote. En ambos estadíos, el antígeno parasitario correspondiente al fragmento de ADN clonado fue reconocido en ensayos de western blot por anticuerpos purificados por inmunoafinidad, revelando dos bandas definidas de 29 y 32 kDa. Posiblemente las diferencias observadas en el peso molecular de la proteína parasitaria correspondiente a la secuencia de ADN aislada se debe a que dicha proteína podría estar sometida a modificaciones postraduccionales. Dado que no se observaron diferencias en los patrones de western blot para los dos estadíos analizados, este antígeno parecería no estar regulado en el desarrollo entre estas dos formas parasitarias. Posteriormente, los ensayos de inmunofluorescencia mostraron una ubicación subcelular fundamentalmente a nivel de la membrana flagelar.

A partir de los fagos clonados conteniendo el fragmento de ADNc codificante para este antígeno, se purificó dicho fragmento de ADN, mostrando un tamaño significativamente mayor que el necesario para codificar una proteína completa de 32 kDa (tamaño que se corresponde con la banda más pesada observada por western blot). Esto permitió inferir que posiblemente el fago contuviera la secuencia codificante completa para esta proteína. Datos posteriores mostraron a partir de la secuencia parcial de ADN, que el inserto contiene la secuencia 3´ no codificante, la secuencia codificante completa y un fragmento de la secuencia 5´ no codificante.

El análisis de la secuencia parcial obtenida desde el extremo 5' reveló una homología del 100% con las secuencias reportadas para el antígeno de 24 kDa de *T. cruzi* (24-kDa Ag) (Tanaka M. et al. 1996, secuencia depositada en la base de datos del GenBank no publicada), la proteína ligante de calcio F29 (Porcel B. et al. 1996) y la proteína de unión a calcio de *T. cruzi* FCaBP-PBol (Godsel L. et al. 1995-a). Además, se ha observado una homología del 99 % con los genes codificantes para las proteínas 1F8 (Gonzalez A. et al. 1985), la proteína flagelar de unión a calcio de 24 kDa (Engman D. et al. 1989) y la proteína de unión a calcio de *T. cruzi* de la cepa Y denominada también antígeno ALC1 (Ouassi A. et al. 1992). Además se encontró una homología significativa con un gen codificante para una proteína flagelar ligante de calcio de otra especie de tripanosomátido filogenéticamente relacionada al *T. cruzi*: el *Trypanosoma rangeli* (Porcel B. et al 1996). Por otro lado es importante destacar que en otros trypanosomátidos relacionados, como *Leishmania sp.* no se han podido detectar genes o criptogenes conteniendo secuencias para este tipo de proteínas (Maldonado R. et al. 1997, Porcel B. et al. 1996, Silber A. M. et al. 1997).

En estudios realizados por electroforesis en campo pulsado de genomas de otros tripanosomátidos para la búsqueda de genes homólogos, también se observó su presencia en otros miembros de la familia de los tripanosomátidos (*T. conorhini*, *T. freitasi*, *T. lewisi*, *Herpetomonas megaseliae*, *Leptomonas seimouri* y *Phytomonas serpens*) (Maldonado R. A. et al. 1997). Dado que las secuencias de ADN para estos organismos aún no han sido reportadas ni en la bibliografia ni en la base de datos del GenBank, no fue posible ampliar las comparaciones en relación con el grado de conservación de esta secuencia a nivel de género.

A partir del extremo 3' del fragmento de ADNc obtenido se ha secuenciado un tramo de 118 nucleótidos correspondientes a la región 3' no codificante del fragmento de ADNc. En esta región las homologías obtenidas resultaron menores (95% para el gen de la CaBP 1F8 y 94% para el gen de la proteína flagelar de unión a calcio de 24 kDa y para la FCaBP-PBol). Para las secuencias de ADN codificante para las proteínas 1F8, 24-kDa Ag y F29 comparadas anteriormente, la secuencia de esta región no fue reportada en la

base de datos consultada (GenBank, National Institutes of Health), por lo cual los porcentajes de homología en estas regiones no pudieron ser establecidos.

Estas proteínas flagelares ligantes de Ca^{2+} han sido muy estudiadas desde el punto de vista de su utilidad en el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*. Por ejemplo, el antígeno 1F8 expresado como proteína recombinante mostró una especificidad de entre un 96,2 y un 99,6% y una sensibilidad de entre un 79 y un 100% en distintos ensayos de ELISA frente a sueros de personas infectadas y no infectadas (Umezawa E. et al. 1999). La proteína flagelar ligante de calcio de 24 kDa (FCaBP) recombinante al ser evaluada antigénicamente frente a un panel de sueros humanos, mostró tener altos valores de especificidad y sensibilidad (Godsel L. et al. 1995-b), sola o en combinación con otro antígeno recombinante (Krautz G. M. et al. 1998). Por otra parte, la proteína F29 recombinante fue probada para su uso en el seguimiento de pacientes en tratamiento, al evaluar la eficacia de la quimioterapia contra la enfermedad de Chagas de un grupo de niños de 6 a 12 años en la fase indeterminada de la infección (Sosa Estani S. et al. 1998).

En el presente trabajo se ha demostrado mediante ensayos de inhibición de la penetración que al menos algunas proteínas de esta familia en el *T. cruzi* están involucradas en el proceso de invasión celular. La capacidad invasiva de los tripomastigotes de *T. cruzi* a células en cultivo en presencia de anticuerpos específicos contra la proteína recombinante (obtenidos mediante purificación por inmunoafinidad) resultó disminuída en un 54 % (disminución estadísticamente significativa) respecto de los ensayos control realizados en presencia de anticuerpos obtenidos mediante el mismo protocolo de purificación pero a partir de un suero preinmune.

La mayoría de las proteínas de unión a calcio descriptas en diferentes eucariotas contienen de dos a ocho copias de motivos de unión a calcio de tipo "brazos EF" similares a los de la calmodulina y están agrupadas en una superfamilia denominada "proteínas de unión a calcio con dominios de "brazos EF" o *EF hand calcium binding proteins*". Estos dominios consisten en 29 aminoácidos arreglados en una conformación "hélice-vuelta-hélice" en los cuales los aminoácidos funcionalmente importantes

involucrados en la coordinación por calcio están altamente conservados entre las proteínas moduladas por calcio que han sido reportadas (Moncrief N. D. et al. 1990).

Las proteínas flagelares ligantes de calcio constituyen una familia de proteínas altamente homólogas entre sí denominadas "calflaginas" dentro de la superfamilia de las proteínas ligantes de calcio con dominios de "brazos EF" (Wu Y. et al. 1994). En el *T. cruzi* están codificadas por una familia de genes dispuestos en tandem de aproximadamente 20 miembros (Gonzalez A. et al. 1985). La mayor divergencia encontrada para las secuencias codificantes de las calflaginas descriptas hasta este momento para *T. cruzi* fue de 1,7 % entre las proteínas F29 y 1F8. Estas proteínas poseen cuatro sitios de unión potencial a Ca^{2+}, de los cuales sólo dos son funcionales. Estos sitios comprenden aproximadamente el 75 % de la molécula (Maldonado R. et al. 1999).

La ubicación de estas moléculas en la superficie del flagelo del parásito, la diferencia observada entre el peso molecular predecible a partir de una secuencia deducida de una secuencia consenso de ADN (24 kDa) y el observado experimentalmente (29-32 kDa) y la observación de dos bandas reconocidas por los anticuerpos específicos en los ensayos de western blot llevan a pensar que esta proteína posiblemente esté glicosilada, y que los dos pesos moleculares observados corresponderían a dos glicoformas distintas. En este sentido, el análisis de la secuencia de una de estas proteínas deducida de la secuencia consenso de ADN, revela que la misma presenta dos sitios potenciales de N-glicosilaciones (-N-X-T-) en las posiciones 60 y 179, y es rica en residuos serina y treonina (sitios potenciales para las O-glicosilaciones), la mayor parte de ellos en regiones hidrofílicas según muestra el análisis de hidropaticidad, siendo por lo tanto blancos potenciales para la acción de glicosil transferasas. Sin embargo la única modificación postraduccional descripta hasta ahora (además de la formación de complejos con Ca^{2+}) consiste en la miristoilación (cotraduccional) y palmitoilación (postraduccional) (Godsel L. y Engman D. 1999). Esto no sería compatible con la exposición de esta proteína en la cara externa de la membrana citoplasmática. De hecho, Godsel y Engman han demostrado que al expresar una calflagina fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP) en epimastigotes, la

localización subcelular de la misma es dependiente de su capacidad de unir Ca^{2+}, y cuando se sitúa en la membrana flagelar lo hace del lado interno de la misma (Godsel L. y Engman D. 1999). Sin embargo, en ensayos de inmunofluorescencia con parásitos no permeabilizados, se ha observado la presencia de esta proteína en la cara externa de la membrana (Roodveldt C. comunicación personal). Por otra parte el hecho de que anticuerpos específicos contra esta proteína sean capaces de bloquear algún paso temprano en el proceso de invasión celular lleva a pensar que durante este proceso, al menos algunas de estas moléculas estarían expuestas en la membrana externa. Estos datos indicarían la existencia de un mecanismo de tráfico y localización subcelular finamente regulado.

Dado que diversas proteínas moduladas por calcio han sido detectadas en el flagelo de trypanosomas (Paindavoine P. et al. 1992, Ogueta S. B. et al. 1994), se ha sugerido un posible rol para el calcio en el plegamiento del flagelo durante la motilidad celular, y un rol para estas proteínas (fundamentalmente las calflaginas) en el mantenimiento de la estructura flagelar (Maldonado R. et al. 1997). Sin embargo, los resultados aquí presentados, así como los de otros autores demostraron que proteínas del grupo de las calflaginas estarían presentes en la región del flagelo aún en las formas amastigotes del parásito, en las que la estructura flagelar está pobremente desarrollada y no parece ser funcional desde el punto de vista de la motilidad (Godsel L. y Engman D. 1999). Por otra parte en otros organismos relacionados, cuyas estructuras flagelares son en principio comparables, no se han encontrado hasta ahora genes homólogos, como en el caso de *Leishmania sp* (Maldonado R. et al. 1997, Porcel B. et al. 1996, Silber A. M. et al. 1997). Estos datos en conjunto le quitan sustento a la posibilidad de una participación directa de las calflaginas en el movimiento flagelar.

En trabajos anteriores, algunas proteínas ligantes de Ca^{2+} han sido involucradas en la adhesión del parásito a la célula huésped y en la ligación de Ca^{2+} (Ruben L. y Naghighat N. 1990). Sin embargo estas actividades propuestas no han podido ser demostradas hasta ahora, y sólo quedaron en un terreno especulativo. En tripanosomátidos se cree que algunas de estas proteínas jugarían un importante rol regulatorio, incluyendo su intervención en la coordinación de los eventos del ciclo vital

(Ruben L. y Haghighat N. 1990, Scheibel L. W. 1992, Wu Y. et al. 1994) y en la homeostasis y el metabolismo del Ca^{2+} (Maldonado R. et al. 1999).

Un sistema propuesto recientemente como modelo para explicar el funcionamiento de las calflaginas lo constituyen las proteínas las de la familia de la recoverina (Godsel L. y Engman D. 1999). Las recoverinas constituyen una familia de proteínas ligantes de Ca^{2+} con cuatro motivos de "brazos EF", y están involucradas en la regulación de los procesos de transducción de señales mediante un mecanismo de tipo interruptor acil calcio (Zozulya S. y Stryer L. 1992). Estas proteínas son direccionadas a la membrana plasmática cuando están unidas a calcio, donde mediante su asociación con otras proteínas son capaces de modular procesos tales como la fosforilación-defosforilación (Calvert P. D. et al. 1995). A partir del modelo de la recoverina, queda planteada la hipótesis de que esta proteína sería un sensor de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático y su función sería la de modular las actividades de otras proteínas de la membrana flagelar en respuesta a las señales que disparan variaciones transientes de los niveles de Ca^{2-} intracelular.

Aún no se ha demostrado una función precisa para las calflaginas. Sin embargo se ha especulado extensivamente sobre su posible participación en diversos procesos celulares sobre la base de su capacidad de unir calcio, un modulador prácticamente universal en las funciones celulares, y de su similitud estructural con otras proteínas eucariotas ligantes de Ca^{2+} tales como la calmodulina y la recoverina (Godsel L. y Engman D. 1999). En este sentido, Godsel y Engman demostraron que una proteína del grupo de las calflaginas es miristoilada durante la síntesis, y se comporta como una proteína de tipo interruptora que funciona por un mecanismo de unión a grupos acilos, en particular palmitoil, y a Ca^{2+}. En presencia de altos niveles de Ca^{2+} intracelular, la proteína se coordina con este catión y es dirigida por un mecanismo aún desconocido a la membrana flagelar, donde se ancla. Allí, su ubicación es estabilizada por una palmitoilación en la región N- terminal. Dadas las observaciones sobre la presencia de proteínas relacionadas en la superficie externa e interna de la membrana plasmática, quedan por ser explicados el o los mecanismos por los cuales proteínas idénticas o

altamente homólogas podrían estar ubicadas en ambas caras de la membrana plasmática, y la posible funcionalidad de esta disposición para estas proteínas.

El Ca^{2+} intracelular es el disparador de una variedad de procesos a través de la activación de diferentes enzimas y proteínas. Entre otros, juega un papel muy importante en el proceso de invasión celular, y su regulación debe estar finamente controlada en el parásito (Moreno S. et al. 1994). Las proteínas de la familia de las calflaginas podrían estar involucradas como sistemas sensores de los niveles de calcio tanto extracelular como intracelular, asociadas a proteínas involucradas en la homeostasis del Ca^{2+} tanto en la cara externa como interna de la membrana plasmática. Es posible que los anticuerpos capaces de reconocer a estas proteínas interfieran con el sensado de las concentraciones extracelulares de Ca^{2+}, provocando así una desregulación parcial en los niveles de Ca^{2+} intracelular en el parásito, produciendo por lo tanto una disminución en la capacidad del mismo de invadir células.

III. La glicoproteína símil lectina de 67 kDa (LLGP-67)

El reconocimiento de componentes de la membrana celular por proteínas de unión a regiones glucídicas de los glicoconjugados de membrana en los organismos patógenos que deben obligatoriamente invadir las células del huésped para completar su ciclo de vida es un mecanismo generalizado (revisado por Ofek I. y Sharon N. 1990). Particularmente en el caso de *T. cruzi* se ha establecido un cúmulo de información experimental en este sentido (revisado por Burleigh B. y Andrews N. W. 1995-a).

En el presente trabajo se ha demostrado la presencia de una proteína de unión a galactosa, se la ha caracterizado parcialmente desde un punto de vista bioquímico y se han llevado a cabo estudios funcionales que la involucran en el reconocimiento de receptores celulares en las etapas tempranas de la invasión. La molécula identificada consistió en una glicoproteína de 67 kDa de peso molecular presente en al menos dos de los estadíos del parásito: el estadío epimastigote (a partir del cual fue purificada) y el estadío tripomastigote. Se estableció su localización subcelular, revelándose su presencia tanto a nivel superficial como interno. Esta proteína mostró estar N-glicosilada, ya que

resultó reactiva en un lectino-enzimo ensayo con la lectina Con A. A partir de estos datos, la glicoproteína fue denominada denominada LLGP-67 (por lectin-like glycoprotein). También se ha demostrado que la LLGP-67 es uno de los componentes de la fracción fenólica de glicoproteínas de membranas.

Esta molécula resultó ser además un antígeno relevante en el huésped humano, mostrando una alta sensibilidad y especificidad (98.00% y 98.11%, respectivamente) al ser evaluada contra un panel de sueros humanos provenientes de personas infectadas o no. Estos datos contribuyen a demostrar que esta molécula estaría presente en los estadíos parasitarios que ocurren en el huésped humano y demuestran también que es antigénicamente relevante.

Por otra parte, se demostró que la LLGP-67 está involucrada en el reconocimiento de estructuras glucídicas en tejidos que el parásito es capaz de invadir, tanto en ratones como en el huésped humano. Finalmente se ha demostrado que esta glicoproteína está involucrada en la invasión celular: en un ensayo de inhibición de la penetración de tripomastigotes de *T. cruzi* a células LLC-MK2 en presencia de un suero inmune específico se observó una disminución del 67 % en el recuento de parásitos internalizados respecto de un control de infección celular en las mismas condiciones pero usando suero preinmune.

La presencia de una proteína tipo lectina con especificidad por galactosa en el *T. cruzi* involucrada en el proceso de reconocimiento de receptores celulares durante la invasión celular quedó sugerida a partir de los trabajos de Henriquez y colaboradores, en el cual se demuestra que tanto lectinas capaces de reconocer residuos galactosa o N-acetil galactosamina tales como la RCA (Henriquez D. et al. 1981), como los residuos galactosa como la β-D galactofuranosa libre (de Arruda M. V. et al. 1989) son capaces de inhibir significativamente la internalización del parásito.

El hallazgo de una molécula con actividad de reconocimiento y unión a residuos galactosidados es consistente con la descripción de algunas proteínas asociadas a actividades de reconocimiento de galactosa, N-acetil glucosamina y manosa descriptas

por Bonay y Fresno (Bonay P. y Fresno M. 1995). En particular, la proteína de unión a galactosa descripta por estos autores es una proteína de 68-70 kDa de peso molecular, presente en la superficie de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos, y presenta características compatibles con la descripta en este trabajo. Estos autores, hasta el momento han identificado al menos dos proteínas ligantes de carbohidratos (CBP), presentes tanto en la superficie de tripomastigotes metacíclicos como en epimastigotes (Bonay P. y Fresno M. 1995). Las proteínas descriptas fueron purificadas por interacción directa con una mezcla de asialofetuina y asialotiroglobulina inmobilizadas sobre matrices de cromatografía. Los picos de cromatografía obtenidos correspondieron a proteínas que mostraron unirse específicamente a residuos galactosa y manosa. Ambos correspondieron a glicoproteínas de entre 68 y 70 kDa de peso molecular. Se observó que estas proteínas fueron capaces de unirse a componentes de la superficie de células del huésped en una forma saturable y dosis dependiente. Un análisis ultraestructural mostró que en células musculares residuos galactosil se acumulaban en la región de adhesión del parásito y eran internalizados durante la formación del fagolisosoma (Araujo-Jorge T. C. et al. 1992). Finalmente, los autores llevaron a cabo un ensayo de inhibición de la adhesión de parásitos a células LLC-MK2, utilizando CBP ligante de manosa y galactosa libres como moléculas de competencia por el receptor celular. Observaron una capacidad de bloqueo de la adhesión parasitaria de hasta un 50 % para la CBP ligante de manosa, mientras que no observaron bloqueo de la adhesión del *T. cruzi* a las células del huésped en presencia de la CBP ligante de galactosa (Bonay P. y Fresno M. 1995).

Estos datos son consistentes con la presencia de diversas moléculas con actividad de unión a carbohidratos en la superficie tanto de los estadíos infectivos como no infectivos del *T. cruzi*. La similitud en la actividad, al menos a nivel cualitativo, de la LLGP-67 descripta en el presente trabajo, y la CBP ligante de manosa descripta por Bonay y Fresno indicarían una posible identidad entre ambas moléculas. La similitud (no identidad) observada en el peso molecular, no contribuye en este caso a aclarar el problema, ya que podrían ser moléculas iguales con diferente patrón de glicosilación, debido por ejemplo a las diferencias entre las cepas utilizadas en uno y otro trabajo, o las condiciones de cultivo. Por otra parte se podría tratar de moléculas diferentes pero

estructuralmente relacionadas, que a nivel de actividad podrían presentar divergencias en los requerimientos de entorno de los residuos galactosa que son capaces de reconocer. Esto las convertiría en específicas para distintos tipos de receptores galactosidados. De esta manera se explicarían (más alla de las diferencias en el diseño experimental) los resultados observados en los experimentos de adhesión o invasión a células en cultivo.

IV. Un modelo sobre el cual estudiar la interacción entre el parásito y las células del huésped humano desde el punto de vista del reconocimiento

En este trabajo se demostró la posibilidad de obtener moléculas de reconocimiento y unión a resíduos glucídicos por medio de un sistema de purificación directa de proteínas sobre las membranas de los eritrocitos del huésped. Se ha demostrado que los eritrocitos desialidados son capaces de exponer residuos galactosa (mediante el reconocimiento específico de los mismos por una lectina galactosa específica tal como la PNA) capaces de ser reconocidos por una molécula de unión a galactosa del *T. cruzi*.

La desialidación es un proceso que ocurre naturalmente durante la interacción del *T. cruzi* con las células del huésped, debido a la actividad trans-sialidasa en las membranas del parásito. Este proceso de transferencia de ácido siálico es relativamente inespecífico en el sentido de que cualquier glicoconjugado exógeno que contuviera ácido siálico terminal en sus antenas es un potencial sustrato de la actividad trans-sialidasa parasitaria. Incluso en el caso de encontrarse sobre la superficie de eritrocitos (célula a la que el *T. cruzi* no puede invadir) o en forma de glicoproteínas solubles (Libby P. et.al. 1986, Pereira M. E. 1983).

A pesar de ser los eritrocitos probablemente las únicas células humanas que el *T. cruzi* no puede invadir, algunos autores han reportado la posibilidad de utilizar este sistema (eritrocitos - epimastigotes de *T. cruzi*) para estudiar algunos fenómenos durante la interacción del *T. cruzi* con las células del huésped. De hecho, la lisis celular mediada por *T. cruzi* y la actividad de fusión de membranas, (Luján H. y Bronia D. 1994), la trans-sialidación (Pereira M. E. 1983), y la capacidad de algunos componentes

parasitarios de disparar procesos proteolíticos a nivel de la membrana dependientes de un aumento transitorio en los niveles de Ca^{2+} intracelular (Calderon R. et al. 1989) han sido abordados desde el estudio de la interacción entre los epimastigotes de *T. cruzi* y los eritrocitos. Por otra parte, las membranas de los eritrocitos aportan un modelo de membrana celular humana que puede ser de interés, ya que son accesibles en cantidades suficientes para su estudio debido a que son fácilmente obtenibles. Finalmente, las glicoproteínas presentes en la superficie de los eritrocitos son modificadas a nivel postraduccional de forma comparable a las glicoproteínas de las membranas de otras células humanas. Esto es particularmente importante en el caso de las interacciones entre proteínas del *T. cruzi* y del huésped humano, ya que las interacciones vía glicosilaciones son fundamentales. En este sentido, se propone que el sistema utilizado puede representar eventos tempranos del proceso de invasión celular y aportar información de interés respecto de esta etapa de la interacción entre el parásito y el huésped humano.

La posibilidad de ampliar el uso de las columnas de membranas de eritrocitos a la búsqueda de otras moléculas involucradas en el reconocimiento y la adhesión fue confirmada por el hecho de que durante una elución de la columna con una alta concentración de NaCl y la regeneración de la columna en condiciones fuertemente caotrópicas se observó la elución de otras proteínas parasitarias (datos no mostrados). Esto estaría indicando la presencia de sitios de reconocimiento y unión sobre la base de especificidades e interacciones moleculares diferentes de aquellos estudiados en el presente trabajo. Incluso, esto podría involucrar mecanismos de interacción entre parásitos y células del huésped por vías diferentes al reconocimiento de las regiones glucídicas de las glicoproteínas de membranas, aún no extensivamente explorados.

En el presente trabajo se propone la aplicación del sistema de membranas eritrocitarias humanas para la identificación de proteínas del *T. cruzi* involucradas en la interacción con las células del huésped y en forma más general como un modelo de interacción entre las membranas celulares humanas y el parásito. Es claro que los resultados obtenidos no pueden ser directamente extrapolados en el sentido de involucrar en forma directa a las moléculas parasitarias identificadas por este sistema en el proceso de reconocimiento previo a la infección. Sin embargo este modelo puede proveer

moléculas parasitarias capaces de interactuar con membranas celulares humanas que podrían ser subsecuentemente evaluadas en un sistema de células de mamíferos para validar la hipótesis de su participación en el proceso de infección celular.

V. Epílogo

El proceso de invasión celular por el *Trypanosoma cruzi*, particularmente el mediado por mecanismos no fagocíticos, se ha revelado como sumamente complejo. Originalmente se intentó comprenderlo básicamente desde el estudio de moléculas candidatas a funcionar como receptores y antireceptores. Sin embargo en los últimos quince años el panorama se fue enriqueciendo: la mayoría de las moléculas identificadas originariamtente como involucradas en el reconocimiento resultaron pertenecer a una superfamilia de glicoproteínas de membranas, algunas de las cuales presentan actividades enzimáticas que modifican a los componentes de la superficie del parásito y de las células del huésped, tales como la trans-sialidasa (revisado por Burleigh B. y Andrews N. W. 1995). Las proteínas que son el blanco mayoritario de la actividad trans sialidasa pertenecen a una familia de proteínas altamente heterogéneas: las mucinas. Estas también han sido involucradas en el proceso de invasión celular (revisado por Burleigh B. y Andrews N. 1995). Otras proteínas de superficie involucradas presentan actividades proteasa (Franke de Cazzulo B. et al. 1994) o isomerasa (Moro A. et al. 1995) participarían en la invasión celular de una forma que aún no está clara. Por otra parte, se ha descubierto un complejo entramado de señales entre el parásito y la célula que involucra para ambos al Ca^{2+} como uno de los mensajeros intracelulares de importancia fundamental: si no se produce un aumento transiente de la concentración intracelular de Ca^{2+} en el parásito y en la célula, la invasión no es eficiente (revisado por Burleigh B. y Andrews N. W. 1998, Docampo R y Moreno S. N. 1994).

A pesar de los avances en la comprensión de los fenómenos relacionados con la invasión celular por parte del *T. cruzi*, el proceso no está todavía completamente dilucidado. En primer lugar, aún no se han identificado todas las moléculas involucradas

en dichos fenómenos. En segundo lugar, hay identificadas moléculas que participan del proceso de invasión celular de alguna manera, pero no está claramente definido cómo lo hacen.

En el presente trabajo se propuso el estudio de una fracción de glicoproteínas de membranas que mostró contener moléculas involucradas en el proceso de invasión celular no estudiadas hasta ahora desde este punto de vista. Dos de estas moléculas fueron identificadas y su participación en eventos relacionados con invasión fue demostrada. En un caso se ha probado la actividad de reconocimiento de receptores celulares. En el otro caso, aún no se conoce con certeza la actividad de la proteína, pero parece probable (y en esto coinciden diversos autores) que la misma esté relacionada con la detección de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular y extracelular. Finalmente se propuso un modelo de estudio de las interacciones entre el *T. cruzi* y las membranas celulares humanas mediante el uso de membranas eritrocitarias reticuladas. Este sistema de trabajo permitió la identificación de una de las moléculas aquí presentadas.

CONCLUSIONES

I. La fracción fenólica de glicoproteínas de membranas del *Trypanosoma cruzi* contiene moléculas involucradas en el proceso de invasión celular y constituye una posible fuente para identificar glicoproteínas parasitarias no previamente asociadas a este proceso.

II. Una proteína de la familia de las calflaginas del *Trypanosoma cruzi* está involucrada en en proceso de invasión a las células del huésped.

III. Una lectina del *Trypanosoma cruzi* galactosa específica está involucrada en el reconocimiento de glicoconjugados expuestos en la superficie de tejidos que el parásito puede invadir y en el reconocimiento de glicoconjugados de la superficie de las células del huésped previo a la invasión.

IV. Las membranas eritrocitarias proveen un modelo válido para la identificación de moléculas de reconocimiento del *Trypanosoma cruzi* y para el estudio de su interacción con las membranas de las células del huésped, ya que es capaz de representar al menos algunas de las interacciones que ocurren a nivel de reconocimiento entre el parásito y las células.

Ariel M. Silber
Autor

Alberto J. Marcipar
Director

REFERENCIAS:

Abuin G., Colli W., de Souza W. & Alves M. J. M. (1989) A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc85) is heterogeous in expresion and molecular constitution. Mol. Biochem. Parasitol. 35, 229.

Acosta A., Schenkman R. P. & Schenkman S. (1994) Sialic acid acceptors of different stages of *Trypanosoma cruzi* are mucine-like glycoproteins linked to the parasite membrane by GPI anchors. J. Med. Biol. Res. 27, 439.

Affranchino J. L., Ibañez C. F., Luquetti A. O., Rassi A., Reyes M. B., Macina R. A., Aslund L., Petersson U. & Frasch A. C. C. (1989) Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. Mol. Biochem. Parasitol., 34, 221.

Alcantara A. & Brener Z. (1978) *Trypanosoma cruzi*: role of macrophage membrane components in the phagocytosis of bloodstream forms. Exp. Parasitol. 50, 1.

Almeida de Faria M., Freymuller E., Colli W. & Alves M. J. M. (1999) *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. Exp. Parasitol. 92, 263.

Alonso J. M., Pividori S. & Guilleron C. (1986) Circulating antigens of *Trypanosoma cruzi* in patients with Chagas' disease in an endemic area. Medicina (Bs. As.) 46, 69.

Alves M. J. M., Abuin G., Kuwajima V. Y. & Colli W. (1986) Patrial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 21, 75.

Andrade Z. (1991) Pathogenesis of Chagas' disease. Res. Immunol. 142, 126.

Andrews N. W. & Colli W. (1982) Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. J. Protozool. 29, 264.

Andrews N. W., Katzin, A. M. & Colli W. (1984) Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity. Eur. J. Biochem. 140, 599.

Andrews N. W., Hong K. -S., Robbins E. S. & Nussenzweig V. (1987) Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 64, 474.

Andrews N., Robbins E., Ley V., Hong K. & Nussenzweig V. (1988) Developmentally regulated, phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J. Exp. Med. 167, 2, 300.

Andrews N. W., Einstein M. & Nussenzweig V. (1989) Presence of antibodies to the major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigote in sera from chagasic patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40, 1, 46.

Andrews N. W., Abrams C. K., Slatin S. L. & Griffiths G. (1990) A *Trypanosoma cruzi* secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. Cell 61, 1277.

Andrews N. W. (1994) From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. Brazilian J. Med. Biol. Res. 27, 471.

Araguth M. F., Rodrigues M. M. & Yoshida N. (1988) *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypanosomes: neutralization by the stage-specific monoclonal antibody 1G7 and immunogenicity of 90 kDa surface antigen. Parasitol. Immunol. 10, 707.

Araujo F. G. (1982) Detection of circulating antigens of *Trypanosoma cruzi* by enzyme immunoassay. Ann. Trop. Med. Parasitol. 76, 1, 25.

Araujo-Jorge T. C. & De Souza W. (1984) Effect of carbohydrate, periodate and enzymes in the process endocytosis of *Trypanosoma cruzi* by macrophages. Acta Trop. 41, 17.

Araujo-Jorge T. C., Barbosa H. & Meirelles M. N. L. (1992) *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87, Supl. 1, 43.

Araya J. E., Cano M. I., Yoshida N. & da Silveira J. F. (1994) Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 66, 161.

Ashall F. (1990) Characterization of an alkaline peptidase of *Trypanosoma cruzi* and other trypanosomatids. Mol. Biochem. Parasitol. 38, 77.

Ashall F., Harris D., Roberts H., Healy N. & Show E. (1990) Substrate specificity and inhibitor sensitivity of a trypanosomatid alkaline peptidase. Biochim. Biophys. Acta 1035, 293.

Avila H., & Avila A. (1981) *Trypanosoma cruzi*: allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas' disease. Exp. Parasitol. 51, 204.

Avila H., Borges Pereira J., Thiemann O., de Paiva E., Degrave W., Morel C. & Simpson L. (1993) Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 31, 9, 2421.

Barbosa H. S. & Meirelles M. N. (1995) Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. Cell Struct. Funct. 4, 275.

Barr S. C., Han W., Andrews N. W., Lopez J. W., Ball B. A., Pannabecker T. L. & Gilmour R. F. Jr. (1996) A factor from *Trypanosoma cruzi* induces repetitive cytosolic free Ca^{2+} transients in isolatesd primary canine cardiac myocytes. Infect. Immun. 64, 5, 1770.

Bonaldo M. C., Scharfstein J., Murta A. C. M. & Goldemberg S. (1991) Further characterization of *Trypanosoma cruzi* GP57/51 (cystein proteinase) as the major antigen expressed by differentiating epimastigotes. Parasitol. Res. 77, 567.

Bonay P. & Fresno M. (1995) Characterization of carbohydrate binding proteins in *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem. 19, 11062.

Bongertz V., Hungerer K. D. & Galvao-Castro B. (1981) *Trypanosoma cruzi*: circulating antigens. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 76, 1, 71.

Boothroyd J. C. (1990) "Molecular biology of trypanosomatids" en "Modern parasite biology - Cellular, immunological and molecular aspects". Editor: D. J. Wyler. W. H. Freeman and Co., New York, p. 333.

Bosch M., Trombetta S. E., Engstrom U. & Parodi A. J. (1988) Characterization of dolychol diphosphate oligosaccharide:protein oligosaccharyltransferase and glycoprotein processing glucosidases ocurring in trypanosomatids. J. Biol. Chem. 263, 17360.

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

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

Brener Z. (1977) Intraspecific variation of *Trypanosoma cruzi*. PAHO Sci. Publ. 347, 11.

Brener Z. (1980) Immunity to *Trypanosoma cruzi*. Adv. Parasitol. 18, 247.

Breniere S., Bosseno M., Telleira J., Carrasco R., Vargas F., Yaksic N. & Noireau F. (1995) Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. Am. J. Trop. Med. Hyg. 53, 2, 179.

Burguess D. E., Kuhn R. E. & Carlson K. S. (1981) Induction of parasite-specific helper T lynphocytes during *Trypanosoma cruzi* infections in mice. J. Immunol. 127, 2092.

Burleigh B. & Andrews N. W (1995-a) The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of the mammalian cell. Annu. Rev. Microbiol. 49, 175.

Burleigh B. A. & Andrews N. W. (1995-b) A 120 kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca^{2+} signaling factor for mammalian cells. J. Biol. Chem. 270, 51780.

Burleigh B. A., Caler E. V., Webster P. & Andrews N. W. (1997) A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca^{2+} signaling in mammalian cells. J. Cell. Biol. 136, 3, 609.

Burleigh B. & Andrews N. W. (1998) Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. Curr. Opin. Microbiol. 1, 4, 461.

Caler E. V., Vaena de Avalos S., Haynes P. A., Andrews N. W. & Burleigh B. A. (1998) Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. EMBO J. 17, 4975.

Calderon R. O., Luján H., Aguerri A. M. & Bronia D. (1989) *Trypanosoma cruzi*: involvement of proteolytic activity during cell fusion induced by epimastigote form. Mol. Cell. Biochem. 86, 189.

Calvert P. D., Klenchin V. A. & Bownds M. D. (1995) Rhodopsin kinase inhibition by recoverin. Function of recoverin myristoylation. J. Biol. Chem. 270, 24127.

Camargo E. P. (1964) Grouth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypomastigote in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 6, 93.

Camargo M. & Noshino-Shimizu S. (1974) Diagnóstico accidental de laboratorio de infecciones chagásicas agudas, pos-transfusionales nao supeiditadas. Rev. Asoc. Med. Brasil, 20: 335.

Camargo M. M., Almeida I. C., Pereira M. E., Ferguson M. A. Travassos L. R. & Gazzinelli R. T. (1997-a) Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiates the synthesis of proinflamatory cytokines by macrophages. J. Immunol. 158, 5890-5901.

Camargo M. M., Andrade A. C., Almeida I. C., Travassos L. R. & Gazzinelli R. T (1997-b) Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membrane trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. J. Immunol. 159, 6131-6139.

Campetella O., Henriksson J., Aslund L., Frasch A. C. C., Petersson U. & Cazzulo J. J. (1990) The major cystein proteinase (cruzipain) of *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polimorfic tandemly organized genes located on different chromosomes. Mol. Biochem. Parasitol. 50, 225.

Cardillo F., Voltarelli J. C., Reed S. G. & Silva J. S. (1996) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukine 10: role of NK cells. Infect. Immun. 64, 128.

Cardoni R. (1994) "Respuesta inmune efectora" en "Enfermedad de Chagas". Editores: Storino R. & Milei J. Doyma Argentina, Buenos Aires, p. 87.

Carlomagno M., Cura E., Pérez A. Segura E. (1989) Informe sobre Chagas. Ciencia Hoy, 1, 37.

Carvalho M., Krieger M., Almeida E., Oelemann W., Shikanai-Yassuda M., Ferreira A., Pereira J., Sáez-Alquézar A., Dorlhiac-Llacer P., Chamone D. & Goldenberg S. (1993) Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. Transfusion 33, 10, 830.

Carvalho T. M., Ferreira A. G., Coimbra E. S., Rosestolato C. T. & De Souza W. (1999) Distribution of cytoskeletal structure and organelles of the host cells during evolution of the intracellular parasitism of *Trypanosoma cruzi*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 3, 325.

Carvalho T. M. & de Souza W. (1986) Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 28, 205.

Carvalho T. M. & de Souza W. (1989) Early events related with behaviour of *Trypanosoma cruzi* with an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. Cell Structure and Function 14, 383.

Castro C., Craig S. P. & Castañeda M. (1981) Genome organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 4, 273.

Cavallesco R. & Pereira M. E. (1988) Antibody to *Trypanosoma cruzi* neuraminidase enhances infection *in vitro* and identifies a subpopulation of trypomastigotes. J. Immunol. 140, 617.

Cazzulo J. J., Cazzulo M. C., Martinez J. & Franke de Cazzulo, B. M. (1990) Some kinetic properties of a cystein proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Biophys. Acta 1037, 186.

Cazzulo J. J. & Frasch A. C. C. (1992) SAPA/transialidase and cruzipain: two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzimatically inactive domains. FASEB J. 6, 3259.

Cazzulo J. J. (1994) Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. J. Bioenerg. And Biomembranes, 26, 2, 157.

Cerisola J. (1977) Chemotherapy of Chagas' infection in man. PAHO Sc. Publications 347, 35.

Cerisola J., Álvarez M. & De Rissio A. (1979) Immunodiagnóstico da doença de Chagas. Evolución serológica de pacientes con doença de Chagas. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 12, 403.

Ciavaglia M., Carvalho T. U. & De Souza W. (1993) Interaction of *Trypanosoma cruzi* with cells with altered glycosylation patters. Biochem. Biophys Res. Commun. 193, 718.

Colli W. (1993) Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. FASEB J. 7, 1257.

Corral R. S., Orn A., Freilij H. L., Bergman T. & Grinstein S. (1989) Purification and characterization of an 80-kilodalton *Trypanosoma cruzi* urinary antigen. J. Clin. Microbiol. 27, 1, 145.

Couto A. S., Katzin A. M., Colli W. & de Lederkremer R. M.. (1987) Sialic acid in a complex oligosaccharide chain of the Tc-85 surface glycoprotein of the trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 26, 145.

Couto A. S., Goncalez M. F., Colli W. & de Lederkremer R. M. (1990) The N-linked carbohydrate chain of the 85-kilodalton glycoprotein from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes contains sialyl, fucosyl and galactosyl (α1-3) galactose units. Mol. Biochem. Parasitol. 39, 100.

Couto A. S., de Lederkremer R. M., Colli W. & Alves MJM. (1993) The glycosylphosphatidylinositol anchor of the trypomastigote-specific Tc-85 glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. Metabolic labeling and structural studies. Eur. J. Biochem. 217, 597.

Crane M. S. & Dvorak J. A. (1982) Influence of monosaccharides on the infection of vertebrate cells by *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 5, 333.

Cross G. A. M. & Takle G. B. (1993) The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. Annu. Rev. Microbiol. 46, 385.

Curto de Casas S. I. (1985) Problemática geográfica de la endemia chagásica y técnicas para su estudio. En Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas. Tomo I. Epidemiología-Vectores. OPS y Servicio Nacional de Chagas (Ministerio de Salud y Acción Social República Argentina), Buenos Aires, p. 31.

Chagas C. (1909) Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1, 159.

Chiari E. & Brener Z. (1966) Contribution to the parasitological diagnosis of human Chagas' disease in its chronic phase. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 8: 134.

de Arruda M. V., Colli W. & Zingales B. (1989) Terminal beta-D-galactofuranosyl epitopes recognized by antibodies that inhibit *Trypanosoma cruzi* internalization into mammalian cells. Eur. J. Biochem. 182, 413.

de Diego J. et al. (1997) Alteration of macrophage function by a *Trypanosoma cruzi* membrane mucin. J. Immunol. 159, 4983.

de Titto E., Segura E. & Braun M. (1983) Cellular immunity in Chagas' disease patients. Lymphoproliferative response to subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. Immunol. Lett. 6, 161.

de Titto E. H. & Araujo F. J. (1987) Mechanisms of cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: importance of sialidase activity. Acta Trop. 44, 273.

De Morais C., Higuchi M. & Lage S. (1989) Chagas' heart disease and myocardial infarct. Incidence and report of four necropsy cases. Ann. Trop. Med. Parasitol. 83, 207.

De Souza W. (1984) Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Int. Rev. of Cytology 86, 197.

Dorta M. L., Ferreira A. T., Oshiro M. E. M. & Yoshida N. (1995) Ca^{2+} signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. Mol. Biochem. Parasitol. 73, 285.

Doyle P., de la Canal L., Engel J. C. & Parodi A. (1986) Characterization of the mechanism of protein glycosylation and the structure of glycoconjugates in tissue cultured trypomastigotes and intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 21, 93.

Dvorak J. (1975) New *in vitro* approach to quantitation of *Trypanosoma cruzi* vertebrates cell interactions. New Approaches Am. Trypanosom. Res. Sci. Pub. 318, 109.

Eakin A. E., Mills A. A., Harth G., Mc Kerrow J. H. & Craik C. S. (1992) The sequence, organization and expression of the major cystein proteinase (cruzipain) of *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem. 267, 7411.

Eisenstein B. (1990) The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. New Engl. J. Med. 322, 178.

Engel J. C. & Parodi A. J. (1985) *Trypanosoma cruzi* cells undergo an alteration in protein N-glycosylation upon differentiation. J. Biol. Chem. 260, 10105.

Engman D., Krause K. -H., Blumin J. H., Kim K. S., Kirchhoff V. L. & Doneldson J. E. (1989) A novel flagelar Ca-binding protein in Trypanosomes. J. Biol. Chem. 264, 18627.

Falkow F., Isberg R. R. & Portnoy D. A. (1992) The interaction of bacteria with mammalian cells. Annu. Rev. Cell Biol. 8, 333.

Favoreto S. Jr., Dorta M. L. & Yoshida N. (1998) *Trypanosoma cruzi* 175-kDa protein tyrosine phosphorilation is associated with host cell invasion. Exp. Parasitol. 89, 188.

Fernandez M. A., Muñoz-Fernandez M. A. & Fresno M. (1993) Involvement of β_1-integrins in the binding and entry of *Trypanosoma cruzi* into human macrophages. Eur. J. Immunol. 23, 552.

Franco F. R. S., Paranhos-Bacalla G. S., Yamamuchi L. M., Yoshida N. & da Silveira J. F. (1993) Characterization of a cDNA clone encoding the carboxy-terminal domain of a 90 kilodalton surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. Infect. Immun. 61, 4196.

Franchin G., et al (1997) Passive transfer of a monoclonal antibody specific for sialic acid- dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice. Infect. Immun. 65, 2548.

Franke de Cazzulo B. M., Martinez J., North M. J., Coombs G. H. & Cazzulo J. J. (1994) Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol. Lett. 124, 1, 81.

Freilij H., Müller L. & Gonzalez Cappa S. M. (1983) Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. J. Clin. Microbiol. 18, 327.

Freilij H. L., Corral R. S., Katzin A. M. & Grinstein S. (1987) Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas' disease. J. Clin. Microbiol. 25, 1, 133.

Freilij H., Storino R. (1994) "Diagnóstico de Laboratorio" en "Enfermedad de Chagas" R. Storino, J. Milei. Cap. 21: 343.

Frevert U., Schenkman S. & Nussenzweig V. (1992) Stage-specific expresion and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 60, 2349.

Gallerano R., Marr J. & Sosa R. (1990) Therapeutic efficacy of allopurinol in patiens with chronical Chagas' disease. Am. Trop. Med. Hyg. 43, 159.

Giordano R., Alves M. J. M., Colli W., Tewari D., Fouts D. L. & Manning J. E. (1994-a) The epitope recognized by neutralizing antibody H1A10 is encoded by a member of the *Trypanosoma cruzi* TSA/trans-sialidase superfamily gene. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 89, 97.

Giordano R., Chammas R., Veiga S. S., Colli W. & Alves M. J. M. (1994-b) An acidic component of the heterogenous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. Mol. Biochem. Parasitol. 65, 85.

Godsel L., Olson C., Lacava Z. & Engman D. (1995-a) Comparison of the 24 kDa flagelar calcium-binding protein cDNA of two strains of *Trypanosoma cruzi*. J. Euk. Microbiol. 42, 3, 320.

Godsel L., Tibbetts R., Olson C., Chaudoir B. & Engman D. (1995-b) Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. J. Clin. Microb. 33, 8, 2082.

Godsel L. & Engman D. (1999) Flagellar protein localization mediated by a calcium-myristoyl/palmitoyl switch mechanism. EMBO J. 18, 8, 2057.

Gonzalez A., Lerner T. J., Huecas M., Sosa-Pineda B., Nogueira N. & Lizardi P. M. (1985) Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene family in *Trypanosoma cruzi*. Nucleic Acids Research 13, 16, 5789.

Gonzalez-Cappa S. M., Kloetzel J., Katzin A. M. & Riberio dos Santos R. (1980) *Trypanosoma cruzi*: activity of immune sera on surface antigens. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 22, 6, 275.

Gonzalez Cappa S. M., Katzin A. M., Añasco N. & Lajmanovich S. (1981) Comparative studies on infectivity and surface carbohydratesof several strains of *Trypanosoma cruzi*. Medicina (Buenos Aires) 41, 549.

Gonzalez Cappa S. M. & Isola E. L. D. (1994) "El parásito" en "Enfermedad de Chagas". Editores: Storino R. & Milei J. Doyma Argentina, Buenos Aires, p. 31.

Gonzales-Perdomo M., Lisboa de Castro S., Meirelles M. & Goldenberg S. (1990) *Trypanosoma cruzi* differentiation are blocked by topoisomerasa II inhibitors. Antimicrob. Agents Chemother. 34, 1707.

Gottlieb M. (1977) A carbohydrate-containing antigen from *Trypanosoma cruzi* and its detection in the circulation of infected mice. J. Immunol. 119, 2, 465.

Gottlieb M. (1978) *Trypanosoma cruzi*: identification of a cell surface polysaccharide. Exp. Parasitol. 45, 2, 200.

Grant I., Gold J., Wittner M., Tanowitz H., Nathan C., Mayer K., Reich L., Wollner N., Steinherz L., Ghavimi F., O'Reilly R. & Armsotrong D. (1989) Transfusion-associated acute Chagas' disease acquired in the United States. Ann. Intern. Med. 111, 849.

Greig S., Ashall F. & Hudson L. (1990) Use of total parasite DNA probes for the direct detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in domicilliary *Rhodnius proxilus*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 84, 59.

Guhl F., Hudson L., Marinkelle C., Jaramillo C. & Bridge D. (1987) Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. Parasitology 94, 475.

Hadley L. H., Klotz F. W. & Miller L. H. (1987) Invasion of erythrocytes by malaria parasites: a cellular and molecular overview. Annu. Rev. Microbiol. 40, 415.

Hall B. F., Webster P., Ma A. K., Joiner K. A. & Andrews N. W. (1992) Desialylation of lysosomal membranes glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. J. Exp. Med. 176, 313.

Harel-Bellan A., Joskowicz M., Fradelisi D. & Eisen H. (1983) Modification of T-cell proliferation and IL-2 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Proc. Natl. Acad. Science U.S.A. 80, 3466.

Hayes R., & Schofield C. (1990) Estimación de las tasas de incidencia de infecciones y parasitosis crónicas a partir de la prevalencia: la enfermedad de Chagas en América Latina. Bol. Of. Sanit. Panam. 108, 308.

Heath J. P. & Holifield B. F. (1991) Cell locomotion. Actine allone in lamellipodia. Nature 352, 107.

Henriquez D., Piras R. & Piras M. M. (1981) The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 2, 359.

Herrera E. M., Ming M., Ortega-Barria E. & Pereira M. E. (1994) Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulfate on host cells and penetrin counter-receptors on the trypanosomes. Mol. Biochem. Parasitol. 65, 73.

Heuser J. E. (1989) Changes in lysosome shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH. J. Cell. Biol. 108, 855.

Hoff R., Teixeira R., Carvalho J. & Mott K. (1978) *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during during the acute stage of Chagas' disease. N. Engl. J. Med. 298, 604.

Hynes R. O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 69, 11.

Iida K. & Ley V. (1991) Isolation and characterization of a 92-kD surface molecule of *Trypanosoma cruzi* amastigotes recognized by a monoclonal antibody that induces complement-mediated killing. Am. J. Trop. Med. Hyg. 45, 619.

Isola E. L. D. & Gonzalez Cappa S. M.(1994) "Vectores transmisores: triatominos "vinchucas." en "Enfermedad de Chagas." Editores: Storino R. & Milei J. Doyma Argentina, Buenos Aires, p. 41.

Kagan I. (1976) The value of detecting IgM in the immunofluorescence test for the diagnosis of parasitic infections. J. Rhod. Med. Tech. 5, 12.

Kagan I. (1980) Serodiagnosis of parasitic diseases. En Manual of Clinical Immunology, 2nd. ed., N. Rose, H. Friedman (eds). Amer. Soc. Microbiol., Washington p. 573.

Kahn S., Van V. W. & Eisen H. (1990) The major 85-kD surface antigen of the mammalian form of the *Trypanosoma cruzi* is encoded by a large heterogenous family of simultaneously expressed genes. J. Exp. Med. 172, 589.

Kahn S., Wleklinski M., Aruffo A., Farr A., Coder D. & Kahn M. (1995) *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. J. Exp. Med. 182: 1243.

Kaslow D. (1983) A rapid biochemical method for purifying λ DNA from phages lysates. Nucl. Acids Res. 14, 6767.

Katzin A. M. & Colli W. (1983) Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi*. An N-acetyl-D-glucosamine-containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. Biochim. Biophys. Acta 727, 403.

Katzin A., Alves M. J. M., Abuin G. & Colli W. (1989) Antigenuria in chronic chagasic patients detected by a monoclonal antibody raised against *Trypanosoma cruzi*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 83, 3, 341.

Kelm S. & Schauer R. (1997) Sialic acids in molecular and cellular interactions. Int. Rev. Cytol. 175, 137.

Kierszenbaum F. & Pienkowski M. M. (1979) Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. Infect. Immun. 24, 117.

Kipnis T. L., Calich V. L. G. & Dias da Silva W. (1979) Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. Parasitology 78, 89.

Kipnis T. L., David J. R., Alper C. A. Sher A. & Dias da Silva W. (1981) Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of the alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 602.

Kirchhoff L. (1989) Is *Trypanosoma cruzi* a new threat to our blood supply? Ann. Intern. Med. 111, 773.

Kooy F. R., Ashall F., Van der Ploeg M. & Overdulve P. (1989) On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 36, 73.

Krautz G. M., Peterson J. D., Godsel L., Krettli A. & Engman D. (1998)Human antibody response to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. Am. J. Trop. Med. Hyg.58, 2, 137.

Krettli A. U. & Brener Z. (1976) Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol. 116, 755.

Krettli A. U., Weisz Carrington P. & Nussenzweig V. (1979) Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. Clin. Exp. Immunol. 37, 416.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680.

Lelchuk R., Patrucco A. & Manni J. (1974) Studies of cellular immunity in Chagas' disease: effect of glutaraldehyde treated specific antigen on inhibition of leukocyte migration. J. Immunology 112, 1578.

Ley V., Andrews N. W., Robbins E. S. & Nussenzweig V. (1988) Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. J. Exp. Med. 168, 649.

Ley V., Robbins E. S., Nussenzweig V. & Andrews N. W. (1990) The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. J. Exp. Med. 171, 401.

Libby P., Alroy J. & Pereira M. E. (1986) A neuraminidase from *Trypanosoma cruzi* removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. J. Clin. Invest. 77, 127.

Lima M. F. & Kierszenbaum F. (1982) Biochemical requirements for intracellular invasion of *Trypanosoma cruzi*: protein synthesis. J. Protozool. 9, 566.

Luján H. & Bronia D. (1994) Intermembrane lipid transfer during *Trypanosoma cruzi*-induced erythrocyte membrane destabilization. Parasitology 323.

Macedo A. M. & Pena S. D. J. (1998) Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. Parasitology Today 14, 3, 119.

Maekelt G. A. (1983) La epidemiología de la enfermedad de Chagas en relación con el ecosistema domiciliario. Interciencia. 8, 6, 353.

Maldonado R., Linss J., Thomaz N., Olson C., Engman D. & Goldenberg S. (1997) Homologues of the 24-kDa flagelar Ca^{2+}-binding protein gene of *Trypanosoma cruzi* are present in other members of the Trypanosomatidae family. Exp. Parasitol. 86, 200.

Maldonado R. A., Mirzoeva S., Godsel L., Lukas T. J, Goldenberg S., Watterson D. M., & Engman D. (1999) Identification of calcium binding sites in the trypanosome flagelar calcium acyl swith protein. Mol. Biochem. Parasitol. 101, 61.

Marcipar A., Barnes S., Lentwojt E. & Broun G. (1982) Immunoenzymatic determination of antibody bound *Trypanosoma cruzi* soluble antigens. App. Biochem. Biotechnol. 7, 459.

Margni R. (1989) Inmunología e Inmunoquímica. (4ta. Edición). Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.

Marr J. & Docampo R. (1986) Chemotherapy for Chagas' disease: a perspective for current therapy and consideration for future research. Rev. Infect. Dis. 8, 884.

Martin U. O., Afchain D., Loyens M., Maidana C. & Capron A. (1989) *Trypanosoma cruzi*: circulating polysaccharide factors excreted in vitro and in vivo. Medicina (Bs. As.) 49, 1, 33.

McCabe R. E., Remington J. S. & Araujo F. G. (1984) Mechanisms of invasion and replication of the intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 46, 372.

McCabe R. E., Meagher S. G. & Mullins B. T. (1991) Endogenous interferon-gamma, macrophages activation, and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi*. J. Infect. Dis. 163, 912.

Meirelles M. N. L., Araujo J. T. C. & de Souza W. (1982) Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages *in vitro*: dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. Z. Parasitenkd. 68, 7.

Meirelles M. N. L. & de Souza W. (1983) Interactions of lysosomas with endocytic vacuoles in macrophages simultaneously infected with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. J. Submicroscop. Cytol. Pathol. 17, 327.

Meirelles M. N. L., Araujo J. T. C., Miranda C. F., de Souza W. & Barbosa H. S. (1986) Eur. J. Cell. Biol. 41, 198.

Meirelles M. N. L., Juliano L., Carmona E., Silva S. G., Costa E. M. Murta A. C. & Scharfstein J. (1992) Inhibitor of the major cysteinyl proteinase (GP 57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. Mol. Biochem. Parasitol. 52, 175.

Mendes R., Hoshino-Shimizu S., Moura Da Silva A., Mota I., Heredia R., Luquetti A. & Leser P. (1997) Serological diagnosis of Chagas' disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. J. Clin. Microb., 35, 7, 1829.

Milder R. & Kloetzer J. (1980) The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages *in vitro*. Interaction with host cell lysosomes and host cell fate. Parasitology 80, 139.

Milei J. (1994) "Patología" en "Enfermedad de Chagas" Editores: Storino R. & Milei J. Doyma Argentina, Buenos Aires, p. 141.

Miles M. A., Toye R., Oswald S. & Godfrey S. (1977) The identification by isoenzymes patterns of two distinct straingroup of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brasil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 71, 217.

Ming M., Chuenkova M., Ortega-Barria E. & 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.

Ming M., Ewen M. E. & Pereira M. E. (1995) *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signalling pathway. Cell 82, 2, 287.

Minoprio P., Cury M., Cheikh E., Ross D., Coutinho A., Eisen H. & Hontebeirie-Joscowicz M. (1991) Chagas' disease consequence of unbalance immune system. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 86, (supl. 1), 39.

Moncrief N. D., Kretsinger R. H. & Goodman M. (1990) Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I Relationship based on aminoacid sequences. J. Mol. Evolution 30, 522.

Montgomery R., Webster P. & Mellman I. (1991) Accumulation of indigestible substances reduces fusion competence of macrophages lysosomes. J. Immunol. 147, 3087.

Morel C., Chiari E., Camargo E. P., Mattei D. M., Romanha A. J. & Simpson L. (1980) Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterised by pattern of restrictions endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc. Nat. Acad. Sci. - U.S.A. 77, 6810.

Moreno S., Silva J., Vercesi A. E. & Docampo R. (1994) Cytosolic free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. J. Exp. Med. 180, 1535.

Moro A., Ruiz-Cabello F., Fernandez-Cano A., Stock R. P. & Gonzalez A. (1995) Secretion by *Trypanosoma cruzi* of s peptidyl-prolyl cis-trans isomerase involved in cell infection. EMBO J. 14, 11, 2483.

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

Nabors G. S. & Tarleton R. (1991) Differential control of IFN-gamma and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol. 146, 3591.

Nashimura H., Sugawara K., Kitame I. & Nakamura K. (1988) Attachment of Influenza C virus to human erythrocytes. J. Gen. Virol. 69, 2545.

Nickerson P., Orr P., Schroeder M., Sekla L. & Johnston J. (1989) Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. Ann. Intern. Med. 111, 851.

Nogueira N. & Cohn Z. (1976) *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. J. Exp. Med. 142, 1402.

Ofek I. & Sharon N. (1990) Adhesins as lectins: specificity and role in infection. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 151, 91.

Ogueta S. B., Solari A. & Tellez de Iñon M. T. (1994) *Trypanosoma cruzi* epimastigote form posses a Ca^{2+} calmodulin dependent protein kinase. FEBS Letters 337, 293.

Okumara M., Correa-Neto A. & Silva A. (1962) Contribuçao para o estudo da patogenia das lesoes vasculares na doenca de Chagas experimental em camundongos branco. Rev. Paul. Med. 61, 265.

Oliveira J., Correa De Araujo R., Navarro M. & Mucillo G. (1983) Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas heart disease. Am. J. Cardiol. 52, 147.

Ortega-Barria E. & Pereira M. E. A. (1991) A new *Trypanosoma cruzi* heparin-binding protein promoted fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomas into mammalian cells. Cell 67, 411.

Ortega-Barria E. & Pereira M. E. A. (1992) Entry of *Trypanosoma cruzi* into eucariotic cells. Infect. Agents Dis. 1, 136.

Osuna A., Ortega G., Gamarro F., Catanys S. & Ruiz-Perez L. (1986) Effects of interferon on the infectivity of *Trypanosoma cruzi* in cultured HeLa cells. Int. J. Parasitol. 15, 167.

Ouasi A., Afchain D., Capron A. & Grimaud J. A. (1984) Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological functions. Nature 308, 380.

Ouassi M. A., Cornette J., Gohain D., Capron A., Grasmasse H. & Tartar A. (1986-a) *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from fibronectin cell attachment domain. Science 234, 603.

Ouassi A., Cornette J. & Capron A. (1986-b) Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. Mol. Biochem. Parasitol. 19, 201.

Ouassi A., Taibi A., Cornette J., Velge P., Marty B., Loyens M., Esteva M., Rizvi F. S. & Capron A. (1990) Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. Parasitology 100, 115.

Ouassi A., Aguirre T., Plumas-Marty B., Piras M., Schonek R., Gras-Masse H., Taibi A., Loyens M., Tartar A., Capron A. & Piras R. (1992) Cloning and sequencing of a 24-kDa *Trypanosoma cruzi* specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. Biology of the Cell 75, 11.

Paindevoine P., Rolin S., Van Assel S., Geuskens M., Jauniaux J. C., Dinsart C., Huet G. & Pays E. (1992) A gene from the variant surface glycoprotein expression sites encodes one of several transmembrane adenylate cyclases located on the flagellum of *Trypanosoma brucei*. Mol. Cell. Biology 12, 1218.

Pan A. A. & McMahon-Pratt D. D. (1989) Amastigote and epimastigote stage-specific components of *Trypanosoma cruzi* characterized by using monoclonal antibodies. J. Immunol. 143, 1001.

Parodi A. J. & Quesada-Allue L. A. (1982) Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi*. I. Characterization of dolichol-bound monosaccharides and oligosaccharides synthesized *in vivo*. J. Biol. Chem. 257, 7641.

Parodi A. J., Lederkremer G. Z. & Mendelzon D. H. (1983) Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi*. The mechanism of glycosylation and structure of protein-bound oligosaccharide. J. Biol. Chem. 258, 5589.

Parodi A. J. (1993-a) N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. Glycobiology 3, 3, 193.

Parodi A J. (1993) Protein N-glycosylation in trypanosomatids. A pathway with odd enzymes at both ends. Biol. Res. 26, 69.

Pereira C. M., Favoreto S. Jr., da Silveira J. F., Yoshida N. & Castilho B. A. (1999) Adhesion of *Escherichia coli* to HeLa cells mediated by *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein-derivated peptides inserted in the outer membrane protein lamB. Infect. Immun. 67, 9, 4908.

Pereira M. E. , Loures M. A., Villalta F. & Andrade A. F. B. (1980) Lectin receptors as markers of *Trypanosoma cruzi*. J. Exp. Med. 152, 1375.

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

Pereira M. E., Mejia J. S., Ortega-Barria E., Matzilevitch & Prioli R. (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.

Peterson D. S., Wrightsman R. A. & Manning J. E. (1986) Cloning of a major antigen surface gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat. Nature 322, 566.

Pinto Dias J. C. (1979) "Mecanismos de transmissao." en "*Trypanosoma cruzi* e Doenca de Chagas." Editores: Z. Brener e Z. Andrade. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 152.

Piras M. M., Piras R. & Henriquez D. (1982) Changes in morphology and infectivity of cell culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 6, 67.

Piras M. M., Henriquez D. & Piras R. (1985) The effect of proteolytic enzymes and proteases inhibitors on the interaction of *Trypanosoma cruzi* with fibroblasts. Mol. Biochem. Parasitol. 14, 151.

Piras M. M., Henriquez D. & Piras R. (1987) The effect of fetuin and other sialoglycoproteins on the *in vitro* penetration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes into fibroblastic cells. Mol. Biochem. Parasitol. 22, 135.

Piras R., Henriquez D. & Piras M. M. (1980) "Studies on host-parasite interactions: role of fibroblastic cell surface functions and *Trypanosoma cruzi* forms in the infective process". En "Host-invader interplay". Editor: H. van den Bosche, Elsevier/North Holland Biomedical, Amsterdam, 131.

Pizzi T. P., Rubio M. D., Prager R. & Silva R. C. (1952) Acción de la cortisona en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. Bol. Chil. Parasitol. 7, 22.

Plata F., Garcia Pons F. & Wietzerbin J. (1987) Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma *in vivo*. Ann. Inst. Pasteur/Immunol. 138, 397.

Plata F., Wietzerbin J., Garcia Pons F., Falcoff E. & Eisen H. (1984) Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi in vitro*. Eur. J. Immunol. 14, 930.

Pollevick G. D., Affranchino J. R., Frasch A. C. C., & Sanchez D. O. (1991) The complete sequence of SAPA, a shed acute-phase antigen of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 47, 247.

Porcel B., Bontempi E., Henriksson J., Rydaker M., Aslund L., Segura E. L., Pettersson U, & Ruiz A. M. (1996) *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of genes encoding putatives Calcium-binding proteins, highly conserved in trypanosomatids. Exp. Parasitol. 48, 387.

Previato J. O., Andrade A. F., Pessolani M. C. & Mendonça-Previato L. (1985) Incorporation of sialic acido into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. Mol. Biochem. Parasitol. 16, 85.

Previato J. O., Andrade A. F., Vermelho A., Firmino J. C., & Mendonça-Previato L. (1990) Evidence for N-glycolylneuraminic acid incorporation by *Trypanosoma cruzi* from infected animals. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 85, 38.

Prioli R., Mejía J. S. & Pereira M. E. (1990) Monoclonal antibodies against *Trypanosoma cruzi* neuraminidase reveals enzyme polymorphism, recognize a subset of trypomastigotes, and enhances infection *in vitro*. J. Immunol. 144, 4384.

Procopio D. O., Da Silva S., Cunningham C. C. & Mortara R. A. (1998) *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. Exp. Parasitol. 1, 1.

Putney J. W. Jr. (1993) Excitement about calcium signaling in inexcitable cells. Science, 262, 676.

Quesada-Allue L. A. & Parodi A. (1983) Novel Mannose carrier in the trypanosomatid *Chritidia fasciculata* behaving as a short α-saturating polyprenyl phosphate. Biochem. J. 212, 123.

Ramirez M. I., Ruiz R., Araya J. E., da Silveira J. F. & Yoshida N. (1993) Involvement of the stage-specific 82 kDa adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote in host cell invasion. Infect. Immun. 61, 3636.

Reed S. G. (1988) *In vivo* administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune supresion and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol. 140, 4342.

Reyes M. B., Pollevick G. D. & Frasch A. C. C. (1994) An unusually small gene encodes a putative mucine-like glycoprotein in *Trypanosoma cruzi*. Gene, 40, 139.

Rezende J. & Luquetti A. (1994) Megaformaciones chagásicas. En Enfermedad de Chagas, Editores: Storino, R.; Milei, J., Ed. Doyma Argentina, Bs. As., Cap. 20 p. 160.

Roberts D. D., Olson L. D., Barile M. F., Ginsburg V. & Krivan H. C. (1989)Sialic acid dependent adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to purified glycoproteins. J. Biol. Chem. 264, 9289.

Rodriguez A., Rioult M. G., Ora A. & Andrews N. W. (1995) A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca^{2+} mobilization and microfilament rearrangement in host cells. J. Cell. Biol. 129, 5, 1263.

Rodriguez A., Samoff E., Rioult M. G, Chung A. & Andrews N. W. (1996) Host cell invasion by trypanosomas requires lysosomes and microtubule/kinesine-mediated transport. J. Cell. Biol. 134, 2, 349.

Rodriguez A., Webster P., Ortego J. & Andrews N. W. (1997) Lysosomes behave as Ca^{2+} regulated exocytic vesicles in fibroblast and epithelial cells. J. Cell. Biol. 137, 1, 93.

Rodriguez A., Martinez I., Chung A., Berlot C. H. & Andrews N. W. (1999) cAMP regulates Ca^{2+} dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. J. Biol. Chem. 274, 24, 16754.

Rosenberg I., Prioli R. P., Ortega-Barria E. & Pereira M. E. (1991) Stage-specific phospholipase C-mediated release of *Trypanosoma cruzi* neuraminidase. Mol. Biochem. Parasitol. 46, 303.

Ross A. & Novoa-Montero D. (1993) Comparability and reliability of ELISA, Immunofluorescence, and Indirect Hemagglutination assays for *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. J. Infect. Dis. 168, 1581.

Rottenberg M., Cardoni R., Andersson R., Segura E. & Örn A. (1988-a) Resistance to *Trypanosoma cruzi* requires T helper/inducer cells as well as natural killer cells. Scand. J. Immunol. 28, 573.

Rottenberg M., Cardoni R., Andersson R. & Segura E. L. (1988-b)Role of T-helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. Scand. J. Immunol. 28, 573.

Rottenberg M., Lindqvist C., Koman A., Segura E. & Örn A. (1989. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection modulates both interleukin 2 recpetor expression and interleukin 2 production. Scand. J. Immunol. 30, 65.

Ruben L. & Naghighat N. (1990) "Calcium-dependent regulatory pathways in *Trypanosoma brucei*: characterization of 20000-dalton calcium-binding protein, calcimedins and calmodulins". En "Calcium as an intracellular messanger in eucaryotic microbes". Editor: E. H. O'Day. Am. Soc. For Microbiol. Press, Washington D. C. p. 317.

Ruiz R., Rigoni V. L., Gonzalez J. & Yoshida N. (1993) The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. Parasitol. Immunol. 15, 121.

Ruiz R. C., Favoreto S. Jr., Dorta M. L., Oshiro M. E., Ferreira A. T., Manque P. M. & Yoshida N. (1998) Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expresion of surface glycoproteins with differential Ca^{2+} signalling activity. Biochem. J. 330, 505.

Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. & Erlich H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 4839, 487.

Sambrook J., Fristsch E. F. & Maniattis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Santana J. M., Grellier P., Rodier M. -H., Schrevel J. & Teixeira A. (1992) Purification and characterization of a new 120 kDa alkaline proteinase of *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 187, 1466.

Santori F. R., Paranhos-Bacalla G. S., da Silveira J. F., Yamauchi L. M., Araya J. E. & Yoshida N. (1996) A recombinant protein based on the *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote 82-kilodalton antigen that induces an effective immune response to acute infection. Infect. Immun. 64, 4, 1093.

Scott M. & Snary D. (1982) American trypanosomiasis (Chagas' disease). Immunology of parasitic infections. Blackwell Sc. Pub. 261.

Schauer R., Reuter G., Muhlpfordt H., Andrade A. F. B. & Pereira M. E. (1983) The ocurrence of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1053.

Schauer R. (1985) Sialic acid and their role as biological masks. Trends Biochem. Sci. 10, 357.

Scheibel L. W. (1992) Role of calcium/calmodulin-mediated processes in protozoa. Int. Rev. Cytology 134, 165.

Schenkman R. P. S., Vandekerckhove F. & Schenkman S. (1993) Mammalian cell sialic acid enhances *Trypanosoma cruzi* invasion. Infect. Immun. 61, 898.

Schenkman S., Andrews N. W., Nussenzweig V & Robbins E. S. (1988-a) *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. Cell 55, 157.

Schenkman S., Yoshida N. & Cardoso de Almeida M. L. (1988-b) Glycophosphatidylinositol anchored proteins in metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 29, 141.

Schenkman S., Robbins E. S. & Nussenzweig V. (1991-a) Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. Infect. Immun. 59, 645.

Schenkman S., Jiang M. S., Hart G. W. & Nussenzweig V. (1991-b) A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. Cell 65, 1117.

Schenkman S., Diaz C. & Nussenzweig V. (1991-c) Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. Exp. Parasitol. 72, 76.

Schenkman S., Ferguson M. A. J., Heise N., Cardoso de Almeida M. L., Mortara R. A. & Yoshida N. (1993) Mucine like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalysed by trans-sialydase in metaciclic forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 59, 293.

Schenkman S. & Eichinger D. (1993) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. Parasitol. Today 9, 218.

Schenkman S., Eichinger D., Pereira M. E. A. & Nussenzweig V. (1994) Structural and functional properties of *Trypanosoma cruzi* transialidase. Annu. Rev. Microbiol. 48, 499.

Schmunis G. A., Gonzalez Cappa S. M., Traversa O. C. & Yanovsky J. F. (1971) The effect of immunodepresion due to neonatal thymectomy on infection with *Trypanosoma cruzi* in mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 65, 89.

Schmunis G. A. (1992) *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood suplly in endemic and nonendemic countries. Transfusion 31, 547.

Seebeck T., Hemphill A. & Lawson D. (1990) The cytoskeleton of trypanosomes. Parasitology Today 6, 49.

Segura E. L., Bua J. E., Rosenstein de Campanini A., Subias E., Esteva M., Moreno M. & Ruiz A. M. (1986) Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*: complement-mediated lytic activity against trypomastigotes and passive immunoprotection in mice. Immunol. Lett.13, 4, 165.

Shikanai-Yasuda M., Lopes M., Tolezano J., Umezawa A., Amato Neto V., Pereira Barreto A., Higaki Y., Moreira A., Funayama G., Barone A., Duarte A., Odone V., Cerri G., Sato M., Possi D. & Shiroma M. (1990) Doença de Chagas aguda: vias de transmissao, aspectos clinicos e resposta à terapéutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 32, 16.

Sica R. (1994) "Compromiso del sistema nervioso". En "Enfermedad de Chagas", Editores: Storino, R.; Milei, J., Ed. Doyma Argentina, Bs. As., Cap. 18: p. 303.

Silber A., Búa J., Porcel B., Segura E. & Ruiz A. M. (1997) *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set o primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. Exp. Paras. 85, 225.

Silva J. S., Twardzik D. R. & Reed S. G. (1991) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). J. Exp. Med. 174, 539.

Silva J. S., Morrisey P. J., Grabstein K. H., Mohler K. M., Anderson D. & Reed S. G. (1992) Interleukine 10 and intrerferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J. Exp. Med. 175, 169.

Silva L. H. P. & Nussenzweig V. (1953) Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin. Biol. 20, 191.

Simpson L. & Show J. (1989) RNA editing and the mitocondrial cryptogenes of kinetoplastid protozoa. Cell 57: 355.

Soeiro M. de N., Paiva M. M., Barbosa H. S., Meirelles M. N. & Araulo-Jorge T. C. (1999) A cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down modulated after infection. Cell Struct. Funct. 24, 139.

Sosa Estani S., Segura E. L., Ruiz A. M., Velazquez E., Porcel B. & Yampotis C. (1998) Eficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59, 4, 526.

Souto-Padrón T. & De Souza W. (1985) Glycolipids contribute to the negative surface charge of the epimastigote and the trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Biochim. Biophys Acta 814, 163.

Souto-Padrón T., Campetella O., Cazzulo J. J. & De Souza W. (1990) Cystein proteinase in *Trypanosoma cruzi*: Immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. J. Cell. Sci. 96, 485.

Storino R. (1994) "Chagas indeterminado" en "Enfermedad de Chagas". Editores: Storino R. & Milei J. Doyma Argentina, Buenos Aires, p. 235.

Storino R. & Jorg M. (1994) "Vías de infección y aspectos clínicos" en "Enfermedad de Chagas". Editores: Storino R. & Milei J. Doyma Argentina, Buenos Aires, p. 185.

Storino R & Barragan H. (1994) "Epidemiología." en "Enfermedad de Chagas." Editores: Storino R. & Milei J. Doyma Argentina, Buenos Aires, p. 41.

Tanowitz H., Kirchhoff L., Simon D., Morris S., Weiss L. & Wittner M. (1992) Chagas' Disease. Clinical Microb. Reviews Oct., 400.

Tardieux I., Webster P., Ravesloot J. Boron W., Lunn J. A., Heuser J. & Andrews N. W. (1992) Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. Cell 71, 1117.

Tardieux I., Nathanson M. H., Andrews N. W. (1994) Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca^{2+}-transients. J. Exp. Med. 179, 1017.

Tarleton R. (1990) Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. 144, 717.

Tarleton R. (1994) The role of T cell subpopulations in experimental Chagas' disease. Res. Immunol. 142, 130.

Texeira A., Texeira G., Macedo V. & Prata A. (1978) Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. J. Cell. Biochem. 516, 134.

Teixeira S. M. R., Russell D. G., Kirchhoff L. V. & Donelson J. E. (1994) A differentially expressed gene family encoding "amastin", a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. J. Biol. Chem. 269, 20509.

Torrico F., Heremans H., Rivera M. T., Van Marck E., Billiau A. & Carlier Y. (1991) Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. J. Immunol. 146, 3626.

Trischman T. (1983) Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease. J. Immunol. 130, 1953.

Trombetta S., Bosch M. & Parodi A. J. (1989) Glucosylation of glycoprotein by mammalian, plant, fungal and trypanosomatid protozoa microsomal membranes. Biochemestry 28, 8108.

Trombetta S., Gañan S. & Parodi A. J. (1991) The UDP-Glc:glycoprotein transferase is a soluble protein of the endoplasmic reticulum. Glycobiology 1, 155.

Trombetta S. & Parodi A. J. (1992) Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-Glc:glycoprotein glucosyl transferase. J. Biol. Chem. 267, 9236.

Tschudi E., Anziano D. & Dalmasso A. (1972) Lymphocyte transformation in Chagas' disease. Inf. Immunity 6, 905.

Umezawa F., Bastos S. F., Camargo M. E., Yamauchi L. M., Santos M. R., Gonzalez A., Zingales B., Levin M. J., Sousa O., Rangel-Aldao M. J., & da Silveira J. F. (1999) Evaluation of recombinant antigensfor serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. J. Clin. Microbiol. 37, 5, 1554.

Velge P., Ouassi A., Cornette J., Afchain D. & Capron A. (1988) Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction. Parasitology 97, 2.

Vickerman K. 1976, "The diversity of kinetoplastid flagellates" en "Biology of the Kinetoplastida" Editores: W. H. R. Lumsden y D. H. Evans. Academic Press, New York Vol. 1, p. 1.

Villalta F. & Kierszenbaum F. (1983) Role of cell surface mannose residues in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. Biochim. Biophys. Acta 736, 39.

Villalta F. & Kierszenbaum F. (1984) Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: role of cell surface of galactose residues. Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 228.

Wendel S., Brener Z., Camargo M. & Rassi A. (1992) Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. p. 271, ISBT-Sociedade Brasileira de hematologia e Hemoterapia, Sao Paulo, Brasil.

WHO (1987) Chagas' Disease. Tropical disease research: a global partnership (8th programme report). WHO, Geneva: 89.

WHO Technical Report Series (1991) Control of Chagas' Disease. WHO, Geneva.

Wilkovsky S. E., Wainszelbaum M. J. & Isola E. L. D. (1996) *Trypanosoma cruzi*: participation of intracellular Ca^{2+} during metacyclic trypomastigote-macrophage interaction. Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 222, 386.

Wisnivesky-Colli C., Paulone I., Perez A., Chuit R., Gualtieri J., Solarz N., Smith A. & Segura E. L. (1987) A new tool for continuous detection of the presence of triatomine bugs, vectors of Chagas disease, in rural household. Medicina (Buenos Aires), 47, 45.

Wisnivesky-Colli C., Paulone I., Chuit R., Perez A., & Segura E. L. (1988) A new method for the detection of reinfested household during surveillance activities of control programms of Chagas' disease. Rev. Arg. Microbiol. 20, 96.

Wu Y., Deford J., Benjamin R., Lee M. G. S. & Ruben L. (1994) The gene family of EF-hand calcium-binding proteins from the flagellum of *Trypanosoma brucei*. Biochem. J. 304, 833.

Yakubu M., Majumder S. & Kierzembaum F. (1994) Changes in *Trypanosoma cruzi* infectivity by treatments that affects calcium ion levels. Mol. Biochem. Parasitol. 66, 119.

Yoshida N., Mortara R. N., Araguth M. F., Gonzalez J. C. & Russo M. (1989) Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 57, 1663.

Yoshida N., Blanco S. A., Araguth M. F., Russo M. & Gonzalez J. (1990) The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 39, 39.

Zhong L., Lu H. G., Moreno S. & Docampo R. (1998) Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by *Trypanosoma cruzi* is linked to cell invasion. FEMS Microbiol. Lett. 161, 1, 15.

Zimmerly S., Majeed M., Gustavsson M., Stendahl O., Sanan D. A. & Ernst J. D. (1996) Phagosome-lysosome fusion is a calcium-independent event in macrophages. J. Cell Biol. 132, 49.

Zingales B., Andrews N. W., Kuwajima V. Y. & Colli W. (1982) Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: Possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. Mol. Biochem. Parasitol. 6, 111.

Zingales B. & Colli W. (1985) "*Trypanosoma cruzi*: Interaction with Host Cells" en "The Biology of Trypanosomas". Current Topics in Microbiology and Immunology. Ed. Springer - Verlag Berlin, Heidelberg. Vol. 117 p. 128.

Zingales B., Katzin A. M., Arruda M. V. & Colli W. (1985) Correlation of tunicamycin-sensitive surface glycoprotein from *Trypanosoma cruzi* with parasite interiorization in mammalian cells. Mol. Biochem. Parasitol. 16, 21.

Zingales B., Carniol C., de Lederkremer M. R. & Colli W. (1987) Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. (1987) Mol. Biochem. Parasitol. 26, 135.

Zozulya S. & Stryer L. (1992) Calcium-myristoyl protein switch. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11569.